А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

1 – 767

Albert L. Lehninger

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

The Johns Hopkins University
School of Medicine

Worth Publishers, Inc.

А. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

В ТРЕХ ТОМАХ

1

Перевод с английского
канд. физ-мат. наук В. В. Борисова,
канд. биол. наук М. Д. Гроздовой
и
канд. мед. наук С. Н. Преображенского

под редакцией
акад. В. А. Энгельгардта
и
проф. Я. М. Варшавского

МОСКВА «МИР» 1985

УДК 577.1
Л44
ББК 28.072

Ленинджер А.

Л44 Основы биохимии: В 3-х т. Т. 1. Пер. с англ.– М.: Мир, 1985.–367 с., ил.

Имя крупного американского биохимика А. Ленинджера уже известно советским читателям по его книге «Биохимия», выпущенной в русском переводе издательством «Мир» в 1974 г. Новая книга представляет собой фундаментальное учебное пособие, предназначенное для изучения основ биологической химии.

Главная задача автора – объяснение молекулярной логики биологических систем, позволяющей понять основы функционирования живых организмов. В русском переводе книга выходит в трех томах.

Первый том посвящен молекулам, образующим химическую основу живой природы. Последовательно рассмотрены следующие вопросы: роль воды в организме, структура и функции аминокислот, пептидов, белков, ферментов, витаминов, микроэлементов, углеводов и липидов. Предназначена для биологов разных специальностей, медиков, а также студентов и всех лиц, интересующихся молекулярными основами процессов жизнедеятельности.

Л $\frac{2001040000-218}{041(01)-1985}$ сводный план 1985 г. **ББК 28.072**
57.04

Редакция биологической литературы

© 1982 by Worth Publishers, Inc.
© Перевод на русский язык, «Мир», 1985

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ ПЕРЕВОДА

Имя автора «Основ биохимии», крупного американского ученого и педагога, профессора Университета Дж. Гопкинса Альберта Л. Ленинджера хорошо известно советскому читателю по русским переводам его учебника биохимии и книг по биоэнергетике, получившим широкое распространение и признание в нашей стране.

Главная цель, которую поставил перед собой А. Ленинджер при написании этого нового учебника, состояла не столько в том, чтобы сообщить читателю конкретную информацию о структурах и механизмах, обеспечивающих функционирование живых организмов (хотя такая информация составляет основное содержание книги), сколько в том, чтобы разъяснить ему общие принципы, лежащие в основе процессов жизнедеятельности. Совокупность этих принципов автор называет «молекулярной логикой живого». Эта цель А. Ленинджера вытекает из его общей точки зрения на роль биохимии в системе современного образования, к которой он пришел в последние годы. По мнению А. Ленинджера, наступило время, когда вводный курс биохимии должен быть включен в программу не только биологических и медицинских, но и других факультетов высших учебных заведений. Обоснованием этой далеко не общепринятой и на первый взгляд даже неожиданной точки зрения может служить то, что вводный курс биохимии позволил бы студентам понять молекулярные основы жизни и составить благодаря этому ясное представление о тех конкретных путях, которыми живая природа решает целый ряд практически важных задач, стоящих перед химиками, физиками и инженерами. Но все же главное значение вводного курса биохимии определяется тем местом, которое занимает комплекс биологических наук в современном естествознании, и той ролью, которую должна играть биология в научном воспитании молодых людей. Только знание биологических законов поможет им в полной мере оценить значение важнейшей проблемы, стоящей сейчас перед человечеством,– сохранения живой природы и здоровья людей. Понимание этих законов должно стать достоянием не только специалистов биологического профиля, но и всех образованных и мыслящих людей.

Особое значение в этой ситуации приобретает, естественно, задача создания руководства по биохимии, в котором материал излагался бы в ясной и доходчивой форме, но вместе с тем на высоком научном уровне. Это задача исключительной трудности. Тем не менее А. Ленинджеру, как нам кажется, удалось решить ее – написанная им книга «Основы биохимии» является великолепным учебным пособием, удовлетворяющим самым строгим требованиям. Важное достоинство книги состоит в систематичности и четкости изложения материала, характеризующих автора как прекрасного педагога,– его язык лаконичен, все формулировки ясны и продуманны, внимание читателя постоянно обращено на основные принципы, а не на второстепенные детали. Заслуживает похвалы и высокий научный уровень книги – в ней учтены самые последние достижения биохимии и смежных наук (вплоть до 1981–82 гг.).

При всей привлекательности идеи А. Ленинджера о целесообразности включения большого вводного курса биохимии в учебные программы высших учебных заведений небиологического и немедицинского профиля, едва ли, как нам кажется, ее удастся реализовать, по крайней мере в ближайшие годы, хотя бы потому, что эти программы в настоящее время и без того перегружены и нуждаются в сокращении. Но уже тот факт, что эта идея породила такую прекрасную книгу как «Основы биохимии», вполне оправдывает ее.

Можно не сомневаться в том, что эта книга окажется очень полезной не только для широкого круга читателей, изучающих или преподающих биохимию, но и для лиц, активно работающих в этой области и желающих систематизировать свои знания. Она окажется «находкой» и для людей других специальностей, интересующихся современным состоянием этой быстро развивающейся науки.

В русском издании «Основ биохимии» мы сочли целесообразным распределить материал книги по трем томам. Перевод выполнен В. В. Борисовым (гл. 1 и 5–8), М. Д. Гроздовой (предисловие. гл. 24,25), М. Г. Дуниной (гл. 13–20, 22 и 23), С. Н. Преображенским (гл. 2–4, 9–12, 21 и 26) и В. Г. Горбулевым (гл. 27–30, приложения и словарь терминов).

В. А. Энгельгардт

Я. М. Варшавский

ПРЕДИСЛОВИЕ

Книга «Основы биохимии» адресована в первую очередь студентам, впервые приступающим к изучению биохимии. Это новая книга, а не просто осовремененный вариант моих прежних учебников «Биохимия» (1970, 1975) и «Краткий курс биохимии» (1973). Первоначально я намеревался подготовить новые издания этих учебников, но постепенно убеждался в том, что едва ли они будут соответствовать поставленным целям. В самом деле, первое издание «Биохимии», опубликованное в 1970 г., предназначалось главным образом для студентов, которым предстояло прослушать первый и, может быть, единственный в своей жизни курс биохимии. Когда учебник был переиздан в 1975 г., его объем увеличился более чем на 20%. Если бы при подготовке третьего издания я сделал бы аналогичную попытку включить в него новые достижения биохимии, то объем книги составил бы не менее 1500 страниц. Разумеется, такой учебник мог бы сыграть важную роль в преподавании биохимии, однако он не вполне отвечал бы потребностям той студенческой аудитории, для которой преимущественно была написана «Биохимия». «Основы биохимии» – это возвращение к моей первоначальной цели; если угодно, это возрождение первого издания «Биохимии», датируемое 1982 годом.

Дело не только в объеме книги. Наступило время, когда один учебник биохимии уже не может ответить каждому студенту на все вопросы. Полный курс, содержащий описание всех аспектов современной биохимии на таком уровне, который удовлетворял бы студентов, специализирующихся в области биохимии, безусловно, производил бы отпугивающее впечатление на большинство из тех, кому предстоит впервые познакомиться с этим предметом. Кроме того, известно, что при переиздании учебников их структура обычно усложняется, а текст становится более насыщенным, и в результате нередко исчезает та ясность изложения, которая обеспечивала успех первым изданиям. По-видимому, лучше всего попытаться написать учебник заново.

Одно время я считал, что биохимию следует преподавать студентам старших курсов после тщательного изучения ими химии и биологии. Сегодня я придерживаюсь другой точки зрения. Преподавание биохимии нужно начинать гораздо раньше, поскольку она объединяет все науки о живом и ее изучение способствует лучшему пониманию любой области биологии. И не только биологии – преподавание начального курса биохимии студентам химических и физических факультетов дает возможность на увлекательных примерах пояснить, как в живых организмах решаются некоторые фундаментальные проблемы, стоящие перед физикой и химией.

В более широком плане студенческий курс биохимии вносит также вклад в подготовку молодежи к будущему, связанному с постоянно возрастающим беспокойством о здоровье и благополучии всего человечества. Поразительные успехи биохимической генетики и генетической инженерии наряду с социальными последствиями их использования уже стали предметом широкого общественного внимания и интереса. Мы становимся также свидетелями того, как рост народонаселения, а соответственно и увеличение потребностей в продуктах питания, сырье и энергии нарушают тонко сбалансированные экологические равновесия

в биосфере. Обществу во все возрастающей мере приходится принимать ответственные решения в конфликтных ситуациях, возникающих при столкновении интересов политического, экономического и этического характера с биологическими законами. Можно, следовательно, утверждать, что знание биохимии полезно любому образованному человеку, независимо от рода его деятельности; я уже не говорю о том особом интеллектуальном удовольствии, которое дает изучение этого предмета человеку, желающему узнать и понять, какие молекулярные взаимодействия лежат в основе жизнедеятельности.

Предлагаемая читателю книга состоит из четырех частей: биомолекулы, биоэнергетика и метаболизм, вопросы биохимии человека и основы молекулярной генетики. Она написана в том же стиле, что и «Биохимия». Излагая материал, я стремился не столько к энциклопедическому охвату всех деталей, сколько к выявлению основы и молекулярной логики биохимии; однако процессы, имеющие фундаментальное значение, раскрыты во всей полноте и подробностях.

Книга начинается с глав, посвященных структуре клеток и важнейшим принципам органической химии, относящимся к биомолекулам; материал, изложенный в этих главах, может оказаться полезным для тех, кто недостаточно подготовлен по биологии и органической химии. После рассмотрения свойств воды подробно описываются структура и биологические функции белков. На примере гемоглобина детально показано, как аминокислотная последовательность определяет его конформацию и как конформация белковых макромолекул может влиять на структуру и функцию клеток. Далее подробно рассматриваются ферменты и способы регуляции их активности, причем постоянно подчеркивается значение трехмерной структуры белка и для иллюстрации приводится целая «галерея» структур ферментов.

Первая часть книги завершается главами, посвященными витаминам и коферментам, углеводам, а также липидам и мембранам.

Во второй части рассматриваются биоэнергетика и метаболизм клеток – «основное блюдо» биохимии. После изложения принципов клеточной биоэнергетики следует детальное описание гликолиза, цикла трикарбоновых кислот, транспорта электронов и окислительного фосфорилирования. Далее идут главы, в которых рассматривается катаболизм жирных кислот и аминокислот, а затем главы, посвященные биосинтетическим процессам и фотосинтезу. Подробно обсуждаются метаболические последовательности и принципы их регуляции.

Третья часть книги посвящена биохимии человека. Она состоит из глав, в которых анализируются взаимосвязи между различными органами в процессах метаболизма, рассматриваются вопросы, касающиеся эндокринной регуляции и питания человека. С моей точки зрения, проблема питания не сводится к знанию того, что тот или иной витамин входит в состав того или иного кофермента. Наука о питании – это один из самых важных вкладов биохимии в благосостояние человечества и, по моему убеждению, она требует более обобщенного, интегративного подхода, чем получала до сих пор.

В четвертой части книги я особенно подробно останавливаюсь на наиболее острых вопросах молекулярной генетики; здесь рассмотрены самые последние данные в этой области (по 1981 год включительно), в том числе методы клонирования ДНК.

На протяжении всей книги приводится большое число любопытных сведений из смежных областей; одни из них касаются истории науки, другие – медицины, третьи – зоологии и физиологии животных, сельского хозяйства и науки о питании, проблем охраны окружающей среды и обеспечения человечества продуктами питания. В некоторых местах в книгу включены небольшие разделы, содержащие информацию о более сложных вопросах и количественных зависимостях, а также о некоторых любопытных проблемах частного характера. Поскольку этот материал необязателен для общего курса биохимии, он

приводится в виде дополнений и четко выделен. Из таких дополнений можно почерпнуть сведения, например, о преобразовании уравнения Хендерсона—Хассельбальха, RS-системе, определении возраста человека на основе химии аминокислот или о способах установления нуклеотидной последовательности ДНК.

Книга включает почти 850 рисунков, таблиц, схем и фотографий. Каждая глава завершается кратким заключением и списком рекомендуемой и цитированной литературы. В конце книги имеется достаточно полный словарь биохимических терминов (более 400 слов).

Особо следует отметить помещенные в конце каждой главы вопросы и задачи общим числом более 350; большую часть их составил Поль ван Эйкерен из Колледжа Харви Мадда. Цель этих вопросов и задач состоит не просто в том, чтобы читатель произвел какие-то вычисления. Они призваны фокусировать его внимание на внутренних связях биохимических процессов; некоторые из них требуют весьма вдумчивого анализа. Все вопросы и задачи, а также ответы к ним были тщательно просмотрены опытными преподавателями общего курса биохимии.

Представляя эту книгу на суд читателей, я по-прежнему буду приветствовать любые предложения и критические замечания преподавателей, и студентов.

Благодарности

Я глубоко признателен тем, кто помогал мне в подготовке этой книги. Прежде всего я должен поблагодарить Поля ван Эйкерена за составление большинства вопросов и задач, а также ответов к ним. Карл Шонк из Центрального университета штата Мичиган скрупулезно проверил все вопросы и задачи, а также ответы и дал ряд полезных советов, как повысить их дидактическую ценность. Я хотел бы поблагодарить также Барбару Солнер-Уэбб из Медицинской школы Джонса Гопкинса за составление вопросов и задач для глав по биохимической генетике.

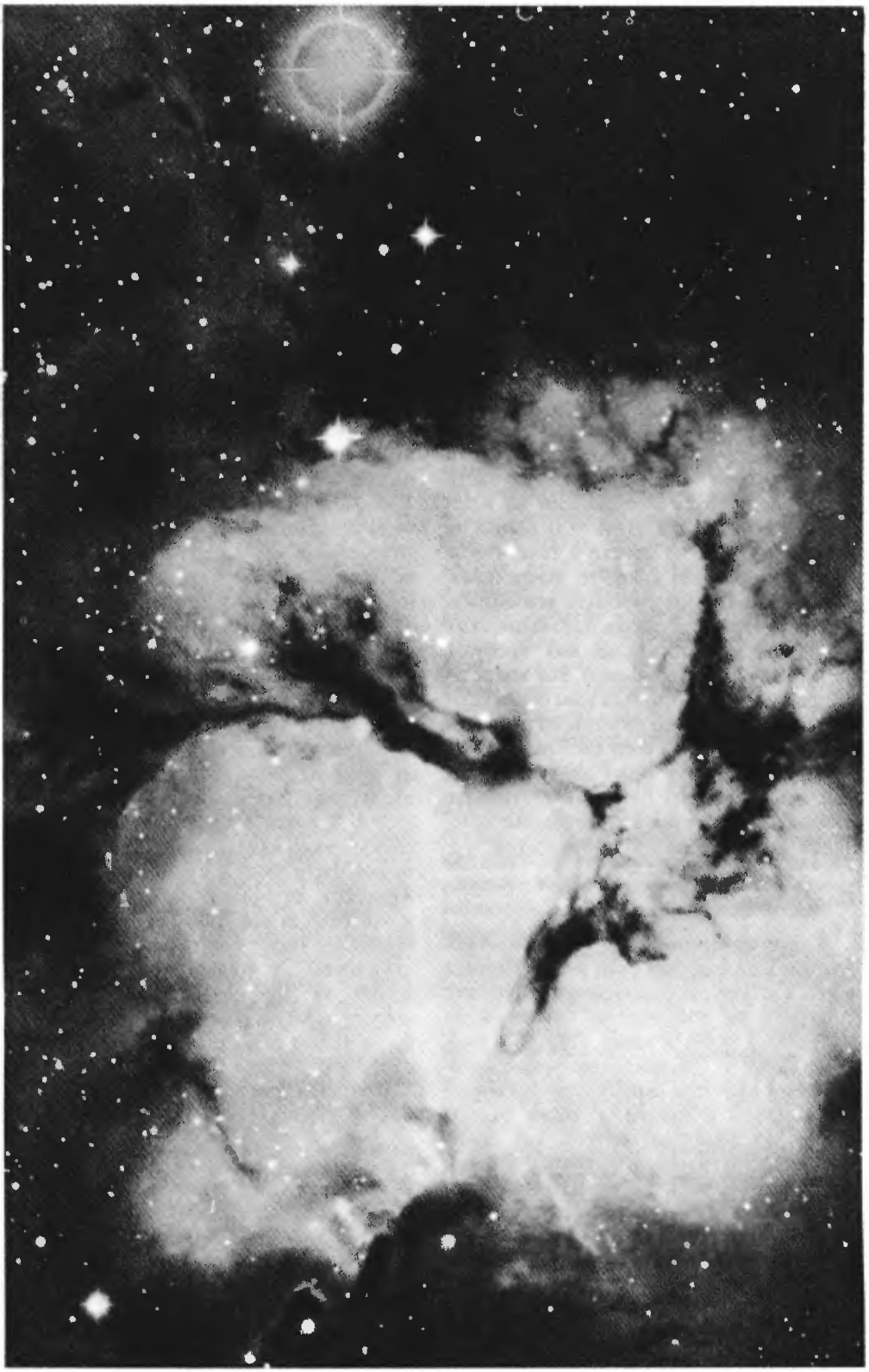
Эдвард Хэррис из Техасского университета, Джеймс Хейгман из Университета штата Нью-Мексико и Карл Шонк критически и подробно рассмотрели весь текст как в черновом, так и в окончательном варианте. Отдельные разделы рукописи были также внимательно прочитаны Норманом Сэнсингом из Университета Джорджии, Джеймсом Бамбургом из Университета штата Колорадо, Микаэлом Дамусом из Калифорнийского университета в Дэвисе, а также Полем Инглундом и Барбарой Соллнер-Уэбб из Медицинской школы Джонса Гопкинса. Кейт Робертс из Института Джона Иннеса дал полезные советы относительно иллюстраций к первым главам. Джоффри Мартин тщательно проверил правильность всех приведенных в книге уравнений и структурных формул, а Линда Хэнсфорд прочитала корректуру и составила предметный указатель. Однако вся ответственность за возможные фактические ошибки или неправильную интерпретацию данных лежит целиком на мне.

Я особенно признателен Пегги Джейн Форд, которая не только перепечатывала (причем неоднократно) рукопись книги, но и помогала мне распределить время и внимание между такими конкурирующими моими обязанностями, как преподавание, научные исследования, административная деятельность и подготовка книги. Я хотел бы также поблагодарить сотрудников издательства «Уорт Паблишерс» Джун Фокс и в особенности Сэлли Андерсон, которые редактировали книгу и отвечали за все этапы ее производства. Приношу также благодарность всем сотрудникам издательства «Уорт Паблишерс» за их сочувствие, поддержку и практическую помощь. Едва ли можно было лучше отнестись к автору при выпуске его детища в свет.

В заключение я должен выразить глубокую признательность за неоценимую помощь и постоянное сочувствие моей жене, которая не только относилась с пониманием к тем длительным творческим мукам, которые составляют удел автора толстой книги, но и была также самым тонким критиком стиля и языка.

Альберт Л. Ленинджер

Спаркс, Мэриленд
Январь, 1982 г.



ЧАСТЬ I

БИОМОЛЕКУЛЫ

Около 20 миллиардов лет назад произошел сверхмощный взрыв, и все пространство заполнилось раскаленными субатомными частицами с очень высокой энергией. Так возникла Вселенная. Постепенно, по мере остывания Вселенной, из этих элементарных частиц сформировались положительно заряженные ядра, к которым стали притягиваться отрицательно заряженные электроны. Таким путем образовалось около сотни или несколько более химических элементов. Все атомы, присутствующие сегодня во Вселенной, в том числе и атомы, входящие в состав живых организмов, возникли в результате этого «большого взрыва», так что и мы, люди, и вообще все живые существа созданы из звездной пыли.

Простые органические соединения, из которых построены все организмы, присущи лишь живой природе и в современных земных условиях являются продуктами только биологической активности. Эти соединения, называемые биомолекулами, играют роль строительных блоков при образовании биологических структур; они были отобраны в ходе биологической эволюции благодаря их пригодности к выполнению строго определенных функций в живых клетках. Во всех организмах эти соединения одинаковы. Биомолекулы связаны между собой и взаимодействуют в соответствии с правилами «молекулярной игры» – молекулярной логики живого состояния. Размеры, форма и химические свойства биомолекул позволяют им не только служить строительными блоками при создании сложной структуры клеток, но и участвовать в непрекращающихся процессах превращения энергии и вещества. Биомолекулы следует рассматривать, таким образом, с двух точек зрения – химической и биологической. Биохимия – это суперхимия, т. е. химия наиболее высокоорганизованной материи.

Межзвездный газ и пыль в созвездии Стрельца. В межзвездном пространстве присутствует большое число простых органических соединений, которым приписывают роль предшественников биомолекул, существующих на Земле и, как знать, быть может, еще где-нибудь во Вселенной.

ГЛАВА 1

БИОХИМИЯ – МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЛОГИКА ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Объекты живой природы состоят из «неживых» молекул. Если эти молекулы выделить и каждый их вид исследовать в отдельности, то можно убедиться, что они подчиняются всем законам физики и химии, описывающим поведение неодушевленной материи. Тем не менее живые организмы обладают необычными свойствами, отсутствующими в скоплениях неживых молекул. Если мы поближе познакомимся с этими особыми свойствами, то нам станут более понятны те основные вопросы, ответы на которые пытается найти биохимия.

1.1. Для живой материи характерны некоторые отличительные особенности

Одна из наиболее примечательных особенностей живых организмов – это их сложность и высокая степень организации. Они характеризуются усложненным внутренним строением и содержат множество различных сложных молекул. Живые организмы представлены миллионами разных видов, тогда как окружающая нас неживая материя – глина, песок, камни, вода – состоит из неупорядоченных смесей сравнительно простых химических соединений.

Вторая особенность живых организмов заключается в том, что любая составная часть организма имеет специальное назначение и выполняет строго определенную функцию. Это относится не только к макроскопическим структурам и, в частности, к органам, таким, как сердце, легкие или мозг, но и к микроскопическим внутриклеточным структурам, таким, как клеточное ядро. Даже индивидуальные химические соединения, содержащиеся в клетке, например белки или липиды, наделены специальными функциями. Поэтому вполне правомерен вопрос о том, для какой цели понадобилась живому организму та или иная молекула или химическая реакция, тогда как спрашивать о функции различных химических соединений, входящих в состав неживой материи, абсолютно бессмысленно.

Третья особенность живого, благодаря которой мы ближе подходим к сути жизненных процессов, состоит в том, что живые организмы обладают способностью извлекать, преобразовывать и использовать энергию окружающей их среды – либо в форме органических питательных веществ, либо в виде энергии солнечного излучения. Эта энергия позволяет организмам создавать собственные богатые энергией сложные структуры и поддерживать их целостность. Кроме того, за счет этой энергии организмы выполняют механическую работу при передвижении; она также дает возможность осуществлять перенос различных веществ через мембраны. Живые организмы никогда не бывают в состоянии равновесия – это касается как процессов, идущих в самих организмах, так и их взаимодействия с окружающей средой. Неживая материя, напротив, неспособна к целенаправленному использованию энергии для поддержания своей структуры и выполнения работы. Предоставленная самой себе, она постепенно раз-

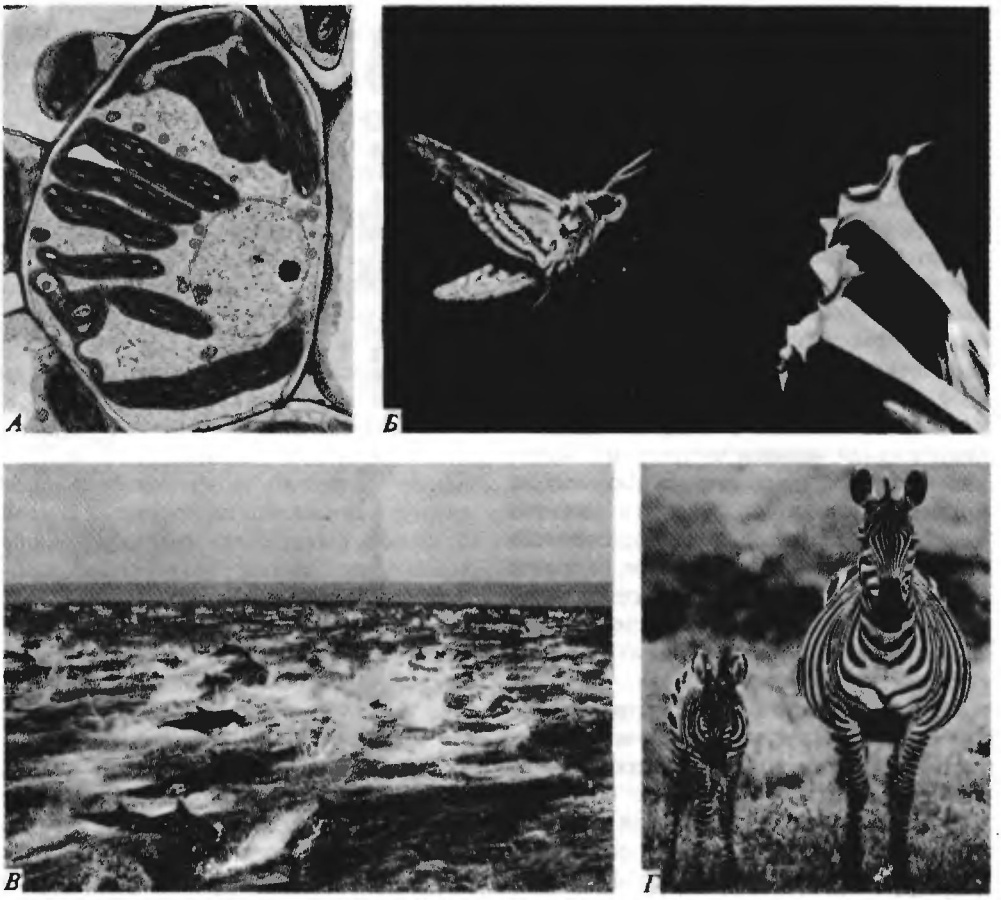


Рис. 1-1. Некоторые характерные особенности живой материи – «признаки жизни». *А*. Поперечный срез фотосинтезирующей клетки, на котором видна ее тонкая и сложная структура: темные образования – это хлоропласты, содержащие тысячи молекул хлорофилла, ориентированных так, чтобы они могли улавливать солнечную энергию. *Б*. Длинный хоботок бабочки бражника в результате длительной биологической эволюции оказался приспособленным к извлечению нектара из цветков с длинным раструбом. *В*. Дельфины, питающиеся мелкой рыбой, преобразуют химическую энергию пищевых продуктов в мощные импульсы мышечной энергии. *Г*. Биологическое сомовоспроизведение происходит с почти идеальной точностью.

рушается и со временем переходит в неупорядоченное состояние; при этом устанавливается равновесие с окружающей средой.

Но самая поразительная особенность живых организмов – это их способность к точному самовоспроизведению – свойство, которое можно считать поистине квинтэссенцией живого состояния. Известные нам смеси веществ, входящие в состав неодушевленных предметов, не проявляют способности к росту и воспроизведению, обеспечивающему сохранение из поколения в поколение одинаковой формы, массы и внутренней структуры этих предметов.

1.2. Биохимия стремится понять природу живого состояния

Мы можем спросить теперь: если живые организмы состоят из безжизненных молекул, то почему же тогда живая материя столь радикально отличается от неживой, которая тоже состоит из неодушевленных молекул? Почему живой организм представляет собой нечто

большее, чем сумму своих неживых компонентов? Философы когда-то объясняли это тем, что живые организмы наделены таинственной и божественной жизненной силой. Но эта доктрина, получившая название *витализма*, была отвергнута современной наукой, которая пытается найти рациональное и прежде всего доступное проверке объяснение происходящих в природе явлений. Биохимия как наука свою главную задачу видит в том, чтобы определить, каким образом неживые молекулы, составляющие в своей совокупности живые организмы, взаимодействуют друг с другом, поддерживая живое состояние и обеспечивая его воспроизведение. Разумеется, биохимия позволяет получать важную информацию, находящую применение в медицине, сельском хозяйстве, пищевой промышленности и производстве, однако конечная ее цель заключается все же в познании тайны жизни во всех ее конкретных проявлениях.

Молекулы, из которых состоят живые организмы, подчиняются всем известным законам химии, но, кроме того, они взаимодействуют между собой в соответствии с другой системой принципов, которой мы можем дать общее название – *молекулярная логика живого состояния*. Эти принципы вовсе не обязательно представляют собой какие-то новые, до сих пор еще неизвестные нам физические законы или силы. Их следует рассматривать скорее как особую систему закономерностей, характеризующих природу, функции и взаимодействия *биомолекул*, т. е. таких молекул, которые входят в состав живых организмов.

Посмотрим теперь, сумеем ли мы сформулировать какие-либо важные принципы молекулярной логики живого состояния.

1.3. Все живые организмы содержат органические макромолекулы, построенные по общему плану

Большинство химических компонентов живых организмов представляют собой органические соединения, т. е. соединения углерода, в которых атомы углерода ковалентно связаны с другими атомами углерода, а также с атомами водорода, кислорода и азота. Живая материя состоит из великого множества самых разнообразных органических соединений, причем многие из них представляют собой необычайно большие и сложные молекулы. Даже самые простые, мельчайшие по размеру бактериальные клетки содержат очень большое число различных органических молекул. Например, в клетке бактерии *Escherichia coli* (обычная кишечная палочка) насчитывается около 5000 разных видов органических соединений, в том числе 3000 раз-

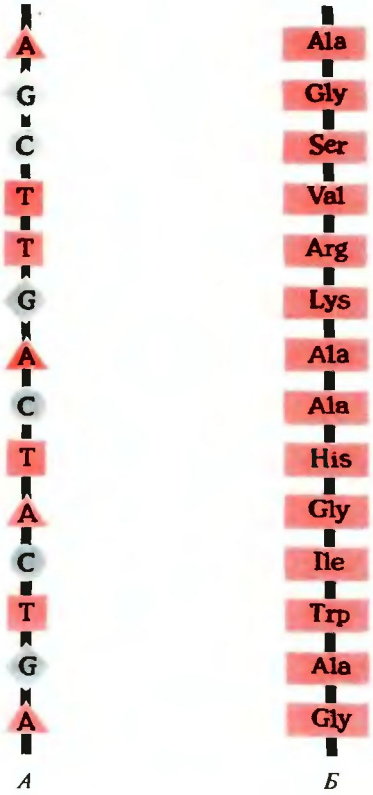


Рис. 1-2. *А.* Схематическое изображение участка молекулы ДНК, состоящей из нуклеотидных строительных блоков четырех типов, расположенных в определенной последовательности. *Б.* Схематическое изображение участка молекулы белка, построенной из расположенных в определенной последовательности аминокислотных звеньев.

личных белков и 1000 разных типов нуклеиновых кислот. Белки и нуклеиновые кислоты – это очень крупные и сложные молекулы (*макромолекулы*); точное строение известно лишь для немногих из этих молекул. В гораздо более сложном организме человека число различных белков заведомо превышает 50 000. По всей вероятности, среди белков *E. coli* нет ни одного, который по молекулярной структуре был бы идентичен какому-либо белку человека, хотя многие из них функционируют сходным образом. Фактически каждый вид живых организмов содержит свой набор белков и нуклеиновых кислот, и почти все они четко отличаются от белков и нуклеиновых кислот, принадлежащих другому виду. Поскольку существуют около 10 миллионов видов живых организмов, легко подсчитать, что все эти виды, вместе взятые, должны содержать по минимальной оценке 10^{11} различных белков и почти столько же различных нуклеиновых кислот.

Если бы биохимики поставили перед собой задачу выделить, охарактеризовать и синтезировать все органические молекулы, входящие в состав живых организмов, то это было бы совершенно безнадежным делом. Однако, как это ни парадоксально, все огромное разнообразие органических молекул в живых организмах сводится к довольно простой картине. Это связано с тем, что все макромолекулы в клетке состоят из простых и небольших молекул нескольких типов, используемых в качестве строительных блоков, которые связываются в длинные цепи, содержащие от 50 до многих тысяч звеньев. Длинные, похожие на цепи молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) построены всего из четырех типов строительных блоков – дезоксирибонуклеотидов, расположенных в определенной последовательности. Белки представляют собой цепи, состоящие из 20 различных ковалентно связанных друг с другом аминокислот – низкомолекулярных органических соединений с известной структурой. Эти аминокислоты могут быть расположены в самых разных последовательностях и образовывать огромное множество разнообразных белков, подобно тому как 26 букв английского алфавита, расположенные в определенном порядке, составляют почти неограниченное число слов, предложений и даже книг. Более того, те четыре нуклеотида, из которых построены все нуклеиновые кислоты, и 20 аминокислот, из которых построены все белки, одинаковы во всех организмах, включая животных, растения и микроорганизмы. Этот факт убедительно свидетельствует в пользу того, что все живые организмы произошли от общего предка.

Для простых молекул, из которых построены все макромолекулы, характерна еще одна примечательная особенность. Она состоит в том, что каждая из этих молекул выполняет в клетке сразу несколько функций. Различные аминокислоты служат не только строительными блоками белков, но и предшественниками гормонов, алкалоидов, пигментов и многих других биомолекул. Нуклеотиды используются не только как строительные блоки нуклеиновых кислот, но и как коферменты и переносчики энергии. В живых организмах обычно не бывает соединений, которые не выполняли бы какой-либо функции, хотя функции некоторых биомолекул нам пока неизвестны.

Исходя из всех этих рассуждений, мы можем теперь сформулировать ряд принципов молекулярной логики живого:

Структура биологических макромолекул проста в своей основе.

Все живые организмы состоят из одних и тех же молекул, используемых как строительные блоки, что указывает на их происхождение от общего предка.

Идентичность организмов каждого вида сохраняется благодаря наличию свойственного только ему набора нуклеиновых кислот и белков.

Все биомолекулы выполняют в клетках специфические функции.

1.4. Обмен веществ и энергии в живых организмах

Живые организмы не составляют исключения в том смысле, что обмен энергии у них подчиняется всем обычным физическим законам. Процессы роста и поддержания жизни требуют затрат энергии, которые должны быть каким-то образом возмещены. Живые организмы поглощают из окружающей среды энергию в такой форме, чтобы ее можно было использовать в конкретных условиях их существования при данных значениях температуры и давления. Затем они возвращают в среду эквивалентное количество энергии, но уже в другой, менее доступной для них форме. Полезная форма энергии, которая требуется живой клетке, называется *свободной энергией*; ее можно определить просто как энергию, способную совершать работу при постоянных температуре и давлении. Менее полезный вид энергии, возвращаемый клеткой в окружающую среду, выделяется главным образом в форме тепла, которое рассеивается в среде и превращается в энергию беспорядочного движения. Таким образом, мы можем сформулировать еще один принцип молекулярной логики живого:

Живые организмы создают и поддерживают сложные, упорядоченные и целенаправленные элементы своей структуры за счет свободной энергии окружающей среды; эту энергию они затем возвращают в среду в менее пригодной для них форме.

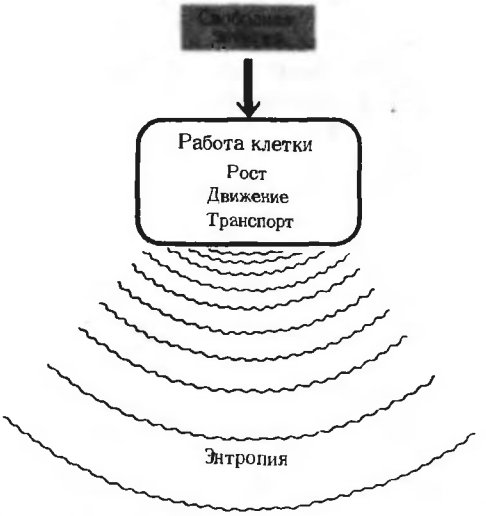


Рис. 1-3. Живые организмы совершают различные виды работы за счет поглощаемой ими свободной энергии окружающей среды. Они возвращают в среду эквивалентное количество энергии в виде тепла и других форм непригодной для них энергии хаотического движения. Степень такого «обесценивания» (рассеяния) энергии можно охарактеризовать энтропией.

Хотя живые организмы способны преобразовывать энергию, они кардинальным образом отличаются от обычных машин, созданных человеком. Системы преобразования энергии в живых клетках целиком построены из сравнительно хрупких и неустойчивых органических молекул, не способных выдерживать высокие температуры, сильный электрический ток, действие сильных кислот и оснований. Все части живой клетки имеют примерно одну и ту же температуру, нет в клетках и сколько-нибудь значительных перепадов давления. Отсюда можно заключить, что клетки не могут использовать тепло как источник энергии, поскольку тепло может совершать работу лишь тогда, когда оно переходит от более нагретого тела к более холодному. Клетки совсем не похожи на тепловые и электрические двигатели – наиболее знакомые нам типы двигателей.

Живые клетки представляют собой химические машины, работающие при постоянной температуре.

Это еще один принцип молекулярной логики живого состояния. Клетки используют химическую энергию для выполнения химической работы в процессе их роста и биосинтеза клеточных компонентов, а также осмотической работы, необходимой для переноса питательных веществ в клетку, и механической работы сократительного и двигательного аппаратов.

Для всех живых организмов в земной



Рис. 1-4. Солнечный свет служит исходным источником всех форм биологической энергии.

биосфере источником энергии служит в конечном счете солнечное излучение, которое возникает в результате реакции ядерного синтеза – слияния ядер водорода с образованием ядер гелия, протекающего на Солнце при необычайно высокой температуре. Фотосинтезирующие клетки растений улавливают энергию солнечного излучения и расходуют ее на превращение углекислого газа и воды в разнообразные богатые энергией растительные продукты, например крахмал и целлюлозу. При этом они выделяют в атмосферу молекулярный кислород. Другие организмы, не способные к фотосинтезу, получают необходимую им энергию путем окисления богатых энергией растительных продуктов атмосферным кислородом. Образующийся в результате углекислый газ и другие продукты окисления возвращаются в окружающую среду и снова вовлекаются растениями в круговорот веществ. Это дает нам основание сформулировать еще два принципа молекулярной логики живого состояния.

Энергетические потребности всех живых организмов прямо или косвенно удовлетворяются за счет солнечной энергии.

Весь растительный и животный мир (вообще все живые организмы) зависят друг от друга, поскольку между ними через внешнюю среду постоянно происходит обмен энергией и материей.

1.5. Ферменты, играющие роль катализаторов в живых клетках, управляют сложно организованной сетью химических реакций

Клетки могут функционировать как химические машины благодаря присутствию в них ферментов – катализаторов, способных в значительной мере ускорять различные химические реакции без сколько-нибудь заметного потребления



Рис. 1-5. Ферменты во много раз повышают скорость определенных химических реакций.

их самих. Ферменты – это высокоспециализированные белки, синтезируемые в клетке из простых строительных блоков – аминокислот. Каждый тип ферментов служит катализатором химической реакции только какого-то одного типа; поэтому обмен веществ в любой клетке осуществляется при участии нескольких сотен различных типов ферментов. Ферменты намного превосходят те катализаторы, которые синтезируют в лаборатории химики, так как они обладают значительно более высокой специфичностью и эффективностью каталитиче-

ского действия, а также способны работать в относительно мягких условиях – при умеренной температуре и физиологической концентрации водородных ионов. В присутствии ферментов за какие-то секунды протекают сложные последовательности реакций, для проведения которых в химической лаборатории потребовались бы дни, недели или месяцы работы. Кроме того, реакции, катализируемые ферментами, идут со 100%-ным выходом и без образования побочных продуктов. В то же время известно, что реакции, которые проводят в лаборатории химики-органики, почти всегда сопровождаются образованием одного или нескольких побочных продуктов. Поскольку каждый фермент способен ускорять лишь какую-то одну цепь реакций данного соединения, не влияя на другие возможные реакции с его участием, в живой клетке может одновременно протекать множество различных химических реакций; при этом не возникает никакой опасности, что клетка погрязнет в месиве бесполезных побочных продуктов.

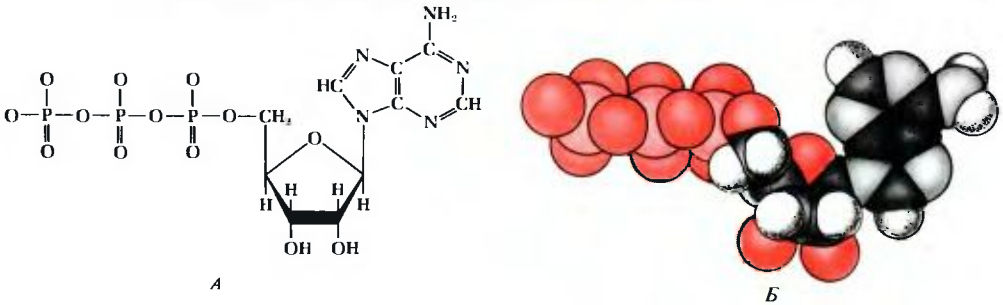


Рис. 1-6. Ферменты часто катализируют последовательно протекающие химические реакции.

Сотни протекающих в клетке химических реакций, катализируемых ферментами, организованы в виде множества различных последовательностей идущих друг за другом реакций. Такие последовательности могут состоять из нескольких реакций – от 2 до 20 и более. Одни из этих последовательностей ферментативных реакций приводят к расщеплению органических пищевых продуктов на более простые соединения, причем в процессе такого расщепления из них извлекается химическая энергия. Другие последовательности реакций, требующих затраты энергии, начинаются с малых молекул-предшественников, которые постепенно соединяются друг с другом и образуют крупные и сложные макромолекулы. Все эти цепи взаимосвязанных ферментативных реакций, составляющих в совокупности клеточный метаболизм, имеют множество узловых точек.

1.6. Клетки используют энергию в химической форме

Живые клетки улавливают, сохраняют и передают энергию в химической форме, главным образом в виде энергии, заключенной в молекулах *аденозинтрифосфата* (ATP). Именно ATP служит главным переносчиком химической энергии в клетках всех живых организмов. ATP может передавать свою энергию некоторым другим биомолекулам, теряя при этом концевую фосфатную группу; в результате богатая энергией молекула ATP превращается в энергетически обедненную молекулу *аденозиндифосфата* (ADP). В свою очередь ADP может снова соединиться с фосфатной группой и превратиться в ATP либо за счет солнечной энергии (в фотосинтезирующих клетках), либо за счет химической энергии (в животных клетках). ATP служит главным связующим звеном ме-


NH2
O
O
O
O
P
O
O
O
O

1.8. Живые организмы способны к точному самовоспроизведению

Самое замечательное свойство живых клеток – это их способность воспроизводить себе подобных с почти идеальной точностью на протяжении сотен и тысяч поколений. Следует сразу же отметить три характерные особенности процесса воспроизведения. Во-первых, живые организмы настолько сложны, что трудно себе представить, каким образом передаваемое из поколения в поколение количество генетической информации может уместиться в крошечном клеточном ядре, в котором эта информация хранится. Мы знаем теперь, что вся генетическая информация, содержащаяся в бактериальной клетке, заключена в одной большой молекуле *дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)*. А гораздо большее количество генетической информации, содержащееся в одной половой клетке человека, закодировано в наборе молекул ДНК общей массой всего лишь $6 \cdot 10^{-12}$ г. Это позволяет нам сформулировать еще один важный принцип молекулярной логики живого состояния:

Генетическая информация закодирована при помощи структурных единиц субмолекулярных размеров; эти единицы представляют собой четыре типа нуклеотидов, из которых построены все молекулы ДНК.

Вторая замечательная особенность процесса самовоспроизведения живых организмов – необычайно высокая стабильность генетической информации, хранящейся в ДНК. До наших дней сохранились лишь немногие древние записи, хотя они были вытравлены на медных пластинках или высечены на камне. Например, рукописи Мертвого моря и Розеттский камень, давший ключ к расшифровке древнеегипетских иероглифов, насчитывают всего несколько тысячелетий. Однако есть все основания считать, что многие современные бактерии имеют почти те же размеры, форму, внутреннюю структуру и содержат те же типы строительных блоков молекул ферментов, что и бактерии, жившие миллионы лет назад. И это постоянство сохраняется, несмотря на то что бактерии, как и все другие организмы, подвержены непрерывным эволюционным изменениям. Генетическая информация не записана на меди и не выбита на камне, а хранится в форме ДНК – настолько хрупкой органической молекулы, что она разрывается на множество фрагментов при

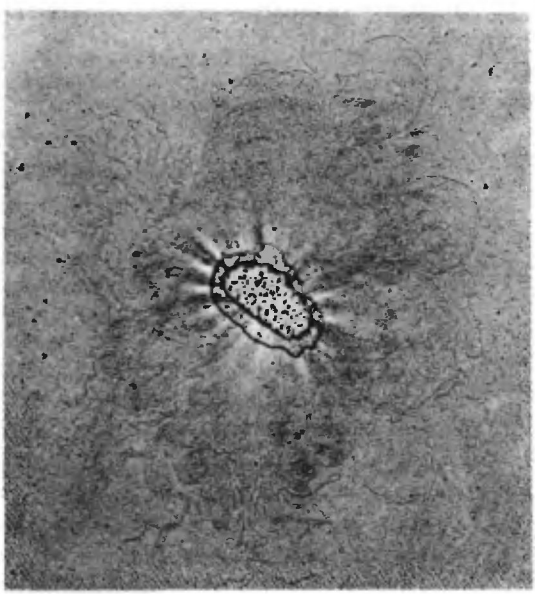


Рис. 1-9. Единичная молекула ДНК, высвободившаяся из разрушенной клетки бактерии *Hemophillus influenzae*. Молекула ДНК в сотни раз длиннее самой клетки.

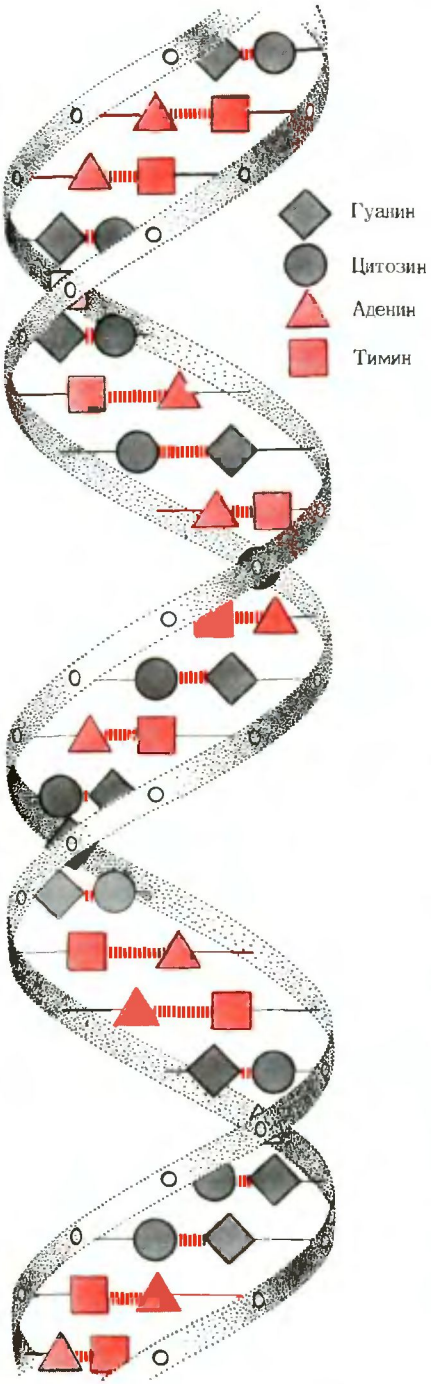


Рис. 1-10. Комплементарность между кодирующими элементами двух цепей ДНК.

простом перемешивании содержащего ДНК раствора или втягивании его в пипетку. Цепи ДНК часто рвутся даже и в неповрежденной клетке, но там они быстро и автоматически восстанавливаются. Замечательная способность живых клеток сохранять свой генетический материал есть следствие *структурной комплементарности*. Одна цепь ДНК служит матрицей, на которой ферментативным путем строится или восстанавливается другая структурно комплементарная ей цепь. Однако, несмотря на почти идеальную точность процесса генетической репликации, в ДНК изредка происходит то или иное очень небольшое изменение — *мутация*, которая может приводить к появлению либо более совершенного и более приспособленного потомства, либо, наоборот, потомства, менее способного к выживанию. Таким путем живые организмы непрерывно повы-

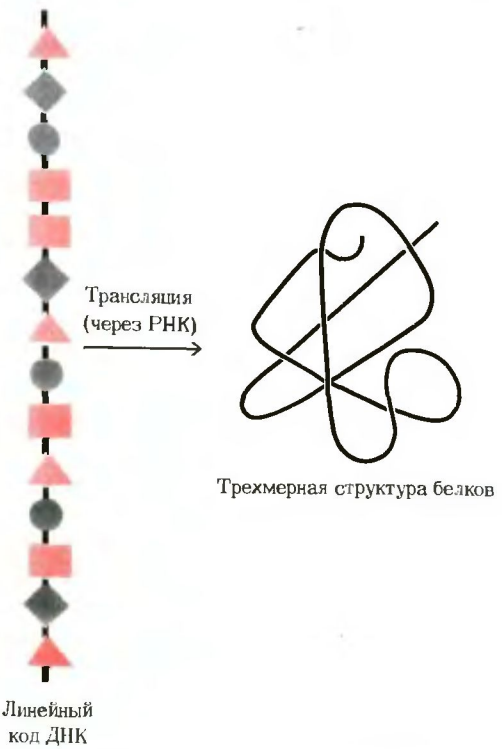


Рис. 1-11. Информация, записанная в виде линейной последовательности нуклеотидов в ДНК, транслируется (т. е. переводится) в трехмерную структуру белков.

шают свою способность к выживанию, причем под влиянием изменений в окружающей среде возникают новые виды, претерпевающие дальнейшую эволюцию.

Рассмотрим третью замечательную особенность переноса генетической информации в живых организмах. Генетическая информация закодирована в форме линейной, одномерной, последовательности нуклеотидов – строительных блоков ДНК. Но живые клетки имеют трехмерную структуру и состоят из трехмерных компонентов. «Одномерная» информация, заключенная в ДНК, преобразуется в «трехмерную» информацию, присущую живым организмам, путем трансляции (т. е. перевода с одного языка на другой) структуры ДНК в структуру белка. В этом процессе принимает участие рибонуклеиновая кислота (РНК). В отличие от молекул ДНК, имеющих в основном одинаковую структурную форму, молекулы разных белков самопроизвольно свертываются характерным для данного белка способом, образуя самые разнообразные трехмерные структуры, каждая из которых выполняет специфическую функцию. Точная геометрия молекул данного белка определяется его аминокислотной последовательностью, которая в свою очередь определяется нуклеотидной последовательностью соответствующего участка ДНК.

Теперь мы можем суммировать основные принципы молекулярной логики клеток:

Живая клетка – это способная к самосборке, саморегуляции и самовоспроизведению изотермическая система органических молекул, извлекающая свободную энергию и сырьевые ресурсы из окружающей среды.

В клетке осуществляется множество последовательно протекающих органических реакций, ускоряемых органическими катализаторами (ферментами), которые производит сама клетка.

Клетка сама себя поддерживает в стационарном динамическом состоянии, далеком от равновесия с окружающей средой. Она функционирует по принципу максимальной экономии компонентов и процессов.

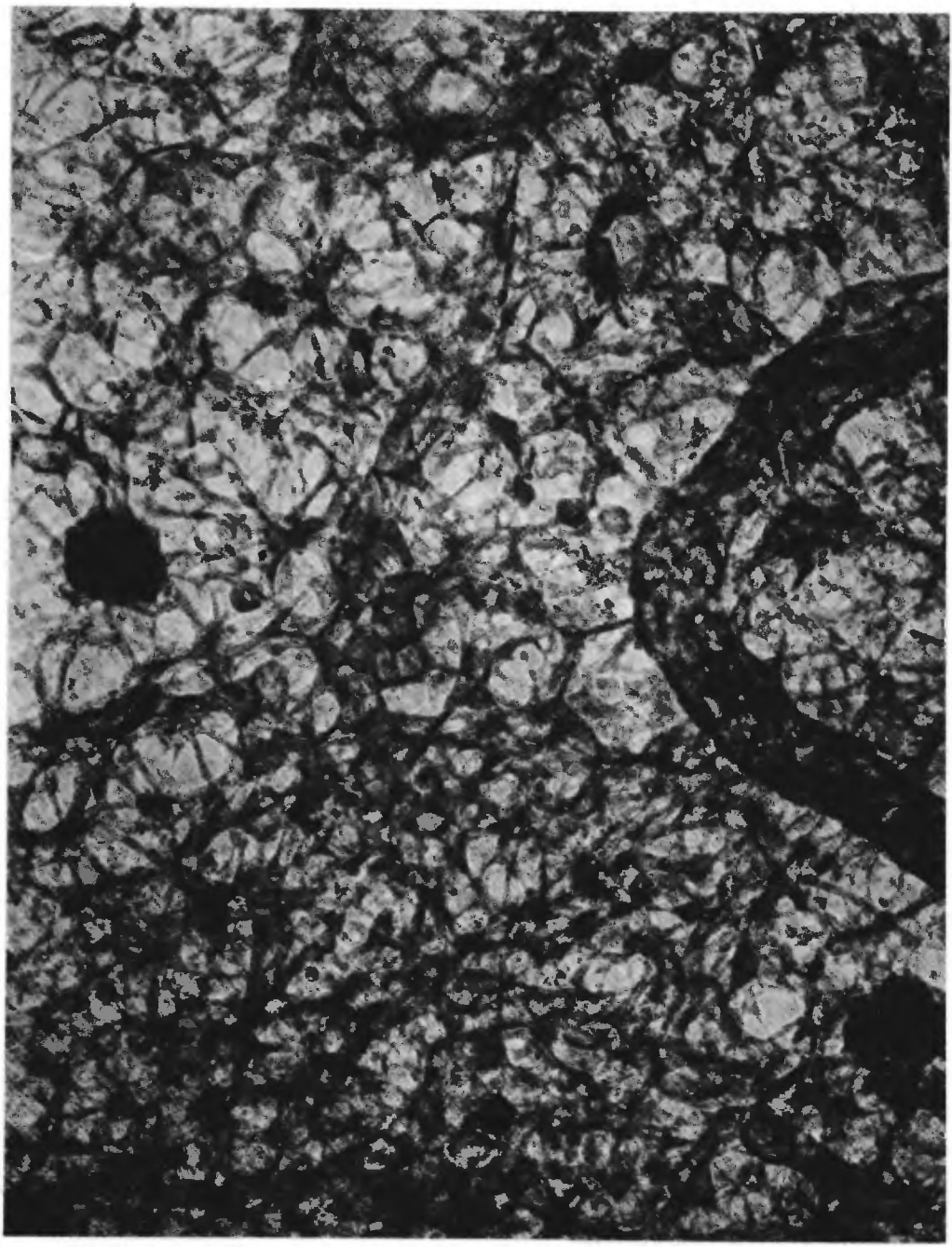
Способность клетки к почти точному самовоспроизведению на протяжении многих поколений обеспечивается самовосстанавливающейся системой линейного кодирования.

Цель биохимии состоит в том, чтобы понять, каким образом взаимодействия биомолекул друг с другом порождают описанные выше особенности живого состояния. Рассматривая молекулярную логику живых клеток, мы ни разу не столкнулись с нарушением известных физических законов или с необходимостью сформулировать какие-либо новые законы. «Мягкие» органические механизмы, обеспечивающие функционирование живых клеток, подчиняются той же совокупности законов, которые управляют работой машин, созданных человеком; однако химические реакции и регуляторные процессы, протекающие в клетках, гораздо более совершенны и намного превосходят возможности современной химической технологии.

Хотя мы отдаем себе отчет в том, что сформулированные нами принципы, составляющие в совокупности молекулярную логику живого состояния, носят несколько упрощенный и механистический характер, они, по всей видимости, распространяются на все живые клетки. Возникает вопрос: а можно ли молекулярную логику живого состояния в том виде, в каком она здесь изложена, использовать для описания сложных многоклеточных организмов и особенно для описания наиболее высокоорганизованных форм жизни? Можно ли ее приложить к организму человека с его необычайной и уникальной способностью мыслить, говорить и творить? Мы еще не можем даже и пытаться ответить на эти вопросы, хотя теперь знаем, что развитие и поведение высших организмов определяются молекулярными факторами и видоизменяются под их влиянием; следовательно, развитие и поведение высших организмов должны иметь биохимическую основу. Однако пока у нас нет ответов на эти более сложные вопросы, так как сегод-

няшней биохимии известна лишь очень малая доля того, что нам предстоит еще узнать о живых организмах.

В этом общем обзоре мы показали, что биохимия – это не просто описание каких-то разрозненных химических данных о живой материи, но что она покоится на некой основополагающей системе, включающей ряд важных организующих принципов. Теперь, когда мы приступаем к изучению биохимии, эти организующие принципы будут служить нам основными ориентирами. Сначала мы опишем различные классы биомолекул. Затем мы перейдем к анализу изотермических, последовательно связанных друг с другом, саморегулируемых ферментативных реакций, составляющих систему, через которую осуществляется обмен веществом и энергией между организмом и окружающей средой, т. е. метаболизм. Наконец, мы рассмотрим молекулярные основы самовоспроизведения клеток и преобразования «одномерной» информации, содержащейся в ДНК, в трехмерную структуру белков. По ходу дела мы увидим, что биохимия способствует формированию новых важных представлений, касающихся физиологии человека, проблем питания и медицины, более глубокому пониманию биологии растений, основ сельского хозяйства, эволюции, экологии, а также великого круговорота вещества и энергии между солнцем, землей, растениями и животными.



ГЛАВА 2

КЛЕТКИ

Читатели могут задать вопрос: почему, приступая к обсуждению биохимии, мы начинаем с клеток? Конечно, некоторые из вас уже, возможно, изучали биологию клетки. Тем не менее начать с клетки необходимо, потому что большинство биохимических реакций в естественных условиях происходит именно в клетках, а не в колбах или пробирках. Основное различие между биохимией и «обычной» химией состоит в том, что биохимические реакции протекают в строго ограниченных условиях, заданных размерами клеток и их внутренней структурой, а также физическими и химическими условиями, совместимыми с жизнью клеток.

Обычные известные нам химические реакции проводят в реакционных сосудах, изготовленных из небиологических материалов, причем размеры этих сосудов несопоставимо больше величины реагирующих молекул. Кроме того, для обычных химических реакций иногда требуются высокие температуры или давления, активные реагенты или электрическая энергия; часто такие реакции проводят в органических растворителях. В отличие от химических биохимические реакции в живых клетках протекают в объемах, жестко ограниченных размерами клеток или их органелл, необычайно хрупкие стенки которых часто имеют толщину порядка нескольких молекул. Кроме того, биохимические реакции осуществляются только в водной среде при сравнительно низких постоянных температурах. Клетки не могут переносить экстремальной температуры или давления, экстремальной кислотности или присутствия соединений, обладающих высокой химической активностью. В дальнейшем, рассматривая химию биологических процессов, мы всегда должны помнить о размерах, строении и свойствах клеток, постоянно согласуя между собой представления химии и биологии клетки.

В этой главе мы остановимся на строении и биохимических свойствах клеток наиболее распространенных типов. В последующих главах некоторые аспекты этой проблемы будут рассмотрены более подробно.

Структура, затерявшаяся в цитоплазме клетки. Сеть или решетка очень тонких нитей, образующих «основное вещество» животных клеток при чрезвычайно большом увеличении. Обычные методы электронной микроскопии не позволяли увидеть эту сеть – она была обнаружена лишь совсем недавно благодаря новому методу высоковольтной электронной микроскопии с очень высокой разрешающей способностью. На рисунке показана лишь назначительная часть цитоплазмы клетки, которая буквально пронизана этой сложной трехмерной сетью.

2.1. Все клетки обладают некоторыми общими структурными характеристиками

Клетки – это структурные и функциональные единицы живых организмов. Простейшие организмы представляют собой единичные клетки; в отличие от них организм человека содержит, по-видимому, не менее 10^{14} клеток. Существует множество самых разнообразных клеток, очень сильно различающихся по размерам, форме и функциональной спе-

циализации. В пригоршне земли или в стакане воды, взятой из пруда, можно обнаружить десятки различных одноклеточных организмов, а любой многоклеточный организм, будь то человек или какое-нибудь растение, состоит из десятков или сотен высокоспециализированных типов клеток, функционирующих совместно в составе тканей и органов. Как бы ни был велик и сложен организм, клетки каждого типа сохраняют определенную индивидуальность и независимость.

Несмотря на многочисленные внешние различия, клетки разных типов обладают поразительным сходством в своих главных структурных особенностях (рис. 2-1). Каждая клетка окружена очень тонкой мембраной, ограничивающей ее содержимое и позволяющей ей быть до некоторой степени самостоятельной. Клеточная мембрана, которую называют также *плазматической мембраной*, характеризуется избирательной проницаемостью. Это ее свойство позволяет необходимым питательным веществам и солям проникать внутрь клетки, а излишним продуктам выходить из нее. В то же время клеточная мембрана препятствует проникновению в клетку ненужных веществ из окружающей среды. Молекулярная организация плазматической мембраны у всех клеток примерно одинакова: она состоит из двух слоев липидных молекул с множеством включенных в нее специфических белков. Одни мембранные белки обладают ферментативной активностью, тогда как другие связывают питательные вещества из окружающей среды и обеспечивают их перенос в клетку. Внутреннее пространство любой клетки заполнено *цитоплазмой*, в которой протекает большинство катализируемых ферментами реакций клеточного метаболизма. Именно в цитоплазме высвобождается химическая энергия, необходимая для построения клеточных структур и поддержания их целостности, а также для механической работы сокращения и передвижения. В цитоплазме всех клеток присутствуют также *рибосомы* – небольшие гранулы диаметром от 18 до 22 нм, функция которых состоит в обеспечении синтеза белков. Кроме того, все живые клетки содержат *ядро* или *ядерное тельце*, в которых происходит редупликация генетического материала и его хранение в виде дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК).

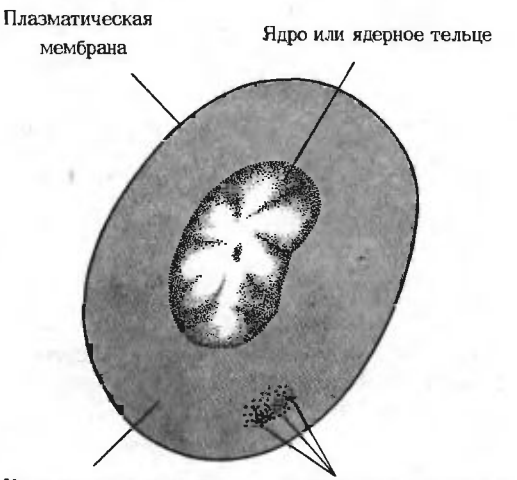


Рис. 2-1. Все клетки ограничены мембраной, содержат ядро или ядерное тельце и рибосомы. Далее мы увидим, что существует два основных класса клеток, различающихся по другим структурным элементам.

2.2. Клетки должны иметь очень малые размеры

Клеткам присуща еще одна важная структурная особенность – все они относительно малы (иначе и не может быть). Обычно в лабораторных условиях химические реакции проводят в сосудах, объем которых составляет десятки миллилитров или даже литры. Содержимое таких реакционных сосудов должно постоянно тщательно перемешиваться, с тем чтобы скорость реакции не лимитировалась скоростью диффузии реагирующих молекул. В живых же клетках биохимические реакции протекают в компартментах («отсеках») микроскопически малого объема. Например, объем клетки бактерии *Escherichia coli* составляет всего лишь $2 \cdot 10^{-12}$ миллилитра (мл). Для того чтобы ясно представить себе, какое

значение имеет величина клетки с точки зрения химических аспектов ее жизнедеятельности, необходимо сначала познакомиться с размерами биомолекул и клеток. Как указано в табл. 2-1, в качестве единиц длины при определении размеров клеток и их компонентов в настоящее время используются *нанометр* (нм) и *микрометр* (мкм). Хотя старые единицы, такие, как *ангстрем* или *микрон*, применяются все реже, их также следует знать. Чтобы читатель имел приблизительное представление о величине клеток, в табл. 2-2 приведены размеры некоторых наиболее важных биологических структур и, в частности, небольших биомолекул (аланина и глюкозы), макромолекул (трех белков и липида), надмолекулярных систем (рибосом и вирусов), клеточных органелл (митохондрий и хлоропластов), бактерии и печеночной клетки. Многие бактериальные клетки достигают в длину 2 мкм, а большинство клеток высших животных – 20 или 30 мкм.

Таблица 2-1. Международная система единиц

Основные единицы	
Длина	Метр (м)
Масса	Килограмм (кг)
Время	Секунда (с)

Приставки	
10^3, кило- (к)	10^{-3}, милли- (м)
10^6, мега- (М)	10^{-6}, микро- (мк)
10^9, гига- (Г)	10^{-9}, нано- (н)

Единицы длины, используемые в биологии клетки и биохимии

Нанометр (нм)	$= 10^{-9}$ м
	$= 10^{-6}$ мм
	$= 10^{-3}$ мкм
Микрометр (мкм)	$= 10^{-6}$ м
	$= 10^{-3}$ мм
	= 1000 нм

Устаревшие, но все еще часто используемые единицы

1 микрон (μ) = 1 микрометр (мкм)
1 миллимикрон (мμ) = 1 нанометр (нм)
1 ангстрем (Å) = 0,1 нанометр (нм)

Таблица 2-2. Размеры некоторых биологических структур

Структура	Размер в длину (нм)
Аланин (аминокислота)	0,5
Глюкоза (сахар)	0,7
Фосфатидилхолин (мембранный липид)	3,5
Миоглобин (белок малых размеров)	3,6
Гемоглобин (белок средних размеров)	6,8
Рибосома *E. coli*	18
Вирус полиомиелита	30
Миозин (длинный палочковидный белок)	160
Вирус табачной мозаики	300
Митохондрия клетки печени	1 500
Клетка *E. coli*	2 000
Хлоропласт из листа шпината	8 000
Клетка печени	20 000

Может возникнуть вопрос: почему живые клетки имеют именно такие размеры? Почему нет клеток, которые были бы значительно меньше или значительно больше известных нам клеток? Оказывается, для этого есть важные причины. Самая маленькая жизнеспособная клетка – микроорганизм *Mycoplasma* – не может быть намного меньше, чем она есть, просто из-за того, что молекулы, из которых она построена, имеют фиксированную величину, задаваемую размерами атомов углерода, водорода, кислорода и азота. Для обеспечения жизнедеятельности клетки необходимо, чтобы она содержала хотя бы минимальное число различных биомолекул. Поэтому, если бы клетки были меньше, они должны были быть построены из более мелких атомов или молекул.

С другой стороны, клетки, вероятно, не могут быть намного больше, чем они

есть, просто потому, что в этом случае скорости метаболических процессов могли бы лимитироваться скоростью диффузии молекул питательных веществ внутри клетки, что ограничило бы возможности регуляции метаболизма. Максимальные размеры клеток зависят, таким образом, от основных законов физики, определяющих скорость диффузии молекул, растворенных в водной среде. Действительно, в наиболее крупных клетках цитоплазма разделена на структуры меньших размеров, клеточные *органеллы*, в значительной мере для того, чтобы облегчить возможность быстрых взаимодействий между специфическими молекулами за счет сокращения пути, который они преодолевают, прежде чем сталкиваются и вступают в реакцию друг с другом. Вполне понятно, что одна из причин, по которой клетки имеют малые размеры, состоит в том, что им приходится обходиться без электрических или механических перемешивающих устройств. Другая причина связана с существованием оптимального соотношения между поверхностью и объемом клеток. Благодаря тому что площадь поверхности клетки относительно велика по сравнению с ее объемом, в клетку проникает большее число молекул питательных веществ в единицу времени. В результате несложных вычислений можно убедиться в том, что с увеличением диаметра сферы отношение площади ее поверхности к объему резко снижается. (Попробуйте сами рассчитать отношения поверхности к объему для сфер диаметром 1, 10 и 100 мкм. Площадь поверхности сферы равна $4\pi r^2$, а ее объем – $4/3\pi r^3$, где r – радиус, а π равно 3,14.)

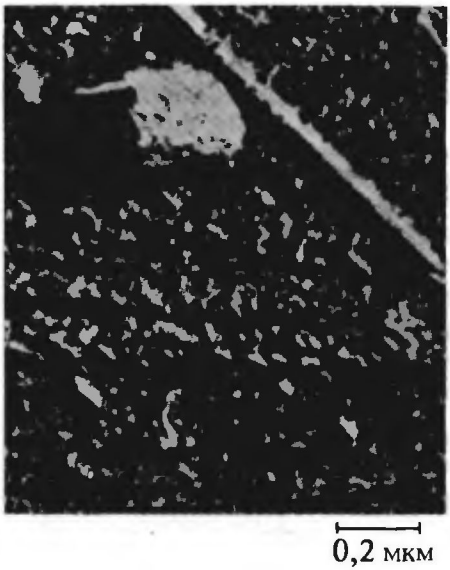


Рис. 2-2. Возраст этого напоминающего бактерию микроископаемого, найденного в Южной Африке при раскопках залежей кремниевых пород, носящих название «черный сланец», составляет около 3,4 миллиардов лет. Это одно из древнейших известных в настоящее время ископаемых получило название *Eobacterium isolatum*, что означает «единственная бактерия на заре (жизни)».
Короткая прямая линия под этой и всеми последующими электронными микрофотографиями характеризует масштаб; 1 мкм составляет 1/10 000 см.

2.3. Существуют два больших класса клеток – прокариотические и эукариотические

Наиболее просто устроенные мельчайшие клетки, имеющие самое древнее происхождение, носят название *прокариоты*; они представлены различными видами одноклеточных микроорганизмов – *бактерий*. Прокариоты были первыми клетками, возникшими в процессе биологической эволюции: ископаемые остатки этих клеток, возраст которых составляет более 3 млрд. лет ($3 \cdot 10^9$), были найдены в древних сланцах в Африке (рис. 2-2), а также в Австралии. *Эукариотические клетки*, возникшие, вероятно, на 1 млрд. лет позднее прокариот, характеризуются значительно большими размерами, более сложной организацией, необычным разнообразием и способностью к дифференцировке. Именно из таких клеток состоят все многоклеточные животные, растения и грибы.

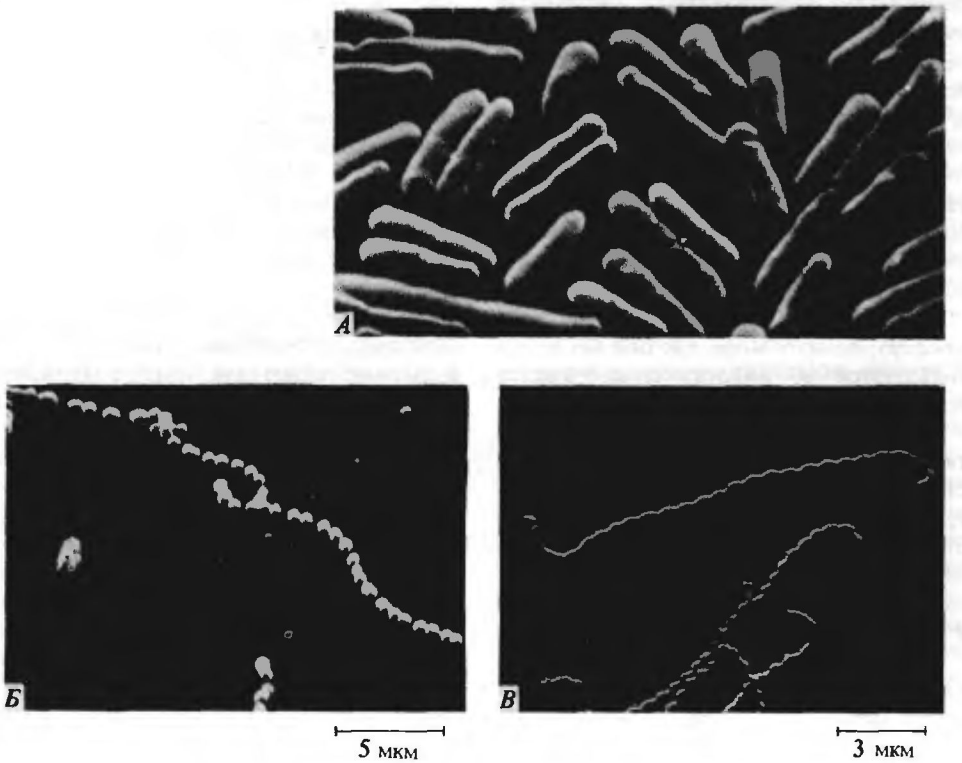
Термины «прокариот» и «эукариот» происходят от греческого слова karyon («орех» или «зерно», т. е. ядро). Прокариот означает «до ядра», а эукариот – с «хорошо оформленным ядром». В прокариотической клетке генетический мате-

риал локализован в довольно неупорядоченном, не окруженном мембраной ядерном тельце, или *нуклеоиде*. Эукариотическая клетка, напротив, содержит высокоорганизованное, очень сложное ядро, окруженное *ядерной оболочкой*, состоящей из двух мембран. Рассмотрим теперь прокариотические и эукариотические клетки несколько подробнее.

2.4. Прокариоты – самые простые и самые мелкие клетки

К прокариотам относятся около 3000 видов бактерий, в том числе организмы, обычно называемые *сине-зелеными водорослями*. Сине-зеленые водоросли составляют особое семейство бактерий, их современное и предпочтительное название – *цианобактерии* («циано» – синий). Особое положение цианобактерий объясняется наличием у них выделяющей кислород фотосинтетической системы, во многом сходной с системой фотосинтеза высших зеленых растений. Некоторые другие классы бактерий также могут осуществлять фотосинтез, однако они не выделяют кислород. Большинство видов бактерий не способны к фотосинтезу и получают энергию за счет расщепления питательных веществ, поступающих из окружающей среды. Существуют 20 различных семейств прокариот, классификация и названия которых основаны на их внешнем виде (рис. 2-3), а также на способности к передвижению, окрашиванию, потреблению определенных пита-

Рис. 2-3. Классификация и названия некоторых прокариот основаны на их внешнем виде. *А*. Бациллы – палочкообразные микроорганизмы, к которым относится *Escherichia coli*, а также патогенные микробы, вызывающие дифтерию, столбняк и туберкулез. *Б*. Кокки – сферические бактерии. Иногда они объединяются, образуя пары (диплококки), группы (стафилококки) или цепочки (стрептококки; показаны на этом рисунке). К коккам относятся бактерии, вызывающие скарлатину, некоторые виды пневмоний и раневые инфекции. *В*. Спирохеты – спиралевидные, часто очень длинные (до 500 мкм) бактерии. На рисунке показаны бактерии длиной от 10 до 15 мкм. К этому классу микроорганизмов относится возбудитель сифилиса.



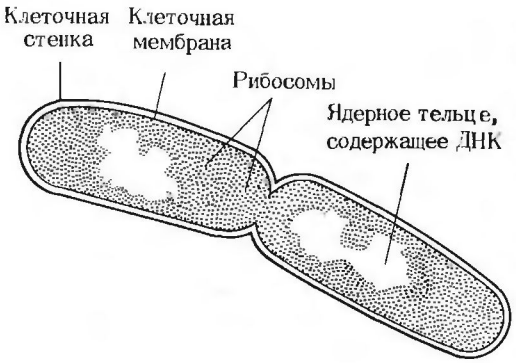
тельных веществ и синтезу определенных продуктов. Некоторые бактерии обладают *патогенными* (болезнетворными) свойствами, однако большинство из них весьма полезны. К прокариотам относятся также семейства очень мелких клеток, обычно паразитирующих внутри других клеток.

Хотя прокариотические клетки не видны невооруженным глазом и менее знакомы нам по сравнению с высшими животными и растениями, они составляют очень существенную часть биомассы Земли. Вероятно, три четверти всей живой материи на Земле приходится на долю микроорганизмов, большинство из которых – прокариоты. Более того, прокариоты играют важную роль в биологических превращениях материи и энергии на Земле. Фотосинтезирующие бактерии, обитающие как в пресной, так и в морской воде, поглощают солнечную энергию и используют ее для синтеза углеводов и других компонентов клеток, которые в свою очередь служат пищей для других организмов. Некоторые бактерии могут фиксировать молекулярный азот (N_2) из атмосферы, образуя биологически полезные азотсодержащие соединения. Таким образом, прокариоты играют роль отправной точки для многих пищевых цепей в биосфере. Кроме того, прокариоты выполняют функцию конечных потребителей, поскольку различные бактерии осуществляют расщепление органических структур в мертвых растениях и животных, возвращая тем самым конечные продукты распада в атмосферу, почву и моря, где они вновь используются в биологических циклах углерода, азота и кислорода.

Прокариотические клетки представляют исключительную ценность для исследований в области биохимии и молекулярной биологии, так как они несложны по своей структуре, их можно легко и быстро выращивать в больших количествах, а механизмы репродукции и передачи генетической информации у них относительно просты. В оптимальных условиях при 37°C в простой питательной среде, содержащей глюкозу, соли аммония и неорганические вещества, бактерии делятся каждые 20–30 мин. Другая важная особенность прокариотических клеток – это их способность размножаться очень простым способом – неполовым путем. Клетки растут до тех пор, пока их размеры не увеличатся вдвое, после чего делятся на две идентичные дочерние клетки, каждая из которых получает одну из двух копий генетического материала (ДНК) родительской клетки. Прокариотические клетки содержат только одну хромосому, представляющую собой двухцепочечную молекулу ДНК. Кроме того, можно легко индуцировать образование генетических мутантов прокариот, а затем выращивать их. Благодаря всем этим свойствам бактерии сыграли важную роль в формировании наших представлений об основных молекулярных процессах, обеспечивающих передачу генетической информации.

2.5. *Escherichia coli* – самая известная из прокариотических клеток

Escherichia coli (рис. 2.4) – типичная непатогенная бактерия, обитающая в желудочно-кишечном тракте людей и многих высших животных. Эта бактерия исследована наиболее полно из всех прокариотических, а возможно, и любых других клеток. Длина клеток *E. coli* составляет около 2 мкм, а диаметр – немного меньше 1 мкм. Клетки *E. coli* защищены клеточной стенкой, с внутренней стороны которой расположена тонкая клеточная мембрана, ограничивающая цитоплазму и ядерное тельце (нуклеоид), содержащее одну молекулу двухцепочечной ДНК в виде очень длинной замкнутой петли, часто называемой *кольцом*. Молекула ДНК *E. coli* почти в 1000 раз длиннее самой клетки и, следовательно, должна быть очень плотно упакована, чтобы поместиться внутри нуклеоида, длина которого не превышает 1 мкм. Как и у всех остальных прокариот, генетический материал у *E. coli* не окружен мембраной. Помимо основной молекулы ДНК, расположенной в нуклеоиде, в цитоплазме большинства бактерий содержатся очень



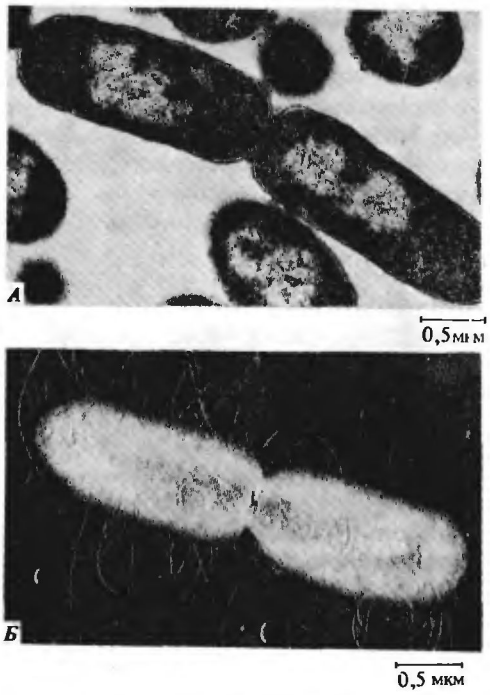


Рис. 2-4. Два изображения клеток *E. coli*. *А*. Электронная микрофотография тонкого среза. В центре видны две клетки, которые только что завершили деление, но еще не разошлись. Светлые участки в центре каждой клетки – ядреные тельца, или нуклеоиды, содержащие ДНК. Очень темные гранулы в цитоплазме – рибосомы. *Б*. Электронная микрофотография поверхности клеток *E. coli*, на которой видны пили и жгутики.

мелкие кольцевые фрагменты ДНК – *плазмиды*. В дальнейшем мы увидим, что изучение этих не связанных с основной молекулой ДНК полунезависимых генетических элементов привело в наши дни к новым важным достижениям в области генетической биохимии и инженерии.

Внешняя клеточная стенка *E. coli* покрыта чехлом, или капсулой, из слизистого вещества. Через чехол проходят наружу короткие, похожие на волоски структуры, называемые *пилями*, функция которых пока не совсем понятна. Штаммы *E. coli* и других бактерий, способных к передвижению, имеют также один или несколько длинных *жгутиков*, играющих роль пропеллеров при перемещении бактерий в водной среде. Жгутики бактерий представляют собой тонкие, жесткие, изогнутые стерженьки с поперечным сечением 10–20 нм. Они прикрепляются к расположенной на внутренней стороне мембраны структуре, напоминающей автоматическую трансмиссию, которая обеспечивает вращение жгутиков. Мембрана клетки – это очень тонкий двойной слой (бислой) липидных молекул, пронизанный белками. Клеточная мембрана обладает избирательной проницаемостью и содержит белки, способные транспортировать питательные вещества внутрь клетки, а продукты распада – из клетки во внешнюю среду. В клеточной мембране большинства прокариот присутствуют также важные белки, переносящие электроны и превращающие энергию окислительных процессов в химическую энергию АТР. Внутренние мембраны фотосинтезирующих бактерий, происходящие из плазматической мембраны, содержат хлорофилл и другие фоточувствительные пигменты (рис. 2-5).

В цитоплазме *E. coli* встречается ряд гранулообразных структурных элементов. Наиболее заметные из них – это интенсивно прокрашивающиеся *рибосомы*, диаметр которых у прокариот составляет около 18 нм. Рибосомы, в состав которых входят рибонуклеиновая кислота и многочисленные белковые молекулы, осуществляют синтез клеточных белков. Рибосомы часто собираются в группы, называемые *полирибосомами*, или *полисомами*. В цитоплазме многих бактерий

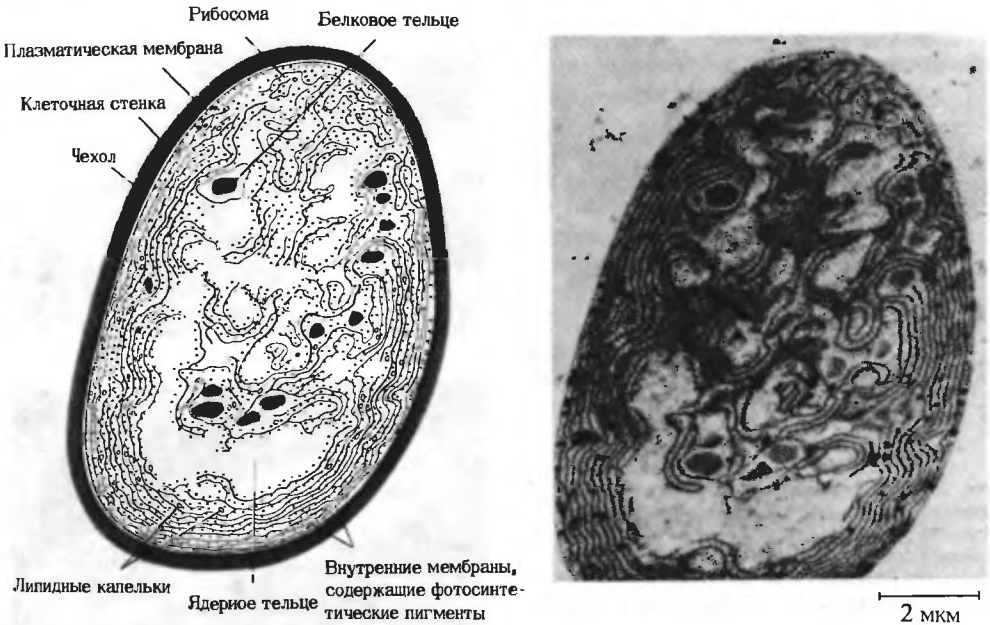


Рис. 2-5. Электронная микрофотография сине-зеленой водоросли (или цианобактерии) *Anabaena azollae*. Многочисленные внутренние мембраны образованы из плазматической мембраны; они содержат хлорофилл и другие фотосинтетические пигменты. Цианобактерии часто объединяются друг с другом, образуя длинные цепочки или нити.

присутствуют также *гранулы*, содержащие запасенные питательные вещества: в одних случаях – это крахмал, а в других – жиры. *Цитозоль* – водная фаза цитоплазмы – содержит в растворенном виде многие ферменты, молекулы, играющие роль строительных блоков и предшественников макромолекул, а также различные неорганические соли.

Даже у простой бактерии мы видим примитивное разделение труда внутри клетки. Клеточная стенка служит пограничным барьером, обеспечивающим защиту клетки. Клеточная мембрана транспортирует питательные вещества внутрь клетки и ненужные продукты из нее наружу, а также запасает химическую энергию в виде АТР. В цитоплазме протекает целый ряд ферментативных реакций, приводящих к образованию многих компонентов клетки; рибосомы производят белки, а ядерное тельце участвует в сохранении и передаче генетической информации.

Хотя прокариоты относительно просты и невелики по сравнению с эукариотическими клетками, некоторые из них способны к проявлению поразительно сложных видов активности. Например, многим бактериям свойствен *хемотаксис*. Для таких бактерий оказываются привлекательными определенные химические соединения, особенно питательные вещества, и в их присутствии бактерии перемещаются по направлению к ним; напротив, токсические вещества отталкивают бактерии, и они движутся в противоположную сторону. Таким образом, бактерии обладают примитивной сенсорной системой, передающей сигналы их жгутикам, с помощью которых клетки движутся либо в сторону того или иного аттрактанта, либо в противоположную сторону от репеллента (рис. 2-6). Бактерии обладают также примитивной памятью.

Клетки некоторых видов прокариот имеют тенденцию объединяться в группы или располагаться в виде нитей. Такие образования создают впечатление примитивных многоклеточных организмов; однако известно, что истинные



Рис. 2-6. Хемотаксис у бактерий. Подвижные бактерии могут чувствовать незначительные концентрационные градиенты и «плыть» в направлении к аттрактантам типа питательных веществ. С помощью одного или нескольких жгутиков клетка перемещается по прямолинейным траекториям, прерываемым «кувыркающимися» движениями. Бактерия движется к аттрактанту (или от репеллента) не по прямому, а по извилистому пути.

многоклеточные организмы состоят только из эукариотических клеток.

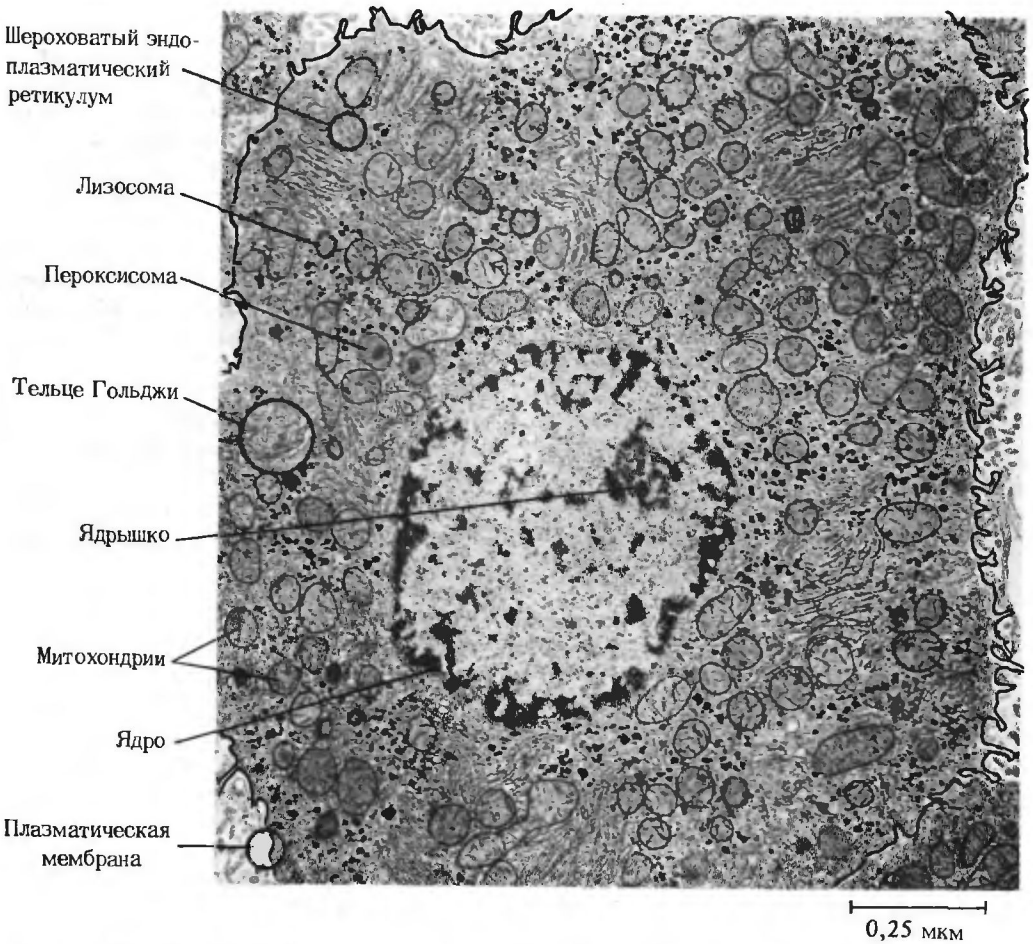
2.6. Эукариотические клетки крупнее и сложнее прокариотических

Типичные эукариотические клетки значительно крупнее, чем прокариоты. Например, гепатоциты, основные клетки печени высших животных, имеют диаметр 20–30 мкм, тогда как диаметр бактерий не превышает 1–2 мкм. Однако важен не столько линейный размер клеток, сколько их объем, который у большинства эукариотических клеток в 1000–10 000 раз больше, чем у бактерий. Чтобы приблизительно представить себе относительные объемы эукариотических и прокариотических клеток, можно воспользоваться формулой для определения объема сферы (разд. 2.2). У некоторых эукариотических клеток, например у неоплодотворенного куриного яйца, размеры намного больше указанных выше, хотя почти весь объем такой клетки заполнен питательными веществами, необходимыми для роста эмбриона. Есть также необычайно длинные эукариотические клетки: так, длина отдельных двигательных нейронов человека может превышать 1 м. Однако наиболее характерная особенность эукариотических клеток – это наличие оформленного, окруженного парой мембран ядра со сложной внутренней структурой. Подобно прокариотам, эукариотические клетки также могут делиться неполовым путем, но это происходит с помощью значительно более сложного процесса, называемого *митозом*. Половые клетки (гаметы) эукариотических организмов способны к сложной половой конъюгации, сопровождаемой обменом генами.

Еще одно важное различие между эукариотами и прокариотами состоит в том, что эукариотические клетки, кроме организованного ядра, содержат целый ряд других ограниченных мембранами внутриклеточных органелл, таких, как *митохондрии, эндоплазматический ретикулум* и *тельца Гольджи*. Каждая из этих органелл выполняет специфические функции в метаболизме и жизнедеятельности клетки. На рис. 2-7 показана типичная эукариотическая клетка – клетка печени крысы, имеющая необычайно сложное внутреннее строение с высокой степенью компартментации. Как мы увидим в дальнейшем, эукариотическим клеткам свойственно более тонкое разделение функций между содержащимися в них многочисленными структурными элементами, каждый из которых играет специфическую роль в жизнедеятельности клетки.

Все высшие животные, растения и грибы состоят только из эукариотических клеток. К эукариотам относятся также многие одноклеточные организмы – различные виды простейших, диатомовые водоросли, эвгленовые, дрожжи и миксомицеты.

Благодаря тому что эукариотические клетки содержат значительно больше ге-



нетического материала и часто претерпевают половую конъюгацию, при которой может происходить обмен генами, эукариотические формы жизни в большей степени способны к дифференцировке и специализации по сравнению с прокариотами. Именно этим объясняется тот факт, что существуют миллионы различных видов эукариотических организмов, тогда как число видов прокариот не превышает нескольких тысяч. С другой стороны, прокариотические организмы значительно лучше переносят изменения условий внешней среды и существенно быстрее размножаются, что позволяет им выживать в весьма неблагоприятных условиях.

Рассмотрим теперь более детально строение и функции различных компонентов эукариотических клеток.

Рис. 2-7. Микрофотография крысиного гепатоцита (клетки печени основного типа), полученная методом трансмиссионной электронной микроскопии. Красным цветом выделена плазматическая мембрана, обладающая большой площадью поверхности и образующая многочисленные складки. Эти пальцеобразные выросты клеточной мембраны, благодаря которым значительно увеличивается площадь ее поверхности, более четко видны на микрофотографии изолированного гепатоцита, полученной методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2-20).

2.7. Ядро эукариот — это очень сложная структура

В ядре содержится почти вся ДНК эукариотической клетки. Как в животных клетках (рис. 2-7), так и в растительных (рис. 2-8) ядро окружено *ядер-*

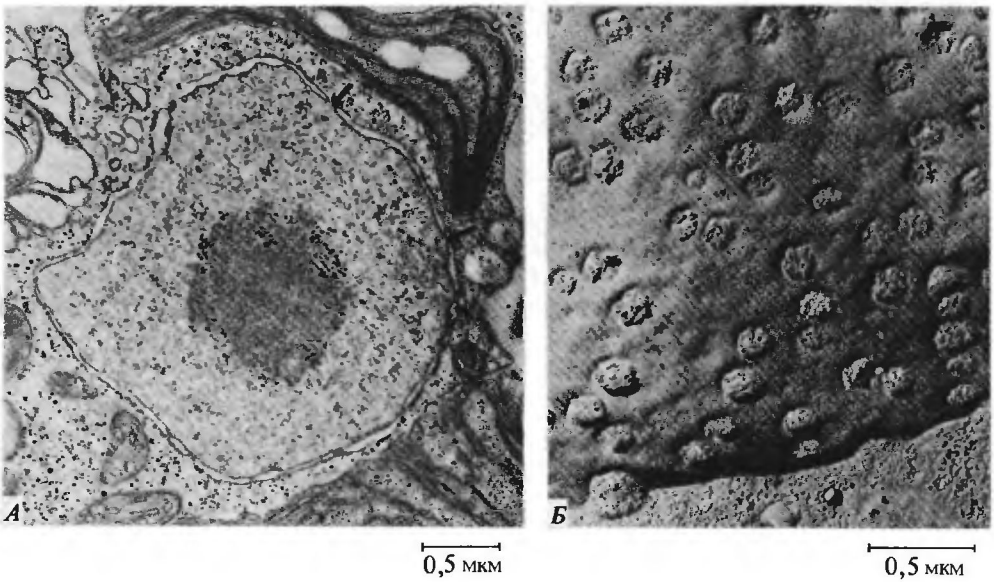


Рис. 2-8. *А*. Электронная микрофотография хорошо сформировавшегося ядра эукариотической водоросли *Chlamydomonas*. Темное тельце в центре ядра – это ядрышко, место образования основных компонентов рибосом. По периферии ядрышка можно видеть частично сформировавшиеся рибосомы. Ядерная оболочка состоит из двух тесно прилегающих друг к другу мембран с ядерными порами; две из них показаны стрелками. *Б*. Поверхность ядерной оболочки с многочисленными ядерными порами. Через поры можно увидеть внутреннее содержимое ядра. Эта микрофотография получена методом замораживания – скалывания.

ной оболочкой, состоящей из двух близко расположенных друг к другу мембран, разделенных узким пространством. Через определенные интервалы обе мембраны ядерной оболочки сливаются друг с другом, образуя отверстия с диаметром около 90 нм – *ядерные поры*. Через эти отверстия происходит обмен различными веществами между ядром и цитоплазмой.

Внутри ядра находится *ядрышко* (рис. 2-8), которое прокрашивается более интенсивно благодаря высокому содержанию в нем рибонуклеиновой кислоты (РНК). Ядрышко служит «фабрикой» РНК; здесь же осуществляются первые этапы синтеза рибосом.

В остальной части ядра содержится *хроматин*, названный так за его способность окрашиваться характерным образом (рис. 2-7 и 2-8). Хроматин состоит из ДНК, РНК и ряда специфических белков. В промежутках между делениями клеток хроматин распределяется случайным образом по всему ядру, а непосредственно перед делением собирается в дискретные гранулярные тельца – *хромосомы*. Эукариотические клетки данного вида содержат строго определенное число хромосом; например, в соматических клетках человека имеется 46 хромосом. После репликации образовавшиеся дочерние хромосомы расходятся и попадают в дочерние клетки в результате весьма сложной последовательности событий – *митоза*. Наиболее важные стадии митоза показаны на рис. 2-9. После завершения митоза хроматин вновь распределяется по всему ядру.

Таким образом, хорошо оформленное ядро эукариотической клетки имеет очень сложную структуру и выполняет значительно более сложные биологические функции по сравнению с относительно простым ядерным тельцем прокариот.

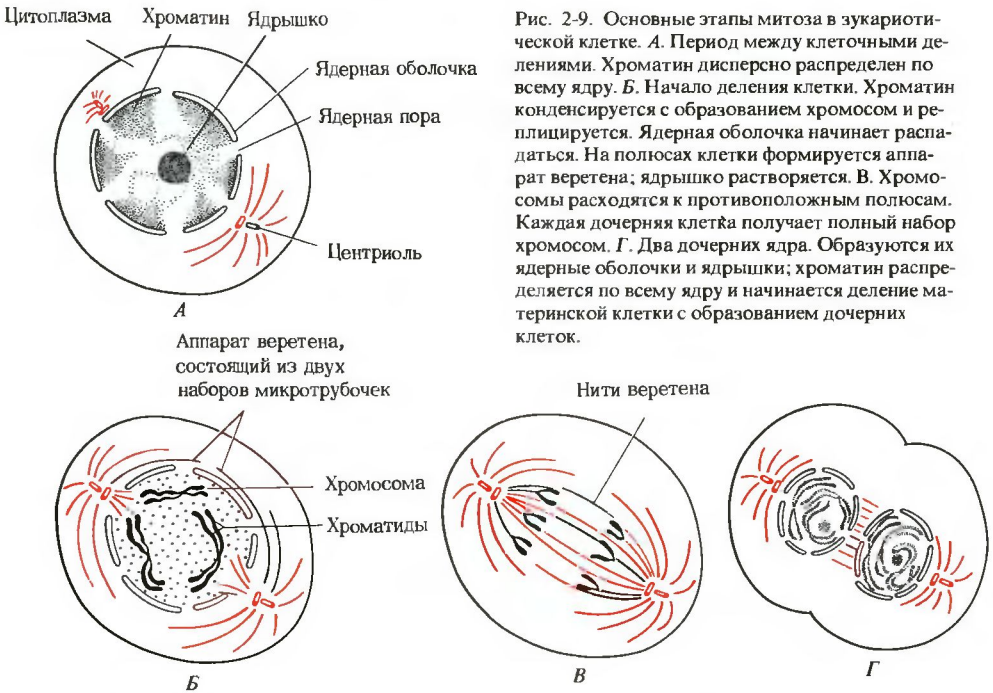


Рис. 2-9. Основные этапы митоза в эукариотической клетке. *А*. Период между клеточными делениями. Хроматин диспергно распределен по всему ядру. *Б*. Начало деления клетки. Хроматин конденсируется с образованием хромосом и реплицируется. Ядерная оболочка начинает распадаться. На полюсах клетки формируется аппарат веретена; ядрышко растворяется. *В*. Хромосомы расходятся к противоположным полюсам. Каждая дочерняя клетка получает полный набор хромосом. *Г*. Два дочерних ядра. Образуются их ядерные оболочки и ядрышки; хроматин распределяется по всему ядру и начинается деление материнской клетки с образованием дочерних клеток.

2.8. Митохондрии – «силовые установки» эукариотических клеток, поставляющие энергию

Весьма заметное место в цитоплазме эукариотических клеток занимают *митохондрии* (рис. 2-10). Размеры, внешний вид, число митохондрий, а также место их локализации могут варьировать в очень широких пределах в зависимости от вида клеток. В каждой клетке печени крысы содержится около 1000 митохондрий. Их диаметр составляет примерно 1 мкм, т. е. по своим размерам митохондрии мало отличаются от бактериальных клеток. Эукариотические клетки некоторых типов, например сперматозоиды или дрожжевые клетки, содержат всего лишь несколько очень крупных митохондрий, тогда как другие, например куриной яйцо,– много тысяч митохондрий. Иногда митохондрии образуют сильно разветвленные структуры и занимают значительную часть объема цитоплазмы.

Каждая митохондрия имеет две мембранные системы. Гладкая внешняя мембрана полностью окружает всю митохондрию. Внутренняя же мембрана образует выступающие внутрь митохондрии складки – *кристы*. В митохондриях печени число крист сравнительно невелико, тогда как в сердечных клетках имеется очень много крист, причем они располагаются параллельно друг другу. Внутреннее пространство митохондрий заполнено гелеподобным веществом – *матриксом*.

Митохондрии выполняют в клетке функцию «силовых установок», поставляющих энергию. В них содержится большое число ферментов, которые сообща катализируют окисление органических питательных веществ клетки молекулярным кислородом до двуокиси углерода и воды. Одни из этих ферментов находятся в матриксе, другие – во внутренней мембране. В процессе окисления выделяется большое количество энергии, которая используется для образования *аденозинтрифосфата* (АТР) – главной молекулы, запасающей энергию в клетке. Образованные в митохондриях молекулы АТР диффундируют во все части клетки, где используются для выполнения необходимой работы.

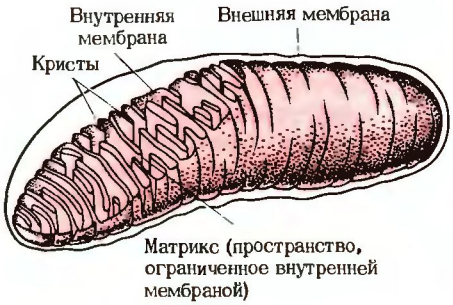




Рис. 2-10. Структура митохондрий. Название митохондрий происходит от греческих слов "mitos" – нить и "chondros" – зерно или семя. В некоторых клетках митохондрии имеют вытянутую, почти нитевидную форму, однако в большинстве случаев для них характерна эллиптическая или сферическая форма. На приведенной здесь электронной микрофотографии митохондрии из клетки поджелудочной железы видна гладкая внешняя мембрана и многочисленные складки внутренней мембраны – кристы.

В митохондриях содержится небольшое количество ДНК, а также РНК и рибосомы. Митохондриальная ДНК кодирует синтез некоторых специфических белков внутренней мембраны. Может возникнуть вопрос: почему в митохондриях содержится ДНК? Этот вопрос привел к созданию интересной концепции, согласно которой митохондрии возникли в ходе эволюции путем вторжения в цитоплазму крупных прокариотических анаэробных клеток других прокариотических клеток меньшего размера, способных использовать молекулярный кислород для окисления питательных веществ (рис. 2-11). Вторгнувшиеся бактерии стали, таким образом, паразитами в клетках-хозяевах. В ходе дальнейшей эволюции эти взаимоотношения приобрели со временем характер симбиоза, выгодного как для хозяина, так и для паразита. Сейчас мы знаем, что во время деления клетки митохондрии тоже делятся. Таким образом, не исключено, что ДНК и рибосомы митохондрий – это потомки ДНК и рибосом тех мелких бактерий, которые когда-то вторглись в клетку.

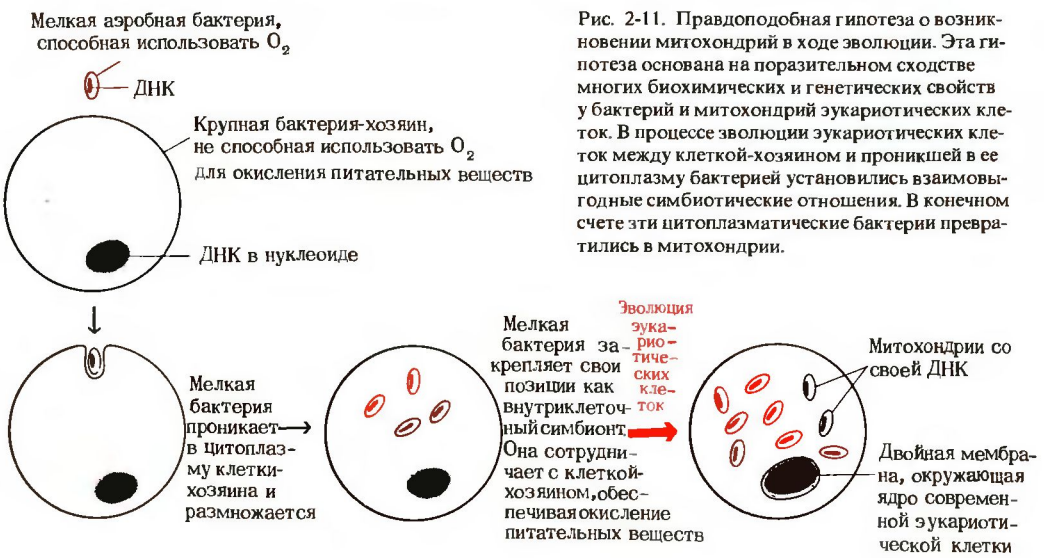
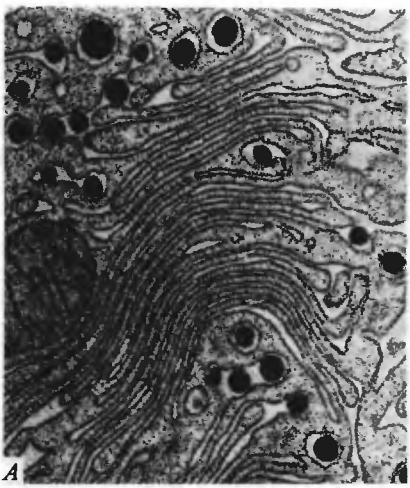
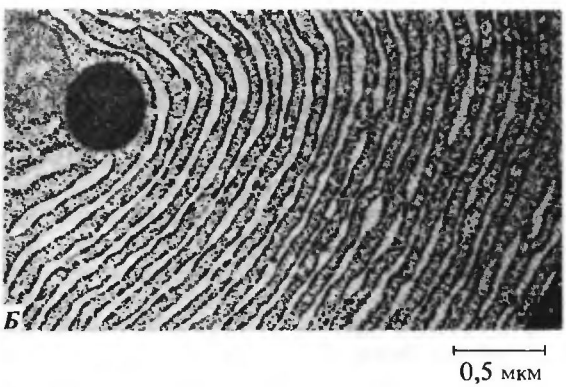


Рис. 2-11. Правдоподобная гипотеза о возникновении митохондрий в ходе эволюции. Эта гипотеза основана на поразительном сходстве многих биохимических и генетических свойств у бактерий и митохондрий эукариотических клеток. В процессе эволюции эукариотических клеток между клеткой-хозяином и проникшей в ее цитоплазму бактерией установились взаимовыгодные симбиотические отношения. В конечном счете эти цитоплазматические бактерии превратились в митохондрии.

2.9. Эндоплазматический ретикулум образует каналы в цитоплазме

В цитоплазме практически всех эукариотических клеток имеется очень сложный трехмерный лабиринт мембранных каналов – *эндоплазматический ретикулум*, многочисленные складки и разветвления которого заполняют всю цитоплазму (рис. 2-12). Пространства внутри эндоплазматического ретикулума, называемые *цистернами*, используются в качестве каналов, по которым осуществляется транспорт различных веществ, как правило, из клетки во внешнюю среду. Однако в некоторых клетках цистерны служат хранилищами запасенных питательных веществ. Существуют два типа эндоплазматического ретикулума: *шероховатый* и *гладкий*. Наружная поверхность мембраны шероховатого эндоплазматического ретикулума усеяна рибосомами, тогда как в гладком эндоплазматическом ретикулуме рибосом нет. Рибосомы, связанные с шероховатым эндоплазматическим ретикулумом, участвуют в биосинтезе белков, которые либо временно остаются в клетке, либо сразу же выводятся из нее. Белки, синтезированные на связанных с мембраной рибосомах, проталкиваются через мембрану внутрь цистерн, откуда в конечном счете выводятся во внеклеточное пространство. Эндоплазматический ретикулум играет также какую-то роль в биосинтезе липидов. В эукариотических клетках различных типов он различается по форме и выполняет разные функции. Так, в клетках скелетных мышц, сокращение которых стимулируется ионами Ca^{+}, эндоплазматический ретикулум участвует в процессе расслабления, обеспечивая реабсорбцию ионов Ca^{2+}.





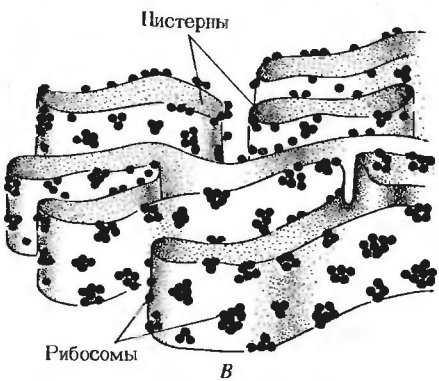


Рис. 2-12. *А*. Эндоплазматический ретикулум (шероховатый) клетки поджелудочной железы Клетки этого типа очень активно синтезируют белки на рибосомах, прикрепленных к внешней поверхности мембраны, а затем секретируют их в цистерны. Слева видна часть митохондрии. *Б*. Отдельные рибосомы и цистерны при большем увеличении. *В*. Схема, иллюстрирующая трехмерную структуру эндоплазматического ретикулума. Видно, как из узких цистерн формируются сплошные лабиринтоподобные каналы, пронизывающие значительную часть цитоплазмы клетки.

2.10. Тельца Гольджи – секреторные органеллы

Почти все эукариотические клетки содержат характерные скопления окруженных мембранами пузырьков, называемые *тельцами Гольджи* (рис. 2-13). Такое название они получили в честь итальянского цитолога Камилло Гольджи, впервые описавшего эти образования в конце XIX в. В эукариотических клетках различных типов тельца Гольджи имеют разную форму, однако наиболее характерна стопкообразная структура, состоящая из уплощенных пузырьков, каждый из которых окружен одиночной мембраной. От краев пузырьков больших размеров отпочковываются сферические пузырьки гораздо меньших размеров.

В тельца Гольджи из эндоплазматического ретикулума поступает ряд клеточных продуктов; здесь они «пакуются» в секреторные пузырьки, которые затем перемещаются к внешней плазматической мембране и сливаются с ней. Слившиеся с мембраной пузырьки могут в дальнейшем разрываться, высвобождая свое содержимое во внеклеточную среду; этот процесс, называемый *экзоцитозом*, часто используется для транспортировки готовых компонентов внешней клеточной стенки из внутренней части клетки, где они синтезируются, к внешней, где они присоединяются к растущей клеточной стенке.

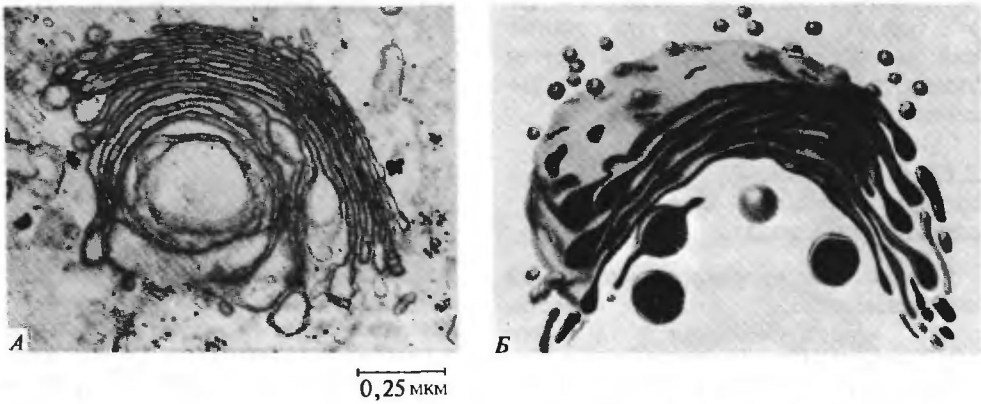


Рис. 2-13. *А*. Тельце Гольджи в цитоплазме амебы. Мелкие сферические пузырьки отщепляются от краев более крупных уплощенных пузырьков. *Б*. Рисунок, показывающий пространственное строение тельца Гольджи.

2.11. Лизосомы – контейнеры с гидролитическими ферментами

Лизосомы – это окруженные мембраной сферические пузырьки, встречающие-

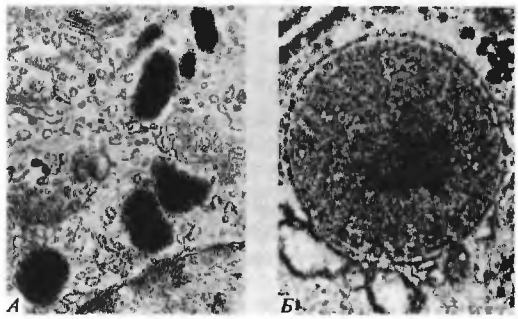


Рис. 2-14. Лизосомы и пероксисомы – это «мешки» с ферментами. *А*. Часть клетки коры надпочечника. Темные овальные тельца различной формы – это лизосомы. По своим размерам они меньше митохондрий. Лизосомы содержат более 40 гидролитических ферментов; кроме того, в них иногда обнаруживаются складки «излишней» мембраны, в которых находятся белки и другие компоненты клетки. *Б*. Пероксисома. Кристаллическое вещество – это уратоксидаза, один из нескольких содержащихся в пероксисомах ферментов, образующих перекиси.

ся в цитоплазме клетки (рис. 2-14). Размеры их варьируют, но, как правило, не превышают размеров митохондрий. Лизосомы содержат много различных ферментов, способных переваривать, т.е. расщеплять путем гидролиза, уже ненужные клеточные белки, полисахариды и липиды. Поскольку такие ферменты могут разрушить и остальное содержимое клетки, они заключены в лизосомы. Белки и другие компоненты, которые необходимо разрушить, избирательно переносятся внутрь лизосом, где подвергаются гидролитическому расщеплению до простейших составных частей, поступающих затем обратно в цитоплазму. У людей с наследственной *болезнью Тея–Сакса* в лизосомах нет ряда ферментов, гидролизующих липиды, в результате чего некоторые из этих соединений накапливаются в мозгу и других тканях, что приводит к задержке умственного развития.

2.12. Пероксисомы – пузырьки, разрушающие перекись водорода

Еще один тип окруженных мембраной цитоплазматических органелл представляют *пероксисомы* (рис. 2-14). Эти структуры, известные также под названием *микротельца*, несколько крупнее лизосом, имеют одиночную внешнюю мембрану и содержат большое количество белка, часто в кристаллическом виде. Внутри этих структур заключены ферменты, образующие и использующие перекись водорода, откуда и происходит их название – пероксисомы. Необычайно токсичная для клеток перекись водорода (H_2O_2) расщепляется в пероксисомах на воду и кислород под воздействием еще одного содержащегося в них фермента – *каталазы*. Благодаря тому что ферменты, образующие перекись водорода, и каталаза локализованы внутри пероксисом, остальное содержимое клетки защищено от разрушающего воздействия перекисей.

2.13. Микрофиламенты участвуют в сократительных процессах клеток

Исследования, проведенные методом электронной микроскопии с высокой разрешающей способностью, показали, что в цитоплазме большинства эукариотических клеток содержатся многочисленные *нити*, или *филаменты*, состоящие из последовательно соединенных друг с другом белковых молекул. Существуют три класса таких нитей, различающихся по

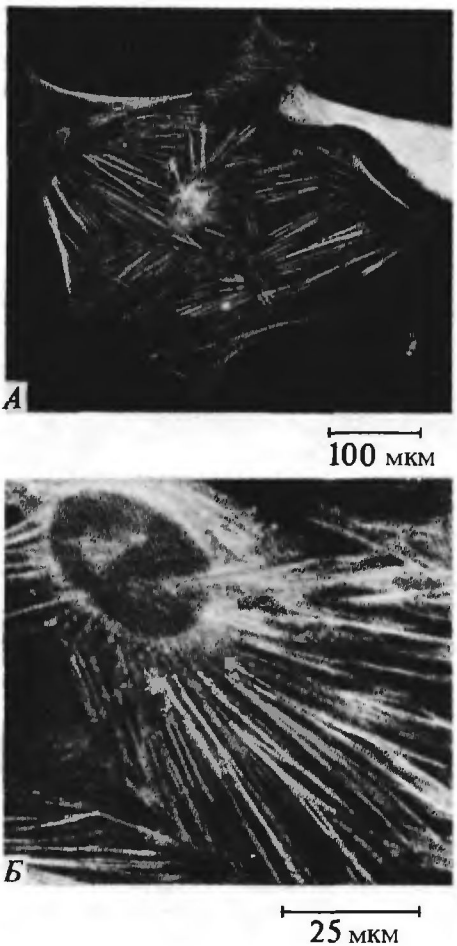


Рис. 2-15. Актиновые и миозиновые нити в фибробластах – специализированных клетках соединительной ткани. *А*. Тонкие актиновые нити, выявленные с помощью флуоресцентного маркера. *Б*. Миозиновые нити, расположенные около ядра.

диаметру, составу и функциям. Наиболее тонкие из них – *микрофиламенты* (*микронити*) имеют диаметр около 5 нм (рис. 2-15). Часто они образуют напоминающие паутину сплетения непосредственно под клеточной мембраной. Было показано, что микрофиламенты идентичны тонким *актиновым нитям* сократительного аппарата скелетной мышцы. Микронити участвуют в создании напряжения, возникающего при сокращении мышцы, образовании складок или выпячиваний клеточной мембраны, а также при перемещении различных структур внутри клеток.

Второй тип нитей в эукариотических клетках – это миозиновые нити, которые намного толще актиновых (рис. 2-15). Миозиновые нити – основной компонент сократительного аппарата скелетной мышцы, однако они встречаются и в немышечных клетках, часто в ассоциации с тонкими актиновыми нитями. В клетках некоторых типов миозиновые нити прикреплены к клеточной мембране. Актиновые и миозиновые нити связаны с различными видами клеточных и внутриклеточных передвижений.

Нити третьего типа еще толще, их диаметр составляет около 10 нм. Такие нити обнаруживаются во многих клетках и имеют разные названия.

2.14. Микротрубочки также связаны с клеточными движениями

Многие эукариотические клетки, в частности длинные клетки нервной системы животных, содержат *микротрубочки* диаметром около 25 нм (рис. 2-16). Каждая микротрубочка состоит из 13 плотно упакованных нитей белковых молекул, расположенных вокруг полой сердцевины. В нервных клетках пучки микротрубочек участвуют в транспорте веществ из тела клетки к концам клеточных отростков – *аксонов*. Микротрубочки выполняют много функций. Например, при их участии осуществляется работа митотического веретена во время деления клеток; они играют также роль двигательных элементов в ворсинках и жгутиках эукариот.

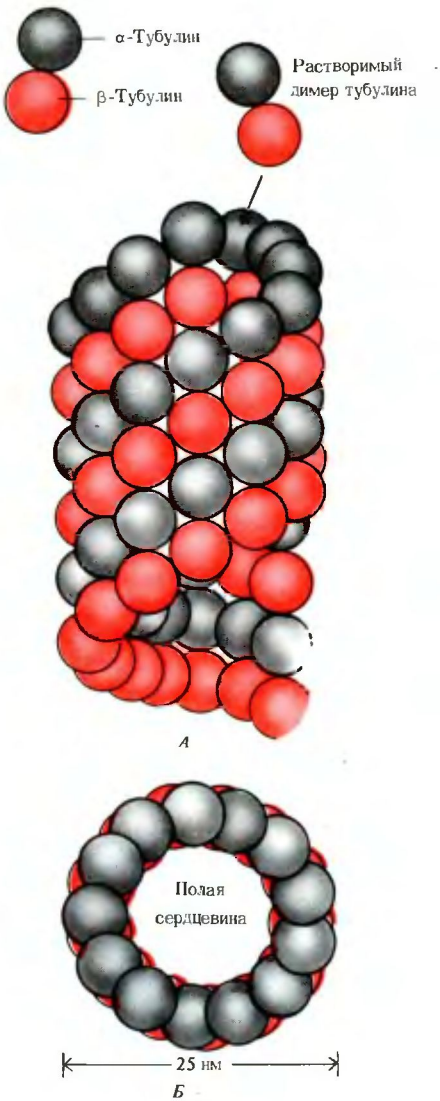


Рис. 2-16. Микротрубочки. Эти длинные полые структуры выполняют множество функций в клетке. Они придают клеткам форму, участвуют в клеточном делении (рис. 2-9) и транспорте веществ, играют роль подвижных структурных компонентов ресничек и жгутиков (рис. 2-18) в эукариотических клетках и образуют часть цитоскелета (рис. 2-17). *А*. Строение микротрубочки. Она собрана из комплексов двух белков – α- и β-тубулина. Эти белки образуют 13 вертикальных нитей, расположенных в виде спирали вокруг полой сердцевины. Диаметр и шаг спирали несколько варьируют у разных клеток. *Б*. Поперечное сечение микротрубочки, на котором 13 вертикальных нитей видны с торца.

2.15. Микрофиламенты, микротрубочки и микротрабекулярная сеть образуют цитоскелет

Во многих эукариотических клетках микрофиламенты различных типов и микротрубочки в совокупности образуют гибкий каркас, получивший название *цитоскелета*. Недавно был открыт третий компонент цитоскелета – *микротрабекулярная сеть* (см. фотографию перед началом данной главы). Эта структура была обнаружена при помощи высоковольтного электронного микроскопа, обладающего очень высокой разрешающей способностью. До применения этого метода микротрабекулярную сеть удавалось наблюдать только в виде неразрешаемого фона, названного *основным веществом* цитоплазмы. Микротрабекулярная сеть состоит из очень тонких переплетающихся нитей, химический состав которых пока неизвестен, но в них почти наверняка содержатся белки. Точная трехмерная организация и функция микротрабекулярной сети в различных клетках в настоящее время активно исследуются.

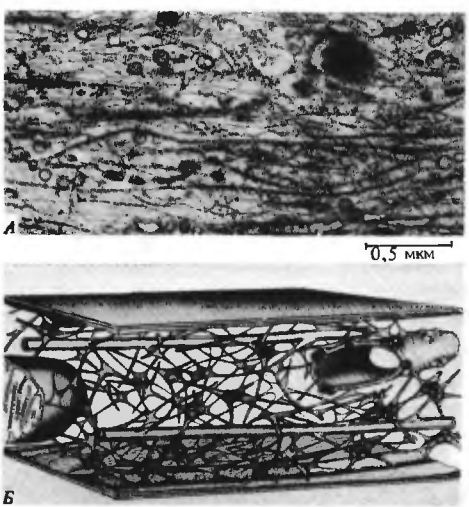
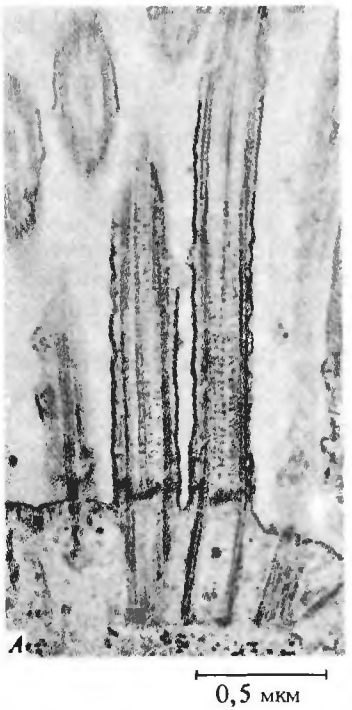


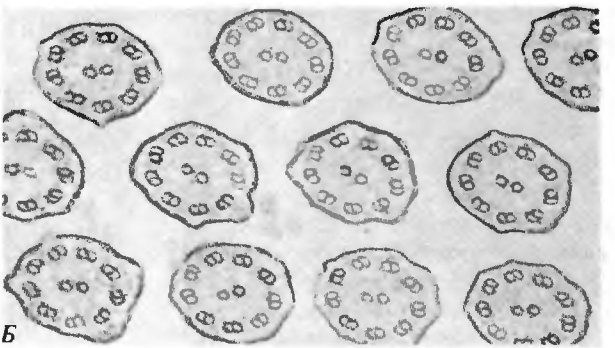
Рис. 2-17. *А*. Электрониая микрофотография волокнистого цитоскелета фибробласта. *Б*. Схематическое изображение цитоскелета фибробласта. Длинные трубки – это микротрубочки, а более тонкие элементы – микрофиламенты различных типов.

Цитоскелет придает клеткам их характерный внешний вид и форму, служит местом прикрепления внутриклеточных органелл и различных телец, фиксируя их местоположение в клетке, а также обеспечивает возможность взаимосвязи между составными частями клетки. Цитоскелет следует рассматривать не как жесткий постоянный каркас клетки, а как подвижную, изменяющуюся во времени структуру. Микротрубочки, например, постоянно собираются из их составных частей и вновь распадаются. Строение цитоскелета фибробласта человека схематически показано на рис. 2-17.

2.16. Реснички и жгутики позволяют клеткам передвигаться

Реснички и жгутики – подвижные структуры, или отростки, выступающие с поверхности многих одноклеточных эукариот и некоторых клеток животных (но не растений), построены по одному общему архитектурному плану (рис. 2-18). Важно, однако, подчеркнуть, что жгутики эукариот очень сильно отличаются от жгутиков прокариот. Жгутики прокариот намного тоньше (10–20 нм) и состоят из отдельных белковых нитей. Они представляют собой упругие, изогнутые стерженьки, вращательное движение которых целиком зависит от расположенных в клеточной мембране «моторов». Жгутики эукариот гораздо толще (200 нм), имеют более сложную структуру и способны самостоятельно вращаться по всей своей длине. Реснички и жгутики эукариот окружены выступами клеточной мембраны и содержат по 9 пар микротрубочек, расположенных вокруг 2 центральных трубочек; при этом образуется так называемая *структура* $9+2$ (рис. 2-18). Реснички и жгутики имеют одинаковый диаметр, но длина ресничек (не превышающая 10 мкм) значительно меньше длины жгутиков (не более 200 мкм). В большинстве случаев реснички служат для того, чтобы передвигать вещества вдоль поверхности клетки с помощью волнообразных, напоминающих гребню движений, тогда как жгутики действуют как пропеллеры, проталкиваю-





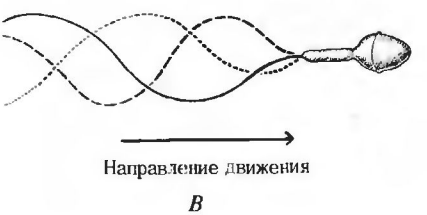


Рис. 2-18. Реснички и жгутики имеют одинаковое строение, но реснички значительно короче. Пары микротрубочек окружены выступающими за пределы клетки цитоплазмой и клеточной мембраной. Скольжение и закручивание микротрубочек относительно друг друга, стимулированные АТР, вызывают волнообразные движения жгутиков. *А*. Параллельно расположенные микротрубочки ресничек на продольном срезе. *Б*. Поперечный срез ресничек. Видна структура 9 + 2, образованная девятью парами или девятью двойными микротрубочками, расположенными вокруг двух центральных трубочек. *В*. Принцип действия жгутика сперматозоида, проталкивающего вперед всю клетку.

щие клетку вперед. Сперматозоиды животных имеют один длинный жгутик (рис. 2-18). Движения ресничек и жгутиков обусловлены сложными скользящими перемещениями отдельных микротрубочек относительно друг друга внутри структуры 9 + 2.

Скольжение нитей или микротрубочек относительно друг друга за счет энергии АТР – это процесс, лежащий в основе сокращения скелетной мышцы, вращательных движений ресничек и жгутиков, а также образования характерных выпячиваний, углублений и складок при движении клеточной мембраны, что наблюдается, например, у амебы.

2.17. В цитоплазме содержатся также гранулярные тельца

В цитоплазме эукариот содержатся также гранулярные элементы, не отграниченные мембранами. Главные из них — *рибосомы* (рис. 2-19), одни из которых находятся в цитоплазме в свободном состоянии, а другие связаны с эндоплазматическим ретикулумом. Рибосомы эукариот крупнее рибосом прокариот, однако и те и другие выполняют одну и ту же основную функцию: биосинтез белков из аминокислот.

Другой тип гранулярных элементов в цитоплазме эукариотических клеток – это *гранулы гликогена* (рис. 2-19), которые особенно часто встречаются в клетках печени. Макромолекулы гликогена представляют собой сильно разветвленные цепи, образованные остатками молекул глюкозы. Гранулы гликогена выполняют функцию запасных источни-

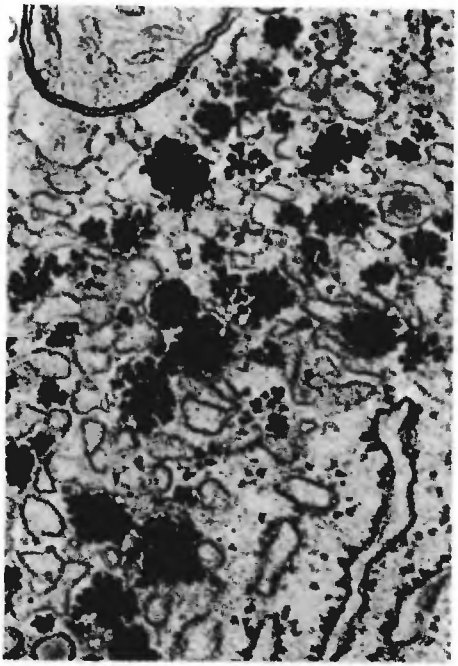


Рис. 2-19. Гранулы гликогена (интенсивно окрашенные) в цитоплазме клетки печени хомяка. Гранулы состоят из больших групп, образуемых молекулами гликогена. По своим размерам они значительно превышают рибосомы, которые видны на поверхности эндоплазматического ретикулума в нижнем правом углу.

ков энергии, особенно в клетках печени и мышц. В некоторых эукариотических клетках содержатся *жировые капельки*, в которых также запасаются богатые энергией вещества.

2.18. Цитозоль – непрерывная водная фаза цитоплазмы

Цитоплазматические органеллы, рибосомы и другие гранулярные элементы погружены в сплошную водную фазу – *цитозоль*. Цитозоль – это не просто разбавленный водный раствор; его состав весьма сложен, а консистенция приближается к гелю. В цитозоле растворены многие ферменты и ферментные системы, а также другие белки, обеспечивающие связывание, хранение и транспорт питательных веществ, микроэлементов и кислорода. В цитоплазме в виде растворов содержится также огромное число небольших биомолекул разных типов, к которым относятся не только строительные блоки биополимеров, такие, как аминокислоты и нуклеотиды, но и сотни небольших молекул органических соединений, так называемых *метаболитов* – промежуточных продуктов, образующихся при биосинтезе или распаде макромолекул и их строительных блоков. Например, превращение поступающей из крови глюкозы в молочную кислоту в работающей скелетной мышце осуществляется в результате последовательного образования 10 промежуточных продуктов, причем только последний из них непосредственно превращается в молочную кислоту.

К третьему классу растворенных в цитозоле веществ относятся различные *коферменты*, а также ATP и ADP – главные компоненты системы переноса энергии в клетке. И наконец, в цитозоле содержатся различные *ионы неорганических солей*, такие, как K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, HCO_3^- и HPO_4^{2-}.

Все составные части цитозоля поддерживаются в постоянных концентрациях и сбалансированных пропорциях благодаря функционированию систем, обеспечивающих их транспорт через плазматическую мембрану.

2.19. Клеточная мембрана имеет большую площадь поверхности

Выше уже шла речь о том, что для клеток, как правило, выгодно иметь большую площадь поверхности (по отношению к объему) с тем, чтобы скорость протекающих в них метаболических процессов не лимитировалась скоростью поступления питательных веществ и кислорода внутрь клеток. В случае эукариот эта проблема решается путем комбинации двух факторов. Прежде всего, скорость метаболизма в большинстве эукариотических клеток значительно ниже, чем в прокариотических, поскольку для сохранения вида прокариотам требуется

максимально возможная скорость роста и размножения клеток. Для роста необходима энергия, поступающая в клетку либо в виде питательных веществ, либо в форме поглощенной ею энергии света; поэтому для обеспечения максимальной эффективности усвоения питательных веществ или улавливания энергии света прокариоты должны иметь большую площадь поверхности клеточной мембраны по отношению к объему клетки. Что же касается эукариотических клеток, то у них нет такой настоятельной необходимости быстро расти и делиться, и потому их энергетические потребности обычно не столь велики.

Вместе с тем эукариотические клетки характеризуются специфическими структурными особенностями, обеспечивающими максимальное отношение площади поверхности клетки к объему. Так, нервные клетки, в которых интенсивность метаболизма относительно высока, имеют длинную и узкую форму и соответственно бóльшую площадь поверхности. Форма других клеток может быть весьма разветвленной или звездообразной, однако чаще всего площадь поверхности клетки увеличивается благодаря образованию на ней многочисленных складок или пальцеобразных отростков (так называемых *микроворсинок*) клеточной мембраны. Как видно на фотографии клетки печени, полученной методом трансмиссионной электронной микроскопии (см. рис. 2-7), клеточная мембрана имеет отнюдь не гладкую, а весьма неровную поверхность. Это свойство мембраны еще более явно выражено на фотографии поверхности клетки печени, полученной методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 2-20). Микроворсинки есть у многих животных клеток и, в частности, у клеток, выстилающих внутренний просвет тонкого кишечника, по которому молекулы питательных веществ должны проходить с высокой скоростью в ходе усвоения переваренной пищи.

2.20. На поверхности многих животных клеток имеются также «антенны»

С внешней стороны плазматической мембраны многие клетки животных тканей имеют тонкую гибкую клеточную оболочку. В ней содержится большое число разнообразных полисахаридных, липидных и белковых молекул, расположенных на наружной стороне плазматической мембраны. На поверхности клетки находится много различных молекулярных структур, принимающих и распознающих внешние сигналы. К их числу относятся *участки распознавания* клеток,

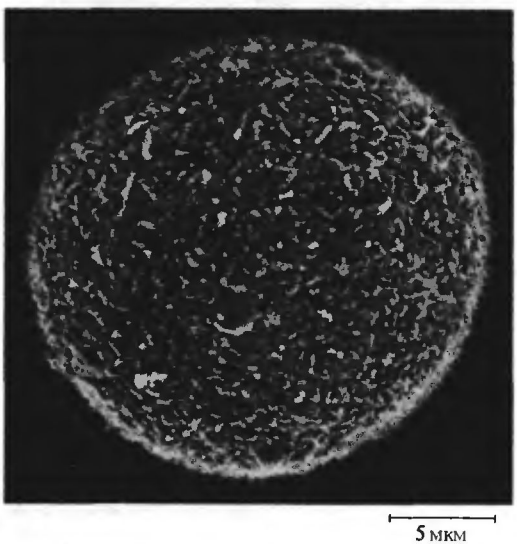


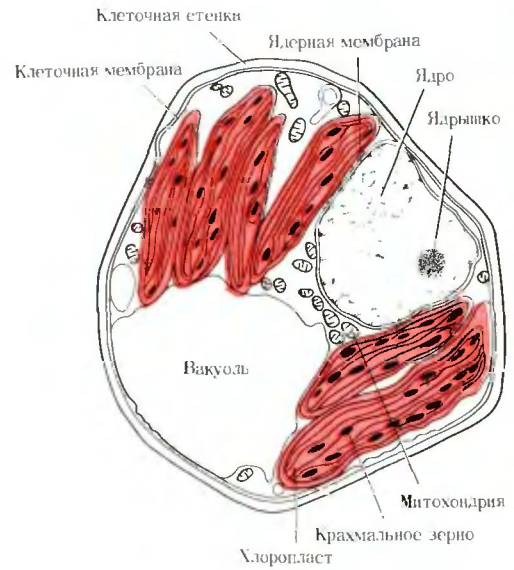
Рис. 2-20. Микрофотография поверхности изолированной клетки печени крысы, полученная методом сканирующей электронной микроскопии. Видно, что площадь поверхности клетки сильно увеличена за счет микроворсинок, форма и расположение которых постоянно меняются.

при помощи которых однотипные клетки узнают друг друга и прикрепляются одна к другой, образуя структуру специфических тканей. На поверхности многих животных клеток имеются также *рецепторные участки*, связывающие различные гормоны. Гормоны – это химические посредники, секретируемые определенными клетками в кровь; они регулируют активность других клеток в каком-то ином месте организма. Связываясь с рецепторными участками на поверхности клетки-мишени, молекулы гормонов стимулируют определенный аспект клеточной активности. Другие специфические участки на поверхности животных клеток могут распознавать и связывать некоторые чужеродные для данных клеток белки. Связывание чужеродных белков с такими участками вызывает ответные реакции клеток, в результате чего развивается аллергия. Эти же специфические участки отвечают за отторжение чужеродных для данного реципиента тканей и органов после их хирургической пересадки. Таким образом, поверхность многих животных клеток представляет собой поистине сложную мозаику, составленную из различных чувствительных молекулярных «антенн», при помощи которых клетки общаются с внешним миром и отвечают на воздействие специфических агентов, присутствующих в окружающей среде.

2.21. Эукариотические клетки растений имеют некоторые специфические особенности

Эукариотические клетки высших растений (рис. 2-21) несколько отличаются от клеток высших животных, несмотря на сходство их основных особенностей. Пожалуй, наиболее явное различие состоит в том, что большинство растительных клеток содержит *пластиды*. Пластиды – это расположенные в цитоплазме специализированные органеллы, окруженные двумя мембранами. К самым типичным пластидам, характерным для всех клеток зеленых растений, относятся *хлоропласты* (рис. 2-22). Подобно митохондриям хлоропласты можно рассматри-

Рис. 2-21. Электронная микрофотография клетки листа кукурузы. Заметьте, что по своим размерам хлоропласты значительно превышают митохондрии, однако число их меньше числа митохондрий. По мере увеличения возраста клетки вакуоль обычно становится крупнее. Клеточная стенка относительно толстая и жесткая.



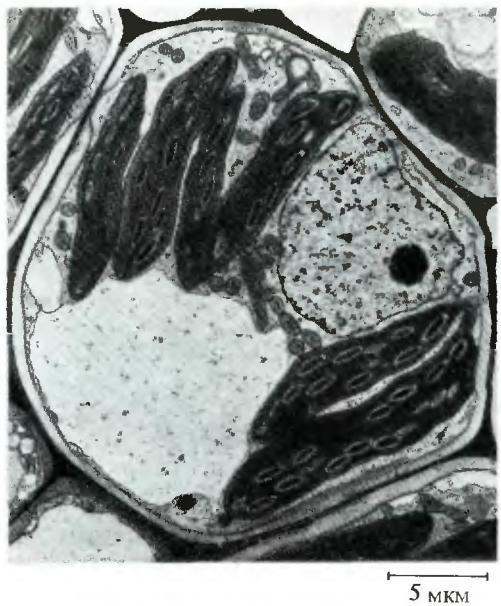




Рис. 2-22. Хлоропласт фотосинтезирующей клетки листа салата.

вать как «силовые установки», поставляющие энергию. Существенное различие между ними заключается в том, что хлоропласты – это *солнечные* силовые установки, использующие энергию света, тогда как митохондрии – *химические* «силовые установки», использующие химическую энергию молекул питательных веществ. Хлоропласты поглощают световую энергию и используют ее для восстановления двуокиси углерода с образованием углеводов, например крахмала, что сопровождается высвобождением молекулярного кислорода (O_2). Фотосинтезирующие клетки растений содержат как хлоропласты, так и митохондрии, причем хлоропласты служат «силовыми установками» на свету, а митохондрии – в темноте, когда окисляются углеводы, образовавшиеся в процессе фотосинтеза в дневное время.

Хлоропласты значительно крупнее митохондрий и могут иметь самую разную форму. Из-за высокого содержания в фотосинтезирующих клетках пигмента *хлорофилла* они обычно окрашены в зеленый цвет, однако их окраска может меняться в зависимости от относительных количеств других пигментов, содержащихся в хлоропластах. Молекулы этих пигментов, которые в совокупности способны поглощать световую энергию во всей видимой области спектра, располагаются во внутренней мембране хлоропласта. Эта мембрана свернута весьма сложным образом в виде дисков, называемых *тилакоидами*. Подобно митохондриям хлоропласты тоже содержат ДНК, РНК и рибосомы. Вполне вероятно, что хлоропласты, как и митохондрии, произошли в ходе эволюции эукариотических клеток из паразитирующих прокариот (см. рис. 2-11). Однако в данном случае прокариотами, проникшими в другие более крупные прокариотические клетки, были, по-видимому, примитивные цианобактерии, придавшие клеткам способность к фотосинтезу и образованию кислорода.

Растительные клетки содержат также пластиды других типов. В бесцветных *лейкопластах* запасаются крахмал и масла. Значительное место во многих растительных клетках занимают окруженные одиночной мембраной крупные пузырьки – *вакуоли* (см. рис. 2-21). Они заполнены клеточным соком и различными продуктами, являющимися отходами метаболизма. Эти продукты часто агрегируют с образованием кристаллических отложений. В молодых клетках вакуоли имеют небольшую величину, но по мере старения клеток их размеры увеличиваются, и часто они заполняют весь объем клетки. Вакуоли встречаются также и в некоторых животных клетках, но здесь они, как правило, значительно мельче. У растительных клеток нет ни ресничек, ни жгутиков.

Большинство клеток высших растений полностью окружено *клеточной стенкой*, которая служит в основном жесткой за-

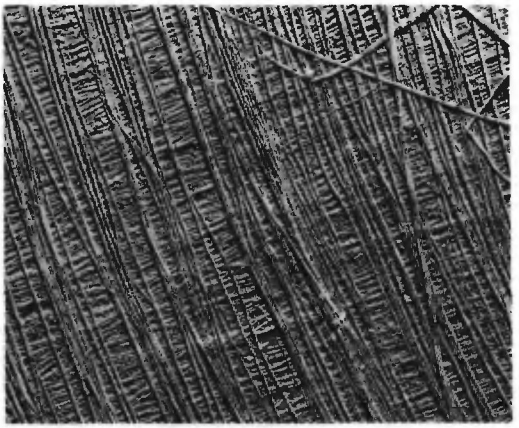


Рис. 2-23. Электронная микрофотография клеточной стенки растений. Стенка состоит из перекрещивающихся слоев целлюлозных волокон, погруженных в органический «клей». Стенки растительных клеток очень прочны, по своей структуре они напоминают бетонную плиту, укрепленную стальной арматурой.

щитной оболочкой. Клеточная стенка сравнительно толста, имеет пористое строение и очень прочна (рис. 2-21 и 2-23). Она состоит из целлюлозных волокон, «склеенных» друг с другом сложными полимерными цементирующими веществами. Вода и небольшие молекулы легко проходят через поры в клеточной стенке, которая, однако, предохраняет клетку от набухания и растяжения. В одеревеневших частях растений и стволах деревьев первичные клеточные стенки окружены толстыми прочными *внешними*, или *вторичными, стенками*. В совокупности они могут выдерживать огромные нагрузки.

2.22. Вирусы – надмолекулярные паразиты

Наш обзор, в котором клетки рассматриваются как единицы живой материи, не может быть полным, если мы не коснемся вирусов. Хотя вирусы и не являются живыми, они представляют собой образующиеся биологическим путем надмолекулярные комплексы, которые способны к самовоспроизведению в соответствующих клетках-хозяевах. Вирус состоит из молекулы нуклеиновой кислоты и окружающей ее защитной оболочки, или *капсида*, построенной из белковых молекул. Вирусы существуют в двух состояниях. Вне сформировавших их клеток вирусы представляют собой просто неживые частицы, называемые вирионами, которые имеют правильную форму, определенные размеры и химический состав. Некоторые вирусы можно получить даже в кристаллическом виде; следовательно, они ведут себя как чрезвычайно крупные молекулы. Однако как только вирусная частица (или ее нуклеиновая кислота) проникает в специфическую для нее клетку-хозяина, форма ее существования качественно изменяется – она становится внутриклеточным паразитом. Вирусная нуклеиновая кислота несет генетическую информацию, определяющую всю структуру интактного вириона. Она подчиняет себе весь биохимический аппарат клетки-хозяина, нарушая его нормальное функционирование, и переключает ферменты и рибосомы клетки с синтеза нормальных клеточных компонентов на производство множества новых дочерних вирусных частиц. В результате заражение клетки-хозяина одним-единственным вирионом может привести к образованию десятков или даже сотен новых вирусных частиц (рис. 2-24). В одних системах хозяин – вирус образовавшиеся вирионы высвобождаются из клетки-хозяина, которая в дальнейшем погибает и подвергается лизису. В других же системах вновь синтезированная вирусная нуклеиновая кислота остается внутри клетки-хозяина, иногда лишь незначительно влияя на ее жизнеспособность; однако часто при

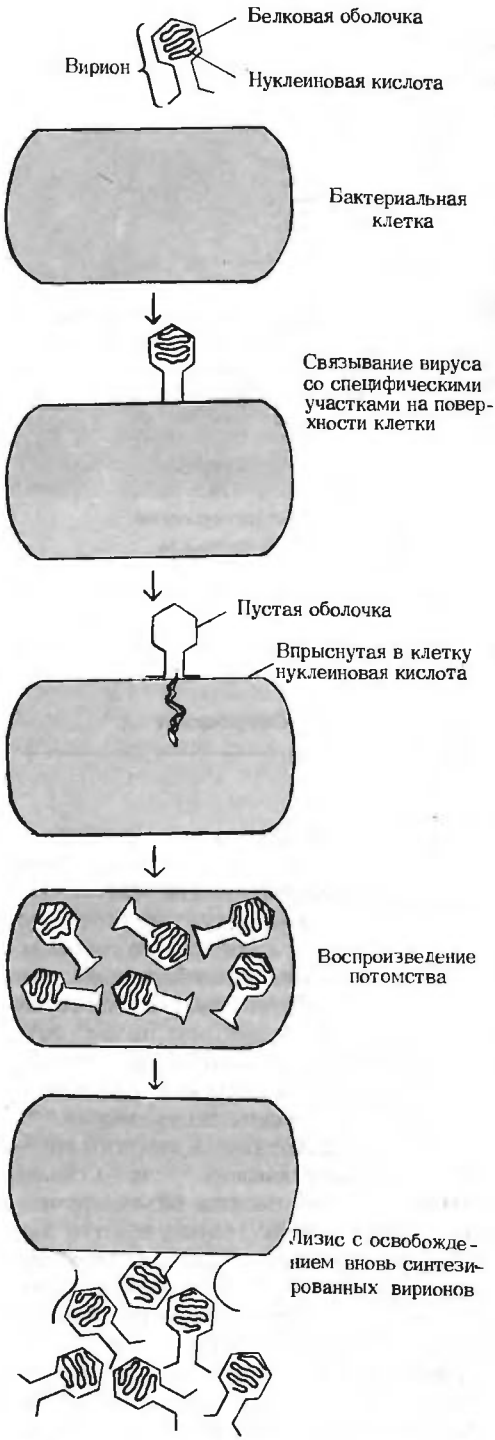


Рис. 2-24. Репликация бактериофага в клетке-хозяине.

этом происходят серьезные изменения как во внешнем виде клетки-хозяина, так и в ее функциях. Одни вирусы содержат ДНК, а другие – РНК.

Известны сотни различных вирусов, специфичных в отношении определенных типов клеток-хозяев. Роль хозяев могут играть клетки животных, растений или бактерий (табл. 2-3). Вирусы, специфичные для бактерий, называются *бактериофагами*, или просто *фагами* (слово «фаг» означает поедать, поглощать). Капсид вирусов может быть построен из белковых молекул только одного типа, как это имеет место, например, в случае *вируса табачной мозаики* – одного из простейших вирусов, который первым был получен в кристаллическом виде (рис. 2-25). Другие вирусы могут содержать десятки и сотни белков различных типов. Размеры вирусов варьируют в широких пределах. Так, один из самых мелких вирусов, бактериофаг ϕX174, имеет диаметр 18 нм, тогда как один из самых крупных вирусов – вирус осповакцины — по размерам своих частиц соответствует самым мелким бактериям. Вирусы различаются также по форме и степени сложности их структуры. К числу наиболее сложных относится *бактериофаг Т4* (рис. 2-25), для которого клеткой-хозяином служит *E. coli*. Фаг Т4 имеет головку, отросток («хвост») и сложный набор хвостовых нитей; при введении вирусной ДНК в клетку-хозяина они действуют совместно как «жало» или шприц для подкожных инъекций. На рис. 2-25 и в табл. 2-3 приведены данные о размерах, форме и массе частиц ряда вирусов, а также тип и величина входящих в их состав молекул нуклеиновых кислот. Некоторые вирусы необычайно патогенны для человека. К ним относятся, в частности, вирусы, вызывающие оспу, полиомиелит, грипп, простудные заболевания, инфекционный мононуклеоз и опоясывающий лишай. Считают, что причиной рака у животных также являются вирусы, которые могут находиться в латентном состоянии. Вирусы играют все более важную роль в биохимических исследованиях, поскольку с их помощью удается получать необычайно ценную информа-

Таблица 2-3. Свойства некоторых вирусов

Вирус	Нуклеиновая кислота	Масса частицы, 10^6 дальтон	Размер в длину, нм	Форма
Бактериофаги *E. coli*				
ϕX 174	ДНК	6	18	Многогранник
T4	ДНК	220	200	Головастикоподобная
λ (лямбда)	ДНК	50	120	Головастикоподобная
MS2	РНК	3,6	20	Многогранник
Вирусы растений				
Вирус табачной мозаики	РНК	40	300	Палочковидная
Вирус кустистой карликовости томата	РНК	10,6	28	Многогранник
Вирусы животных				
Вирус полиомиелита	РНК	6,7	30	Многогранник
Обезьяний вирус 40 (SV 40; вызывает рак у новорожденных животных)	ДНК	28	45	Сферическая
Аденовирус (вызывает обычную простуду)	ДНК	200	70	Многогранник
Вирус оспы	ДНК	4000	250	Сферическая

цию о структуре хромосом, механизмах ферментативного синтеза нуклеиновых кислот и регуляции передачи генетической информации.

Краткое содержание главы

Все клетки имеют ограничивающую их плазматическую мембрану, цитоплазму, рибосомы и ядерную зону или ядро. Размеры и форма клеток определяются скоростями физической диффузии молекул питательных веществ и кислорода, а также соотношением между площадью поверхности и объемом клетки. Существуют два больших класса клеток: прокариотические и эукариотические. Прокариоты, к которым относятся бактерии и сине-зеленые водоросли,–это простые клетки малых размеров, характеризующиеся тем, что содержащийся в них генетический материал не окружен мембраной. У них есть клеточная стенка и плазматическая мембрана, а некоторые из них снабжены жгутиками, с помощью которых они могут передвигаться. В цитоплазме прокариотических клеток нет ограниченных мембраной органелл, но есть рибосомы и гранулы питательных веществ. Прокариотические клетки растут и делятся очень быстро. Бактерия *Escherichia coli*, наиболее полно изученный представитель прокариот, оказалась необычайно полезной для биохимических и генетических исследований.

Эукариотические клетки намного крупнее прокариотических, их объем в 1000–10 000 раз больше объема прокариотических клеток. Наряду с четко выраженным и ограниченным мембраной ядром с многочисленными хромосомами в эукариотических клетках содержатся окруженные мембраной органеллы. К ним, в частности, относятся митохондрии, функция которых состоит в окислении клеточного «топлива» и образовании ATP, а также хлоропласты (в фотосинтезирующих клетках), улавливающие энер-

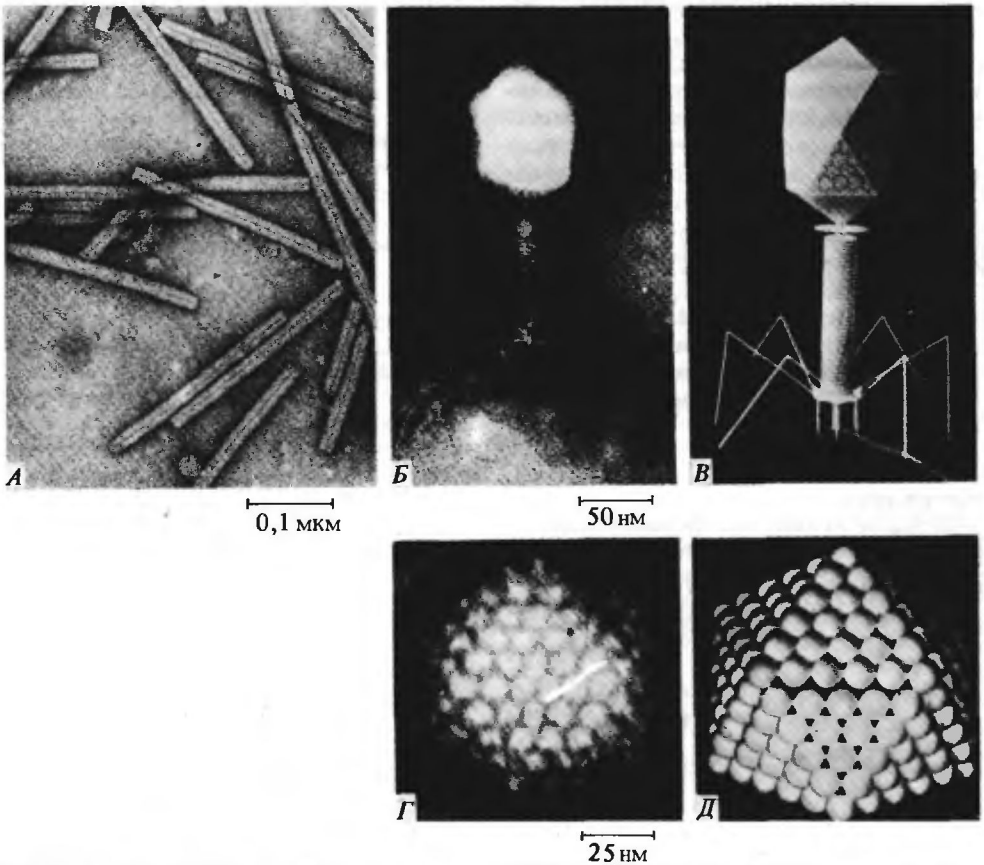


Рис. 2-25. *А*. Вирус табачной мозаики, имеющий палочковидную форму. Электронная микрофотография (*Б*) и модель (*В*) бактериофага Т4 – сложного вируса, по своей форме напоминающего головастика. После прикрепления концевых нитей бактериофага к специфическим участкам на клеточной стенке *E. coli* ДНК из головки бактериофага впрыскивается через отросток («хвост») в клетку. Электронная микрофотография (*Г*) и составленная из теннисных мячиков модель (*Д*) аденовируса, оболочка которого состоит из 252 белковых субъединиц, образующих многогранник с 20 гранями (икосаэдр).

гию света и использующие ее для превращения CO_2 в глюкозу. Предполагается, что митохондрии и хлоропласты произошли от бактерий. В число органелл эукариотических клеток входит и эндоплазматический ретикулум, функция которого заключается в том, что он направляет и транспортирует секретируемые клеткой вещества к тельцам Гольджи, где они упаковываются и выводятся из клетки. Лизосомы содержат деструктивные ферменты, а пероксисомы отделяют ферменты, образующие и разрушающие перекиси, от остального содержимого клетки. В цитоплазме эукариотических клеток обнаруживаются микрофиламенты по меньшей мере трех типов, а также микротрубочки. Микрофиламенты, микротрубочки и микротрабекулярная сеть совместно образуют гибкий внутренний каркас – цитоскелет. Многие животные клетки снабжены ресничками и жгутиками, винтообразные движения которых осуществляются благодаря наличию в них парных микротрубочек. В эукариотических клетках присутствуют также рибосомы. Одни из них находятся в свободном состоянии, а другие связаны с поверхностью шероховатого эндоплазматического ретикулума. На внешней поверхности животных клеток имеются специфические участки, распознающие

и связывающие другие клетки и гормоны.

Вирусы представляют собой неживые надмолекулярные структуры. Каждая вирусная частица состоит из одной молекулы нуклеиновой кислоты и окружающей ее белковой оболочки. Вирусы способны заражать специфические для них клетки, заставляя их воспроизводить вирусные частицы в соответствии с генетической информацией, содержащейся в вирусной нуклеиновой кислоте. Изучение вирусов позволило получить много ценнных сведений о биохимических аспектах переноса генетической информации.

ЛИТЕРАТУРА

Учебники

Curtis H. Biology, 3d ed., Worth, New York, 1979. Прекрасно написанный и иллюстрированный учебник по общей биологии.

Dyson R.D. Cell Biology: A Molecular Approach, 2d ed., Allyn and Bacon, Boston, 1978. Учебник с биохимической ориентацией.

Fawcett D.W. The Cell, 2d ed., Saunders, Philadelphia, 1981. Электронные микрофотографии различных клеток и тканей.

Karp G. Cell Biology, McGraw-Hill, New York, 1979. Особое внимание уделено молекулярным аспектам передачи генетической информации.

Ledbetter M.C., Porter K.R. Introduction to the Fine Sctructure of Plant Cells, Springer-Verlag, New York, 1970.

Loewy A.G., Siekevitz P. Cell Structure and Function, 3d ed., Holt, New York, 1979.

Интересные книги небольшого объема

Luria S. Life: The Unfinished Experiment, Scribner's, New York, 1973. Лауреат Нобелевской премии в области молекулярной биологии делает обзор современной биологии и дает ей оценку.

Margulies L. Origin of Eukaryotic Cells, Yale University Press, New Haven, Conn., 1970. Интересное развитие одной из существующих теорий.

Thomas L. The Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher, Viking, New York, 1974. Увлекательные очерки о жизни клеток, написанные признанным лидером в области биометрических исследований.

Некоторые статьи по специальным вопросам клеточной биологии

Berg H. How Bacteria Survive, Sci. Am., **233**, 36–44, August (1975).

Capaldi R.A. A Dynamic Model of Cell Membranes, Sci. Am., **230**, 26–33, March (1974).

Everhart T.E., Hayes T.L. The Scanning Electron Microscope, Sci. Am., **226**, 54–69, January (1972).

Mazia D. The Cell Cycle, Sci. Am., **230**, 54–64, January (1974).

Porter K.R., Tucker J.B. The Ground Substance of the Living Cell, Sci. Am., **244**, 56–67, March (1981).

Satir P. How Cilia Move, Sci. Am., **231**, 44–63, October (1974).

Sloboda R.D. The Role of Microtubules in Cell Structure and Cell Division, Amer. Sci., **68**, 290–298 (1980).

Wessells N.K. How Living Cells Change Shape, Sci. Am., **225**, 76–85, October (1971).

Вопросы и задачи

Чтобы понять молекулярную логику клеток, мы должны научиться оценивать свойства и взаимодействие биомолекул как в качественном, так и в количественном отношении. Мы должны также уметь анализировать сложные явления, происходящие в живой клетке, сводя эти явления к самым простым компонентам и процессам, лежащим в их основе. С этой целью в конце каждой главы приводится ряд задач, иллюстрирующих важные биохимические принципы. Одни задачи имеют конкретные численные решения, характеризующие размеры молекул и клеток или скорости биохимических процессов. Чтобы решить другие задачи, в которых требуется проанализировать данную биохимическую структуру или процесс, необходимо применить основные биохимические принципы и немного подумать. Некоторые задачи относительно просты и имеют однозначные решения, тогда как другие требуют более серьезного подхода. Решение задач - наилучший путь для прочного усвоения основ биохимии.

Ниже перечислены книги, которые помогут читателю ознакомиться с биохимическими задачами и приобрести навыки в их решении.

Montgomery R., Swenson C.A. Quantitative Problems in Biochemical Sciences, 2d ed., Freeman, San Francisco, 1976.

Segel L. Biochemical Calculations, 2d ed., Wiley, New York, 1976. Особенно хорошо освещены вопросы ферментативной кинетики.

Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E. Biochemistry: A Problems Approach, 2d ed., Benjamin, Menlo Park, Calif., 1981. В этой уникальной книге, охватывающей широкий круг проблем, рассмотрены основные разделы биохимии и приведено большое число различных контрольных вопросов и задач с численными решениями. Основные разделы представлены примерно в той же последовательности, что и в данной книге.

Ниже приведено несколько задач, относящихся к содержанию гл. 2. Их решение поможет читателю более четко уяснить геометрические и численные соотношения, характеризующие структуру клеток и их функции. Для упрощения цитирования и обсуждения каждая задача имеет свое заглавие.

1. *Малые размеры клеток и их составных частей.* Из данных, приведенных в табл. 2-2, приблизительно рассчитайте число а) клеток печени, б) митохондрий и в) молекул миоглобина, которые можно поместить в один слой на кончике булавки (диаметром 0,5 мм). Предполагается, что все структуры имеют сферическую форму. Площадь круга равна πr^2, где $\pi = 3{,}14$.
2. *Число растворенных молекул, содержащихся в самых мелких из известных клеток.* Самыми мелкими из всех известных клеток являются микоплазмы – сферические клетки с диаметром около 0,33 мкм. Малые размеры позволяют микоплазмам легко проходить через фильтры, задерживающие более крупные бактерии. Один из видов микоплазм *Mycoplasma pneumoniae*, может вызывать первичную атипичную пневмонию.

а) Основным источником энергии для микоплазм служит D-глюкоза, ее концентрация внутри таких клеток составляет около 1,0 мМ. Рассчитайте число молекул глюкозы, содержащихся в одной клетке. Число Авогадро (число молекул в 1 моле неионизированного вещества) равно $6{,}02 \cdot 10^{23}$. Объем сферы равен $4/3\pi r^3$.

б) Во внутриклеточной жидкости микоплазм содержится 10 г гексокиназы (мол. масса 100 000) в 1 л. Рассчитайте молярную концентрацию гексокиназы – первого фермента в цепи реакций, приводящих к расщеплению глюкозы с образованием энергии.

3. *Компоненты E. coli.* Клетки *E. coli* имеют форму цилиндра высотой 2 мкм и диаметром 0,8 мкм. Объем цилиндра вычисляется по формуле $\pi r^2 h$, где h – высота цилиндра.

а) Сколько весит одна клетка *E. coli*, если ее плотность (главным образом за счет воды) равна в среднем 1,1 г/см^3?

б) Толщина защитной клеточной стенки *E. coli* равна 10 нм. Какую долю (в процентах) общего объема бактерии составляет клеточная стенка?

в) *E. coli* быстро растет и размножается благодаря тому, что в ее клетке присутствует около 15 000 сферических частиц – рибосом (диаметр 18 нм), осуществляющих синтез белков. Какая часть общего объема клетки приходится на долю рибосом?

4. *Генетическая информация в ДНК E. coli.* Содержащаяся в ДНК генетическая информация закодирована линейной последовательностью ключевых слов, называемых кодонами. Каждый кодон представляет собой специфическую последовательность трех нуклеотидов (три пары нуклеотидов в двухцепочечной ДНК) и соответствует одному аминокислотному остатку в белке. ДНК *E. coli* имеет очень большую молекулярную массу – примерно $2{,}5 \cdot 10^9$. Средняя молекулярная масса пары нуклеотидов равна 660, причем вклад каждой пары нуклеотидов в общую длину молекулы ДНК составляет 0,34 нм.

а) Используя эти данные, рассчитайте длину молекулы ДНК *E. coli*. Сравните длину молекулы ДНК с размерами клетки. Каким образом ей удается уместиться в клетке?

б) Подсчитайте, чему равно максимальное число белков, которое может быть закодировано в молекуле ДНК *E. coli*, если предположить, что белковая молекула *E. coli* состоит в среднем из 400 аминокислот?

5. *Высокая скорость метаболизма у бактерий.* Бактерии характеризуются значительно более высокой скоростью метаболизма по сравнению с животными клетками. В идеальных условиях бактериальная клетка обычно вдвое увеличивается в размерах и делится каждые 20 минут, тогда как животным клеткам для этого требуется примерно 24 ч. Из-за высокой скорости метаболизма бактериям необходимо иметь большую площадь поверхности по отношению к объему клетки.

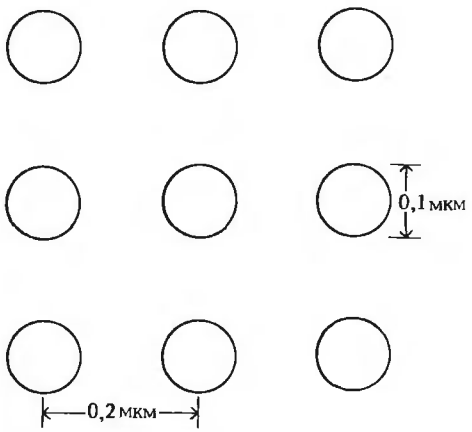
а) Почему максимальная скорость метаболизма должна зависеть от соотношения между поверхностью клетки и ее объемом?

б) Рассчитайте отношение площади поверхности клетки к ее объему у сферической бактерии *Neisseria gonorrhoeae* (диаметром 0,5 мкм), вызывающей гонорею. Сравните полученное значение с отношением поверхности клетки к ее объему у шаровидной амебы – крупной эукариотической клетки диаметром 150 мкм.

в) Оцените отношение площади поверхности тела к его объему у среднего человека весом 70 кг (представьте тело человека в виде сферы и набора цилиндров). Сравните полученное значение с отношением поверхности клетки к ее объему у бактерий.

6. *Стратегия, обеспечивающая увеличение площади поверхности клеток.* Некоторые клетки, функция которых состоит в поглощении питательных веществ из окружающей среды (например, клетки, выстилающие просвет тонкого кишечника или клетки корневых волосков растений), прекрасно приспособлены к выполнению своей роли благодаря тому, что площадь их поверхности, соприкасающейся с питательными веществами, увеличена за счет микроворсинок. Предположим, что эпителиальная клетка, выстилающая просвет тонкого кишечника, имеет форму сферы (диаметром 20 мкм). Поскольку лишь часть клетки обращена в просвет кишечника, будем считать, что микроворсинки покрывают участок, площадь которого составляет 25% площади поверхности клетки. Предположим также, что микроворсинки имеют форму цилиндров высотой 1,0 мкм и диаметром 0,1 мкм и располагаются в виде регулярной решетки с расстоянием 0,2 мкм между центрами двух соседних микроворсинок. Площадь поверхности сферы равна $4\pi r^2$. Исходя из этих данных, рассчитайте: а) число микроворсинок на покрытом ими участке, б) площадь поверхности этого участка без микроворсинок, в) площадь поверхности участка с учетом микроворсинок, г) на сколько процентов увеличится поглощающая способность (определяемая отношением площади поверхности клетки к ее объему) благодаря наличию микроворсинок?

Задача 6



Расположение микроворсинок на покрытом ими участке

ГЛАВА 3

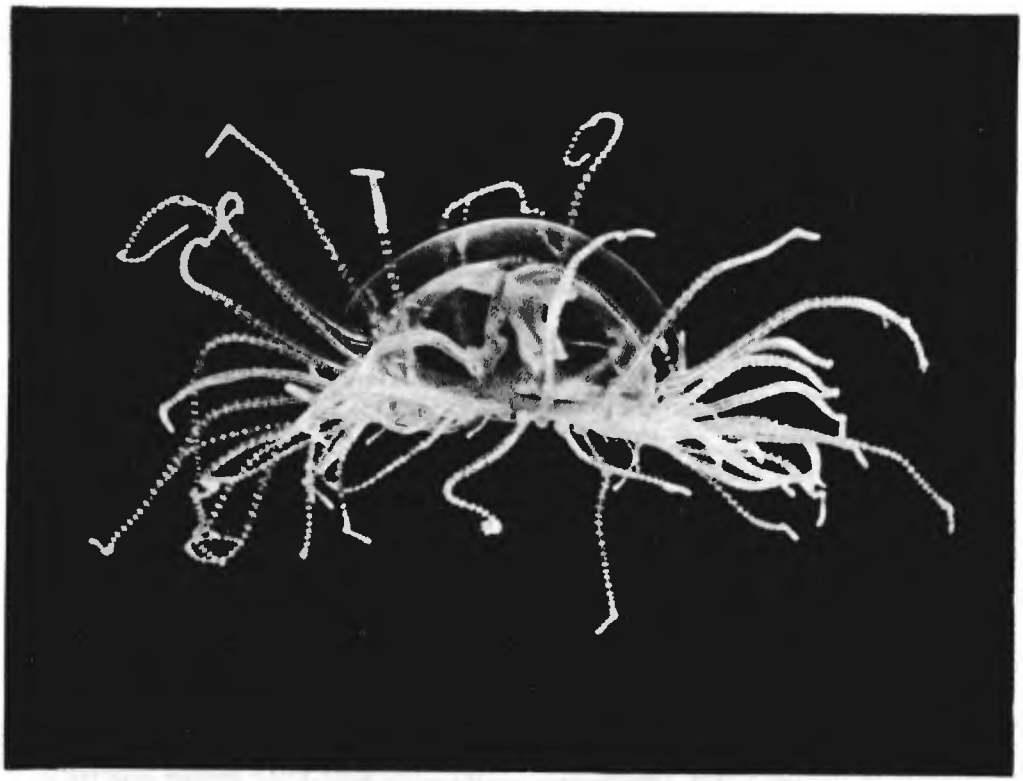
СОСТАВ ЖИВОЙ МАТЕРИИ: БИОМОЛЕКУЛЫ

Мы уже убедились в том, что животные и растения различных видов по химическому составу во многом сходны между собой. Например, все молекулы белков у всех видов живых организмов построены из одного и того же набора 20 различных аминокислот. Точно так же нуклеиновые кислоты у всех видов построены из одного и того же набора нуклеотидов. Теперь мы увидим, что по химическому составу живая материя очень сильно отличается от неживой материи земной коры. Поэтому, прежде чем приступить к изучению биомолекул и их взаимодействий, следует задать несколько важных вопросов. Какие химические элементы и в каких соотношениях обнаруживаются в клетках? Как они туда попали? Каким образом обнаруживаемые в живых клетках молекулы оказались приспособленными для выполнения своих функций?

Чтобы попытаться ответить на эти вопросы, мы должны рассмотреть биомолекулы с тех же позиций, что и небиологические молекулы, используя принципы и подходы, принятые в классической химии. Одновременно следует также охарактеризовать биомолекулы с биологической точки зрения в свете представлений о том, что различные типы молекул в живой материи связываются друг с другом и взаимодействуют, подчиняясь законам, которые мы называем в совокупности молекулярной логикой живого.

3.1. Химический состав живой материи отличается от химического состава земной коры

Для различных форм живого необходимы лишь 27 из 92 природных химических элементов, присутствующих в земной коре. Они перечислены в табл. 3-1. Большинство встречающихся в живой материи элементов имеют сравнительно небольшие порядковые номера, и лишь у трех из них порядковые номера превышают 34. Более того, соотношение этих химических элементов в живых организмах совсем иное, чем в земной коре (табл. 3-2). В живых организмах в наибольших количествах встречаются четыре элемента – водород, кислород, углерод и азот; в большинстве клеток на их долю приходится более 99% общей массы. Относительное содержание трех из этих элементов – водорода, азота и углерода – в живом веществе гораздо выше, чем в земной коре. Различия в элементарном составе земной коры и живой материи станут еще более явными, если при сравнении учитывать только вес сухого вещества живых организмов, исключив из рассмотрения воду, на долю которой приходится более 75% их общего веса. В живых клетках углерод составляет 50–60% сухого вещества, азот – 8–10%, кислород – 25–30% и водород – 3–4%. В земной же коре на долю углерода, во-



Живые организмы, например эта медуза *Gonionemus murbachii*, по химическому составу отличаются от окружающей их среды (в данном случае – морской воды).

Таблица 3-1. Биоэлементы

Установлено, что для существования живой материи необходимы перечисленные ниже элементы; однако не все указанные здесь микроэлементы обязательно требуются каждому виду организмов.

Основные элементы, входящие в состав органического вещества

Углерод	C	Азот	N
Водород	H	Фосфор	P
Кислород	O	Сера	S

Элементы, встречающиеся в виде ионов

Натрий	Na^+	Кальций	Ca^{2+}
Калий	K^+	Хлор	Cl^-
Магний	Mg^{2+}		

Микроэлементы

Железо	Fe	Никель	Ni
Медь	Cu	Хром	Cr
Цинк	Zn	Фтор	F
Марганец	Mn	Селен	Se
Кобальт	Co	Кремний	Si
Йод	I	Олово	Sn
Молибден	Mo	Бор	B
Ванадий	V	Мышьяк	As

дорода и азота, вместе взятых, приходится менее 1% ее общей массы. Вместе с тем восемь из десяти элементов, содержащихся в организме человека в наибольших количествах, входят в число десяти элементов, которые в наибольших количествах присутствуют также и в морской воде.

Исходя из этих данных, можно сделать два рабочих допущения. Согласно первому из них, химические соединения, содержащие углерод, водород, кислород и азот (наиболее распространенные в живой природе элементы) были отобраны в ходе эволюции благодаря их особой приспособленности для участия в процессах жизнедеятельности. Второе допущение состоит в том, что морская вода была именно той жидкой средой, в которой живые организмы впервые появились на ранних этапах развития Земли.

Таблица 3-2. Восемь элементов, содержащихся в наибольших количествах в земной коре и организме человека (% от общего числа атомов)

Земная кора		Организм человека	
Элемент	%	Элемент	%
O	47	H	63
Si	28	O	25,5
Al	7,9	C	9,5
Fe	4,5	N	1,4
Ca	3,5	Ca	0,31
Na	2,5	P	0,22
K	2,5	Cl	0,08
Mg	2,2	K	0,06

3.2. Большинство биомолекул содержит углерод

Химические свойства живых организмов в значительной степени зависят от углерода, на долю которого приходится более половины их сухого веса. Углерод, так же как и водород, кислород и азот, может образовывать ковалентные связи, т. е. связи, осуществляемые парами электронов, принадлежащими обоим соединяющимся атомам (рис. 3-1). Для заполнения внешней электронной оболочки атому водорода не хватает одного электрона, атому кислорода – двух, атому азота – трех и атому углерода – четырех электронов. Таким образом, при взаимодействии атома углерода с четырьмя атомами водорода «обобществляются» четыре электронные пары, в результате чего возникает соединение *метан* (CH_4), в котором каждая общая электронная пара соответствует одной *одинарной связи*. Углерод может образовывать одинарные связи также и с атомами кислорода и азота. Однако наиболее важное значение в биологии имеет способность атомов углерода «делиться» электронными парами друг с другом, что приводит к формированию очень устойчивых одинарных углерод-углеродных связей. Каждый атом углерода может образовать одинарную связь с одним, двумя, тремя или четырьмя другими атомами углерода. Кроме того, два углеродных атома, соединяясь друг с другом, могут

Атом	Число неспаренных электронов (показаны красным цветом)	Число электронов в заполненной внешней оболочке
H·	1	2
:Ö·	2	8
:N·	3	8
·Ċ·	4	8

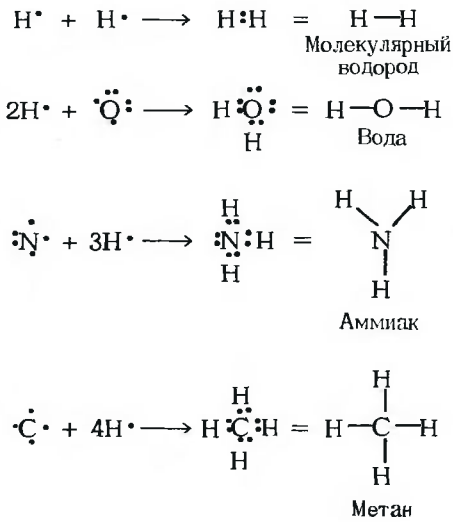


Рис. 3-1. Образование ковалентных связей. Между двумя атомами, имеющими на внешних оболочках неспаренные электроны, могут образоваться ковалентные связи путем «обобществления» электронных пар (молекулярных орбиталей). Атомы, участвующие в формировании ковалентных связей, стремятся к заполнению своих внешних электронных оболочек.

«обобществить» две пары электронов; при этом образуется *двойная* углерод-углеродная связь (рис. 3-2). Благодаря описанным свойствам ковалентно связанные атомы углерода способны образовывать множество разнообразных структур: линейные и разветвленные цепи, циклические и сетчатые структуры, а также их комбинации. Все эти структуры лежат в основе скелетов многочисленных органических молекул самых разных типов (рис. 3-3). К таким углеродным скелетам могут присоединяться другие атомные группы, что обусловлено способностью углерода образовывать ковалентные связи с кислородом, водородом, азотом и серой. Вещества, имеющие скелеты из ковалентно связанных углеродных атомов, называются *органическими* соединениями, причем их разнообразие практически безгранично. Поскольку большинство биомолекул относится к органическим соединениям, можно предположить, что способность углерода участвовать в формировании разнообразных химических связей сыграла решающую роль в выборе именно углеродсодержащих соединений для создания молекулярных механизмов клеток в процессе возникновения и эволюции живых организмов.

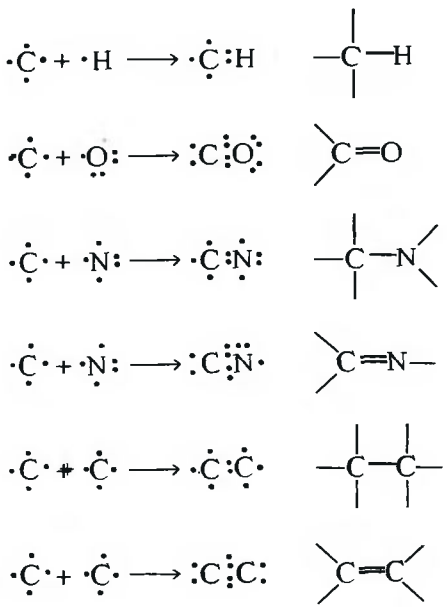


Рис. 3-2. Способность атомов углерода участвовать в образовании различных одинарных и двойных ковалентных связей. Тройные связи в органических биомолекулах встречаются крайне редко.

3.3. Биомолекулы имеют специфическую форму и определенные размеры

Четыре ковалентные одинарные связи, образуемые атомом углерода, располагаются в пространстве в виде тетраэдра,

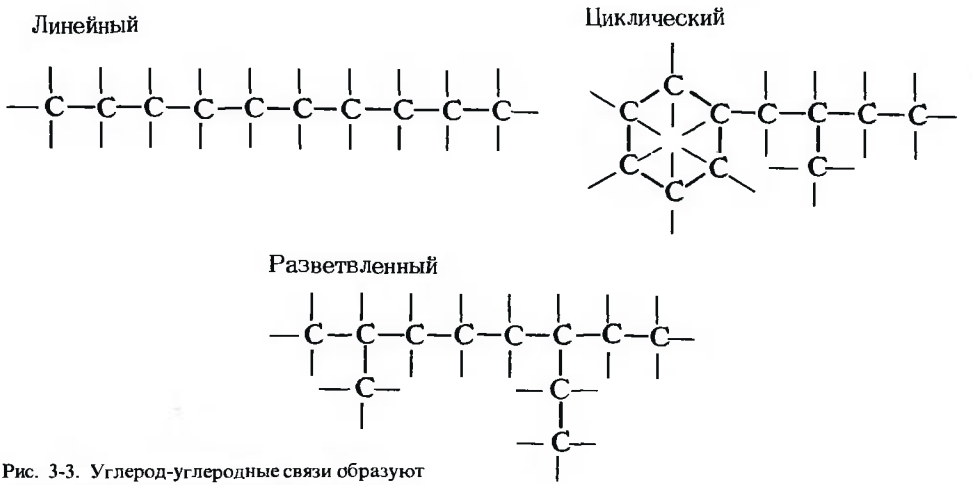
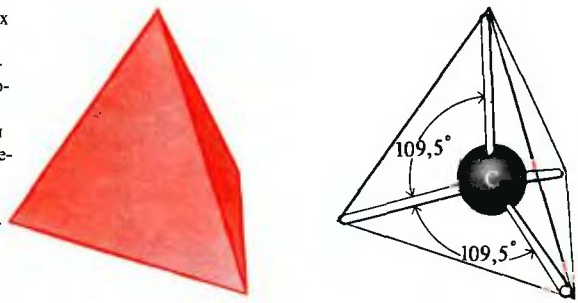


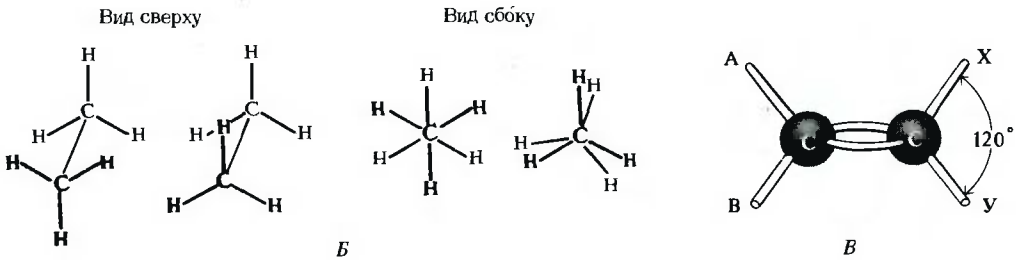
Рис. 3-3. Углерод-углеродные связи образуют каркас молекул многих органических веществ.

причем угол между любыми двумя из этих связей составляет около 109,5° (рис. 3-4). В молекулах различных органических соединений этот угол у разных атомов углерода несколько изменяется. Благодаря такому свойству углеродсодержащие соединения образуют разнообразные трехмерные структуры. Никакой другой химический элемент не может образовывать молекулы, столь различные по размерам и форме, а также по строению боковых цепей и функциональных групп. Необычайная сложность внутриклеточных структур в значитель-

Рис. 3-4. *А*. Четыре одинарные связи, образуемые атомом углерода, расположены в пространстве в виде характерного тетраэдра; длина связей составляет приблизительно 0,154 нм, а угол между ними 109,5°. *Б*. Вокруг одинарных углерод-углеродных связей возможна полная свобода вращения: это отчетливо видно на примере молекулы этана ($H_3C—CH_3$), структуру которого можно изобразить разными схемами. *В*. Двойные углерод-углеродные связи короче, чем одинарные, и свободное вращение вокруг них невозможно. Угол между одинарными связями, образуемыми каждым из атомов углерода, соединенных между собой двойной связью, составляет 120°. Оба атома углерода, образующие двойную связь, и атомы, обозначенные A, B, X и Y, лежат в одной плоскости.



А



Б *В*

ной мере отражает разнообразие размеров и форм органических молекул, из которых они построены.

Второе важное свойство органических соединений заключается в том, что составные части их молекул могут абсолютно свободно вращаться вокруг одинарных углерод-углеродных связей, если только к атомам углерода, участвующим в образовании таких связей, не присоединены очень большие или сильно заряженные группы; в этом случае вращение может быть ограничено. Благодаря такому свойству органические молекулы с большим числом одинарных связей могут принимать различные формы, называемые *конформациями* (рис. 3-4), в зависимости от угла поворота этих связей.

Третье важное свойство ковалентных связей, образуемых углеродом, заключается в том, что они характеризуются определенной длиной. В среднем длина

Таблица 3-3. Радиусы некоторых атомов

Приведенные данные относятся к вандерваальсовым радиусам, характеризующим истинные размеры атомов в пространстве; однако, когда атомы соединяются между собой ковалентными связями, их радиусы в точке взаимодействия с другими атомами уменьшаются из-за притяжения атомов друг к другу за счет образования обобщенной пары (молекулярной орбитали)

Элемент	Радиус, нм	Пространственная модель
		0,1нм
Углерод	0,077	
Водород	0,037	
Кислород	0,066	
Азот	0,070	
Фосфор	0,110	
Сера	0,104	
Некоторые ковалентные связи		
—C—H		
—C—N		
H—O—H		

одинарных углерод-углеродных связей равна 0,154 нм (или 1,54 Å, если использовать более старую единицу длины, применявшуюся ранее в структурной химии); двойные связи короче, их длина составляет примерно 0,134 нм. В отличие от одинарных двойные углерод-углеродные связи обладают большей жесткостью и не допускают свободного вращения. При наличии в молекуле двойной связи углы между одинарными связями увеличиваются (рис. 3-4). Углы между связями и длины связей (от центра одного атома до центра другого) лучше всего можно показать с помощью *моделей из шариков и стержней*, тогда как внешние контуры органических молекул хорошо видны на *пространственных моделях* (рис. 3-5), составные части которых пропорциональны по размерам радиусам атомов (табл. 3-3). Из рассмотренных здесь данных следует, что органические биомолекулы имеют характерные размеры и трехмерную структуру, определяемые строением их скелета и расположением боковых групп.

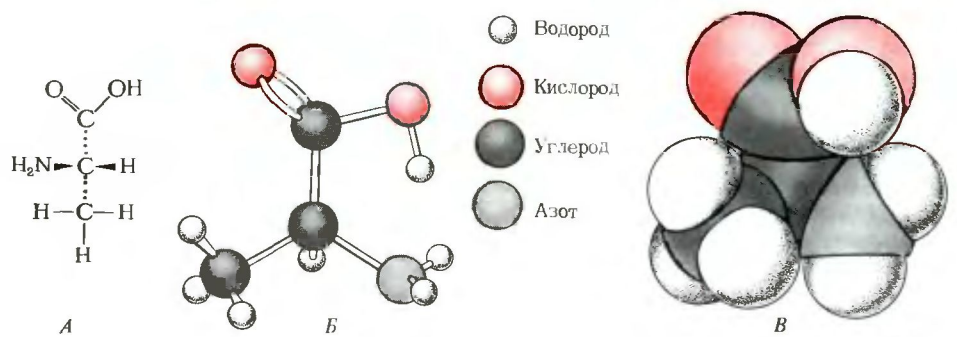
Трехмерная структура (конформация) органических биомолекул играет исключительно важную роль во многих биохимических процессах, в частности при взаимодействии каталитических центров



Рис. 3-6. Комплементарное соответствие молекулы субстрата активному, или каталитическому, центру молекулы фермента. Каталитический центр распознает лишь те молекулы, пространственные характеристики и размеры которых в точности соответствуют его строению.

ферментов с субстратами (рис. 3-6). Для обеспечения нормальных биологических функций молекулы фермента и субстрата должны быть *комплементарными*, т. е. их структуры должны стерически точно соответствовать друг другу. Такая же строгая комплементарность необходима для связывания молекулы гормона с его рецептором на поверхности клетки, для репликации ДНК и многих других протекающих в клетке процессов. Поэтому изучение трехмерной структуры биомолекул при помощи точных физических методов составляет важную часть современных исследований, направленных на выяснение связи между структурой клеток и их биохимическими функциями.

Рис. 3-5. Модели, показывающие строение аминокислоты аланина. *А*. Перспективное изображение структурной формулы. *Б*. Модель из шариков и стержней, на которой хорошо видны относительные длины связей и углы между ними. Шарики показывают приблизительные размеры атомных ядер. *В*. Пространственная модель. Здесь относительные размеры всех атомов точно соответствуют их вандерваальсовым радиусам (см. также табл. 3-3).



3.4. Функциональные группы органических биомолекул определяют их химические свойства

Почти все органические биомолекулы можно рассматривать как производные *углеводородов* – соединений, состоящих из атомов углерода и водорода. Скелет углеводородов построен из атомов углерода, соединенных ковалентными связями; остальные связи атомов углерода используются для связывания их с атомами водорода. Скелеты углеводородов очень устойчивы, поскольку электронные пары в одинарных и двойных углерод-углеродных связях в равной мере принадлежат обоим соседним атомам углерода.

Один или более атомов водорода в углеводородах могут быть замещены различными *функциональными группами*. При этом образуются различные семейства органических соединений. К типичным семействам органических соединений с характерными функциональными группами относятся спирты, в молекулах которых имеется одна или несколько *гидроксильных групп*; *амины*, содержащие *аминогруппы*; *кетоны*, содержащие *карбонильные* группы и *кислоты* с *карбоксильными* группами (табл. 3-4). Некоторые другие часто встречающиеся функциональные группы также играют важную роль в биомолекулах (табл. 3-5).

Функциональные группы органических биомолекул химически гораздо более реакционноспособны, чем насыщенные углеводородные скелеты, которые с трудом поддаются воздействию большинства химических агентов. Функциональные группы могут изменять характер распределения электронов и расположение близлежащих атомов, влияя таким образом на реакционную способность всей органической молекулы в целом. Наличие тех или иных функциональных групп в органических биомолекулах позволяет анализировать и предсказывать поведение последних в химических реакциях. Как мы увидим дальше, действие ферментов (катализаторов живых клеток) основано на распознавании специфической функциональной группы в биомолекуле и каталитическом изменении ее структуры.

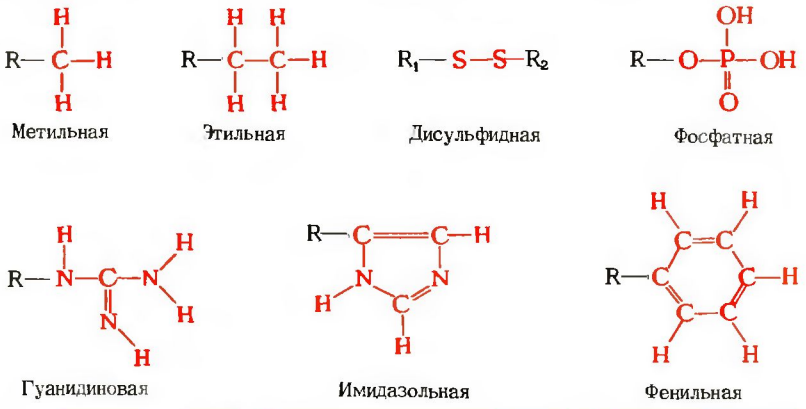
Таблица 3-4. Функциональные группы, характеризующие семейства органических соединений

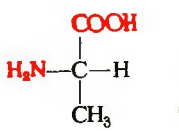
R_1 и R_2 означают углеводородные цепи, к которым присоединены функциональные группы.

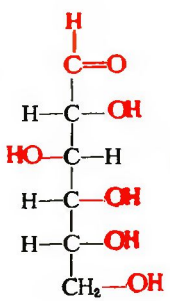
Функциональная группа	Строение	Семейство
Гидроксильная	R_1-O-H	Спирты
Альдегидная	$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-H$	Альдегиды
Карбонильная	$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-R_2$	Кетоны
Карбоксильная	$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-OH$	Кислоты
Аминогруппа	$R_1-N(H)(H)$	Амины
Амидогруппа	$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-N(H)(H)$	Амиды
Сульфгидрильная	R_1-S-H	Тиолы
Сложноэфирная	$R_1-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-O-R_2$	Сложные эфиры
Эфирная	R_1-O-R_2	Простые эфиры

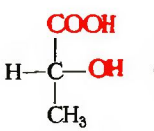
Большинство биомолекул, с которыми нам предстоит иметь дело, содержит функциональные группы двух или нескольких типов и потому обладает *полифункциональными* свойствами. Функциональные группы каждого типа в таких молекулах проявляют характерные для них химические особенности и вступают в определенные реакции. В качестве примера можно привести *аминокислоты* – важное семейство биомолекул, которые

Таблица 3-5. Некоторые другие функциональные группы, присутствующие в биомолекулах




Аминокислота аланин (один из строительных блоков белков)


Глюкоза (сахар)


Молочная кислота (продукт метаболизма глюкозы)

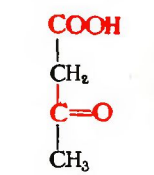

Ацетоуксусная кислота (метаболический продукт, образующийся при окислении жиров)

Рис. 3-7. Биомолекулы с несколькими функциональными группами.

в основном служат строительными блоками белков. Все аминокислоты содержат функциональные группы по меньшей мере двух типов: аминогруппу и карбоксильную группу. На рис. 3-7 приведена формула аминокислоты *аланина*, на которой видны обе эти группы. Химические свойства этой аминокислоты полностью определяются химическими свойствами карбоксильной группы и аминогруппы. Еще одним примером часто встречающихся полифункциональных биомолекул может служить простой сахар *глюкоза*, в молекуле которой содержатся функциональные группы двух типов – гидроксильные группы и альдегидная группа (рис. 3-7). В дальнейшем мы неоднократно убедимся в том, насколько важную роль играют функциональные группы биомолекул в их биологической активности.

3.5. Многие биомолекулы асимметричны

Тетраэдрическое расположение одинарных связей, образуемых атомом углерода, придает некоторым органическим соединениям еще одно замечательное свойство, имеющее исключительно важное значение в биологии. Во всех случаях,

когда в молекуле органического соединения атом углерода связан с четырьмя разными атомами или функциональными группами, говорят, что этот атом *асимметричен*, поскольку он может существовать в двух изомерных формах, называемых *энантиомерами*, различающимися своей пространственной конфигурацией. Как показано на рис. 3-8, энантиомеры относятся друг к другу как предмет и несовместимое с ним зеркальное отражение его. Энантиомеры, называемые также *оптическими изомерами*, или *стереоизомерами*, в химических реакциях ведут себя одинаково, но различаются по весьма характерному физическому свойству, а именно по способности вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света. Если раствор, содержащий энантиомер одного типа, вращает плоскость поляризации вправо, то раствор энантиомера другого типа будет вращать плоскость поляризации влево; угол вращения можно измерить при помощи поляриметра. Соединения, молекулы которых не содержат асимметрических атомов углерода, не способны вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света.

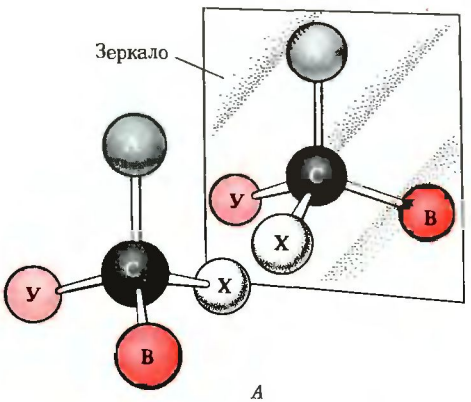
Изображенная на рис. 3-8 аминокислота аланин представляет собой асимметрическую молекулу, поскольку ее центральный атом углерода имеет четыре различных заместителя: метильную группу, аминогруппу, карбоксильную группу и атом водорода. В дальнейшем мы увидим, что два энантиомера аланина в структурном отношении являются несовместимыми между собой зеркальными отражениями друг друга. Эти две формы аланина относятся одна к другой так же, как правая рука к левой, а по нашему опыту мы хорошо знаем, что на правую руку нельзя надеть перчатку для левой руки. Поскольку соединения с асимметрическими атомами углерода встречаются в двух формах, которые можно рассматривать как левые и правые, они получили название *хиральных соединений* (от греческого слова "chiros", что значит рука). Соответственно центральный, или асимметрический, атом хиральных соединений называют *хиральным атомом*, или *хиральным центром*.

Кроме аминокислот многие другие органические биомолекулы аминокислот также обладают хиральными свойствами и содержат один или большее число асимметрических атомов углерода. Примером таких соединений может служить широко распространенный сахар глюкоза, в молекуле которой содержится не менее пяти асимметрических атомов углерода. В живых организмах хиральные молекулы присутствуют обычно только в одной из двух возможных форм. Так, аминокислоты, и в частности аланин, встречаются в белках только в одной хиральной форме. Аналогичным образом глюкоза, основная структурная единица крахмала, обнаруживается в биологических объектах только в одной из своих многочисленных хиральных форм. Наоборот, когда химик в лабораторных условиях синтезирует органическое соединение с одним асимметрическим атомом углерода, используя обычные небиологические реакции, с равной вероятностью образуются обе возможные хиральные формы, в результате чего получается эк-

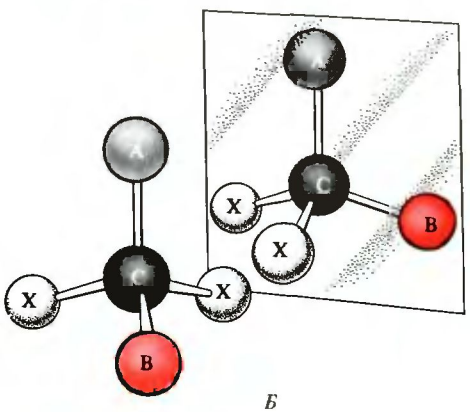
Рис. 3-8. Хиральные молекулы. *А*. Если атом углерода связан с четырьмя разными группами или атомами (A, B, X, Y), то последние могут быть расположены двумя способами; при этом образуются две структуры, представляющие собой несовместимые зеркальные отражения друг друга. Такой атом углерода является асимметрическим; он называется хиральным атомом, или хиральным центром. *Б*. Когда атом углерода связан только с тремя различными группами или атомами, возможна лишь одна пространственная конфигурация; такая молекула является симметрической или ахиральной. В этом случае молекулу также можно представить как два зеркальных отражения, которые, однако, совместимы друг с другом. Если молекулу, изображенную на рисунке слева, повернуть против часовой стрелки (ось вращения проходит сверху вниз через атом A), то она совместится с молекулой, изображенной справа. *В*. Аланин представляет собой хиральную молекулу, поскольку центральный атом углерода в ней связан с четырьмя разными заместителями; это допускает существование двух структур, представляющих несовместимые между собой зеркальные отражения друг друга. Две разные хиральные формы аланина называют D-аланином и L-аланином. Вопрос о физическом смысле букв D и L, используемых для обозначения хиральных форм асимметрических молекул, рассматривается в гл. 5.

вимолярная смесь двух энантиомеров. Разделить эти две хиральные формы в такой смеси можно лишь при помощи специальных физических методов. В живых клетках хиральные биомолекулы синтезируются с участием ферментов таким образом, что возникает только один из двух возможных энантиомеров. Это происходит потому, что сами молекулы ферментов имеют хиральную структуру.

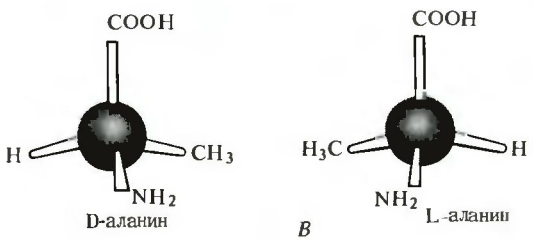
Стереоспецифичность, свойственная многим биомолекулам,– это характерная особенность молекулярной логики живых клеток, которая еще раз убедительно подтверждает, что трехмерная структура биомолекул имеет чрезвычайно важное значение для их биологических функций. Более подробно мы рассмотрим хиральные молекулы и явление стереоизомерии, когда будем знакомиться с аминокислотами (гл. 5) и сахарами (гл. 11).



А



Б



В

3.6. Основные классы биомолекул в клетках представлены очень крупными молекулами

В табл. 3-6 приведены основные классы биомолекул, обнаруживаемые у бактерии *Escherichia coli*, данные о вкладе каждого класса в общую массу клетки и приблизительное число биомолекул каждого

Таблица 3-6. Молекулярные компоненты клетки *E. coli*

	Содержание, % (по весу)	Приблизительное число различных видов молекул
Вода	70	1
Белки	15	3000
Нуклеиновые кислоты		
ДНК	1	1
РНК	6	>3000
Полисахариды	3	5
Липиды	2	20
Молекулы, выполняющие роль строительных блоков и промежуточные соединения	2	500
Неорганические ионы	1	20

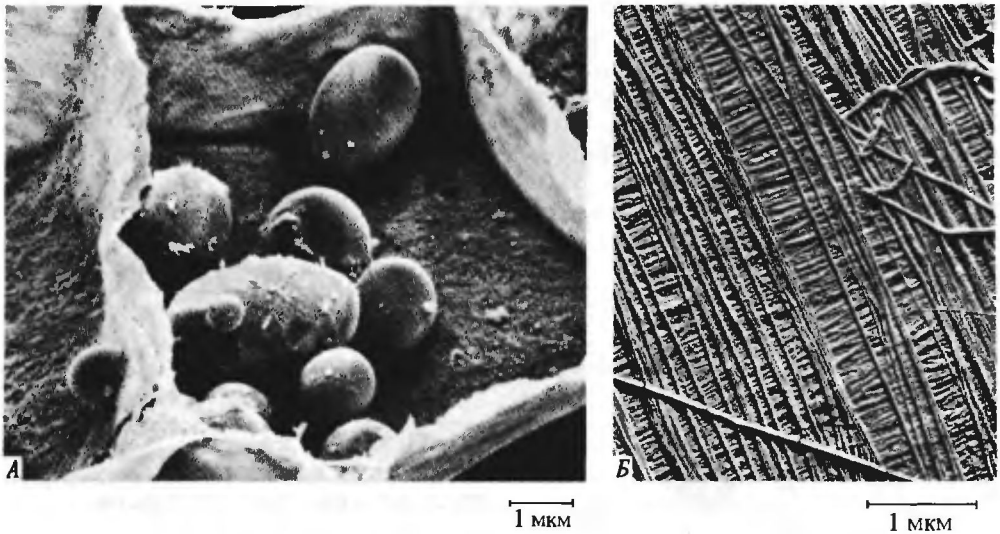


Рис. 3-9. *А.* Микрофотография гранул крахмала в клетке картофеля, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. *Б.* Электронная микрофотография, на которой видна послойная упаковка волокон целлюлозы, приводящая к формированию структурного каркаса клеточных стенок растений.

класса. Наибольшую часть массы клеток *E. coli*, как и всех других клеток и организмов, составляет вода. На долю неорганических солей и других минеральных веществ приходится лишь незначительная часть сухого веса клеток; многие из этих веществ присутствуют в клетке примерно в тех же соотношениях, что и в морской воде. Практически все сухое вещество клеток *E. coli* так же, как и всех остальных клеток, составляют органические соединения, представленные четырьмя основными видами молекул: *белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами* и *липидами*. На долю белков приходится основная часть живой материи не только в клетках *E. coli*, но и во всех других клетках. Термин «протеин» (белок) происходит от греческого слова proteios, означающего «первый» или «главный». У всех живых организмов белки являются прямыми продуктами генов и эффекторами их действия. Многие белки обладают специфической каталитической активностью и функционируют как ферменты. Белки других типов играют роль структурных элементов в клетках и тканях. Ряд белков, присутствующих в мембранах клеток, способствуют транспорту некоторых веществ внутрь клеток и наружу. В осуществлении множества других биологических функций также участвуют белки – пожалуй, наиболее универсальные в этом отношении биомолекулы. *Нуклеиновые кислоты*, ДНК и РНК, во всех клетках выполняют одни и те же функции, обеспечивая хранение, передачу и реализацию генетической информации. ДНК служит хранилищем генетической информации, а различные типы РНК способствуют ее реализации в процессе синтеза белков.

Полисахариды выполняют в основном две функции. Одни из них, например *крахмал*, представляют собой различные формы запасного «горючего», снабжающего клетку энергией, тогда как другие, например *целлюлоза*, используются в качестве внеклеточных структурных компонентов (рис. 3-9). *Липиды*, к которым относятся жиры и жироподобные вещества, во-первых, играют роль основных структурных компонентов мембран и, во-вторых, служат запасной формой богатого энергией «горючего».

Эти четыре наиболее важных класса биомолекул имеют одно общее свойство: все они представляют собой относительно крупные структуры с высокими моле-

кулярными массами и потому называются *макромолекулами.* Молекулярные массы различных белков лежат в пределах от 5000 до 1 млн.; у некоторых нуклеиновых кислот молекулярные массы достигают нескольких миллиардов; полисахариды, например крахмал, также имеют высокие молекулярные массы порядка миллионов. Размеры отдельных липидных молекул значительно меньше (мол. масса 50–1500). Однако обычно липидные молекулы объединяются друг с другом и образуют очень крупные структуры, которые включают тысячи молекул и функционируют, по существу, как макромолекулярные системы (такая система служит, в частности, «основой» клеточных мембран). Таким образом, мы можем отнести подобные липидные структуры также к макромолекулам.

3.7. Макромолекулы образуются из небольших молекул, играющих роль строительных блоков

Мы уже убедились (см. гл. 1), что, хотя в живых организмах содержится множество различных белков и нуклеиновых кислот, построение этих сложных структур основано на весьма простых принципах. В качестве строительных блоков, из которых состоят все белки и нуклеиновые кислоты, используются простые молекулы; число этих молекул невелико, и они имеют одно и то же строение у всех видов организмов. Молекулы всех белков, представляющие собой длинные цепи, построены всего из 20 разных аминокислот, расположенных в той или иной линейной последовательности. Аналогичным образом длинные, напоминающие цепи молекулы нуклеиновых кислот у всех организмов построены из небольшого числа нуклеотидов, образующих различные последовательности. Белки и нуклеиновые кислоты являются *информационными макромолекулами*; каждый белок и каждая нуклеиновая кислота несут определенную информацию, закодированную в последовательности строительных блоков.

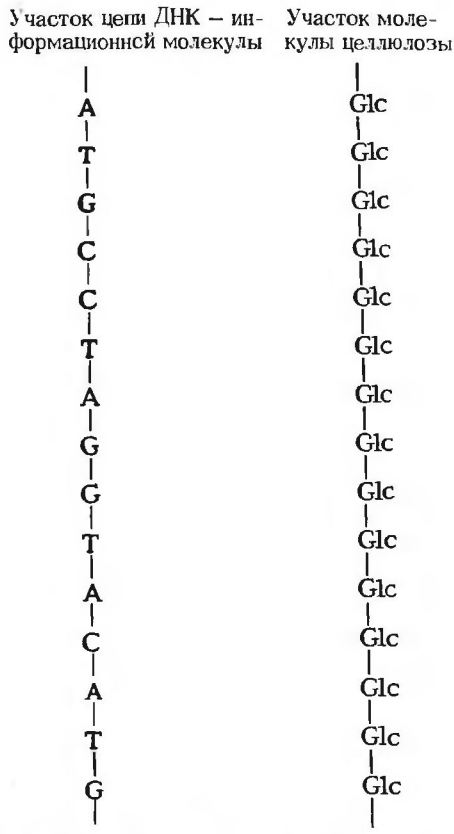
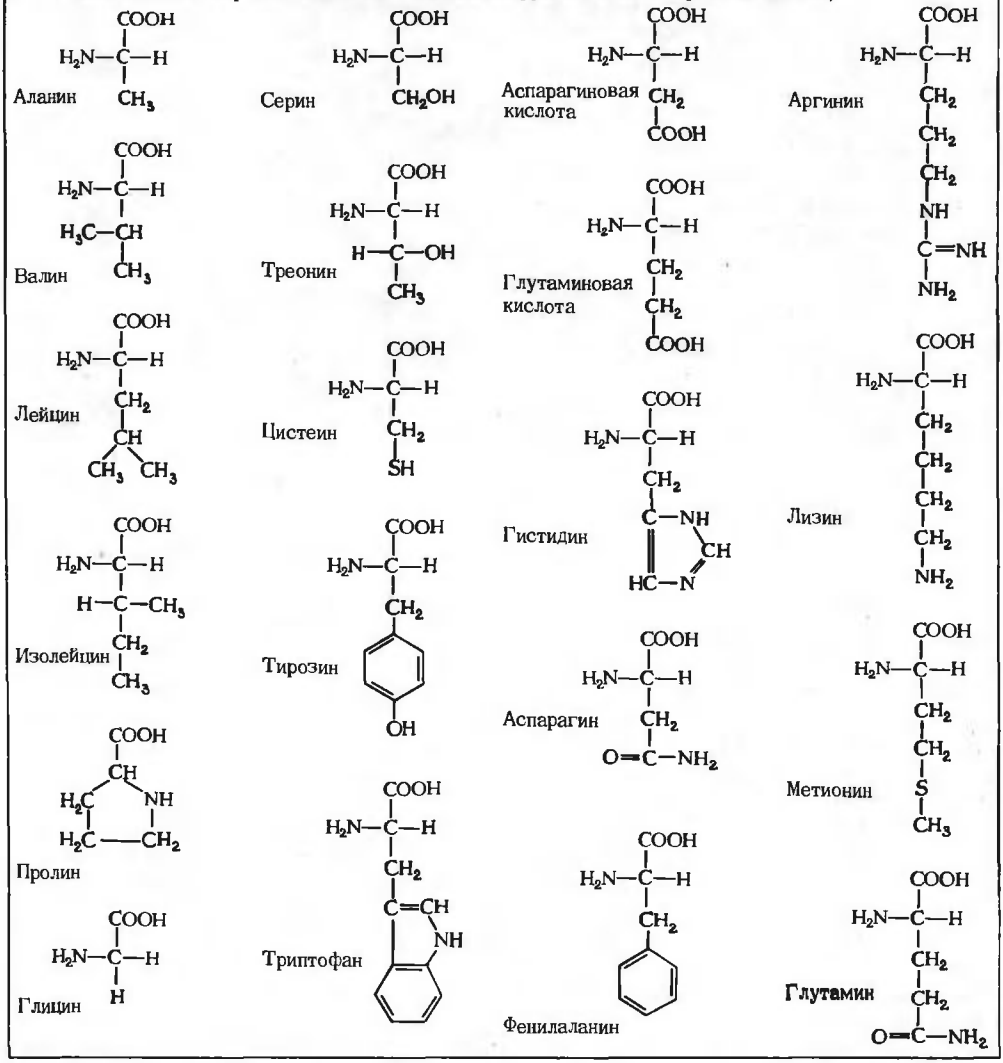


Рис. 3-10. Последовательности строительных блоков в информационных и неинформационных макромолекулах. Буквами A, T, G и C обозначены четыре основания в ДНК – информационной макромолекуле, Glc – глюкоза, повторяющаяся структурная единица в молекуле целлюлозы, которая не содержит генетической информации.

Полисахариды также состоят из большого числа строительных блоков. Крахмал и целлюлоза, например, представляют собой длинные цепи строительных блоков одного типа, а именно сахара глюкозы. Поскольку полисахариды построены из структурных единиц только одного типа или из чередующихся единиц двух типов, они не могут нести закодированную генетическую информацию (рис. 3-10).

Таким образом, более 90% сухого органического вещества в живых организмах составляют тысячи разнообразных макромолекул, построенных всего лишь из трех-четырех десятков различных ви-

А. 20 аминокислот – строительных блоков белков (*R*-группы выделены красным цветом)



дов простых органических молекул. Поэтому, чтобы понять структуру биологических макромолекул и некоторые организационные принципы биохимии, нам необходимо знать строение и свойства сравнительно небольшого числа органических соединений.

3.8. Молекулы, используемые в качестве строительных блоков, имеют простую структуру

На рис. 3-11 показана структура биомолекул, относящихся к разным семействам строительных блоков. В белках строительными блоками служат 20 различных аминокислот; все они содержат карбоксильную группу и аминогруппу, которые связаны с одним и тем же атомом углерода. Аминокислоты отличаются друг от друга строением только одной части молекулы, а именно *боковой группы*, обозначаемой обычно символом R (рис. 3-11, *А*).

Все нуклеиновые кислоты образуются из восьми различных повторяющихся структурных единиц – *нуклеотидов*; четыре из них играют роль структурных еди-

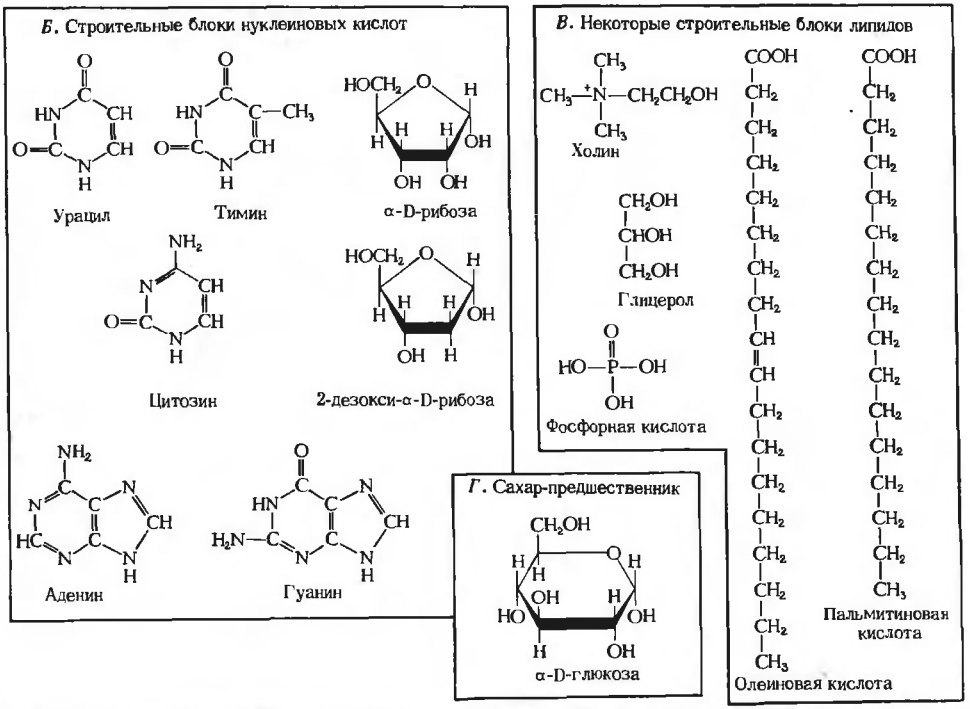


Рис. 3-11. Первичные биомолекулы, играющие роль основных строительных блоков, представляют собой как бы буквы биохимического алфавита. На этом рисунке показаны 20 аминокислот (*А*), из которых построены белки всех организмов, пять азотистых оснований и два пятиуглеродных сахара (*Б*), входящих в состав всех нуклеиновых кислот, основные строительные блоки липидов (*В*) и α-D-глюкоза (*Г*) – родоначальник большинства углеводов.

ниц ДНК, а другие четыре используются при построении РНК. Каждый нуклеотид в свою очередь состоит из трех более мелких единиц: 1) азотистого основания, 2) пятиуглеродного сахара и 3) фосфорной кислоты. Пять различных оснований и два углеводных компонента нуклеотидов показаны на рис. 3-11, *Б*.

Как указывалось выше, наиболее часто встречающиеся в природе полисахариды, крахмал и целлюлоза, состоят из повторяющихся единиц D-глюкозы. Липиды также построены из сравнительно небольшого числа типов органических молекул. Большинство молекул липидов содержит одну или несколько длинноцепочечных жирных кислот, производных *пальмитиновой* или *олеиновой* кислот (рис. 3-11, *В*). Кроме того, многие липиды содержат спирты, например *глицерин*, а некоторые еще и фосфорную кислоту. Таким образом, бóльшая часть биомолекул построена примерно из трех десятков органических соединений, приведенных на рис. 3-11.

Все эти соединения выполняют самые разнообразные функции в живых организмах. Так, изображенная на рис. 3-12 D-глюкоза не только служит строительным блоком резервного углевода крахмала и структурного углевода целлюлозы, но и играет роль предшественника в синтезе других сахаров, таких, как *D-фруктоза*, *D-манноза* и *сахароза* (тростниковый сахар). Жирные кислоты – это компоненты не только сложных липидов клеточных мембран, но и жиров – богатых энергией соединений, обеспечивающих накопление запасного «топлива» в организме. Кроме того, жирные кислоты входят в состав защитного воскового налета на листьях и плодах растений, а также служат предшественниками других специализированных соединений. Аминокислоты – это не только строительные блоки белков; некоторые из них могут быть нейроме-



Рис. 3-12. Каждая первичная биомолекула, используемая в качестве строительного блока, играет также роль предшественника в биосинтезе многих биомолекул других типов.

диаторами (нейротрансмиттерами) и предшественниками ряда гормонов, а у растений – токсичных алкалоидов. Аденин служит строительным блоком нуклеиновых кислот, некоторых коферментов и АТР – соединения, выполняющего роль переносчика энергии в клетках.

Таким образом, изображенные на рис. 3-11 биомолекулы, играющие роль строительных блоков, являются, по существу, предшественниками или родоначальниками большинства других биомолекул. Поэтому мы можем рассматривать их как молекулярный алфавит живой материи. К этим простым органическим веществам нельзя относиться без некоторой доли благоговения и восхищения – ведь они были отобраны в процессе эволюции и стали участниками столь необычных и уникальных взаимоотношений, совокупность которых мы называем молекулярной логикой живых организмов.

3.9. Структурная иерархия в молекулярной организации клеток

Рассмотренные нами биомолекулы, играющие роль строительных блоков, имеют очень небольшие размеры по сравнению с биологическими макромолекулами. Например, длина молекулы такой аминокислоты, как аланин, составляет менее 0,7 нм, тогда как в эритроцитах типичный белок *гемоглобин*, осуществляющий перенос кислорода, состоит примерно из 600 аминокислотных единиц, соединенных в длинные цепи, уложенные в виде глобулярных структур. Молекулы белков, в свою очередь, малы по сравнению, например, с *рибосомами* – субмолекулярными частицами, содержащимися в тканях животных. В состав каждой из них входит приблизительно 70 различных белков и четыре молекулы нуклеиновой кислоты. Рибосомы, в свою очередь, малы по сравнению с такими органеллами, как митохондрии. Таким образом, переход от простых биомолекул к более крупным субклеточным структурам происходит скачкообразно.

На рис. 3-13 показана структурная *иерархия* в молекулярной организации клеток.

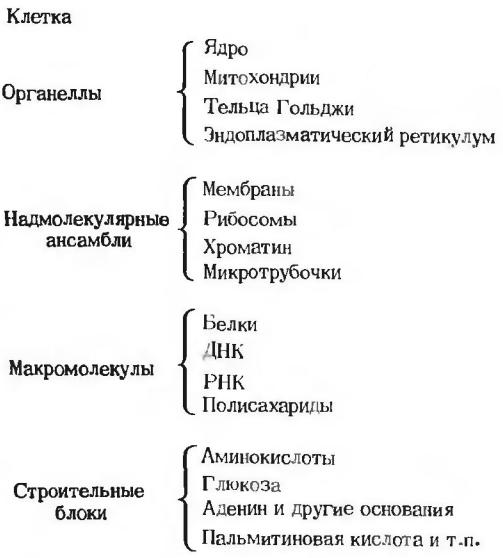


Рис. 3-13. Структурная иерархия в молекулярной организации клеток.



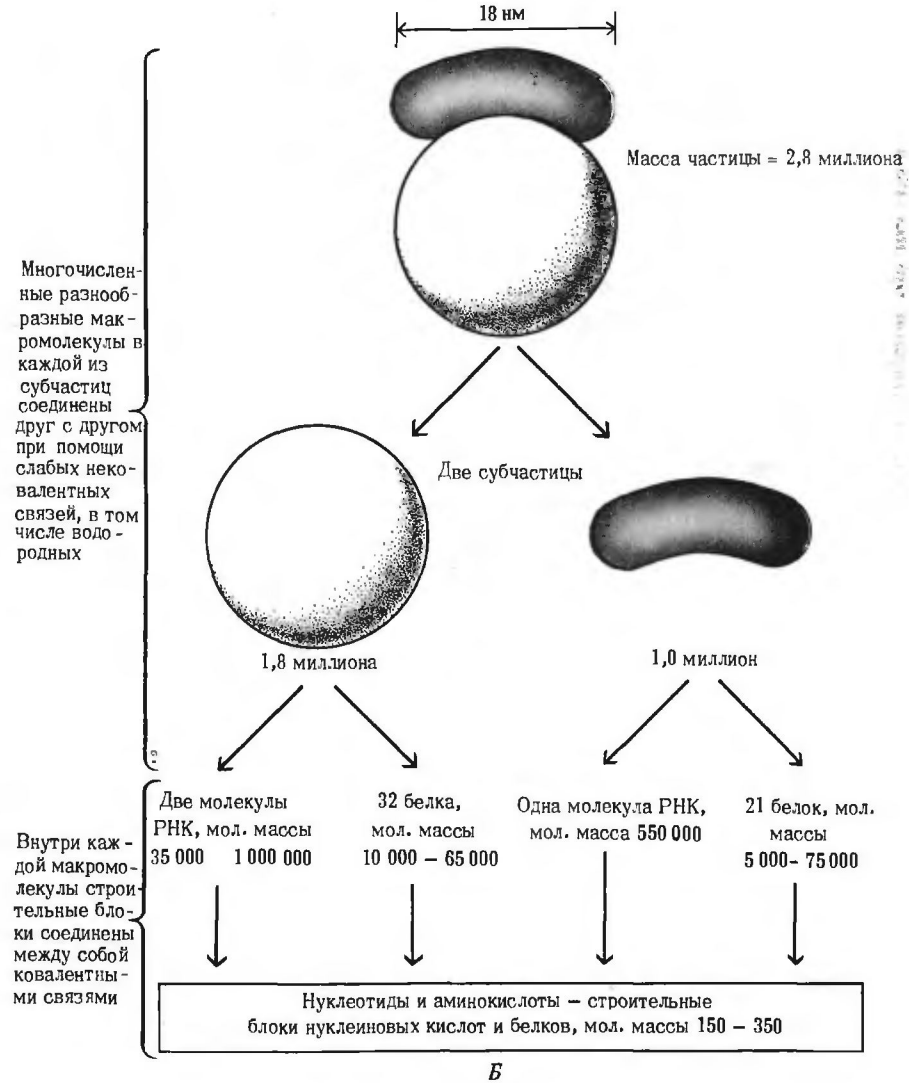


Рис. 3-14. Рибосомы. *А*. Электронная микрофотография сгруппированных рибосом дрожжевых клеток. *Б*. Структурная организация рибосомы *E. coli*. Две субчастицы рибосом *E. coli* на самом деле имеют неправильную форму, в чем мы убедимся в гл. 29.

ток. Самые крупные компоненты эукариотических клеток, *органеллы*, построены из более мелких субструктур – *надмолекулярных ансамблей*, а те в свою очередь – из *макромолекул*. Например, в одной из органелл – клеточном ядре – присутствует несколько типов надмолекулярных ансамблей, таких, как *мембраны, хроматин* и *рибосомы*. Каждый такой надмолекулярный ансамбль состоит из макромолекул; в хроматине, например, содержатся ДНК, различные белки и небольшое количество РНК. Каждая макромолекула в свою очередь состоит из небольших строительных блоков.

В белках, нуклеиновых кислотах и полисахаридах отдельные строительные блоки соединены друг с другом ковалентными связями, тогда как в надмолекулярных ансамблях (в рибосомах, мембранах или хроматине) объединение макромолекул происходит при помощи значительно более слабых взаимодействий. К таким взаимодействиям относятся, в частности, *водородные связи*, энергия которых составляет всего лишь несколько килокалорий, тогда как энергия ковалентных связей достигает 80–100 ккал/моль. В рибосомах, представляющих собой характерные и специфические трехмерные комплексы, молекулы белков и РНК связаны друг с другом благодаря точному соответствию их структур и образованию многочисленных слабых связей (например, водородных), которые, однако, в совокупности оказываются достаточно сильными (рис. 3-14).

Хотя молекулы, играющие роль строительных блоков, очень малы по сравнению с клетками и органеллами, они могут влиять на форму и функции этих гораздо более крупных структур. Так, при генетическом заболевании человека – *серповидноклеточной анемии* в эритроцитах больных обнаруживаются дефектные молекулы гемоглобина, осуществляющего перенос кислорода. Это обусловлено тем, что при синтезе молекул гемоглобина, состоящих почти из 600 аминокислотных остатков, два из них заменяются на другие. Столь незначительное структурное изменение крошечного участка молекулы гемоглобина приводит к нарушению его нормальных функций: эритроциты больных приобретают неправильную форму и утрачивают способность нормально функционировать. Этот пример показывает, что размеры, форма и биологические функции не только макромолекул, но и целых клеток могут зависеть от размеров и формы их элементарных структурных компонентов.

3.10. Биомолекулы первыми возникли в процессе химической эволюции

Поскольку у всех видов живых организмов макромолекулы образуются одним и тем же способом всего лишь из нескольких десятков молекул, играющих роль строительных блоков, было высказано предположение, что все живые организмы произошли от одной первичной линии клеток. Согласно этому предположению, первые возникшие на Земле и выжившие клетки были построены всего из нескольких десятков различных органических молекул, причем каждая из них в отдельности и все они вместе взятые оказались наделенными химическими и физическими свойствами в таком благоприятном сочетании, что это позволило им функционировать в качестве строительных блоков макромолекул и осуществлять столь важные для живых клеток процессы, как преобразование энергии и самовоспроизведение. Такой набор первичных биомолекул, вероятно, сохранялся в ходе биологической эволюции в течение миллиардов лет вследствие его уникальной «пригодности» для реализации процессов жизнедеятельности.

Однако здесь мы сталкиваемся с одним противоречием. В настоящее время органические соединения, в том числе и основные биомолекулы, в земной коре встречаются лишь в следовых количествах. Каким же образом у первых живых организмов возникли столь харктерные органические соединения, используемые в качестве строительных блоков? В 20-х годах нашего столетия А. И. Опарин высказал предположение, что на ранних этапах истории Земли в водоемах на ее поверхности содержалось много раз-

личных органических соединений, концентрация которых могла быть достаточно высокой. Примерно 3 млрд. лет назад из этого теплого органического «бульона» каким-то образом возникли первые примитивные живые клетки. Опарин предположил, что химические и физические процессы, происходившие на первобытной Земле, могли приводить к самопроизвольному образованию простых органических соединений, таких, как аминокислоты и сахара, из компонентов первичной атмосферы, которая по своему составу сильно отличалась от нашего воздуха.



Рис. 3-15. Вспышки молний, сопровождавшие вулканическое извержение, в результате которого в 1963 г. у берегов Исландии возник остров Сертси. Интенсивные электрические поля, высокие температуры и ударные волны, весьма часто возникавшие при таких катаклизмах на первобытной Земле, могли сыграть роль основного фактора в происхождении органических соединений.

Согласно теории Опарина, под воздействием электрической энергии грозовых разрядов или тепла, выделявшегося в результате вулканической деятельности (рис. 3-15), происходила активация метана, аммиака, водяных паров и других компонентов первичной атмосферы, так что они вступали в реакции друг с другом, приводившие к образованию простых органических соединений. Считают, что эти соединения могли конденсироваться и растворяться в первичном океане, который постепенно, в течение столетий, обогащался простыми органическими соединениями самых разных типов. В этом теплом растворе некоторые органические молекулы более активно взаимодействовали друг с другом, образуя при этом более крупные комплексы и структуры. Последние в свою очередь очень медленно и постепенно на протяжении миллионов лет самопроизвольно объединялись, что привело в конце концов к возникновению мембран, белков и катализаторов, которые образовали единые системы, послужившие предшественниками первых примитивных жизнеспособных клеток. В течение многих лет гипотеза Опарина оставалась спекулятивной, так как казалось, что она не поддается проверке.

3.11. Химическую эволюцию можно воспроизвести в лабораторных условиях

Сейчас концепция Опарина о происхождении биомолекул подтверждена результатами лабораторных экспериментов. Классический опыт, иллюстрирующий абиотическое (небиологическое) происхождение органических биомолекул, провел в 1953 г. Стенли Миллер. В течение недели (или дольше) он пропускал электрические разряды, которые должны были имитировать молнии, через газовые смеси метана, аммиака, водяных паров и водорода, заполнявшие пространство между двумя электродами (рис. 3-16). Затем он охлаждал содержимое закрытого сосуда, в котором проводилась реакция, чтобы сконденсировать водорастворимые компоненты, и анализировал образовавшиеся продукты. В газовой фазе Миллер обнаружил окись и двуокись углерода и азот, которые, очевидно, образовались из исходной газовой

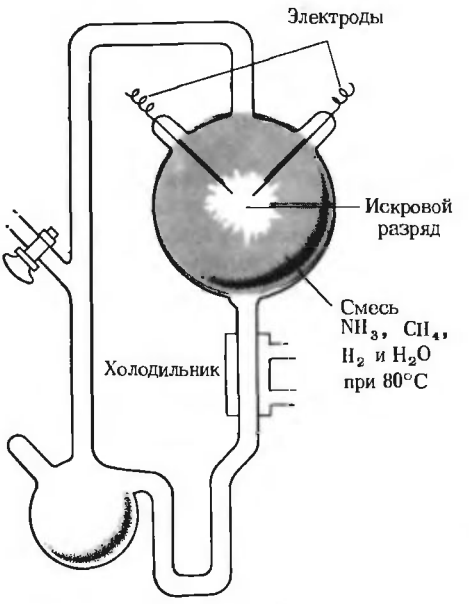


Рис. 3-16. Искроразрядный аппарат, предназначенный для демонстрации абиотического образования органических соединений в условиях первичной атмосферы.

смеси. В темно окрашенном конденсате содержались значительные количества водорастворимых органических веществ. Среди соединений, идентифицированных Миллером, оказались α-аминокислоты, в том числе некоторые аминокислоты, входящие в состав белков. Кроме того, было обнаружено несколько простых органических кислот, встречающихся в живых организмах, и в частности уксусная кислота.

Миллер высказал предположение, что сначала из метана и аммиака образовался цианистый водород (HCN) – вещество, обладающее очень высокой реакционной способностью; последующее взаимодействие цианистого водорода с другими компонентами газовой смеси привело к образованию ряда аминокислот. С тех пор другие исследователи провели много экспериментов подобного типа с использованием различных смесей газов, в том числе азота, водорода, окиси и двуокиси углерода; эти эксперименты вновь продемонстрировали, что при наличии доступного источника энергии из таких смесей легко образуются аминокислоты и другие органические биомолекулы. Было установлено, что образование простых органических молекул активируется под влиянием самых разных форм энергии и излучения – тепла, видимого света, ультрафиолетового излучения, рентгеновских лучей, γ-излучения, искровых и тихих электрических разрядов, ультразвука, ударных волн, а также α- и β-частиц. В экспериментах по имитации условий, существовавших на первобытной Земле, легко образуются сотни различных органических соединений, в том числе представители всех наиболее важных типов молекул, содержащихся в клетках, а также целый ряд веществ, не встречающихся в живой природе. Среди всех этих веществ обнаружены многие аминокислоты, входящие в состав белков, азотистые основания, выполняющие роль строительных блоков нуклеиновых кислот, и ряд органических кислот и сахаров, содержащихся в биологических системах. Таким образом, представляется вполне вероятным, что первичный океан был обогащен растворимыми органическими соединениями, в число которых, возможно, входили многие, если не все, молекулы, используемые сегодня в живых клетках в качестве строительных блоков.

Важным подтверждением того, что простые органические молекулы могут образоваться небиологическим путем, послужило обнаружение спектроскопическим методом сотен различных органических соединений в межзвездном пространстве. Эти наблюдения позволили предположить, что жизнь могла возникнуть и в других частях Вселенной. Под термином *химическая эволюция* подразумевается возникновение органических веществ из неорганических предшественников под воздействием энергии и их дальнейшее развитие. Теперь мы знаем, что Земля образовалась примерно 4800 млн. лет назад. Предполагается, что химическая эволюция продолжалась на Земле по меньшей мере в течение первых 1000 млн. лет ее истории. Затем, вероятно около 3500 млн. лет назад, возникли первые живые клетки, после чего начался процесс биологической эволюции, который продолжается и в наши дни.

Сейчас концентрация органических соединений в океанах относительно невелика; вне живых организмов биомолекулы можно обнаружить лишь в следовых количествах. Что же случилось с первичным «бульоном», богатым органическим веществом? Предполагают, что первые живые клетки использовали содержащиеся в морях органические соединения не только как строительные блоки для создания собственных структур, но и в качестве питательных веществ или «топлива», чтобы обеспечить себя энергией, необходимой для роста. Постепенно с течением времени органические вещества в первичном море стали исчезать быстрее, чем они образовывались под воздействием природных сил. Эта идея, а по существу и вся концепция химической эволюции в целом, была сформулирована более 100 лет назад Чарлзом Дарвином. Об этом свидетельствует следующий отрывок из письма, которое он написал в 1871 г. сэру Джозефу Хукеру: «Часто говорят, что и сейчас существуют все условия, которые необходимы были для возникновения первых живых организмов. Но если (о, как велико это «если») предположить, что в одном из небольших теплых водоемов из всех содержащихся в нем производных аммиака и солей фосфорной кислоты под влиянием света, тепла, электричества и т.д. возникло белковое соединение, готовое к дальнейшим более сложным превращениям, то в наши дни оно было бы немедленно поглощено или уничтожено. Однако до того, как появились живые существа, этого произойти не могло».

Исчезновение органических молекул из морей заставило живые организмы «учиться» самим создавать свои собственные органические биомолекулы. Они научились использовать энергию солнечного света путем фотосинтеза для получения сахаров и других органических соединений из двуокиси углерода; они научились также фиксировать азот из атмосферы и превращать его в азотсодержащие биомолекулы, например аминокислоты. В ходе дальнейшей эволюции различные живые организмы начали взаимодействовать друг с другом, обмениваясь питательными веществами и энергией, что приводило к созданию все более сложных экологических систем.

Опираясь на эти вводные главы, посвященные клеткам и взаимодействующим биомолекулам, из которых они состоят, мы можем приступить теперь к более детальному рассмотрению молекулярных компонентов клеток, не забывая о том, что все они подчиняются сложным законам молекулярной логики живого. Мы начнем с воды – жидкого матрикса всех живых организмов.

Краткое содержание главы

Бóльшая часть сухого вещества живых организмов состоит из углеродсодержащих органических соединений, в которых атомы углерода ковалентно связаны с другими атомами углерода, а также с атомами водорода, кислорода и азота. Углерод был отобран в ходе биологической эволюции, по-видимому, из-за наличия у него целого ряда благоприятных свойств. К их числу относится способность углеродных атомов соединяться друг с другом при помощи одинарных и двойных связей, что делает возможным образование самых разнообразных (линейных, разветвленных и циклических) скелетных структур, к которым присоединяются различные функциональные группы. Органические биомолекулы имеют характерные трехмерные формы, или конформации. Многие биомолекулы существуют в асимметрических, или хиральных, формах, называемых энантиомерами.

Бóльшая часть органического вещества в живых клетках состоит из макромолекул четырех основных типов: нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и ансамблей липидных молекул. Все макромолекулярные системы образуются из небольших, ковалентно связанных друг с другом молекул, играющих роль строительных блоков; число типов таких молекул относительно невелико. Молекулы белков представляют собой цепи, построенные из аминокислот двадцати типов; нуклеиновые кислоты – это цепи, состоящие из нуклеотидных единиц

четырех типов, а полисахариды – цепи простых повторяющихся остатков сахаров. Нуклеиновые кислоты и белки называются информационными макромолекулами; так как характерные последовательности их строительных блоков отражают генетическую индивидуальность различных видов организмов. Полисахариды, напротив, не являются информационными молекулами, поскольку они состоят из одинаковых повторяющихся единиц.

В молекулярной организации клеток существует структурная иерархия. Клетки содержат органеллы, такие, как ядро и митохондрии, которые в свою очередь содержат надмолекулярные структуры, например мембраны и рибосомы, а эти последние представляют собой группу объединенных между собой макромолекул, связанных друг с другом с помощью многочисленных относительно слабых межмолекулярных связей. В макромолекулах отдельные строительные блоки соединены друг с другом ковалентными связями.

Типичные биомолекулы, используемые в качестве строительных блоков, возникли самопроизвольно на ранних этапах истории Земли из атмосферных газов и воды под воздействием энергии. Эти процессы, в совокупности называемые химической эволюцией, можно воспроизвести в лабораторных условиях. Современные биомолекулы (строительные блоки), по-видимому, были отобраны на ранних этапах биологической эволюции благодаря тому, что они оказались лучше других приспособленными для выполнения биологических функций. Число таких биомолекул относительно невелико, однако они обладают весьма разнообразными свойствами и каждая из них может выполнять в клетках самые разные функции.

ЛИТЕРАТУРА

Baker J. J., Allen G. E. Matter, Energy, and Life: An Introduction for Biology Students, 4th ed., Addison-Wesley, Reading, Mass., 1981.

Callewaert D. M., Genyea J. Basic Chemistry: General, Organic, Biological, Worth, New York, 1980.

Calvin M. Chemical Evolution, Oxford University Press, London, 1969. (Имеется перевод: Кальвин М. Химическая эволюция.– М.: Мир, 1971.)

Dickerson R. E., Geis I. Chemistry, Matter, and the Universe, Benjamin, Menlo Park, Calif., 1976.

Frieden E. The Chemical Elements of Life, Sci. Am., 227, 52–64, July (1972).

Lehninger A. L. Biochemistry, 2d ed., Worth, New York, 1975.
В главе 37 более подробно рассматривается происхождение биомолекул и клеток.

Morrison R. T., Boyd R. N. Organic Chemistry, 3d ed., Allyn and Bacon, Boston, 1973. Прекрасный учебник органической химии; рассматриваются многие биомолекулы.

Orgel L. The Origins of Life: Molecules and Natural Selection, Wiley, New York, 1973. Очень интересная книга.

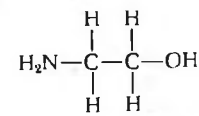
Weinberg S. The First Three Minutes: A Modern View of the Origin of the Universe, Basic Books, New York, 1977.

White E. H. Chemical Background for the Biological Sciences, 2d ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1970.

Вопросы и задачи

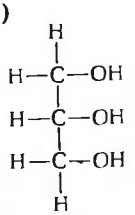
1. *Витамин С: отличается ли искусственно синтезированный витамин от природного?* Производители пищевых продуктов, богатых витаминами, утверждают, в частности, что витамины, полученные из природных источников, полезнее для здоровья, чем синтезированные искусственным путем. Считается, например, что чистая L-аскорбиновая кислота (витамин С) из плодов шиповника полезнее L-аскарбиновой кислоты, синтезированной на химическом заводе. Различаются ли витамины из этих двух источников? Может ли организм различать витамины из разных источников?
2. *Идентификация функциональных групп.* В табл. 3-4 и 3-5 показаны основные функциональные группы. Поскольку свойства и биологическая активность биомолекул в значительной степени зависят от их функциональных групп, важно уметь их идентифицировать. Укажите функциональные группы для каждой из приведенных ниже биомолекул и назовите их.

а)



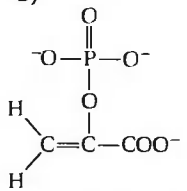
Этаноламин

б)



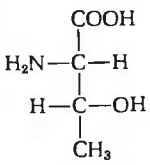
Глицерол

в)



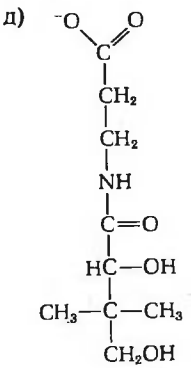
Фосфоенолпируват (промежуточный продукт метаболизма глюкозы)

г)



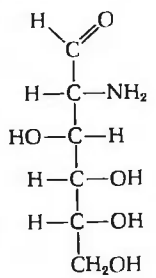
Треонин (аминокислота)

д)



Пантотенат (витамин)

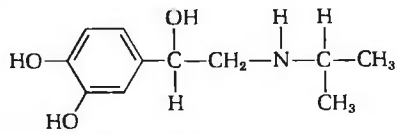
е)



D-глюкозамин

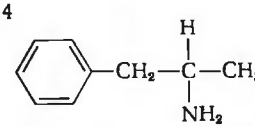
3. *Активность лекарственных веществ и стереохимия.* В некоторых случаях количественные различия в биологической активности двух энантиомеров одного и того же соединения выражены очень сильно. Например, D-изомер изопротеренола – лекарственного препарата, применяемого при легких приступах астмы, действует как бронхорасширяющее средство в 50–80 раз активнее, чем L-изомер. Укажите хиральный центр в молекуле изопротеренола. Почему два энантиомера так сильно различаются по биологической активности?
4. *Действие лекарственных препаратов и форма молекул.* Две фирмы, изготовляющие лекарственные препараты, выпускают один и тот же антидепрессант под разными коммерческими названиями – декседрин и бензедрин. Структурная формула этого вещества приводится ниже. По элементарному составу (т. е. по содержанию C, H и N) и физическим свойствам (температура плавления, растворимость и т. д.) оба препарата идентичны. Тем не менее декседрин рекомендуют применять внутрь в количестве 5 мг в день, тогда как рекомендуемая доза для препарата бензедрина значительно выше. Это означает, что для достижения одного и того же физиологического эффекта бензедрина требуется значительно больше, чем декседрина. Объясните это кажущееся противоречие.

Задача 3



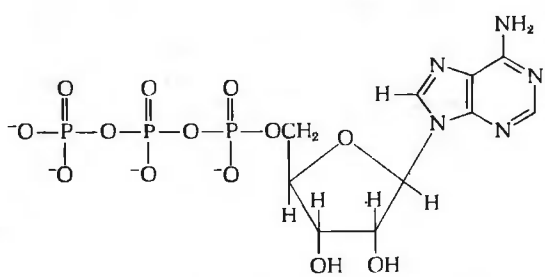
Изопротеренол

Задача 4

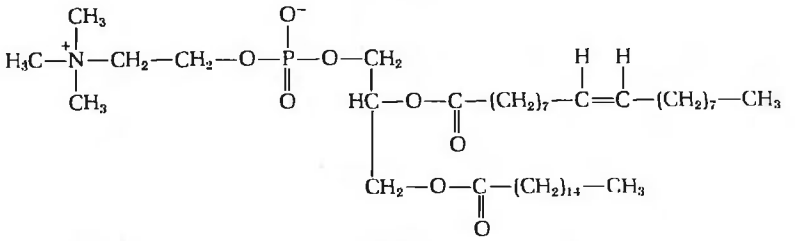


5. *Строительные блоки сложных биомолекул.* Хотя число природных биомолекул огромно и они чрезвычайно сложны по своей структуре, строение этих молекул основано на простых принципах, поскольку все они образуются из ограниченного набора строительных блоков. Структура наиболее важных строительных блоков сложных биомолекул показана на рис. 3-11. Укажите строительные блоки, из которых состоят три изображенные ниже биомолекулы, имеющие важное биологическое значение.

а) Аденозинтрифосфат (АТР) – биомолекула, являющаяся носителем энергии



б) Фосфатидилхолин, основной компонент клеточных мембран у высших организмов



в) Энкефалин, содержащий в пятом положении метионин (мет-энкефалин) – природный опиат мозга



6. *Определение структуры биомолекулы.* Из мышц кролика выделили неизвестное вещество X. Его структура была установлена на основе следующих наблюдений и экспериментов. Результаты качественного анализа показали, что это вещество содержит только углерод, водород и кислород. Взвешенный образец вещества X был подвергнут полному окислению и определены количества образовавшихся H_2O и CO_2. Исходя из данных этого анализа, было сделано заключение, что весовое содержание C, H и O в X составляет соответственно 40,00%, 6,71% и 53,29%. Молекулярная масса вещества X, по данным масс-спектрометрии, оказалась равной 90,0. Методом инфракрасной спектроскопии было установлено, что в молекуле X имеется одна двойная связь. Вещество X легко растворяется в воде, образуя кислый раствор. При исследовании этого раствора с помощью поляриметра было установлено, что X обладает оптической активностью, причем удельное вращение плоскости поляризации $[\alpha]_D$ равно $+2{,}6°$.

а) Определите эмпирическую формулу вещества X.

б) Нарисуйте возможные структурные формулы этого вещества, которые удовлетворяли бы эмпирической формуле и имели одну двойную связь. Рассмотрите только линейные и разветвленные структуры, не принимая во внимание циклические структуры. Учтите, что атомы кислорода с трудом образуют связи друг с другом.

в) Какое значение для структуры молекулы имеет оптическая активность? Какие из перечисленных в пункте б) структур находятся в противоречии с этим наблюдением? Какие структуры соответствуют этому наблюдению?

г) Какое значение для структуры молекулы имеет тот факт, что при растворении X образуется кислый раствор? Какие из полученных структур можно теперь исключить? Какие структуры соответствуют этому наблюдению?

д) Каково строение X? Совместимо ли со всеми имеющимися данными наличие более одной структуры?

ГЛАВА 4

ВОДА

Вода является наиболее широко распространенным веществом в живой природе, и ее весовое содержание в большинстве живых организмов составляет 70% и более. Кроме того, как мы уже говорили, первые живые организмы возникли, вероятно, в первичном океане, так что вода – это по существу прародительница всего живого. Вода заполняет все составные части каждой живой клетки, и именно она представляет собой ту среду, в которой осуществляются транспорт питательных веществ, катализируемые ферментами метаболические реакции и перенос химической энергии. Поэтому все структурные элементы живой клетки и их функции обязательно должны быть приспособлены в отношении физических и химических свойств воды. Более того, как мы узнаем дальше, клетки научились использовать уникальные свойства воды для реализации некоторых процессов их жизнедеятельности.

Часто мы рассматриваем воду просто как безвредную инертную жидкость, удобную для практического использования в разных целях. Хотя в химическом отношении вода весьма устойчива, она представляет собой вещество с довольно необычными свойствами. В самом деле, вода и продукты ее ионизации – ионы H^+ и OH^- – оказывают очень большое влияние на свойства многих важных компонентов клетки, таких, как ферменты, белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Например, каталитическая активность ферментов в значительной мере зависит от концентрации ионов H^+ и OH^-.

4.1. Необычные физические свойства воды обусловлены ее способностью участвовать в образовании водородных связей

По сравнению с большинством других жидкостей вода имеет необычно высокие температуры плавления и кипения и теплоту испарения (табл. 4-1). Эти особенности воды свидетельствуют о сильном притяжении между соседними молекулами, вследствие чего жидкая вода характеризуется большим внутренним сцепле-

Таблица 4-1. Температуры плавления, температуры кипения и теплоты испарения некоторых общеизвестных жидкостей

	Т. пл., °С	Т. кип., °С	Теплота испарения, кал/г[1]
Вода	0	100	540
Метиловый спирт	– 98	65	263
Этиловый спирт	– 117	78	204
Пропиловый спирт	– 127	97	164
Ацетон	– 95	56	125
Гексан	– 98	69	101
Бензол	6	80	94
Хлороформ	– 63	61	59

[1] Количество тепловой энергии в калориях, необходимое для превращения 1,0 г жидкости при температуре ее кипения и атмосферном давлении в газообразное состояние при той же температуре и том же давлении.

нием. Теплота испарения и температура кипения жидкости непосредственно определяются количеством энергии, необходимой для преодоления сил притяжения между соседними молекулами, в результате чего они отрываются друг от друга и жидкость переходит в газообразное состояние.

Почему же для жидкой воды характерно столь сильное взаимное притяжение молекул? Ответ на этот вопрос вытекает из самой структуры молекулы воды. Каждый из двух атомов водорода (в молекуле воды) объединяет свой электрон с одним из электронов атома кислорода. Взаимное расположение возникающих при этом двух электронных пар обусловливает V-образную форму молекулы воды (рис. 4-1). Поскольку у атома кислорода имеются еще две неподеленные электронные пары, он несет частичный отрицательный заряд (в вершине V-образной структуры). Более электроотрицательный атом кислорода стремится притянуть электроны атомов водорода; поэтому на ядрах обоих атомов водорода (протонах) локализуются частичные положительные заряды. Хотя молекула воды в целом электрически нейтральна, ее частичные отрицательный и положительный заряды пространственно разделены, что приводит к возникновению у нее электрического *дипольного момента*. Благодаря такому разделению зарядов две соседние молекулы воды могут притягиваться друг к другу за счет сил электростатического взаимодействия между частичным отрицательным зарядом, локализованным на атоме кислорода одной молекулы воды, и частичным положительным зарядом, локализованным на атоме водорода другой молекулы (рис. 4-1). Такой тип электростатического притяжения называется *водородной связью*.

Поскольку расположение электронов вокруг атома кислорода близко к тетраэдрическому (рис. 4-1), каждая молекула воды в принципе может образовать водородные связи максимально с четырьмя соседними молекулами воды. Предполагается, что в любой данный момент в жидкой воде при комнатной температуре каждая молекула воды образует водородные связи в среднем с 3,4 других молекул. Молекулы в жидкой воде находятся в непрерывном движении, поэтому образующиеся водородные связи постоянно и быстро разрываются и вновь восстанавливаются. Во льду же молекулы воды зафиксированы в пространстве, и каждая из них оказывается связанной водородными связями с максимально возможным числом соседних молекул, т. е. с четырьмя; при этом образуется регулярная кристаллическая структура (рис. 4-2). Вода может служить примером *полярной* жидкости. В отличие от нее молекулы неполярных жидкостей, таких, как бензол или гексан, не проявляют за-

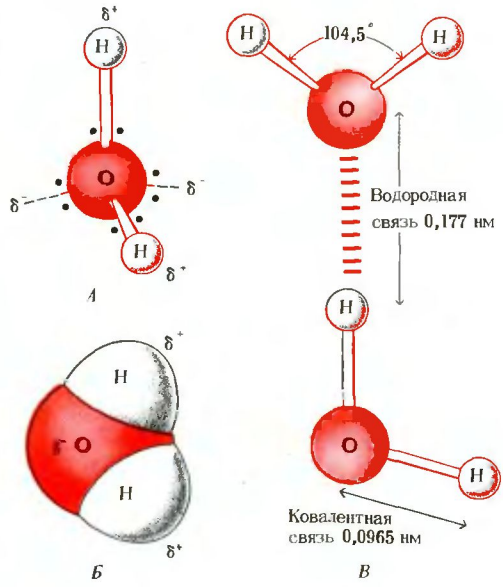


Рис. 4-1. Биполярная природа молекулы H_2O, показанная при помощи модели из шариков и стержней (*А*) и пространственной модели (*Б*). Поскольку расположение валентных электронных пар вокруг атома кислорода в молекуле воды близко к тетраэдрическому, на двух атомах водорода локализованы частичные положительные заряды, а на атоме кислорода – два частичных отрицательных заряда. *В*. Две молекулы H_2O, связанные друг с другом водородной связью (обозначена цветными черточками), соединяющей атом кислорода верхней молекулы и атом водорода нижней молекулы. Каждая молекула H_2O в принципе может быть связана водородными связями максимально с четырьмя другими молекулами H_2O, как это имеет место в случае льда (см. рис. 4-2).

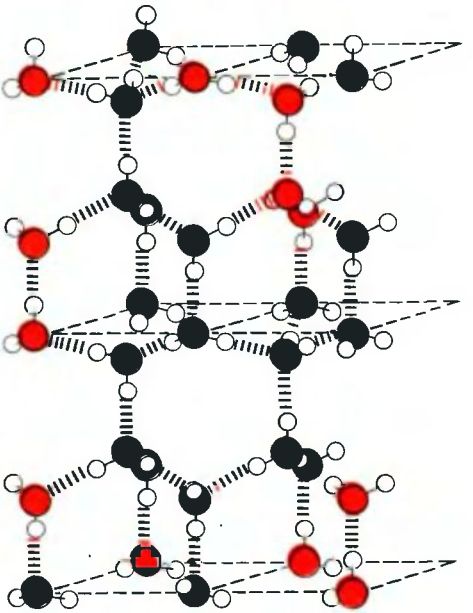


Рис. 4-2. Каждая молекула воды во льду связана водородными связями с четырьмя другими молекулами воды, так что при этом образуется регулярная кристаллическая решетка. В жидкой воде при комнатной температуре каждая молекула воды связывается при помощи водородных связей в среднем приблизительно с 3,4 молекул воды. Таким образом, в жидкой воде молекулы воды расположены относительно друг друга менее «рыхло», чем в кристаллической решетке льда, вследствие чего лед обладает меньшей плотностью по сравнению с водой и поэтому всплывает в ней.

метной тенденции к электростатическому притяжению. Поэтому для разрушения межмолекулярных взаимодействий в таких жидкостях требуется гораздо меньше энергии, и значения теплоты испарения у гексана и бензола, как показывает опыт, действительно намного меньше, чем у воды (табл. 4-1).

Водородные связи слабее ковалентных. Согласно имеющимся данным, энергия водородных связей в жидкой воде (т. е. энергия, необходимая для разрушения одной связи) составляет всего лишь около 4,5 ккал/моль, тогда как энергия ковалентных связей H—O в молекулах воды равна 110 ккал/моль. Тем не менее благодаря своей многочисленности водородные связи обеспечивают высокую устойчивость жидкой воды. Хотя в любой данный момент большинство молекул в жидкой воде соединено между собой водородными связями, время полужизни каждой из водородных связей составляет менее $1 \cdot 10^{-9}$ с. Вследствие этого жидкая вода представляет собой не вязкую, а весьма подвижную жидкость. Для обозначения присутствующих в жидкой воде короткоживущих групп молекул, связанных друг с другом водородными связями, иногда используют термин «мерцающие скопления» (flickering clusters).

4.2. Водородные связи широко распространены в биологических системах и играют в них важную роль

Водородные связи характерны не только для воды. Они легко образуются между любым электроотрицательным атомом (обычно кислородом или азотом) и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом в той же или другой молекуле (рис. 4-3). Атомы водорода, соединенные ковалентной связью с сильно электроотрицательными атомами, такими, как кислород, всегда несут частичные положительные заряды и потому способны к образованию водородных связей, тогда как атомы водорода, ковалентно связанные с атомами углерода, которые не обладают электроотрицательностью, не несут частичного положительного заряда и, следовательно, не способны образовывать водородные связи. Именно это различие служит причиной того, что бутиловый спирт ($CH_3CH_2CH_2CH_2OH$), в молекуле которого один из атомов водорода связан с кислородом и может, таким образом, образовать водородную связь с другой молекулой бутилового спирта, обладает сравнительно высокой температурой кипения ($+117^\circ C$). Наоборот, бутан ($CH_3CH_2CH_2CH_3$), который не способен образовывать межмолекулярные водородные связи, поскольку все атомы водорода в его молекулах связаны с углеродом, имеет низкую температуру кипения ($-0{,}5^\circ C$). Некоторые примеры

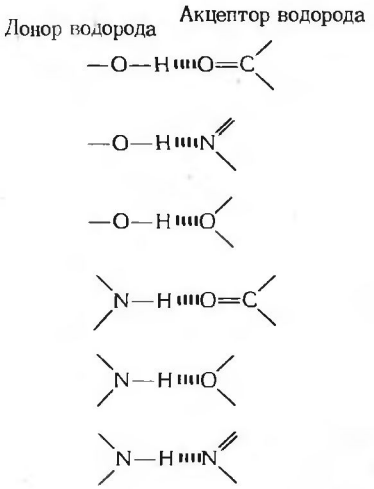


Рис. 4-3. Водородные связи. В связях этого типа атом водорода неравномерно распределен между двумя электроотрицательными атомами. Атом, с которым водород связан ковалентно, служит донором водорода, а электроотрицательный атом другой молекулы – акцептором. В биологических системах электроотрицательными атомами, участвующими в образовании водородных связей, являются кислород и азот; атомы углерода принимают участие в образовании водородных связей только в редких случаях. Расстояние между двумя электроотрицательными атомами, соединенными водородной связью, варьирует от 0,26 до 0,31 нм. Ниже показаны обычные типы водородных связей.

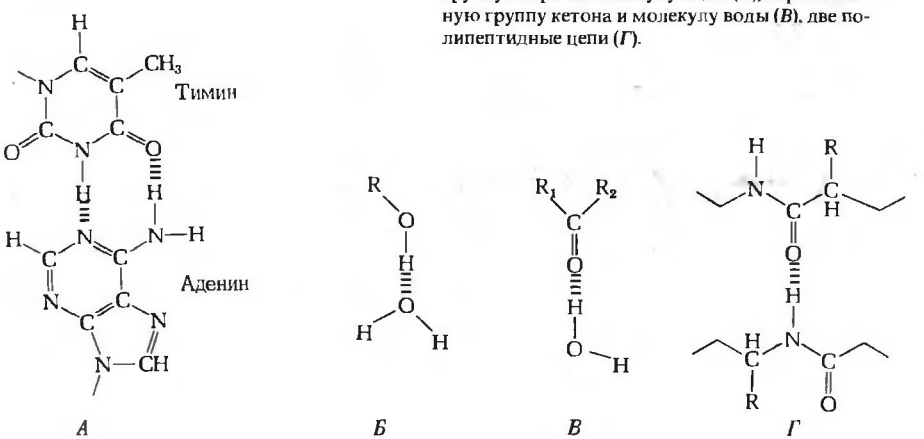
биологически важных водородных связей показаны на рис. 4-4.

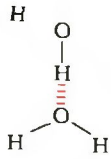
Одна из характерных особенностей водородных связей состоит в том, что они обладают наибольшей прочностью в тех случаях, когда взаимная ориентация связанных между собой молекул обеспечивает максимальную энергию электростатического взаимодействия (рис. 4-5). Другими словами, водородная связь характеризуется определенной направленностью и вследствие этого способна удерживать обе связанные с ее помощью молекулы или группы в определенной взаимной ориентации. Ниже мы увидим, что именно это свойство водородных связей способствует стабилизации строго определенных пространственных структур, характерных для молекул белков и нуклеиновых кислот, содержащих большое число внутримолекулярных водородных связей (гл. 7, 8 и 27).

4.3. Вода как растворитель обладает необычными свойствами

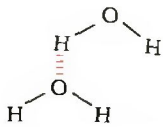
Вода является значительно лучшим растворителем, чем большинство других общеизвестных жидкостей. Многие кристаллические соли, такие, как хлористый натрий, хорошо растворимы в воде, но

Рис. 4-4. Водородные связи, играющие важную роль в биологических системах, могут соединять два комплементарных основания, расположенные в разных цепях ДНК (*А*), гидроксильную группу спирта и молекулу воды (*Б*), карбонильную группу кетона и молекулу воды (*В*), две полипептидные цепи (*Г*).





Сильная водородная связь



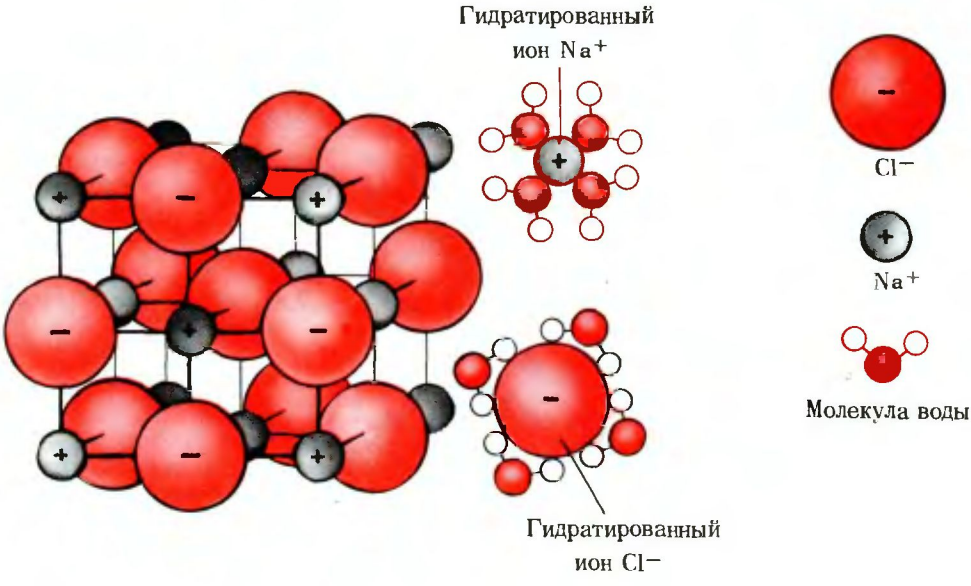
Слабая водородная связь

Рис. 4-5. Направленность водородной связи. Верхняя структура характеризуется более прочной водородной связью, поскольку при такой ориентации взаимодействующих молекул обеспечивается максимально возможное притяжение между частичными электрическими зарядами.

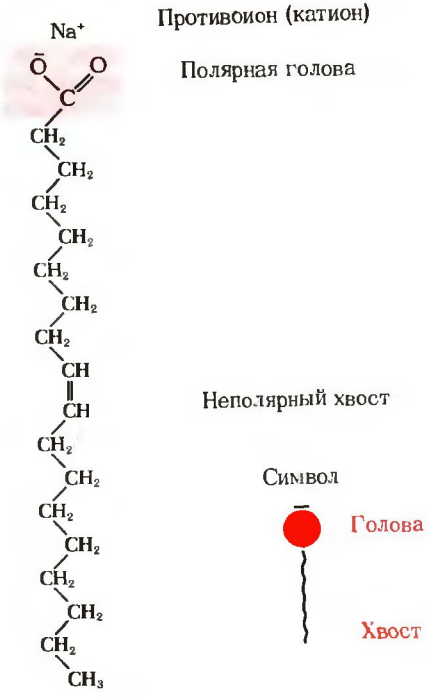
почти нерастворимы в неполярных жидкостях, например в хлороформе или бензоле. Это свойство обусловлено биполярным характером молекулы воды. Кристаллическая решетка соли стабилизирована за счет очень сильного электростатического притяжения между чередующимися друг с другом положительно и отрицательно заряженными ионами. Когда кристалл NaCl помещают в воду, биполярные молекулы воды начинают очень сильно притягивать ионы Na^+ и Cl^-, извлекая их из решетки. В результате эти ионы в гидратированной форме постепенно переходят в раствор (рис. 4-6). Вода растворяет также многие простые органические соединения, содержащие карбоксильные группы или аминогруппы, способные ионизироваться при взаимодействии с водой.

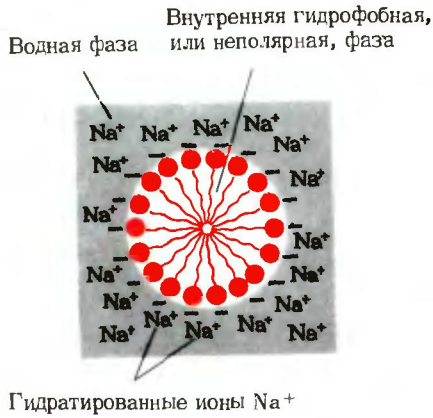
Второй класс веществ, хорошо растворимых в воде, включает многие нейтральные органические соединения, содержащие полярные функциональные группы. К ним относятся, в частности, сахара, спирты, альдегиды и кетоны. Растворимость этих веществ обусловлена способностью молекул воды образовывать водородные связи с гидроксильными группами сахаров и спиртов, а также с карбоксильными группами альдегидов и кетонов (см. рис. 4-4).

Рис. 4-6. Хорошая растворимость в воде многих кристаллических солей обусловлена гидратацией ионов, образующих эти соли. Изображенная здесь кристаллическая решетка NaCl стабилизирована за счет сил притяжения между ионами Na^+ и Cl^-. Кристалл растворяется в воде вследствие гидратации ионов Na^+ и Cl^-, что приводит к их «выталкиванию» из кристаллической решетки.



Третий класс веществ – это вещества, диспергируемые водой. Он включает соединения, содержащие как гидрофобные (водоотталкивающие), так и гидрофильные («любящие» воду) группы. Их часто называют *амфипатическими соединениями*. Примером таких соединений может служить натриевая соль *олеиновой кислоты* – жирной кислоты с длинной цепью. Поскольку длинная углеводородная цепь гидрофобна и, по существу, нерастворима в воде, стремление молекул олеата натрия (мыла) перейти в водную фазу с образованием истинно молекулярного раствора выражено очень слабо. Однако олеат натрия легко диспергируется в воде, образуя агрегаты, называемые мицеллами, в которых гидрофильные отрицательно заряженные карбоксильные группы обращены к водной фазе и взаимодействуют с молекулами воды, а гидрофобные неполярные углеводородные цепи спрятаны внутри структуры (рис. 4-7). Мицеллы могут содержать сотни или даже тысячи молекул мыла. Такие мицеллы остаются равномерно суспендированными в воде, так как все они несут отрицательный заряд и потому стремятся оттолкнуться друг от друга. Мыльная вода обычно бывает мутной, потому что мицеллы имеют довольно большие размеры и рассеивают свет.





Характерное расположение неполярных групп в таких мицеллах обусловлено стремлением окружающих мицеллу молекул воды образовывать водородные связи друг с другом и связываться с гидрофильными карбоксильными группами, вынуждая тем самым углеводородные цепи перемещаться внутрь мицеллы, где они не могут контактировать с водой. Молекулам воды «нравятся» другие молекулы воды и карбоксильные группы больше, чем углеводородные цепи, которые не способны образовывать водородных связей. Мы используем термин *гидрофобное взаимодействие* для обозначения процесса объединения гидрофобных участков амфипатических молекул внутри таких мицелл, однако на самом деле речь идет о стремлении молекул воды, окружающих мицеллу, образовать как можно больше водородных связей друг с другом; именно это стремле-

Рис. 4-7. Образование мицеллы мыла в воде. Неполярные хвосты молекул олеата натрия скрыты внутри мицеллы, тогда как отрицательно заряженные карбоксильные группы находятся на поверхности мицеллы. Число ионов Na^+ в водной фазе равно числу отрицательных зарядов на мицелле, так что в целом раствор электронейтрален.

ние и служит движущей силой образования мицелл и причиной их стабильности. Многие компоненты живых клеток, например фосфолипиды (гл. 12), белки (гл. 8) и нуклеиновые кислоты (гл. 27), обладают амфипатическими свойствами и стремятся образовать в водных растворах структуры, в которых неполярные, гидрофобные, участки изолированы от водной фазы. Более того, как мы увидим ниже (гл. 12), именно мицеллярная организация амфипатических липидных молекул составляет «основу» биологических мембран.

4.4. Растворенные вещества изменяют свойства воды

Водные растворы обладают четырьмя важными свойствами, известными под названием *коллигативных свойств*, в основе которых лежит изменение физической константы воды под влиянием растворенных в ней веществ. К этим свойствам относятся: 1) температура замерзания, 2) температура кипения, 3) давление пара и 4) осмотическое давление. Слово «коллигативный» означает «взаимосвязанный». Коллигативные свойства растворов – это свойства, имеющие общую основу и изменяющиеся под влиянием растворенных веществ так, что эти изменения можно заранее предсказать.

Раствор 1,00 моля любого идеального нелетучего вещества в 1000 г воды (или какого-либо другого растворителя) называется *моляльным* (1 m) раствором. В таком растворе влияние растворенного вещества проявляется в том, что при давлении 760 мм рт. ст. температура замерзания воды (0°C в случае чистой воды) снижается до −1,86°C, температура кипения (обычно 100°C) повышается до 100,543°C, а осмотическое давление, измеряемое при помощи специальной аппаратуры (рис. 4-8), достигает 22,4 атм. Идеальным растворенным веществом называется такое вещество, которое не диссоциирует на две или более составные части и не претерпевает ассоциации, приводящей к уменьшению общего числа растворенных частиц. Коллигативные свойства зависят только от *числа* растворенных частиц в единице объема растворителя и не зависят от их химического строения. Это объясняется тем, что один моль любого неионизированного со-

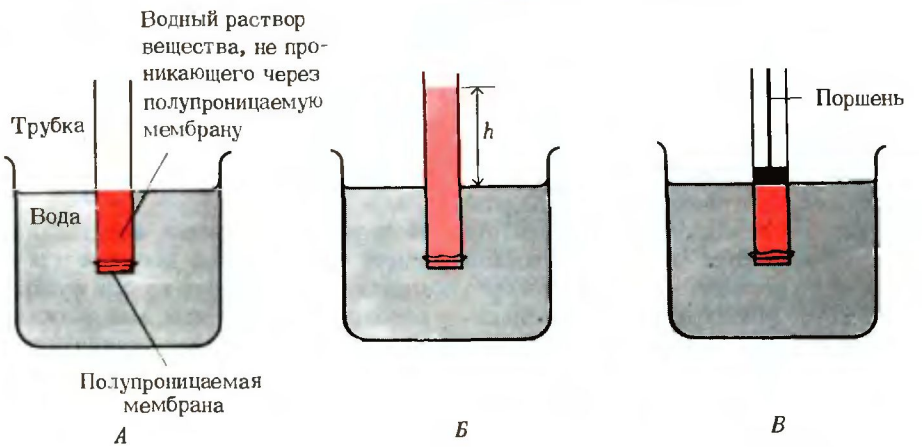


Рис. 4-8. Осмос и осмотическое давление. *А*. Исходное состояние. Вода перетекает из внешнего пространства через мембрану внутрь раствора, стремясь выравнять концентрации воды по обе стороны мембраны. *Б*. Конечное состояние. Вода проникла в раствор вещества, молекулы которого неспособны проходить сквозь мембрану, в результате чего произошло разбавление раствора. В состоянии равновесия давление столба раствора, имеющего высоту h, точно уравновешивает осмотическое давление, характеризующее стремление воды перетекать в зону с более низкой ее концентрацией. *В*. Осмотическое давление – это сила, которую необходимо приложить к поршню, чтобы предотвратить направленный в противоположную сторону осмотический ток жидкости. Оно численно равно гидростатическому давлению столба жидкости высотой h.

единения содержит строго определенное число ($6{,}02 \cdot 10^{23}$) молекул (число Авогадро). Отсюда следует, что 1m растворы глицерина (мол. масса 92) и глюкозы (мол. масса 180) должны иметь одинаковые температуры замерзания (−1,86°C), температуры кипения (100,543°C) и осмотические давления (22,4 атм), поскольку оба этих раствора содержат одно и то же число молекул в 1000 г (1 л) воды. Температура замерзания 0,100 m раствора глюкозы должна быть в 10 раз меньше, чем температура замерзания 1,0 m раствора, т. е. −0,186°C, так как число молекул в этом растворе (на 1 л воды) в 10 раз меньше, чем в 1m растворе. 0,100 m раствор NaCl, в котором все молекулы полностью диссоциированы на ионы Na^+ и Cl^-, должен замерзать при −0,372°C, поскольку число частиц растворенного в нем вещества (на 1 л воды) в два раза больше, чем в 0,100 m растворе глюкозы. Все эти правила, позволяющие предвидеть коллигативные свойства и предсказывать численные значения соответствующих констант, точно соблюдаются только в случае разбавленных водных растворов.

Рассмотренная выше способность воды изменять свои свойства под влиянием растворенных в ней веществ имеет очень важное биологическое значение. Она позволяет, например, пресноводным рыбам сохранять активность в воде при температуре ее замерзания, так как общая концентрация всех растворенных веществ в крови рыб достаточно высока, чтобы температура ее замерзания оказалась ниже температуры замерзания воды. Кроме того, благодаря наличию в крови растворенных веществ, в частности белков, не способных проходить сквозь капиллярные мембраны, в крови создается более высокое осмотическое давление, чем в межклеточной жидкости. В результате вода диффундирует из межклеточной жидкости в кровеносные капилляры, что способствует заполнению сосудистой системы и предохраняет ее от коллапса.

Другая причина, по которой растворенные вещества влияют на свойства воды, состоит в том, что эти вещества стремятся разрушить водородные связи между молекулами воды. Присутствие в воде веществ ионной природы, таких, как NaCl, приводит к заметному изменению структуры жидкой воды. Это обусловлено тем, что каждый ион (в частности, ионы Na^+ и Cl^-) окружен гидратной оболочкой, состоящей из дипольных молекул воды, причем геометрия и свойства таких гидратированных ионов несколько отличаются от геометрии и свойств ассоциатов (кластеров), образуемых молекулами воды за счет водородных связей; гидратированные ионы имеют более упорядоченную и более регулярную структуру. Таким образом, растворенные соли стремятся разрушить нормальную структуру жидкой воды и изменить ее свойства как растворителя. Ниже мы увидим, что растворимость белков резко уменьшается при повышении концентрации нейтральных солей, например NaCl, Na_2SO_4 и $(NH_4)_2SO_4$, изменяющих свойства воды и снижающих ее способность растворять белки. Такое влияние растворенных нейтральных солей может быть использовано для разделения смеси белков, поскольку многие белки различаются по своей способности осаждаться из солевых растворов.

4.5. Состояние равновесия обратимых реакций характеризуется константой равновесия

Молекулы воды обладают слабо выраженной способностью к обратимой ионизации, в процессе которой они распадаются на ионы водорода (H^+) и ионы гидроксила (OH^-); при этом между недиссоциированными молекулами и ионами устанавливается равновесие:

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- . \qquad (1)$$

Поскольку обратимая ионизация воды имеет очень важное значение для понимания свойств и роли воды в функционировании живой клетки, мы должны располагать способом выражения степени ее ионизации в количественных терминах. Рассмотрим кратко некоторые общие свойства обратимых реакций.

Состояние равновесия любой химической реакции характеризуется *константой равновесия*. Выражение константы равновесия для общей реакции

$$A + B \rightleftharpoons C + D \qquad (2)$$

легко можно получить исходя из *закона действующих масс*. Согласно этому закону, химическая реакция, описываемая уравнением (2), будет протекать слева направо, пока не установится новое состояние равновесия, если мы увеличим концентрацию одного из реагирующих веществ (A или B) либо концентрации обоих этих веществ. И наоборот, увеличение концентрации веществ C или D либо одновременное увеличение концентраций обоих этих веществ приведет к тому, что данная реакция будет идти справа налево до достижения нового равновесия. Этому принципу можно дать также более количественную формулировку. Скорость прямой реакции v_1, протекающей слева направо, пропорциональна произведению активных концентраций реагирующих веществ A и B:

$$v_1 = k_1 [A] [B],$$

где k_1 – константа пропорциональности, а квадратные скобки означают молярную концентрацию. Скорость обратной реакции, v_2, протекающей справа налево, равна соответственно

$$v_2 = k_2 [C] [D].$$

Поскольку равновесие определяется как состояние, при котором скорости прямой и обратной реакции равны, при равновесии должно соблюдаться равенство

$$v_1 = v_2$$

и, следовательно:

$$k_1 [A] [B] = k_2 [C] [D].$$

Преобразование этого выражения дает

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C] [D]}{[A] [B]}.$$

Отношение двух констант скорости $\frac{k_{пр}}{k_{обр}}$ может быть заменено одной новой константой, а именно константой равновесия K'_{eq}, равной

$$K'_{eq} = \frac{[C] [D]}{[A] [B]}.$$

[Штрих означает, что величина константы равновесия выражает отношение молярных (а не весовых или объемных) концентраций исходных реагирующих веществ и продуктов реакции.]

Константа равновесия – это постоянная величина, являющаяся количественной характеристикой любой химической реакции, протекающей при определенной температуре. Она позволяет вычислить состав равновесной смеси для данной реакции независимо от количеств исходных веществ и образующихся продуктов. И наоборот, если известны концентрации всех исходных реагентов и конечных продуктов в состоянии равновесия, то для данной реакции, протекающей при известной температуре, легко можно вычислить величину константы равновесия.

4.6. Ионизацию воды можно охарактеризовать величиной константы равновесия

Перейдем теперь от общих рассуждений к рассмотрению интересующего нас процесса ионизации воды и попытаемся описать его в количественных терминах. Этот обратимый процесс приводит, как указывалось выше, к образованию водородных и гидроксильных ионов. Однако, когда мы используем термин «водородный ион» и символ «H^+», следует иметь в виду, что «голых» водородных ионов, т. е. свободных протонов, в воде не существует, поскольку они, как и большинство других ионов, всегда гидратированы, т. е. окружены гидратной оболочкой. Гидратированную форму иона H^+ называют *ионом гидрония* или *ионом гидроксония*. Его часто обозначают H_3O^+, однако в действительности каждый ион H^+ плотно окружен несколькими молекулами H_2O, число которых зависит от температуры.

В соответствии с уравнением

$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^- \qquad (3)$$

ионизация воды происходит лишь в незначительной степени; в любой данный момент при 25°C всего одна из 10 миллионов молекул чистой воды находится в ионизированном состоянии. Хотя вода характеризуется очень слабой тенденцией к ионизации, образующиеся при этом ионы H^+ и OH^- играют исключительно важную роль в биологических процессах. Поэтому мы должны уметь количественно выражать степень ионизации воды.

Мы можем сделать это, если напишем выражение для константы равновесия обратной реакции (3):

$$K'_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}.$$

Это выражение можно упростить, так как относительная концентрация H_2O очень высока (она равна числу граммов воды в 1 л, деленному на ее молекулярную массу в граммах, т. е. 1000 : 18 = 55,5 М) и поэтому представляет собой практически постоянную величину по отношению к очень низким концентрациям ($1 \cdot 10^{-7}$ М) ионов H^+ и OH^- в чистой воде при 25°C. Таким образом, мы можем подставить в выражение для константы равновесия величину 55,5, после чего получим

$$K'_{eq} = \frac{[H^+][OH^-]}{55{,}5}$$

или

$$55{,}5 \cdot K'_{eq} = [H^+][OH^-].$$

Численное значение величины K'_{eq} было тщательно определено на основе данных по электропроводности чистой воды (в чистой воде электрический ток могут проводить только ионы, образующиеся в результате диссоциации H_2O). При 25°C оно оказалось равным $1{,}8 \cdot 10^{-16}$. Подставляя это значение в приведенное выше уравнение, получим:

$$(55{,}5) \cdot (1{,}8 \cdot 10^{-16}) = [H^+][OH^-],$$
$$99{,}9 \cdot 10^{-16} = [H^+][OH^-],$$
$$1{,}0 \cdot 10^{-14} = [H^+][OH^-].$$

Если обозначить произведение $55{,}5K'_{eq}$ через K_w, то можно записать соотношение:

$$K_w = 1{,}0 \cdot 10^{-14} = [H^+][OH^-].$$

Величина K_w называется *ионным произведением* воды; ее численное значение при 25°C равно $1{,}0 \cdot 10^{-14}$. Это означает, что произведение $[H^+][OH^-]$ в водных растворах при 25°C всегда равно строго определенной величине, а именно $1 \cdot 10^{-14}$. Если концентрации ионов H^+ и OH^- в точности равны друг другу, что имеет место, например, в чистой воде, то такой раствор называется *нейтральным*. Исходя из численного значения ионного произведения воды, можно рассчитать концентрацию ионов H^+ и OH^- в воде:

$$K_w = [H^+][OH^-] = [H^+]^2.$$

Решая это уравнение относительно H^+, имеем

$$[H^+] = \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}},$$
$$[H^+] = [OH^-] = 10^{-7}\text{M}.$$

Так как ионное произведение воды является величиной постоянной, очевидно, что если концентрация ионов H^+ превышает $1 \cdot 10^{-7}$ М, то концентрация ионов OH^- должна быть меньше $1 \cdot 10^{-7}$ М, и наоборот. Таким образом, когда концентрация ионов H^+ очень высока, как это имеет место, например, в растворе соляной кислоты, концентрация ионов OH^- должна быть очень низка, поскольку их произведение всегда должно оставаться равным $1 \cdot 10^{-14}$. И наоборот, если концентрация ионов OH^- очень высока, как, например, в растворе NaOH, то концентрация ионов H^+ должна быть очень низка. Следовательно, если мы знаем концентрацию ионов OH^-, то, исходя из численного значения ионного произведения воды, мы можем вычислить концентрацию ионов H^+, а если мы знаем концентрацию ионов H^+, то можно вычислить соответственно концентрацию ионов OH^- (см. дополнение 4-1).

4.7. Шкала pH: обозначения концентраций ионов H^+ и OH^-

Шкала pH представляет собой удобный способ обозначения истинной концентрации ионов H^+ (а следовательно, и ионов OH^-) в любом водном растворе, кислотность которого лежит в интервале между 1,0 М H^+ и 1,0 М OH^-. Шкала pH составлена на основе ионного произведения воды K_w.

Термин pH определяется выражением

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]} = -\log [H^+].$$

В строго нейтральном растворе, в котором концентрация ионов H^+ составляет $1{,}0 \cdot 10^{-7}$ М, величина pH при 25°C равна

$$pH = \log \frac{1}{1 \times 10^{-7}} = \log (1 \times 10^7) =$$

$$= \log 1{,}0 + \log 10^7 = 0 + 7; \qquad pH = 7.$$

Значение 7,0 для pH строго нейтрального раствора – это не случайно выбранная цифра; оно получено из численного значения ионного произведения воды при 25°C. Растворы, имеющие pH больше чем 7, являются щелочными, поскольку концентрация ионов OH^- в таких растворах больше концентрации ионов H^+. И наоборот, растворы, имеющие pH меньше 7, – это кислые растворы (табл. 4-2).

Особенно важное значение имеет то обстоятельство, что шкала pH является не арифметической, а логарифмической. Если говорят, что величины pH каких-то двух растворов различаются на одну единицу, то это означает, что концентрация ионов H^+ в одном из них в 10 раз больше, чем в другом, хотя мы можем и не знать абсолютные значения pH этих растворов. На рис. 4-9 приведены значения pH для некоторых жидкостей. Заметим, что концентрация ионов H^+ в напитке кока-кола (pH 3) или в красном вине (pH

Дополнение 4-1. Ионное произведение воды

Ионное произведение воды позволяет вычислить концентрацию ионов H^+, если известна концентрация ионов OH^-, и наоборот. Две приведенные ниже задачи иллюстрируют эту возможность.

1. Какова концентрация ионов H^+ в 0,1 н. растворе NaOH?

$$K_w = [H^+][OH^-].$$

Решая это уравнение относительно $[H^+]$, имеем

$$[H^+] = \frac{K_w}{[OH^-]} = \frac{1 \cdot 10^{-14}}{0{,}1} = 10^{-13} \text{ М}.$$

2. Какова концентрация ионов OH^- в растворе, в котором концентрация ионов H^+ равна 0,00013 М?

$$K_w = [H^+][OH^-].$$

Решая это уравнение относительно [OH], имеем

$$[OH^-] = \frac{1 \cdot 10^{-14}}{0{,}00013} = 7{,}7 \cdot 10^{-11} \text{ М}$$

Таблица 4-2. Шкала pH

$[H^+]$, M	pH	$[OH^-]$, M	pOH
1,0	0	10^{-14}	14
0,1	1	10^{-13}	13
0,01	2	10^{-12}	12
0,001	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	0,001	3
10^{-12}	12	0,01	2
10^{-13}	13	0,1	1
10^{-14}	14	1,0	0

3,7) приблизительно в 10 000 раз больше, чем в крови.

Иногда для количественной характеристики основности, т. е. концентрации ионов OH^- в растворе, используют величину pOH, определяемую выражением

$$pOH = \log \frac{1}{[OH^-]} = -\log [OH^-],$$

которое аналогично выражению для pH. Например, значение pOH раствора с 0,1 М концентрацией ионов OH^- равно единице, тогда как значение pOH раствора, в котором ионы OH^- присутствуют в 10^{-7} М концентрации, равно 7,0. Следует запомнить, что величины pH и pOH связаны одна с другой очень простым соотношением:

$$pH + pOH = 14.$$

В табл. 4-2 показана эта обратная зависимость между величинами pH и pOH.

Величину pH водного раствора можно приблизительно оценить, используя различные индикаторные красители, такие, как лакмус, фенолфталеин и фенилрот, однако точные измерения pH в химических и клинических лабораториях производят при помощи специальных стеклянных электродов, которые обладают избирательной чувствительностью по отношению к ионам H^+, но нечувствительны к ионам Na^+, K^+ и другим катионам. В приборе, называемом *pH-метром*, сигнал от этого электрода усиливается и сравнивается с сигналом, генерируемым раствором, который имеет точно известную величину pH.



Рис. 4-9. Величины pH некоторых жидкостей.

Измерение pH является одной из наиболее важных и часто используемых в биохимии процедур, поскольку от pH зависят очень многие существенные структурные особенности и активность биологических макромолекул, в частности каталитическая активность фермен-

тов. Более того, измерения pH крови и мочи – это рутинные процедуры, постоянно используемые при диагностике заболеваний. Например, у людей, страдающих тяжелой формой диабета, значение pH крови часто снижено по сравнению с нормальной величиной pH 7,4. Такое состояние называется *ацидозом*. Наоборот, при некоторых других заболеваниях величина pH у больных может быть выше нормы – состояние, называемое *алкалозом*.

4.8. Свойства кислот и оснований тесно связаны со свойствами воды

Молекулы соляной, серной и азотной кислот, называемых обычно *сильными кислотами*, полностью ионизированы в разбавленных водных растворах. Аналогично молекулы *сильных оснований* NaOH и KOH также полностью ионизированы.

В биологии мы чаще встречаемся со *слабыми кислотами* и *слабыми основаниями*, которые при растворении в воде ионизируются не полностью. Примером слабой кислоты может служить *уксусная кислота* (CH_3COOH), придающая уксусу кислый вкус; в качестве примера слабого основания можно привести аммиак (NH_3), водный раствор которого применяется для чистки различных предметов домашнего обихода. Слабые кислоты и основания – это обычные компоненты биологических систем, играющие важную роль в метаболизме и его регуляции. Поведение водных растворов слабых кислот и оснований легче будет понять, если дать сначала точные определения некоторых терминов.

Кислоты можно определить как *доноры протонов*, а основания – как *акцепторы протонов*. Донор протона и соответствующий ему акцептор протона образуют *сопряженную кислотно-основную пару* (табл. 4-3). Примером сопряженной кислотно-основной пары могут служить уксусная кислота (CH_3COOH), играющая роль донора протона, и ацетат-анион (CH_3COO^-), выполняющий функцию акцептора протона; они связаны между собой следующей обратимой реакцией:

Таблица 4-3. Некоторые сопряженные кислотно-основные пары. Каждая пара состоит из донора и акцептора протонов

Донор протона	Акцептор протона
CH_3COOH	CH_3COO^-
$H_3PO_4^-$	$H_2PO_4^{2-}$
NH_4^+	NH_3

$$\underset{\text{Донор протона, сопряженная кислота}}{CH_3COOH} \rightleftharpoons \underset{\text{Протон}}{H^+} + \underset{\text{Акцептор протона, сопряженное основание}}{CH_3COO^-}$$

Характерная особенность каждой кислоты состоит в том, что в водном растворе она стремится отщепить свой протон. Чем сильнее кислота, тем сильнее выражена эта тенденция. Способность любой кислоты HA отщеплять протон и образовывать сопряженное с ней основание A^- характеризуется константой равновесия обратимой реакции

$$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-,$$

равной

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}.$$

Константы равновесия таких реакций чаще называются *константами ионизации*, или *константами диссоциации*. Численные значения констант диссоциации некоторых кислот, часто обозначаемых символом K_a' (индекс «а» от англ. acid – кислота), приведены в табл. 4-4. Обратите внимание, что все эти кислоты различаются по своей способности отдавать протон. Для более сильных кислот, таких, как муравьиная или молочная, характерны более высокие значения констант диссоциации, тогда как для более слабых кислот, к которым относятся, например, ион $H_2PO_4^-$, – более низкие значения. Одна из наиболее слабых кислот, приведенных в табл. 4-4, – ион NH_4^+, обла-

Таблица 4-4. Константы диссоциации и величины pK' некоторых широко распространенных кислот при 25°C

Кислота (донор протона)	K', M	pK'
HCOOH (муравьиная кислота)	$1{,}78 \times 10^{-4}$	3,75
CH_3COOH (уксусная кислота)	$1{,}74 \times 10^{-5}$	4,76
CH_3CH_2COOH (пропионовая кислота)	$1{,}35 \times 10^{-5}$	4,87
$CH_3CHOHCOOH$ (молочная кислота)	$1{,}38 \times 10^{-4}$	3,86
H_3PO_4 (фосфорная кислота)	$7{,}25 \times 10^{-3}$	2,14
$H_2PO_4^-$ (дигидрофосфат-ион)	$1{,}38 \times 10^{-7}$	6,86
HPO_4^{2-} (моногидрофосфат-ион)	$3{,}98 \times 10^{-13}$	12,4
H_2CO_3 (угольная кислота)	$1{,}70 \times 10^{-4}$	3,77
HCO_3^- (бикарбонат-ион)	$6{,}31 \times 10^{-11}$	10,2
NH_4^+ (ион аммония)	$5{,}62 \times 10^{-10}$	9,25

дающий лишь весьма слабо выраженной способностью отдавать протон, о чем свидетельствует очень низкое значение константы диссоциации. Сопряженное основание этой кислоты, аммиак (NH_3), очень легко присоединяет протон.

В табл. 4-4 приведены величины pK', определяемые уравнением

$$\text{p}K' = \lg \frac{1}{K'} = -\lg K'.$$

Символ p, так же как и в случае pH, означает «отрицательный логарифм». Чем легче диссоциирует кислота, тем меньше значение ее pK'. Как мы сейчас увидим, определение величины pK' любой слабой кислоты не представляет особого труда.

4.9. Слабые кислоты имеют характерные кривые титрования

Для определения количества кислоты в данном растворе используется титрование. Эта процедура состоит в добавлении раствора основания (обычно едкого натра, NaOH) точно известной концентрации к отмеренному объему анализируемого раствора кислоты. Раствор основания добавляют маленькими порциями до тех пор, пока кислота не будет точно нейтрализована; момент нейтрализации устанавливают либо по изменению цвета индикатора, либо при помощи pH-метра. Исходя из объема добавленного раствора основания и его концентрации, можно рассчитать концентрацию кислоты в анализируемом растворе.

Если при титровании слабой кислоты тщательно измерять pH титруемого раствора после добавления каждой порции раствора основания вплоть до достижения точки нейтрализации, то можно не только определить концентрацию кислоты, но и получить также важную дополнительную информацию об анализируемом растворе. График, характеризующий зависимость pH титруемого раствора от количества добавленного основания, называется *кривой титрования*. На рис. 4-10 показана кривая титрования уксусной кислоты (типичной слабой кислоты). Проследим за ходом титрования 0,1 M раствора уксусной кислоты 0,1 M раствором NaOH при 25°C, имея в виду, что этот процесс включает два обратимых равновесия:

$$H_2O \rightleftarrows H^+ + OH^-, \qquad (4)$$

$$HAc \rightleftarrows H^+ + Ac^-, \qquad (5)$$

которые характеризуются константами равновесия, численно равными соответственно

$$K_w = [H^+][OH^-] = 1 \cdot 10^{-14}, \qquad (6)$$

$$K' = \frac{[H^+][Ac^-]}{[HAc]} = 1{,}74 \cdot 10^{-5}\ \text{M}. \qquad (7)$$

В начале титрования, до добавления NaOH, уксусная кислота уже слегка ионизирована, причем степень ее ионизации можно вычислить из константы ионизации (7). Попытаемся сделать это. Для упрощения будем считать, что степень ионизации уксусной кислоты чрезвычайно мала и потому концентрация ее недиссоциированных молекул су-

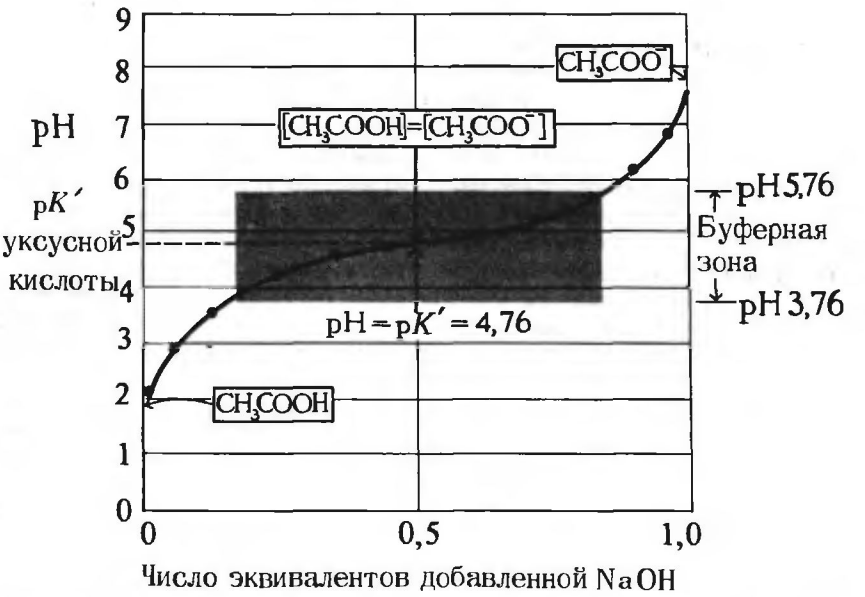


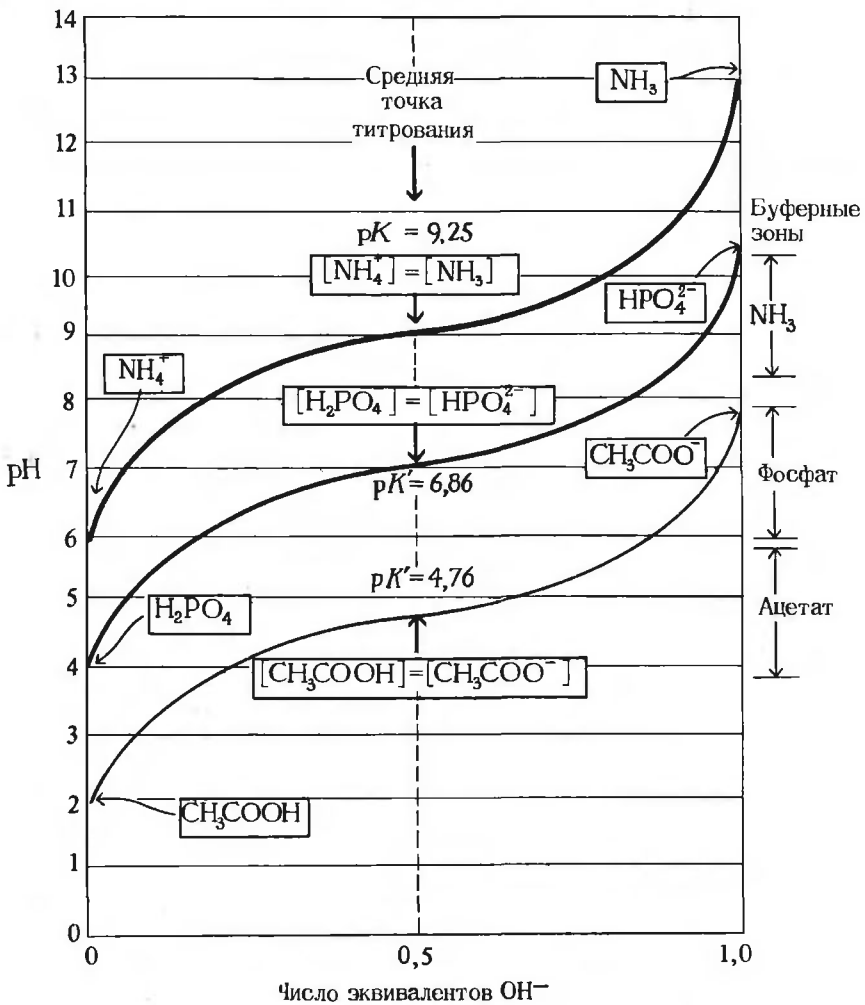
Рис. 4-10. Кривая титрования уксусной кислоты (подробности см. в тексте). После добавления каждой порции стандартного раствора NaOH к титруемому раствору уксусной кислоты, измеряют величину pH смеси. Эту величину откладывают по оси ординат, тогда как по оси абсцисс откладывают долю общего количества NaOH, требуемого для нейтрализации уксусной кислоты, т. е. для достижения pH ≈ 7. Полученные при этом точки позволяют построить кривую титрования. В рамках указаны преобладающие ионные формы уксусной кислоты при соответствующих значениях pH. В средней точке кривой титрования концентрации донора и акцептора протонов равны. Величина pH в этой точке численно равна величине pK' уксусной кислоты. Цветная зона представляет собой область, внутри которой система обладает буферными свойствами.

щественно не отличается от ее общей концентрации, равной 0,1 М.

Когда мы добавляем порции раствора NaOH к титруемому раствору уксусной кислоты, ионы OH^- соединяются с ионами H^+ и образуют молекулы H_2O. При этом концентрации ионов H^+ и OH^- в растворе все время должны соответствовать величине ионного произведения воды $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \cdot 10^{-14}$. Но как только свободные ионы H^+ связываются с ионами OH^-, некоторая часть недиссоциированных молекул HAc сразу же претерпевает дальнейшую диссоциацию, так что вновь устанавливается равновесие, характеризующееся константой диссоциации уксусной кислоты (7). Таким образом, по мере добавления новых порций раствора NaOH в процессе титрования, степень ионизации HAc будет увеличиваться. Следовательно, концентрация HAc в растворе постепенно уменьшается, а концентрация Ac^- возрастает, так как равновесия (4) и (5) на каждой стадии титрования определяются константами равновесия (6) и (7). В средней точке титрования (рис. 4-10), точно соответствующей добавлению 0,5 эквивалентов NaOH, половина исходной уксусной кислоты находится в диссоциированной форме и, значит, концентрация донора протона [HAc] становится равной концентрации акцептора протона $[Ac^-]$. В этой средней точке соблюдается очень важное соотношение: величина pH раствора, содержащего равные молярные концентрации уксусной кислоты и ацетат-иона, а именно pH 4,76, в точности равна величине pK' уксусной кислоты, в чем можно легко убедиться, если сравнить приведенные в табл. 4-4 величины pK' с показанной на рис. 4-10 кривой титрования. Скоро мы поймем смысл этого важного соотношения, которое соблюдается для всех слабых кислот.

По мере того как мы продолжаем процесс титрования, добавляя новые порции раствора NaOH, оставшиеся недиссоциированными молекулы уксусной кислоты постепенно превращаются в ацетат-ионы (CH_3COO^-), тогда как ионы H^+ удаляются из раствора, соединяясь с ионами OH^- в реакции образования воды. В конце концов мы достигаем конечной точки титрования (приблизительно при pH 7,0), в которой все молекулы уксусной кислоты оказываются лишенными протонов, связавшихся с ионами OH^-. В результате образуются H_2O и ацетат. На протяжении всего процесса титрования сосуществуют два взаимосвязанных равновесия (4) и (5), причем соотношение между концентрациями веществ, участвующих в этих равновесиях, все время соответствует численным значениям констант равновесия. Оба этих равновесия обратимы и, будучи по своей природе ионными, устанавливаются практически мгновенно. Поэтому процедуру титрования можно легко провести в обратном

Рис. 4-11. Сравнение кривых титрования трех слабых кислот – уксусной кислоты, $H_2PO_4^-$ и NH_4^+. В рамках указаны преобладающие формы этих соединений при соответствующих значениях pH. Справа обозначены буферные зоны для каждой системы. Сопряженные кислотно-основные пары служат эффективными буферами при тех значениях pH, при которых соединения, играющие роль доноров протонов, ионизированы на 25–75%.



направлении. Начиная от точки нейтрализации, мы можем добавлять к полученному раствору ионы H^+, оттитровывая ацетат-ионы, и таким путем привести раствор к исходному состоянию. После внесения поправки на изменение объема в ходе титрования мы получим точно такую же кривую, которая показана на рис. 4-10. В процессе обратного титрования добавленные ионы H^+ связываются с ионами Ac^-, что приводит к образованию уксусной кислоты (HAc); по мере добавления ионов H^+ отношение $[Ac^-]/[HAc]$ уменьшается до тех пор, пока не достигнет исходного состояния, которое имело место перед началом титрования раствора уксусной кислоты раствором NaOH.

На рис. 4-11 сравниваются кривые титрования трех слабых кислот с сильно различающимися константами диссоциации, а именно уксусной кислоты ($pK' = 4{,}76$), иона $H_2PO_4^-$ ($pK' = 6{,}86$) и иона аммония NH_4^+ ($pK' = 9{,}25$). Хотя кривые титрования всех этих кислот имеют одинаковую форму, они располагаются на разных уровнях вдоль оси pH просто потому, что все три кислоты различаются по своей силе. Уксусная кислота является самой сильной из них и легче других отдает свой протон иону OH^-, так как имеет самую большую константу ионизации K' и соответственно самую низкую величину pK'. Уксусная кислота при pH 4,76 уже диссоциирована на 50%. Труднее отщепляется протон от иона $H_2PO_4^-$, который диссоциирован на 50% при pH 6,86. Ион NH_4^+ – самая слабая из всех трех кислот, его диссоциация на 50% происходит только при pH 9,25.

Теперь мы подошли к наиболее важному пункту, касающемуся кривых титрования слабых кислот, – характер этих кривых свидетельствует о возможности использования слабой кислоты и ее аниона в качестве буфера.

4.10. Буферы – это смеси слабых кислот и сопряженных с ними оснований

Буферы представляют собой водные системы, способные препятствовать изменению их pH при добавлении небольших количеств кислоты (H^+) или основания (OH^-). Буферная система состоит из слабой кислоты (донор протона) и сопряженного с ней основания (акцептор протона). Примером буферной системы может служить смесь уксусной кислоты и ацетат-иона в равных концентрациях; она образуется в растворе при достижении средней точки кривой титрования, показанной на рис. 4-10. Видно, что кривая титрования уксусной кислоты имеет относительно прямой участок, распространяющийся примерно на одну единицу pH по обе стороны от средней точки, которая соответствует pH 4,76. При увеличении концентрации ионов H^+ (или OH^-) в титруемом растворе на данном участке происходит лишь небольшое изменение величины pH. Этот относительно плоский участок представляет собой *буферную область* сопряженной кислотно-основной пары уксусная кислота – ацетат. В средней точке буферной области, где концентрация донора протона (уксусной кислоты) точно равна концентрации сопряженного основания (ацетата), буферная емкость системы максимальна. Это означает, что увеличение концентрации ионов H^+ (или OH^-) вызывает в этой точке минимальное изменение pH. Особенность этой точки кривой титрования уксусной кислоты состоит также в том, что величина pH в ней численно равна значению pK' уксусной кислоты. Очень важно отметить, что величина pH ацетатной буферной системы хотя и слабо, но все же изменяется при добавлении небольшого количества ионов OH^- (или H^+). Однако эти изменения очень малы по сравнению с теми изменениями pH, которые имели бы место при добавлении того же количества ионов OH^- (или H^+) к чистой воде или к раствору соли сильной кислоты и сильного основания, например NaCl, поскольку ни вода, ни растворы таких солей не обладают буферной емкостью.

Буферная емкость – это не результат черной магии, а просто естественное следствие равновесий двух обратимых реакций, которые протекают в растворе, содержащем донор протонов и сопря-

женный с ним акцептор протонов при условии, что оба они присутствуют в приблизительно равных концентрациях. Посмотрим, как работает буферная система, используя для этого схему, приведенную на рис. 4-12. Один из двух компонентов

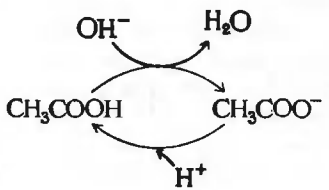


Рис. 4-12. Система уксусная кислота – ацетат может действовать в качестве буфера, способного поглощать либо H^+-, либо OH^--ионы вследствие обратимой диссоциации уксусной кислоты (см. текст).

такой системы – донор протона, или слабая кислота (HA), содержит резервные связанные ионы H^+, которые могут высвобождаться, чтобы нейтрализовать добавленные к системе ионы OH^- с образованием H_2O. Это происходит потому, что равновесие на какой-то момент нарушается, и член $[H^+][OH^-]$ становится больше $1 \cdot 10^{-14}$. Нарушенное равновесие быстро восстанавливается, так что произведение $[H^+][OH^-]$ опять оказывается равным $1 \cdot 10^{-14}$ (при 25°C), что сразу же приводит к снижению концентрации ионов H^+. Однако теперь отношение $[H^+][OH^-]$ становится меньше величины K', и в результате происходит дальнейшая диссоциация кислоты HA, чтобы восстановить нарушенное равновесие. Аналогичным образом другой компонент буферной системы, а именно сопряженное основание – анион A^-, способно связываться с добавленными к буферному раствору ионами H^+ и превращаться в HA. И в этом случае обе реакции ионизации регулируют друг друга и приходят в состояние равновесия. Теперь мы можем понять, почему сопряженная кислотно-основная пара способна препятствовать изменению pH раствора при добавлении к нему небольших количеств основания или кислоты. Способность раствора функционировать в качестве буфера – это просто автоматическое следствие протекающих в нем двух обратимых реакций и установления соответствующих равновесий, определяемых константами равновесия этих реакций, K_w и K'. Если мы добавляем к буферному раствору ионы OH^- (или H^+), то в результате возникает небольшое изменение в соотношении относительных концентраций слабой кислоты и ее аниона, а следовательно, и незначительное изменение pH. Уменьшение концентрации одного из компонентов буферной системы при добавлении небольшого количества основания (или кислоты) точно уравновешивается повышением концентрации другого компонента. Сумма компонентов буферной системы при этом не изменяется, меняется лишь их соотношение.

Укажем еще на одну важную особенность буферных систем. Как следует из сказанного выше, способность системы уксусная кислота – ацетат функционировать в качестве эффективного буфера вблизи pH 4,76 – это автоматическое следствие того факта, что величина pK' уксусной кислоты равна 4,76. Очевидно, что эта система не может служить буфером при pH крови (около 7,4). Приведенные на рис. 4-11 кривые титрования показывают, что для каждой сопряженной кислотно-основной пары характерна своя область pH, в которой она может служить эффективной буферной системой. Видно, что пара $H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$ имеет pK 6,86 и, следовательно, может служить буферной системой в области pH 6,86, тогда как пара $NH_4^+ - NH_3$, для которой величина pK' равна 9,25, ведет себя как буфер вблизи pH 9,25. Из всех этих сопряженных систем только пара $H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$ может быть использована в качестве эффективного буфера при pH крови (pH 7,4).

Количественное соотношение между величиной pH, способностью смеси слабой кислоты и сопряженного с ней основания функционировать в качестве буферной системы и величиной pK' этой слабой кислоты может быть охарактеризовано *уравнением Хендерсона–Хассельбаха*. Это простое уравнение, которое можно использовать при выборе буферной системы, рассмотрено в дополнении 4-2.

Дополнение 4-2. Уравнение Хендерсона–Хассельбаха

Кривые титрования уксусной кислоты, $H_2PO_4^-$ и NH_4^+ (см. рис. 4-11) мало различаются по форме. Это позволяет предположить, что все они отражают какую-то общую закономерность, характерную для процесса титрования слабых кислот. Так оно и есть на самом деле. Форма кривой титрования любой слабой кислоты описывается уравнением Хендерсона–Хассельбаха, анализ которого помогает понять буферные свойства крови и тканей в организмах млекопитающих (т. е. свойства, обеспечивающие поддержание в них требуемых кислотно-основных равновесий). Ниже приведен простой вывод этого уравнения и даны несколько задач, которые можно решить с его помощью.

Уравнение Хендерсона–Хассельбаха – это по существу одна из форм выражения константы диссоциации кислоты:

$$K' = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}.$$

Сначала мы решим это уравнение относительно $[H^+]$:

$$[H^+] = K' \frac{[HA]}{[A^-]}.$$

Теперь напишем выражение для отрицательных логарифмов членов, стоящих слева и справа:

$$-\lg [H^+] = -\lg K' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}.$$

Заменяя $-\lg K'$ на pH и $-\lg pK'$ на pK', получаем

$$pH = pK' - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}.$$

Если поменять местами числитель и знаменатель в выражении $-\lg [HA]/[A^-]$ (что приведет к изменению знака этого выражения), то получится уравнение Хендерсона–Хассельбаха:

$$pH = pK' + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

В более общей форме это уравнение выглядит так:

$$pH = pK' + \lg \frac{[\text{Акцептор протонов}]}{[\text{Донор протонов}]}.$$

Уравнение Хендерсона–Хассельбаха описывает кривые титрования всех слабых кислот и позволяет вывести ряд важных количественных соотношений. Из него можно понять, например, почему величина pK' слабой кислоты численно равна величине pH раствора этой кислоты

в средней точке титрования. В этой точке $[HA] = [A^-]$ и, следовательно,

$$pH = pK' + \lg 1{,}0 = pK' + 0; \qquad pH = pK'.$$

Уравнение Хендерсона–Хассельбаха дает также возможность вычислить величину pK' любой кислоты при данном pH (если известно отношение молярных концентраций донора и акцептора протонов), определить величину pH сопряженной кислотно-основной пары при данном молярном соотношении (если известна величина pK') и рассчитать соотношение между молярными концентрациями донора и акцептора протонов при любом значении pH (если известна величина pK' слабой кислоты).

Ниже приведены конкретные примеры задач всех трех указанных типов вместе с их решениями.

1) Вычислите величину pK' молочной кислоты, если при концентрации свободной молочной кислоты, равной 0,010 М, и концентрации лактат-иона, равной 0,087 М, величина pH равна 4,80.

$$pH = pK' + \lg \frac{[\text{Лактат}]}{[\text{Молочная кислота}]},$$

$$pK' = pH - \lg \frac{[\text{Лактат}]}{[\text{Молочная кислота}]} = 4{,}80 - \lg \frac{0{,}087}{0{,}010} =$$
$$= 4{,}80 - \lg 8{,}7 = 4{,}80 - 0{,}94 = 3{,}86.$$

2) Вычислите величину pH смеси, состоящей из 0,1 М раствора уксусной кислоты и 0,2 М раствора ацетата натрия, если известно, что величина pK' уксусной кислоты равна 4,76.

$$pH = pK' + \lg \frac{[\text{Ацетат}]}{[\text{Уксусная кислота}]} = 4{,}76 + \lg \frac{0{,}2}{0{,}1} = 5{,}06.$$

3) Рассчитайте, каким должно быть соотношение между концентрациями ацетат-иона и уксусной кислоты в буферной системе при pH 5,30.

$$pH = pK' + \lg \frac{[\text{Ацетат-ион}]}{[\text{Уксусная кислота}]};$$

$$\lg \frac{[\text{Ацетат-ион}]}{[\text{Уксусная кислота}]} = pH - pK' = 5{,}30 - 4{,}76 = 0{,}54;$$

$$\frac{[\text{Ацетат-ион}]}{[\text{Уксусная кислота}]} = \text{Антилогарифм } 0{,}54 = 3{,}47$$

4.11. Фосфат и бикарбонат – важные биологические буферные системы

У всех живых организмов внутриклеточные и внеклеточные жидкости обычно имеют характерную и постоянную величину pH, которая поддерживается с помощью различных биологических систем. Однако первая линия защиты живых организмов, препятствующая изменениям их внутреннего pH, обеспечивается буферными системами. Две наиболее

важные буферные системы у млекопитающих – это фосфатная и бикарбонатная системы. Фосфатная буферная система, играющая важную роль в поддержании pH внутриклеточной жидкости, представляет собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из иона $H_2PO_4^-$ (донора протона) и иона HPO_4^{2-} (акцептора протона).

$$\underset{\text{Донор протона}}{H_2PO_4^-} \rightleftarrows H^+ + \underset{\text{Акцептор протона}}{HPO_4^{2-}}$$

Фосфатная буферная система работает точно так же, как ацетатная, с той разницей, что она функционирует в другом интервале значений pH. Эта система обладает максимальной эффективностью вблизи pH 6,86, поскольку величина pK′ ионов $H_2PO_4^-$ равна 6,86 (см. табл. 4-4 и рис. 4-11). Фосфатная буферная пара $H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$ способна сопротивляться изменениям pH в интервале между 6,1 и 7,7 и может, следовательно, обеспечивать достаточную буферную емкость внутриклеточной жидкости, величина pH которой лежит в пределе 6,9–7,4.

Главной буферной системой плазмы крови служит бикарбонатная система, представляющая собой сопряженную кислотно-основную пару, состоящую из молекулы угольной кислоты (H_2CO_3), выполняющей роль донора протона и бикарбонат-иона (HCO_3^-), выполняющего роль акцептора протона:

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-.$$

Эта система, которая имеет свою собственную константу равновесия

$$K_1' = \frac{[H^+][HCO_3^-]}{[H_2CO_3]},$$

функционирует в качестве буфера так же, как и другие сопряженные кислотно-основные пары. Ее уникальная особенность состоит, однако, в том, что один из ее компонентов, а именно угольная кислота (H_2CO_3), образуется в результате взаимодействия растворенной в воде (р) двуокиси углерода с водой в соответствии с обратимой реакцией:

$$CO_2(р) + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3,$$

константа равновесия которой равна

$$K_2' = \frac{[H_2CO_3]}{[CO_2(р)][H_2O]}$$

Поскольку при нормальных условиях двуокись углерода представляет собой газ, величина $[CO_2(р)]$, т. е. концентрация растворенной CO_2, определяется равновесием с CO_2 газовой фазы (г):

$$CO_2(г) \rightleftarrows CO_2(р),$$

характеризуемым константой равновесия K_3', равной

$$K_3' = \frac{[CO_2(р)]}{[CO_2(г)]}.$$

Величина pH бикарбонатной буферной системы зависит от концентрации растворенных в ней компонентов H_2CO_3 и HCO_3^-, выполняющих роль донора и акцептора протонов. Поскольку, однако, концентрация H_2CO_3 в свою очередь зависит от концентрации растворенной CO_2, а последняя – от парциального давления CO_2 в газовой фазе, величина pH бикарбонатного буфера, находящегося в контакте с газовой фазой, в конечном счете определяется концентрацией ионов HCO_3^- в водной фазе и парциальным давлением CO_2 в газовой фазе (см. дополнение 4-3).

Бикарбонатная буферная система функционирует как эффективный физиологический буфер вблизи pH 7,4, потому что донор протона H_2CO_3 в плазме крови находится в подвижном равновесии с большим резервным объемом газообразной CO_2 в воздушном пространстве легких. В любых условиях, когда кровь почему-либо вынуждена поглощать избыток ионов OH^- и pH повышается, количество угольной кислоты (H_2CO_3), частично превратившейся в HCO_3^- в результате взаимодействия с ионами OH^-, быстро восстанавливается за счет большого запаса газообразной CO_2 в легких.

Дополнение 4-3. Как работает бикарбонатная система крови

Буферная система крови включает три взаимосвязанных обратимых равновесия между газообразной CO_2 в легких и бикарбонат-ионом (HCO_3^-) в плазме крови (рис. 1). Когда ионы H^+ попадают в кровь при ее протекании через сосуды тканей, их концентрация сразу же повышается. Это приводит к тому, что равновесие реакции 3 (рис. 1) смещается и устанавливается новое равновесие, соответствующее более

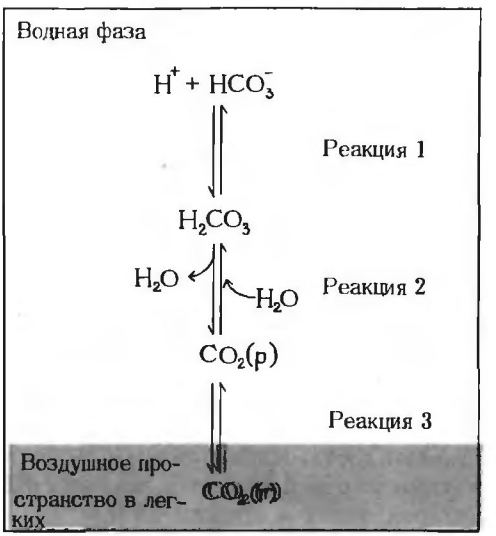


Рис. 1. Между CO_2 в воздушном пространстве легких и бикарбонатным буфером в плазме крови, протекающей через капилляры легких, устанавливается равновесие. Так как концентрация растворенной CO_2 может быть быстро отрегулирована путем изменений скорости дыхания, бикарбонатная буферная система крови находится почти в равновесии с обширным потенциальными резервуаром CO_2.

высокой концентрации H_2CO_3, что в свою очередь приводит к повышению концентрации CO_2 (р) в крови. В результате давление CO_2 в газовой фазе легких тоже повышается и лишняя CO_2 выдыхается. Наоборот, когда в плазму крови поступает некоторое количество ионов OH^-, события происходят в обратной последовательности. Понижение концентрации ионов H^+ вызывает диссоциацию части молекул H_2CO_3 на ионы H^+ и HCO_3^-, а это в свою очередь приводит к растворению в плазме крови некоторого дополнительного количества CO_2 (г), содержащегося в легких. Таким образом, высокая интенсивность процесса дыхания, т.е. высокая скорость вдыхания воздуха и выдыхания CO_2, может обеспечить достаточно быстрые сдвиги этих равновесий, что обусловливает сохранение постоянной величины pH в крови.

CO_2 (г) растворяется в крови, образуя CO_2 (р), которая вступает в реакцию с водой, что приводит к образованию H_2CO_3 (см. дополнение 4-3). И наоборот, когда величина pH крови почему-либо уменьшается, некоторое количество HCO_3^- буферной системы связывается с избытком ионов H^+ и образуется избыток H_2CO_3. Эта H_2CO_3 распадается, выделяя растворенную CO_2, которая в свою очередь переходит в газовую фазу в легких и в конце концов выдыхается организмом. По мере того как кровь протекает через многочисленные капиллярные сосуды

в легких, ее бикарбонатная буферная система быстро приходит почти в равновесное состояние с CO_2 в газовом пространстве легких. Совместное функционирование бикарбонатной буферной системы и легких представляет собой очень ответственный механизм, обеспечивающий поддержание постоянной величины pH крови.

Величина pH плазмы крови поддерживается на удивительно постоянном уровне. В норме плазма крови имеет pH, близкий к 7,40. Нарушения механизмов, регулирующих величину pH, наблюдающиеся, например, при тяжелых формах диабета вследствие ацидоза, обусловленного «перепроизводством» метаболических кислот, вызывают падение pH крови до величины 6,8 и ниже, что в свою очередь, может приводить к непоправимым последствиям и смерти. При некоторых других заболеваниях величина pH крови иногда достигает столь высоких значений, что она уже не поддается нормализации. Поскольку повышение концентрации ионов H^+ всего лишь на $1{,}18 \cdot 10^{-7}$ М (приблизительная разница между кровью при pH 7,4 и кровью при pH 6,8) может оказаться опасным для жизни, возникает вопрос: какие молекулярные механизмы обеспечивают поддержание величины pH в клетках со столь высокой точностью? Величина pH влияет на многие структурные и функциональные свойства клетки, однако к изменениям pH особенно чувствительна каталитическая активность ферментов. На рис. 4-13 приведены типичные кривые, характеризующие зависимость активности некоторых ферментов от pH. Видно, что каждый из этих ферментов проявляет максимальную активность при определенном значении pH, которое называется *оптимумом pH*. Отклонение величины pH в любую сторону от этого оптимального значения часто сопровождается резким падением активности фермента. Таким образом, небольшие сдвиги pH могут приводить к значительным изменениям скорости некоторых жизненно важных для организма ферментативных реакций, протекающих, например, в скелетных мышцах или в мозгу. Биологический контроль, обес-

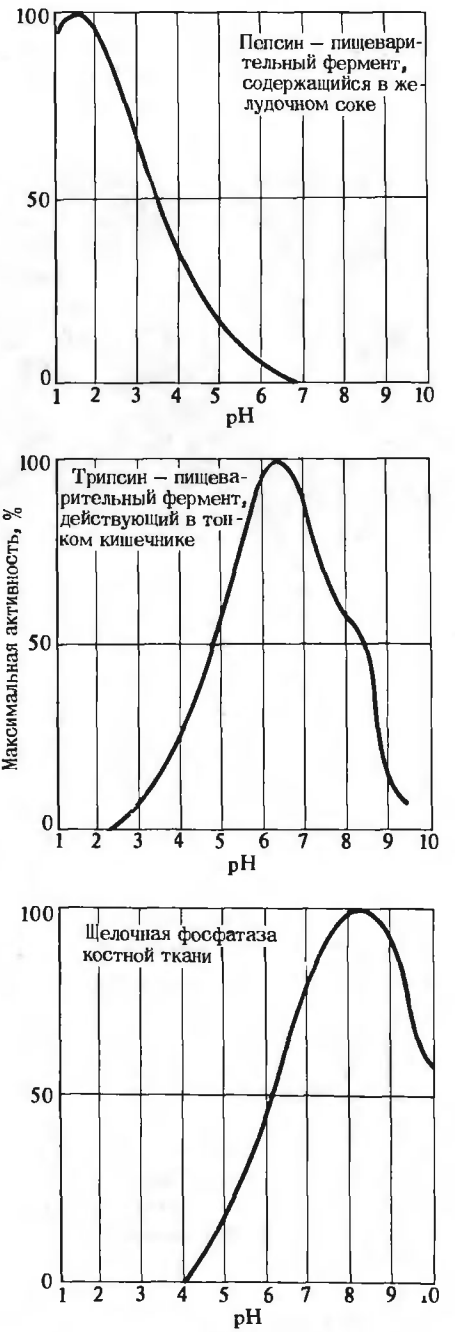


Рис. 4-13. Влияние pH на активность некоторых ферментов. Каждый фермент имеет характерную для него кривую зависимости pH – активность.

печивающий постоянство pH в клетках и жидкостях организма, имеет, следовательно, исключительно важное значение для всех аспектов метаболизма и клеточной активности.

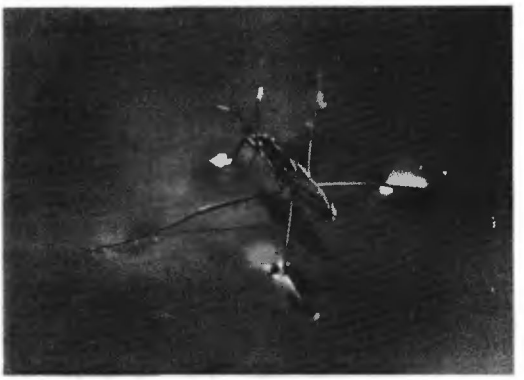


Рис. 4-14. Клоп-водомерка (семейство Gerridae) использует высокое поверхностное натяжение воды. Это насекомое, которое живет на поверхности прудов, имеет специальные волоски на своих первых и третьих парах ног, благодаря которым оно держится на поверхностном слое воды, не продавливая его. Средняя пара ног, проникающая через этот слой, действует как весла.

4.12. Приспособленность живых организмов к водной среде

Живые организмы успешно приспособились к водной среде и даже приобрели способность использовать необычные свойства воды. Благодаря высокой удельной теплоемкости воды она действует в клетках как «тепловой буфер», позволяющий поддерживать в организме относительно постоянную температуру при колебаниях температуры воздуха. Высокая теплота испарения воды используется некоторыми позвоночными для защиты организма от перегревания с помощью механизма теплоотдачи путем испарения пота. Сильно выраженное сцепление молекул в жидкой воде, обусловленное влиянием межмолекулярных водородных связей, обеспечивает эффективный перенос в растениях растворенных питательных веществ от корней к листьям в процессе транспирации. Даже то, что лед имеет более низкую плотность по сравнению с жидкой водой и поэтому всплывает в ней, приводит к важным биологическим последствиям в жизненных циклах водных организмов. Однако наиболее существенным для живых организмов является тот факт, что многие важные биологические свойства макромолекул, в частности белков и нуклеиновых кислот, обусловлены их взаимодействием с молекулами воды в окружающей среде. Ниже мы увидим, что специфические трехмерные структуры белков, определяющие их биологическую активность, поддерживаются благодаря свойствам воды. От свойств воды зависит даже такой важный процесс, как репликация ДНК.

4.13. «Кислые» дожди загрязняют наши озера и реки

Чистая вода, контактирующая с «нормальным» воздухом, имеет pH около 5,6, а не теоретическую величину pH 7. Это связано с тем, что воздух содержит очень небольшое количество газообразной CO_2 (около 0,04%, что соответствует парциальному давлению 0,3 мм рт. ст.). Когда чистая вода, имеющая pH 7,0, приходит в равновесие с CO_2 воздуха, в ней происходят обратимые реакции, в ходе которых образуются ионы H^+ и HCO_3^- (см. дополнение 4-3) и pH воды снижается приблизительно до 5,6:

$$CO_2(г) \rightleftarrows CO_2(р)$$

$$CO_2(р) + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$$

$$H_2CO_3 \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-$$

За последние сто или более лет кислотность осадков – дождей и снега – в восточной части США и Северной Европе постепенно возросла в тридцать раз, что привело к снижению pH воды в озерах и реках этих областей примерно от 5,6 до величин значительно ниже 5,0.

«Кислые» дожди возникают при взаимодействии дождевой воды с содержащимися в атмосфере двуокисью серы и окислами азота, образующимися в результате сжигания угля и нефти, содержащих небольшие количества соединений серы и азота. Таким образом, дождевая вода превращается по существу в разбавленный раствор серной и азотной кислот. Тепловые электростанции и металлургические предприятия, сжигающие уголь и нефть, обычно снабжены высокими дымовыми трубами, через которые продукты сгорания выбрасываются в атмосферу, чтобы исключить загрязнение нижних слоев воздуха, поэтому верхние слои атмосферы над огромными областями земного шара оказались загрязненными этими кислотами, выпадающими на землю в виде дождя. Иногда местные дожди могут быть особенно кислыми: во время ливней в Шотландии в 1974 г. дождевая вода имела pH 2,4 (более низкая величина, чем pH уксуса!)

Вследствие «кислых» дождей вода во многих озерах Скандинавских стран, восточной части Канады, северной части Новой Англии, а также в горах Адирондака и в Флориде стала настолько кислой, что рыба в этих озерах частично или полностью погибла, так как многие виды рыб не выносят кислотности ниже pH 5. Более того, повышение кислотности воды уже вызвало нарушение неустойчивого равновесия между животными и растениями в некоторых пресноводных экологических системах. Поскольку в будущем количество сжигаемого угля увеличится, можно ожидать, что это приведет к еще большей загрязненности запасов пресной воды, если тепловые электростанции и металлургические предприятия не будут снабжены эффективными установками, предотвращающими выброс загрязняющих веществ в атмосферу.

Краткое содержание главы

Вода – это самое распространенное соединение в живых организмах. Относительно высокие значения температуры замерзания, температуры кипения и теплоты испарения воды обусловлены сильными межмолекулярными взаимодействиями, проявляющимися в форме многочисленных водородных связей между соседними молекулами воды. Жидкая вода состоит из короткоживущих скоплений (кластеров) молекул, связанных друг с другом водородными связями. Полярность воды и сильно выраженная способность ее молекул образовывать водородные связи делает воду прекрасным растворителем для многих ионных соединений и других веществ, имеющих полярные молекулы. Вода диспергирует также амфипатические вещества, например мыла, с образованием агрегатов молекул, называемых мицеллами, в которых гидрофобные группы спрятаны внутри и не контактируют с водой, тогда как заряженные группы расположены на внешней поверхности.

Вода очень слабо диссоциирует, образуя ионы H^+ и OH^-. В разбавленных водных растворах концентрации ионов H^+ и OH^- связаны между собой обратной зависимостью: $K_w = [H^+][OH^-] = 1 \cdot 10^{-14}$ (при 25°C). Концентрацию ионов водорода в биологических системах обычно выражают в виде pH, величина которого численно равна отрицательному логарифму концентрации ионов H^+ ($pH = -\lg[H^+]$). Величину pH водных растворов измеряют при помощи стеклянных электродов, чувствительных к концентрации ионов H^+.

Кислоты можно определить как доноры протонов, а основания – как акцепторы протонов. Сопряженная кислотно-основная пара состоит из донора протона HA и соответствующего ему акцептора протона A^-. Способность кислоты HA отдавать свой протон характеризуется ее константой диссоциации

$$\left(K' = \frac{[H^+][HA^-]}{[HA]}\right),$$

или величиной pK', определяемой как $-\lg K'$. Величина pH водного раствора слабой кислоты количественно связана со значением ее pK' и с отношением

концентраций ее протонно-донорной и протонно-акцепторной форм.

Сопряженная кислотно-основная пара может функционировать в качестве буфера, препятствующего изменениям pH при добавлении к раствору щелочи или кислоты; ее буферная емкость максимальна при значении pH, численно равном ее pK'. Наиболее важными в биологическом отношении буферными парами являются $H_2CO_3 - HCO_3^-$ и $H_2PO_4^- - HPO_4^{2-}$. Каталитическая активность ферментов сильно зависит от pH.

ЛИТЕРАТУРА

Callewaert D. M., Jenyea J. Basic Chemistry: General, Organic, Biological, Worth, New York, 1980. Полезно просмотреть как этот, так и другие учебники общей химии.

Dick D. A. T. Cell Water, Butterworths, Washington, 1966. Свойства и функции воды в живых организмах.

Eisenberg D., Kauzmann W. The Structure and Properties of Water, Oxford University Press, Fair Lawn, N.J., 1969. Трактовка физической химии воды, рассчитанная на подготовленных читателей.

Likens G. E., Wright R. F., Galloway J. N., Butler T. J. Acid Rain, Sci. Am., **241**, 43–51, October (1979).

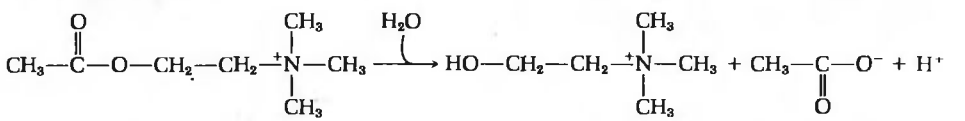
Montgomery R., Swenson C. A. Quantitative Problems in Biochemical Sciences, 2d ed., Freeman, San Francisco, 1976.

Segel I. H. Biochemical Calculations, 2d ed., Wiley, New York, 1976.

Solomon A. K., The State of Water in Red Cells, Sci, Am., **244**, 88–96, February (1971). Статья, посвященная исследованию структуры воды в клетке.

Вопросы и задачи

1. *Автомобильный антифриз.* В качестве вещества, понижающего температуру замерзания воды в радиаторе автомобиля, обычно используется этиленгликоль – спирт, содержащий две гидроксильные группы ($CH_2OH—CH_2OH$). Рассчитайте, какова должна быть приблизительная концентрация этиленгликоля, которая будет достаточной для предотвращения замерзания воды при $-18°C$.
2. *Имитация уксуса.* Один из способов приготовления уксуса (отнюдь не лучший) состоит просто в том, что уксусную кислоту, единственный кислый компонент уксуса, разводят водой до нужного pH (см. табл. 4-4 и рис. 4-9) и добавляют соответствующие приправы. Уксусная кислота при 25°C представляет собой жидкость с плотностью 1,049 г/мл. Рассчитайте, какое количество уксусной кислоты нужно растворить в дистиллированной воде, чтобы получить 1 л раствора, имитирующего уксус.
3. *Кислотность желудочной соляной кислоты.* В клинических лабораториях для определения кислотности желудочного сока оттитровывают 10,0 мл желудочного сока, взятого через несколько часов после еды, 0,1 н. раствором NaOH до нейтральной реакции. Допустим, что для этого потребовалось 7,2 мл раствора NaOH. Так как желудок к этому времени уже не содержит непереваренной пищи или напитков, никаких буферов в нем нет. Какова величина pH желудочного сока?
4. *Измерение содержания ацетилхолина по изменению pH.* Концентрацию нейромедиатора ацетилхолина можно определить по изменению pH, сопровождающему гидролиз ацетилхолина. При инкубации ацетилхолина с каталитическими количествами фермента ацетилхолинэстеразы он количественно превращается в холин и уксусную кислоту, которая диссоциирует с образованием ацетат-иона и иона водорода:



Ацетилхолин Холин Ацетат

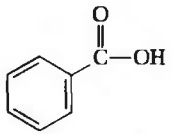
Согласно данным анализа, водный раствор, содержащий неизвестное количество ацетилхолина объемом 15 мл, имел pH 7,65. После инкубации с ацетилхолинэстеразой pH раствора снизился до 6,87. Сколько молей ацетилхолина содержалось в 15 мл исходного раствора, если считать, что в анализируемой смеси отсутствовали буферы?

5. *Смысл величины pK′ кислоты.* Согласно одному из наиболее широко распространенных определений pK', эта величина есть не что иное, как pH, при котором кислота ионизирована на 50%, т.е. представляет собой смесь недиссоциированных молекул кислоты и сопряженного с ней основания в соотношении 50 : 50. Докажите, что это правильно, исходя из выражения для константы равновесия.
6. *Свойства буфера.* Аминокислота глицин часто используется в биохимической практике в качестве главной составной части буферного раствора. Аминогруппа глицина, имеющая pK' 9,3, может существовать либо в протонированной форме ($—NH_3^+$), либо в виде свободного основания ($—NH_2$), которые находятся между собой в равновесии:

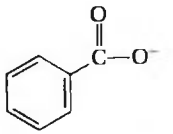
$$—\overset{+}{N}H_3 \rightleftarrows —NH_2 + H^+.$$

а) В каком интервале pH глицин может быть использован в качестве эффективного буфера за счет его аминогруппы?
б) Какова доля молекул глицина, имеющих в 0,1 М растворе при pH 9,0 аминогруппу в протонированной форме ($—NH_3^+$)?
в) Какой объем 5 М раствора KOH нужно добавить к 1,0 л 0,1 М раствора глицина (pH 9,0), чтобы величина pH смеси была равна точно 10,0?
г) Каково должно быть численное соотношение между величинами pH раствора и pK′ аминогруппы глицина, чтобы у 99% молекул глицина аминогруппа находилась в протонированной форме?

Задача 7



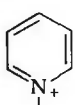
Бензойная кислота
pK' ~ 5
нерастворима в воде



Бензоат-ион
(заряженный)
растворим в воде

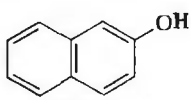
7. *Зависимость растворимости от pH.* Сильно выраженная полярность воды и ее способность легко образовывать водородные связи делает ее прекрасным растворителем для веществ ионной природы. Вместе с тем эта особенность воды обусловливает плохую растворимость в ней неионизируемых неполярных органических веществ, таких, как бензол. В принципе растворимость всех органических кислот и оснований в воде можно повысить путем соответственно депротонирования и протонирования, что приводит в обоих случаях к образованию заряженных частиц. Например, бензойная кислота плохо растворима в воде, однако добавление бикарбоната натрия вызывает повышение pH раствора и депротонирование молекул бензойной кислоты с образованием бензоат-ионов, которые хорошо растворимы в воде. Какой из растворов – 0,1 М NaOH или 0,1 М HCl – нужно добавить к воде, чтобы повысить растворимость веществ *А*, *Б*, *В*?

а)



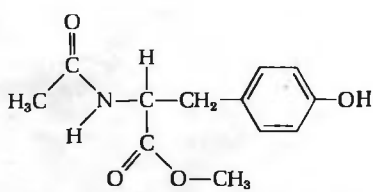
Пиридиний-ион
pK' ~ 5

б)



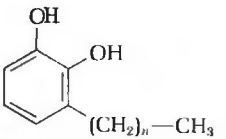
β-Нафтол
pK' ~ 10

в)



Метиловый эфир N-ацетилтирозина
pK' ~ 10

8. *Лечение сыпи, возникающей на коже при соприкосновении с растением сумахом.* Содержащиеся в тканях сумаха производные пирокатехола с длинными цепями алкильных групп вызывают характерную зудящую сыпь.



$pK' = 8$

Если вы случайно дотронулись до сумаха, то какой способ обработки пораженного участка кожи из перечисленных ниже вы изберете и почему?

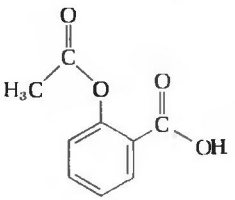
(а) Промывание поверхности кожи холодной водой.

(б) Промывание поверхности кожи разбавленным уксусом или лимонным соком.

(в) Промывание поверхности кожи мылом и водой.

(г) Промывание поверхности кожи мылом, водой и пищевой (питьевой) содой (бикарбонатом натрия).

9. *Величина pH и всасывание лекарственных веществ.* Широко используемый лекарственный препарат аспирин представляет собой слабую кислоту с $pK' = 3{,}5$



$pK' = 3{,}5$

Аспирин всасывается в кровь человека через клетки слизистой желудка и тонкого кишечника. Для того чтобы вещество всасывалось, оно должно легко проходить через клеточные мембраны. Возможность прохождения вещества через клеточную мембрану определяется полярностью его молекул: ионизированные (заряженные) и сильно полярные молекулы проходят медленно, тогда как нейтральные гидрофобные молекулы проходят сквозь мембраны быстро. Где аспирин легче всасывается в кровяной поток — в желудке или в тонком кишечнике, если величина pH желудочного сока в желудке близка к 1, а в тонком кишечнике к 6? Дайте четкое обоснование своего выбора.

10. *Приготовление стандартного буфера для калибровки pH-метра.* Стеклянный электрод, используемый в имеющихся в продаже pH-метрах, дает электрический сигнал, величина которого пропорциональна концентрации ионов водорода. Для того чтобы по величине сигнала можно было правильно судить о величине pH, необходимо провести калибровку стеклянного электрода, используя для этого стандартные растворы с известной концентрацией ионов водорода. Определите, какие количества (в граммах) первичного кислого фосфата натрия ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; мол. масса 138,01) и вторичного кислого фосфата натрия (Na_2HPO_4; мол. масса 141,98) необходимы для приготовления 1 л стандартного буфера с pH 7,00, в котором суммарная концентрация фосфатов равна 0,100 М. (Мол. масса смеси фосфатов будет зависеть от их соотношения). Величина pK' первичного кислого фосфата при 25°C равна 6,86.

11. *Контроль pH крови путем изменения интенсивности дыхания.*

а) Парциальное давление CO_2 в легких может быстро меняться в зависимости от интенсивности и глубины дыхания. Известно, что для избавления от икоты необходимо повысить концентрацию CO_2 в легких. Этого можно добиться, если частично задержать дыхание, медленно и неглубоко вдыхая воздух (гиповентиляция), или вдыхать и выдыхать воздух, прижав к лицу бумажный пакет. В этих условиях парциальное давление CO_2 в воздушном пространстве легких превысит нормальное. Объясните, почему эти процедуры влияют на pH крови.

б) Бегуны на короткие дистанции непосредственно перед стартом обычно интенсивно и глубоко дышат (гипервентиляция) примерно в течение 1/2 мин для удаления CO_2 из легких. Величина pH крови может подскочить при этом до 7,60. Объясните, почему pH крови повышается в этих условиях.

в) Во время бега на короткую дистанцию мышцы производят большое количество молочной кислоты из запасов глюкозы. Исходя из этого факта, объясните, почему перед стремительным бегом полезна гипервентиляция?

ГЛАВА 5

АМИНОКИСЛОТЫ И ПЕПТИДЫ

В количественном отношении белки занимают первое место среди всех содержащихся в живой клетке макромолекул; на их долю приходится не менее половины сухого веса клетки. Белки присутствуют во всех клетках, причем их можно найти в любой части клетки. Велико также и разнообразие белков; в одной клетке можно обнаружить сотни различных видов этих макромолекул. Белки выполняют многообразные биологические функции, поскольку они служат молекулярными инструментами, с помощью которых генетическая информация находит свое реальное воплощение. Поэтому изучение биологических макромолекул разумно начать именно с белков, или протеинов. (Это название происходит от латинского слова, означающего «первый» или «главный».)

Ключ к пониманию структуры любого из всех этих тысяч различных белков дает небольшая группа довольно простых молекул, играющих роль строительных блоков. Для построения всех белков, будь то белки из самых древних линий бактерий или из высших организмов, используется один и тот же набор из 20 различных аминокислот, ковалентно связанных друг с другом в определенной, характерной только для данного белка последовательности. Каждая аминокислота благодаря специфическим особенностям ее боковой цепи наделена химической индивидуальностью, поэтому всю эту группу из 20 аминокислот можно рассматривать как алфавит «языка» белковой структуры.

В этой главе мы уделим внимание также и пептидам – коротким цепям, состоящим из двух или более аминокислот, соединенных ковалентными связями. Поистине замечательное свойство клеток – это их способность соединять 20 аминокислот в различных комбинациях и последовательностях, в результате чего образуются пептиды и белки, обладающие совершенно разными свойствами и биологической активностью. Из одних и тех же строительных блоков разные организмы способны вырабатывать такие разнообразные продукты, как ферменты, гормоны, белок хрусталика глаза, перья, паутина, панцырь черепахи (рис. 5-1), белки молока, энкефалины (наркотики, вырабатываемые самим организмом), антибиотики, ядовитые вещества грибов и многие другие соединения, наделенные специфической биологической активностью.

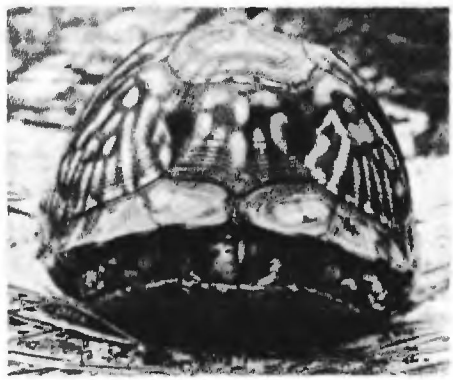


Рис. 5-1. Белок кератин синтезируется у всех позвоночных. Он служит главным структурным компонентом волос, чешуи, рогов, шерсти, ногтей и перьев. Кератин как главный компонент входит также в состав плотного панцыря черепахи.

5.1. Общие структурные свойства аминокислот

При кипячении белков в присутствии сильных кислот и щелочей ковалентные связи между аминокислотами, из которых построены белковые цепи, разрываются. Образующиеся при этом свободные аминокислоты представляют собой сравнительно небольшие молекулы с известной структурой. Первая аминокислота, *аспарагин*, была открыта в 1806 г. Последним из 20 обнаруженных в белках аминокислот оказался *треонин*, который удалось идентифицировать лишь в 1938 г. Каждая аминокислота имеет тривиальное (традиционное) название, происходящее иногда от источника, из которого аминокислота была впервые выделена. Например, аспарагин, как нетрудно догадаться, впервые обнаружили в аспарагусе, а *глутаминовую кислоту* – в клейковине (по-английски «gluten») пшеницы; глицин был назван так за его сладкий вкус (от греч. «glykos» – сладкий).

Все 20 аминокислот, встречающиеся в белках, характеризуются общей структурной особенностью – наличием карбоксильной группы и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода (рис. 5-2). Различаются же аминокислоты только боковыми цепями (R-группами), которые у разных аминокислот неодинаковы по структуре, электрическому заряду и растворимости

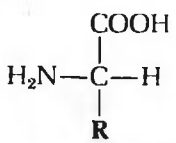


Рис. 5-2. Общая структурная формула аминокислот (в неионной форме), входящих в состав белков. Часть структуры, показанная черным цветом, одинакова у всех α-аминокислот (кроме пролина). Буквой R, выделенной красным цветом, обозначена боковая цепь (R-группа). Каждая аминокислота имеет свою, характерную для нее R-группу. Во всех аминокислотах, за исключением глицина, α-атом углерода связан с четырьмя различными замещающими группами и, следовательно, является асимметрическим, или хиральным, атомом углерода.

Таблица 5.1. Сокращенные обозначения аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенное сокращенное обозначение	Однобуквенное обозначение
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспарагиновая кислота	Asp	D
Валин	Val	V
Гистидин	His	H
Глицин	Gly	G
Глутамин	Gln	Q
Глутаминовая кислота	Glu	E
Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Тирозин	Tyr	Y
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Фенилаланин	Phe	F
Цистеин	Cys	C

в воде. 20 аминокислот, входящие в состав белков, часто называют *стандартными*, *основными* или *нормальными* аминокислотами, чтобы отличить их от других аминокислот, присутствующих в живых организмах, но не встречающихся в белках. Стандартные аминокислоты имеют трехбуквенные и однобуквенные условные обозначения (табл. 5-1), которыми пользуются для сокращенной записи аминокислотного состава и последовательностей аминокислот в полипептидных цепях.

5.2. Почти все аминокислоты содержат асимметрический атом углерода

Как следует из рис. 5-2, все стандартные аминокислоты, кроме одной, содержат в α-положении *асимметрический* атом углерода, с которым связаны

четыре разные замещающие группы: карбоксильная группа, аминогруппа, R-группа и атом водорода. Таким образом, асимметрический α-атом углерода является *хиральным центром* (разд. 3.5). Как мы знаем, соединения с хиральным центром встречаются в двух разных изомерных формах, у которых одинаковы все химические и физические свойства, за исключением одного – направления вращения плоскости поляризации проходящего через них плоскополяризованного света; угол поворота плоскости поляризации измеряют при помощи *поляриметра* (разд. 3.5). Если не считать *глицина*, не имеющего асимметрического атома углерода (рис. 5-3), все остальные 19 аминокислот, образующиеся при гидролизе белков в достаточно мягких условиях, обладают *оптической активностью*, т.е. способны вращать плоскость поляризации света в том или ином направлении. Благодаря тому что в аминокислотах валентные связи вокруг α-атома углерода имеют тетраэдрическое расположение, четыре различные замещающие группы могут располагаться в пространстве двумя разными способами, так что молекула

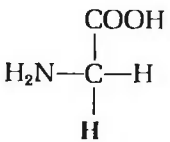
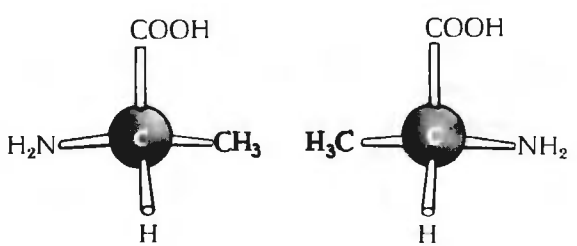


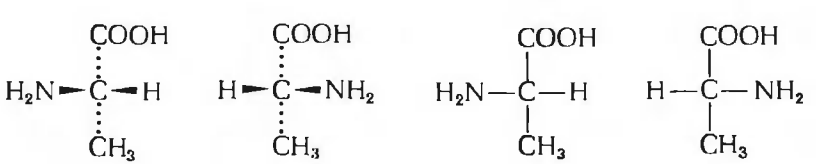
Рис. 5-3. Глицин, единственная аминокислота, у которой нет асимметрического атома углерода. R-группа, представляющая собой атом водорода, выделена красным цветом.

Рис. 5-4. *А*. Два оптических изомера аланина. Карбоксильные группы, представляющие собой точки отсчета, расположены на конце связи, идущей от хирального центра по вертикали. Структуры L- и D-аланина – это несовмещающиеся зеркальные отражения друг друга. *Б* и *В*. Два разных способа изображения пространственной конфигурации оптических изомеров. В перспективных формулах связи, выступающие над плоскостью рисунка, изображаются в виде клиньев, а связи, уходящие за плоскость рисунка, обозначаются пунктиром. В проекционных формулах предполагается, что горизонтальные связи выступают над плоскостью рисунка, а вертикальные – уходят за его плоскость. Правда, проекционным формулам далеко не всегда придают строгий смысл и пользуются ими вне всякой связи со стереохимической конфигурацией молекулы.



А

Перспективные формулы Проекционные формулы



Б *В*

может существовать в двух конфигурациях, представляющих собой несовместимые зеркальные отображения друг друга (рис. 5-4). Эти две формы молекулы называются *оптическими изомерами, энантиометрами* или *стереоизомерами*. Раствор одного стереоизомера данной аминокислоты вращает плоскость поляризации света влево (против часовой стрелки); такой стереоизомер называется *левовращающим* изомером [перед его названием ставят знак (−)]. Другой стереоизомер поворачивает плоскость поляризации света точно на такой же угол, но вправо (по часовой стрелке) и называется *правовращающим изомером* [в этом случае впереди ставят знак (+)]. Эквимолярная смесь (+)- и (−)-форм не способна вращать плоскость поляризации света. Поскольку все аминокислоты (за исключением глицина), выделенные из белков в мягких условиях, вращают плоскость поляризации света, ясно, что в составе белковых молекул они присутствуют только в какой-либо одной стереоизомерной форме.

Оптическая активность стереоизомера количественно выражается величиной *удельного вращения*, которую можно определить, измерив угол поворота плоскости поляризации при прохождении света через раствор чистого стереоизомера с известной концентрацией в кювете поляриметра при заданной длине пути света в растворе:

$$[\alpha]_D^{25}\,C = \frac{\text{Угол вращения плоскости поляризации, град}}{(\text{Длина пути света, дм}) \times (\text{Концентрация, г/мл})}$$

Длину оптического пути выражают в дециметрах и обязательно указывают температуру и длину волны используемого света (обычно это D-линия в спектре натрия, $\lambda = 589$ нм). В табл. 5-2 приведены значения удельного вращения для нескольких аминокислот; обратите внимание, что среди них есть как левовращающие, так и правовращающие.

Таблица 5-2. Удельное вращение некоторых аминокислот, выделенных из белков

Все эти аминокислоты имеют L-конфигурацию, но одни из них правовращающие, а другие – левовращающие.

Аминокислота	Удельное вращение, $[\alpha]_D^{25}$
L-аланин	+1,8
L-аргинин	+12,5
L-гистидин	−38,5
L-глутаминовая кислота	+12,0
L-изолейцин	+12,4
L-лизин	+13,5
L-пролин	−86,2
L-серин	−7,5
L-треонин	−28,5
L-фенилаланин	−34,5

5.3. Стереоизомеры обозначаются в соответствии с их абсолютной конфигурацией

В основе более строгой системы классификации и обозначения стереоизомеров лежит не вращение плоскости поляризации света, а *абсолютная конфигурация* молекулы стереоизомера, т.е. взаимное расположение четырех замещающих групп, находящихся в вершинах тетраэдра, вокруг локализованного в центре асимметрического атома углерода. Для выяснения конфигурации оптически активных соединений их сравнивают с каким-то одним соединением, выбранным в качестве эталона. Таким соединением служит трехуглеродный сахар *глицеральдегид* (рис. 5-5), простейший из сахаров, содержащих асимметрический атом углерода (структура сахаров будет рассмотрена в гл. 11). Два возможных стереоизомера глицеральдегида принято обозначать буквами L и D. Абсолютные конфигурации этих стереоизомеров, установленные методом рентгеноструктурного анализа, показаны на рис. 5-5. Непосредственно под изображением стереоизомеров глицеральдегида приведены конфигурации соответствующих стереоизомеров аминокислоты *аланина*. Для сравнения конфигураций этих стереоизомеров в качестве маркера используют наиболее

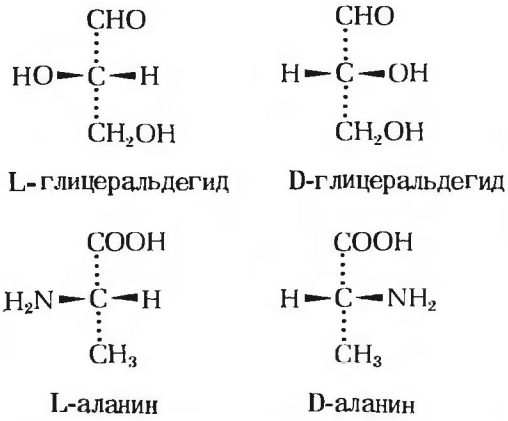


Рис. 5-5. Стерическое соответствие между структурой энантиомеров аланина и абсолютной конфигурацией L- и D-глицеральдегида.

сильно окисленный атом углерода, связанный с асимметрическим атомом углерода. Таким атомом в молекуле L-аланина служит углерод карбоксильной группы, а в молекуле L-глицеральдегида – углерод альдегидной группы. Если эти два атома расположить в пространстве одинаковым образом, то, как видно из рис. 5-5, аминогруппа L-аланина будет соответствовать гидроксильной группе L-глицеральдегида, а метильная группа (R-группа) L-аланина — CH_2OH-группе L-глицеральдегида. Такое же соответствие в абсолютной конфигурации замещающих групп наблюдается и для D-стереоизомеров аланина и глицеральдегида. *Стереоизомеры всех хиральных соединений, соответствующие по конфигурации L-глицеральдегиду, обозначаются буквой L, а стереоизомеры, соответствующие D-глицеральдегиду, – буквой D, независимо от направления вращения плоскости поляризации плоскополяризованного света.* Таким образом, буквы L и D относятся к *абсолютной конфигурации* четырех замещающих групп при хиральном атоме углерода, а не к направлению вращения плоскости поляризации. В табл. 5-2 приведены величины удельного вращения некоторых L-аминокислот.

Если соединение содержит два или более хиральных центров, оно может иметь 2^n стереоизомеров, где n – число хиральных центров. Глицин не содержит асимметрического атома углерода (см. 5-3), и поэтому у него нет стереоизомеров. Все другие аминокислоты, обычно встречающиеся в белках, содержат по одному асимметрическому атому углерода. Исключение составляют *треонин* и *изолейцин*, каждый из которых имеет по два таких атома и $2^n = 2^2 = 4$ стереоизомера. Однако в состав белков входит только по одному из этих четырех возможных изомеров той и другой аминокислоты.

Для соединений, содержащих два или более хиральных центров, приведенная выше система обозначения стереоизомеров связана с определенными трудностями и иногда оказывается неоднозначной. Поэтому для таких соединений все чаще используется новая система обозначения стереоизомеров – так называемая RS-система (см. дополнение 5-1).

Дополнение 5-1. RS-система обозначения оптических изомеров

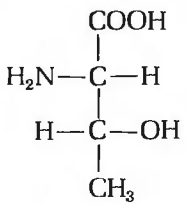
Если соединение содержит два или более хиральных центров, обозначение изомеров на основе DL-системы может оказаться неоднозначным. Чтобы избежать той или иной неопределенности при обозначении оптических изомеров, была предложена так называемая RS-система. Рассмотрим конкретный пример, чтобы понять, как нужно пользоваться этой системой. Прежде всего следует внимательно рассмотреть четыре замещающие группы при каждом асимметрическом атоме углерода и расположить их в порядке уменьшения атомных номеров или в порядке понижения «плотности валентности», так чтобы группа, оказавшаяся последней в этом ряду (имеющая наименьший приоритет), была направлена в противоположную

от наблюдателя сторону. Наблюдатель как бы смотрит вниз на рулевое колесо с тремя спицами, причем связь между асимметрическим атомом углерода и замещающей группой с наименьшим приоритетом представляет собой рулевую колонку. Если остальные группы располагаются при этом в порядке уменьшения приоритета по часовой стрелке, то конфигурация молекулы относительно рассматриваемого хирального центра обозначается буквой R (от лат. *rectus*–правый); если же они располагаются против часовой стрелки, то конфигурация обозначается буквой S (*sinister*–левый). Таким способом определяются обозначения для всех хиральных центров.

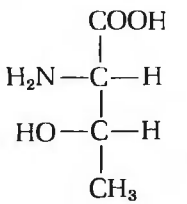
Некоторые часто встречающиеся в биомолекулах функциональные группы располагаются в порядке уменьшения их приоритета следующим образом:

$$SH > OR > OH > NHCOR > NH_2 > COOH > CHO > CH_2OH > C_6H_5 > CH_3 > H.$$

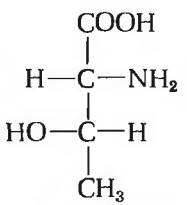
Конфигурации большинства аминокислот, обнаруживаемых в белках, однозначно устанавливаются с помощью DL-системы; однако треонин и изолейцин представляют особый случай, так как каждый из них содержит два асимметрических атома углерода и для них возможно существование четырех (2^2) стереоизомеров. В этих изомерах конфигурация замещающих групп относительно каждого хирального центра была установлена путем сравнения их с L- и D-формами глицеральдегида, и изомеры получили соответствующие обозначения (приставка «алло» означает по-гречески «другой»).



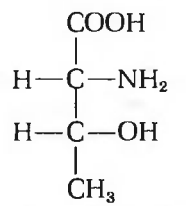
L-треонин



L-*алло*-треонин



D-треонин

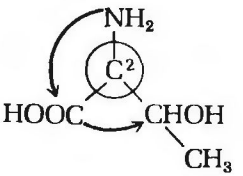


D-*алло*-треонин

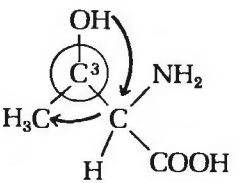
Буквы L и D в обозначениях аминокислот относятся к α-атому углерода (т.е. к углероду во втором положении). Приставка *алло* относится к конфигурации замещающих групп при атоме углерода в третьем положении. Изомеры соединений, имеющих два хиральных центра, называются *диастереоизомерами*.

Рассмотрим теперь, как L-треонин, нормальный изомер, встречающийся в белках, обозначается с помощью RS-системы. Начнем с ато-

ма углерода во втором положении. Если расположить его четыре замещающие группы в порядке уменьшения атомных номеров или «плотности валентности» атомов, связанных с углеродом-2, то получим следующий ряд: $—NH_2$, —COOH, $—CHOHCH_3$, —H. Если теперь представить себе молекулу L-треонина как рулевое колесо, у которого рулевой колонкой служит связь между углеродом-2 и атомом водорода, направленная вниз за плоскость рисунка, то остальные три группы расположатся следующим образом:



Видно, что направление, в котором происходит уменьшение приоритета (показано стрелками) замещающих групп, соответствует повороту против часовой стрелки. Следовательно, углерод-2 имеет конфигурацию S. Такую же стерическую диаграмму можно нарисовать и для атома углерода-3, причем связь между этим атомом углерода и атомом водорода (группой с наименьшим приоритетом) должна быть направлена за плоскость рисунка:



В этом случае все остальные замещающие группы расположатся в порядке уменьшения приоритета по часовой стрелке, т. е. мы получим конфигурацию R. Следовательно, в рамках RS-системы L-треонин обозначается как *(2S, 3R)-треонин*.

Традиционные обозначения изомеров треонина как L-, D-, L-*алло*- и D-*алло*-изомеры известны нам уже в течение многих лет и настолько вошли в привычку, что их продолжают использовать и теперь. То же справедливо и в отношении названий и стереообозначений простых сахаров (гл. 11). Вместе с тем RS-система представляет собой однозначный способ обозначения оптических изомеров соединений, которые либо нельзя сопоставить с изомерами глицеральдегида, либо невозможно однозначно охарактеризовать в рамках DL-системы. Это часто имеет место, когда речь идет о сложных природных соединениях, содержащих два или более хиральных центров.

5.4. Оптически активные аминокислоты в белках представляют собой L-стереоизомеры

Почти все природные биологические соединения, содержащие хиральный центр, встречаются только в какой-нибудь одной стереоизомерной форме – D или L. За исключением глицина, у которого нет асимметрического атома углерода, все аминокислоты, входящие в состав молекул белков, являются L-стереоизомерами. Этот вывод был сделан на основе многочисленных тщательно проведенных химических исследований, в которых оптические свойства аминокислот сопоставлялись с их поведением в химических реакциях. Ниже мы увидим, что в живой природе встречаются также и некоторые D-аминокислоты, но они никогда не входят в состав белков.

Присутствие в белках только L-стереоизомеров аминокислот весьма примечательно, так как в обычных химических реакциях, используемых для синтеза соединений с асимметрическим атомом углерода, всегда получаются оптически неактивные продукты. Это происходит потому, что в обычных химических реакциях с одинаковой скоростью образуются как D-, так и L-стереоизомеры. В результате получается *рацемическая смесь*, или рацемат, – эквимолярная смесь D- и L-изомеров, которая не вращает плоскость поляризации ни в том, ни в другом направлении. Рацемическую смесь можно разделить на D- и L-изомеры только при помощи очень трудоемких методов, основанных на различиях в физических свойствах стереоизомеров. Разделенные D- и L-изомеры со временем снова превращаются в рацемическую смесь (см. дополнение 5-2).

Дополнение 5-2. Как определить возраст человека, используя химию аминокислот

Оптические изомеры аминокислот претерпевают очень медленную и самопроизвольную неферментативную рацемизацию, так что за какой-то весьма длительный период времени чистый L- или D-изомер может превратиться в эквимолярную смесь D- и L-изомеров. Рацемизация каждой L-аминокислоты при данной температуре идет с определенной скоростью. Это обстоятельство можно использовать для определения возраста людей и животных или ископаемых остатков организмов. Например, в белке *дентине*, содержащемся в твердой эмали зубов, L-аспартат самопроизвольно рацемизуется при температуре человеческого тела со скоростью 0,10% в год. У детей в период формирования зубов в дентине содержится только L-аспартат. Можно выделить дентин всего из одного зуба и определить в нем содержание D-аспартата. Такие анализы были проделаны на дентине обитателей горных селений Эквадора, многие из которых приписывали себе слишком большой возраст. Так как в ряде случаев это вызывало сомнения, для проверки был использован рацемизационный тест, который оказался довольно точным. Так, для 97-летней женщины, возраст которой был документально засвидетельствован, согласно тесту был установлен возраст 99 лет.

Тесты, выполненные на ископаемых остатках доисторических животных – слонов, дельфинов и медведей – показали, что данные, полученные этим методом, хорошо согласуются с результатами датирования, основанного на скорости распада радиоактивных изотопов.

Живые клетки обладают уникальной способностью синтезировать L-аминокислоты с помощью *стереоспецифических* ферментов. Стереоспецифичность этих ферментов обусловлена асимметрическим характером их активных центров. Ниже мы увидим, что характерная трехмерная структура белков, благодаря которой они проявляют самые разные виды биологической активности, возникает только в том случае, если *все* входящие в их состав аминокислоты принадлежат к одному стереохимическому ряду.

5.5. Классификация аминокислот на основе их R-групп

Рассмотрим теперь структуру 20 аминокислот, встречающихся в белках. Дело облегчается тем, что все аминокислоты можно сгруппировать на основе признаков, свойственных их R-группам, в частности их *полярности* (табл. 5-3), т.е. способности R-групп к взаимодействию с водой при биологических значениях pH (вблизи pH 7,0). По степени полярности все R-группы аминокислот можно расположить в виде непрерывного ряда, начиная от полностью неполярных, или гидрофобных (т.е. водоотталкивающих), R-групп и кончая сильно полярными, или гидрофильными («любящими» воду), R-группами.

Строение 20 стандартных аминокислот показано на рис. 5-6. Имеется четыре основных класса аминокислот, содержащих R-группы следующих типов: 1) неполярные, или гидрофобные, 2) полярные, но незаряженные, 3) отрицательно заряженные и 4) положительно заряженные. Внутри каждого класса имеется определенная градация по полярности, размерам и форме R-групп.

Таблица 5-3. Классификация аминокислот в соответствии с полярностью их R-групп (при pH 7)

Неполярные R-группы	
Аланин	Метионин
Валин	Пролин
Изолейцин	Триптофан
Лейцин	Фенилаланин
Полярные, но незаряженные R-группы	
Аспарагин	Тирозин
Глицин	Треонин
Глутамин	Цистеин
Серин	
Отрицательно заряженные R-группы	
Аспарагиновая кислота	
Глутаминовая кислота	
Положительно заряженные R-группы	
Аргинин	
Гистидин	
Лизин	

5.6. Восемь аминокислот содержат неполярные R-группы

R-группы этого класса аминокислот представляют собой углеводороды, и, следовательно, они гидрофобны (рис. 5-6). К данному классу относятся пять аминокислот с алифатическими R-группами (*аланин, валин, лейцин, изолейцин* и *пролин*), две аминокислоты с ароматическими кольцами (*фенилаланин* и *триптофан*) и одна аминокислота, содержащая серу (*метионин*). Особого упоминания заслуживает пролин, так как его α-аминогруппа не свободна, а замещена частью R-группы, в результате чего молекула приобретает циклическую структуру (рис. 5-6).

5.7. Семь аминокислот содержат незаряженные полярные R-группы

Эти аминокислоты (рис. 5-6) лучше растворяются в воде, т.е. они более гидрофильны, чем неполярные аминокислоты, так как их функциональные группы образуют водородные связи с молекулами воды. В этот класс аминокислот входят *глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин* и *глутамин*. Полярность серина, треонина и тирозина обусловлена их *гидроксильными группами*, полярность аспарагина и глутамина – их *амидными группами*, а полярность цистеина – его *сульфгидрильной*, или *тиоловой*, группой. R-группа

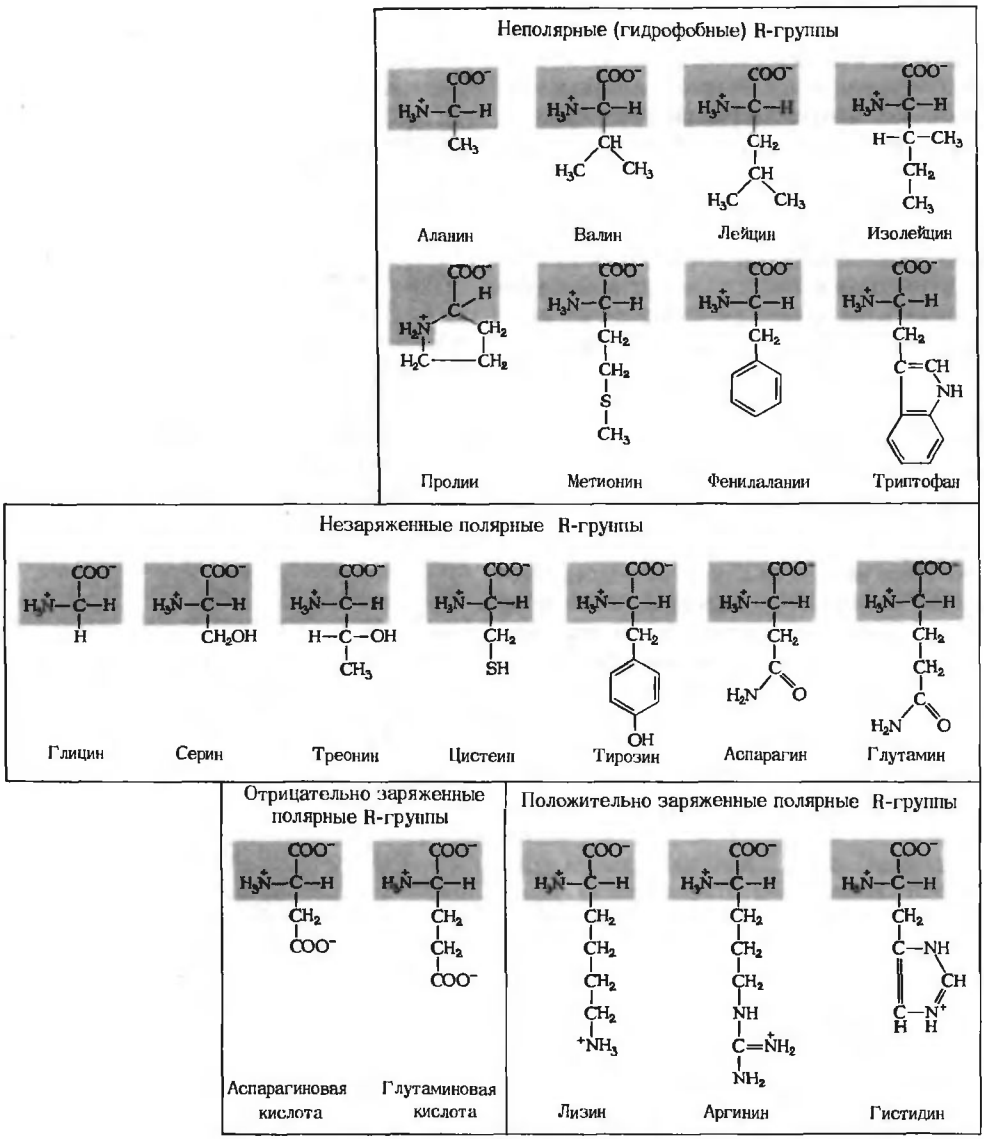


Рис. 5-6. 20 аминокислот, из которых обычно состоят белки. Их аминогруппы и карбоксильные группы показаны ионизированными, как это действительно имеет место при pH 7,0. Части молекул, одинаковые для всех аминокислот, изображены на красном фоне. R-группы обозначены черным.

глицина, представляющая собой всего лишь один атом водорода, слишком мала, чтобы компенсировать сильную полярность α-аминогруппы и α-карбоксильной группы.

Аспарагин и глутамин представляют собой амиды двух других аминокислот – соответственно *аспарагиновой* и *глутаминовой кислот*, которые также служат строительными блоками белков. При кислотном или щелочном гидролизе аспарагин и глутамин легко переходят в эти аминокислоты. Цистеин и тирозин содержат R-группы, диссоциирующие с образованием ионов H^+, однако при pH 7,0 обе эти группы – тиоловая группа цистеина и гидроксильная

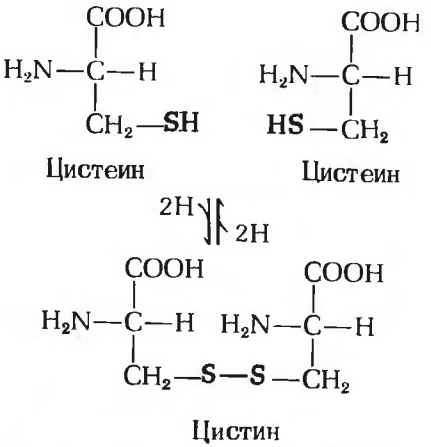


Рис. 5-7. Цистеин и цистин. Тиоловые (—SH) группы двух молекул цистеина легко окисляются и, соединяясь друг с другом, образуют дисульфидную группу цистина. В белках встречаются как цистеин, так и цистин.

группа тирозина – ионизированы лишь в незначительной степени.

Цистеин заслуживает особого упоминания по другой причине. Он может присутствовать в белках в двух формах – либо в форме собственно цистеина, либо в форме *цистина*, молекула которого представляет собой две молекулы цистеина, ковалентно связанные друг с другом при помощи дисульфидного мостика, образующегося при окислении обеих тиоловых групп (рис. 5-7). Цистин играет важную роль в формировании некоторых белков, например гормона *инсулина* и *иммуноглобулинов (антител)*. В этих белках две половины молекулы цистина служат строительными блоками двух разных полипептидных цепей, и благодаря дисульфидной связи они оказываются поперечно связанными между собой (разд. 6.8). Такие поперечные связи обычно отсутствуют во внутриклеточных белках, но широко представлены в белках, секретируемых во внеклеточную жидкость, в которой они выполняют свои функции.

5.8. Две аминокислоты содержат отрицательно заряженные (кислые) R-группы

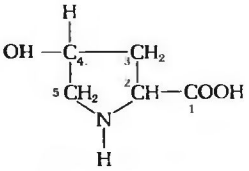
К этому классу относятся *аспарагиновая* и *глутаминовая кислоты*, каждая из которых содержит вторую карбоксильную группу и при pH 7 несет суммарный отрицательный заряд (рис. 5-6). Эти аминокислоты могут быть предшественниками аспарагина и глутамина (см. выше).

5.9. Три аминокислоты содержат положительно заряженные (основные) R-группы

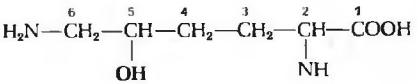
Аминокислоты, у которых R-группы при pH 7,0 несут суммарный положительный заряд,– это *лизин*, содержащий вторую аминогруппу, прикрепленную к алифатической цепи в ε-положении, *аргинин*, имеющий положительно заряженную *гуанидиновую* группу, и *гистидин*, содержащий слабо ионизированную *имидазольную* группу (рис. 5-6).

5.10. В некоторых белках присутствуют нестандартные аминокислоты

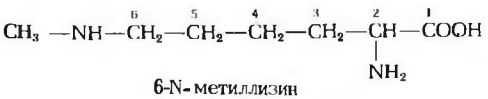
Кроме 20 *стандартных* аминокислот, встречающихся почти во всех белках, существуют нестандартные аминокислоты, являющиеся компонентами лишь некоторых типов белков (рис. 5-8). Каждая из этих нестандартных аминокислот представляет собой производное одной из 20 обычных аминокислот. К нестандартным аминокислотам относятся *4-гидроксипролин*, производное пролина, и *5-гидроксилизин*; обе эти аминокислоты входят в состав *коллагена* – фибриллярного белка соединительной ткани (гл. 7). В мышечном белке миозине, участвующем в работе сократительной системы, присутствует *N-метиллизин* (разд. 14.14). Еще одна нестандартная аминокислота – это *γ-карбоксиглутаминовая кислота*, обнаруженная в *протромбине* – одном из белков, ответственных за свертывание крови (гл. 25), а также в некоторых других белках, которые, как и протромбин, при выполнении своей биологической функции связывают ионы Ca^{2+}. Более сложное строение имеет нестандартная амино-



4-гидроксипролин

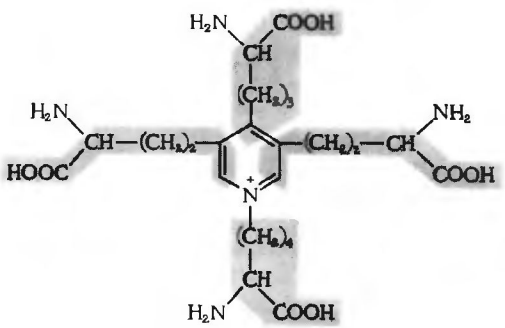


5-гидроксилизин



6-N-метиллизин

А



Десмозин

Б

Рис. 5-8. *А*. Некоторые нестандартные аминокислоты, встречающиеся в белках. Цветом выделены дополнительные функциональные группы, присоединенные к молекулам стандартных аминокислот пролина и лизина. *Б*. Десмозин, обнаруженный в белке эластине, образуется из четырех молекул лизина, углеродные скелеты которых выделены жирным шрифтом и затенены.

кислота *десмозин*, производное лизина, присутствующая только в фибриллярном белке *эластине* (разд. 7.17).

5.11. В водных растворах аминокислоты ионизированы

При растворении в воде аминокислоты ионизируются и ведут себя как кислоты или основания. Знание кислотно-основных свойств аминокислот имеет исключительно важное значение для понимания многих свойств белков. Более того, на этих свойствах аминокислот основаны все методы разделения, идентификации и количественного анализа, т. е. тех обязательных этапов, которые включает процесс определения аминокислотного состава белков и их аминокислотной последовательности.

α-Аминокислоты, содержащие одну аминогруппу и одну карбоксильную группу, кристаллизуются из нейтральных водных растворов в виде полностью ионизированных молекул, которые называются *биполярными ионами* или *цвиттерионами* (что по-немецки означает «гибридные ионы») (рис. 5-9). Хотя такие ионы и несут на своих «полюсах» электрические заряды противоположного знака, в целом они электрически нейтральны и потому не смещаются под действием электрического поля. Предположение о биполярном строении аминокислот вначале было основано на том, что кристаллические

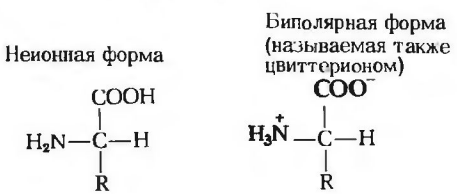


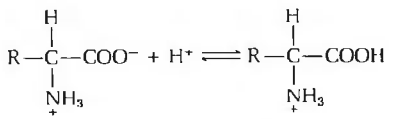
Рис. 5-9. Неионная и биполярная (цвиттерионная) формы аминокислот. Обратите внимание на то, что в биполярной форме оба заряда пространственно разделены и поэтому молекула представляет собой электрический диполь.

аминокислоты имеют значительно более высокие температуры плавления, чем другие органические молекулы таких же размеров. Кристаллическая решетка аминокислот стабилизирована за счет электростатических сил притяжения между противоположно заряженными функциональными группами соседних молекул и в этом отношении напоминает прочную ионную кристаллическую решетку NaCl (разд. 4.3). Чтобы расплавить такой ионный кристалл, необходимо разъединить сильно взаимодействующие положительные и отрица-

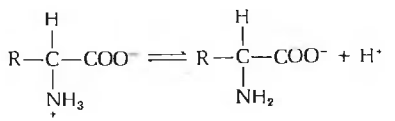
тельные заряды, а это можно сделать только путем нагревания кристалла до очень высокой температуры. Напротив, большинство простых неионных органических соединений сходной молекулярной массы плавится при сравнительно низких температурах в соответствии с тем, что они имеют относительно менее прочные неионные кристаллические решетки.

5.12. Аминокислоты могут вести себя и как кислоты, и как основания

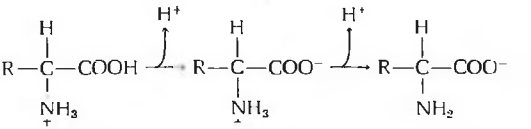
В водном растворе аминокислоты, например аланин, существуют в форме биполярных ионов, которые функционируют либо как кислоты (доноры протонов):



либо как основания (акцепторы протонов):



Вещества с такими двойственными свойствами являются *амфотерными* (от греч. «amphi» – оба) и часто называются *амфолитами*, (сокращение от слов «амфотерные электролиты»). Простая моноаминомонокарбоновая α-аминокислота, такая, как аланин, представляет собой по существу *двухосно́вную кислоту*, когда она находится в полностью протонированной форме, т. е. когда протоны присоединены и к аминогруппе и к карбоксильной группе. В этой форме она имеет две группы, от которых в процессе диссоциации отщепляются два протона, согласно следующему уравнению:



5.13. Аминокислоты имеют характерные кривые титрования

На рис. 5-10 дана кривая титрования аланина, находящегося вначале в полностью протонированной форме. Титрование проходит через две стадии, каждая из которых соответствует отщеплению одного протона. Участок кривой, отвечающий каждой из этих стадий, напоминает по форме кривую титрования одноосно́вной кислоты, например уксусной (см. рис. 4-10), и допускает точно такую же интерпретацию. В самом начале титрования аланина его молекулы находятся в полностью протонированной форме и в растворе преобладают ионы $^{+}NH_3$—CHR—COOH (в этой формуле R означает метильную группу аланина). В средней точке участка кривой, соответствующего первой стадии титрования, когда происходит отщепление протона от карбоксильной группы, присутствуют эквимолярные концентрации донора ($^{+}NH_3$—CHR—COOH) и акцептора ($^{+}NH_3$—CHR—COO^{-}) протонов. Напомним (гл. 4), что этой средней точке соответствует значение pH, численно равное величине pK' титруемой группы. В данном случае средней точке кривой на первой стадии титрования соответствует pH 2,34; следовательно, величина pK' карбоксильной группы аланина равна 2,34. Продолжая титрование дальше, мы достигнем другой важной точки, отвечающей pH 6,02, – точки перегиба кривой. Именно в этот момент заканчивается стадия отщепления первого протона и начинается стадия отщепления второго протона. При этом значении pH аланин находится преимущественно в форме биполярного иона $^{+}NH_3$—CHR—COO^{-}. Чуть позже мы еще вернемся к вопросу

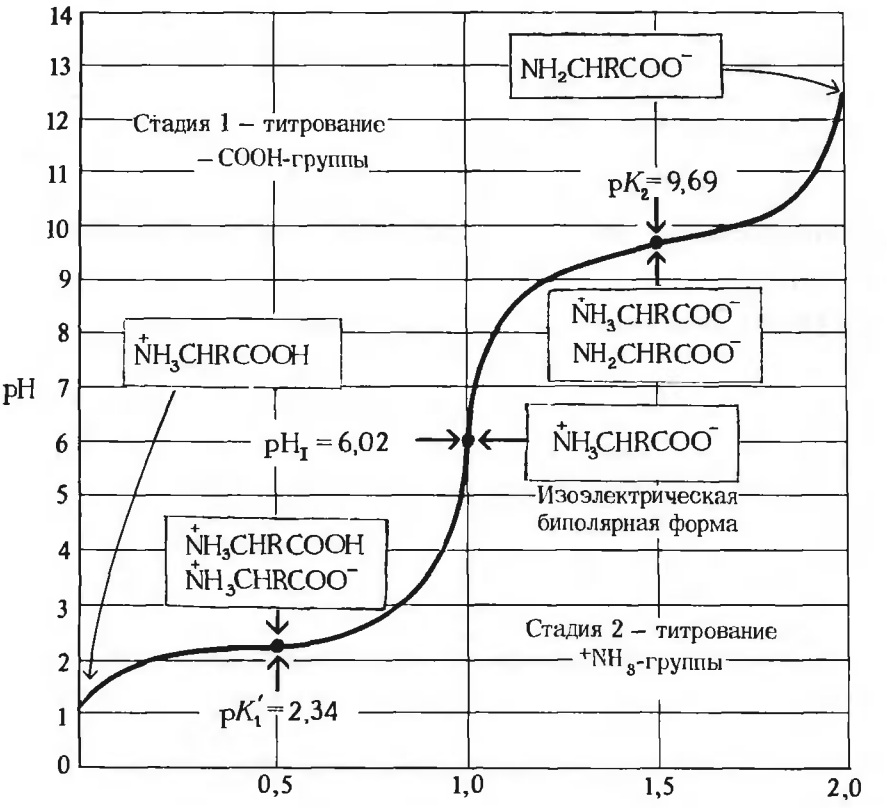


Рис. 5-10. Кривая титрования 0,1 М аланина. Ионные формы, преобладающие при различных значениях pH, заключены в прямоугольные рамки. Буквой R обозначена метильная группа аланина. Пологие участки кривой титрования по обе стороны от точек, соответствующих величинам $pK_1' = 2,34$ и $pK_2' = 9,69$, представляют собой зоны, где аланин обладает буферной емкостью.

о значении этой точки на кривой титрования.

На второй стадии титрования происходит отщепление протона от $^+NH_3$-группы аланина. Средняя точка этого участка кривой титрования соответствует эквимолярным концентрациям ионов $+NH_3—CHR—COO^-$ и $NH_2—CHR—COO^-$. Значение pH в этой точке равно 9,69, такое же значение имеет и pK' $^+NH_3$-группы аланина. Титрование завершается приблизительно при pH 12, когда аланин находится преимущественно в форме полностью депротонированных ионов $NH_2—CHR—COO^-$.

Из кривой титрования аланина мы можем извлечь ряд ценных сведений. Прежде всего она дает нам количественную информацию о величинах pK' каждой из двух ионизируемых групп: карбоксильная группа имеет pK' 2,34, а замещенная аммонийная группа – pK' 9,69. Отметим что степень диссоциации карбоксильной группы аланина более чем в 100 раз выше степени диссоциации карбоксильной группы уксусной кислоты, величина pK' которой равна 4,76. Столь сильное различие кажется на первый взгляд непонятным, поскольку величины pK' других простых монокарбоновых кислот, таких, как муравьиная или пропионовая кислота, мало отличаются от величины pK' уксусной кислоты (см. табл. 4-4). Повышенная способность карбоксильной группы аланина к ионизации обусловлена элек-

тростатическим отталкиванием ее протона от находящейся поблизости положительно заряженной $^{+}NH_3$-группы, связанной, как и COOH-группа, с атомом α-углерода (рис. 5-11). По этой причине ионизационное равновесие карбоксильной группы аланина сильно смещено вправо. При ионизации —COOH-группы уксусной кислоты никакие силы отталкивания не действуют (рис. 5-11).

5.14. По кривой титрования можно предсказать, какой электрический заряд несет данная аминокислота

Из кривых титрования аминокислот следует также, что между pH раствора и суммарным электрическим зарядом аминокислоты существует определенное соотношение. При pH 6,02, соответствующем точке перегиба кривой титрования, где одна стадия титрования переходит в другую, аланин находится в форме биполярного иона (цвиттериона), который полностью ионизирован, но не имеет суммарного электрического заряда (см. рис. 5-10). При этом значении pH молекула аланина электрически нейтральна и не смещается в электрическом поле. Это характеристическое значение pH называется *изоэлектрической точкой* (pH_I или pI). Изоэлектрическая точка представляет собой среднее арифметическое двух величин pK':

$$pH_I = \frac{1}{2}(pK'_1 + pK'_2);$$

отсюда изоэлектрическая точка аланина равна

$$pH_I = \frac{1}{2}(2{,}34 + 9{,}69) = 6{,}02.$$

При любом значении pH, превышающем изоэлектрическую точку, аланин имеет

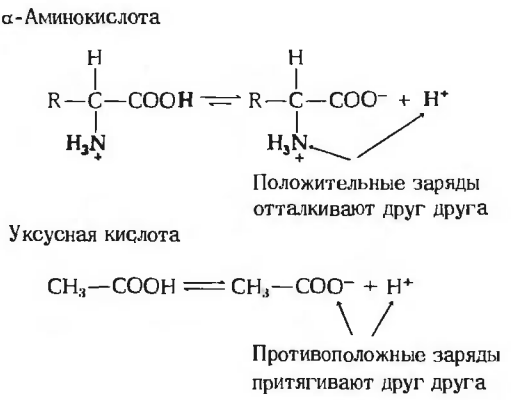


Рис. 5-11. Аминогруппа в α-аминокислотах повышает способность карбоксильной группы к ионизации вследствие взаимного отталкивания положительно заряженной $^{+}NH_3$-группы и положительно заряженного иона H^+ (обе группы выделены красным цветом). Благодаря такому отталкиванию карбоксильная группа в α-аминокислотах имеет более высокую степень ионизации, чем карбоксильная группа уксусной кислоты.

Из кривой титрования аланина (рис. 5-10) мы можем узнать еще об одном важном факте: эта аминокислота проявляет буферные свойства в двух областях pH (см. рис. 4-10). Одна из них определяется сравнительно плоским участком кривой по обе стороны от точки, соответствующей pK' 2,34, откуда следует, что аланин должен быть хорошим буфером вблизи pH 2,34. Другая буферная зона расположена между значениями pH 8,7 и 10,7. Отметим также, что при значении pH около 7,4, характерном для межклеточной жидкости и крови, аланин является плохим буфером.

Используя уравнение Хендерсона–Хассельбаха (гл. 4), мы можем рассчитать, в каком соотношении нужно взять протондонорные и протонакцепторные формы аланина, чтобы приготовить буфер с заданным значением pH, находящимся в пределах буферных зон аланина. Это уравнение позволяет решать также и другие задачи, связанные с буферными свойствами аминокислот.

суммарный отрицательный заряд и движется в электрическом поле в сторону положительного электрода (*анода*). При любом значении pH ниже изоэлектрической точки аланин несет суммарный положительный заряд, как видно из рис. 5-10, и движется в электрическом поле в сторону отрицательного электрода (*катода*). Чем дальше от изоэлектрической точки находится pH раствора аланина, тем больше суммарный электрический заряд, который несут молекулы аланина. Например, при pH 1,0 все молекулы аланина существуют в форме ионов $^{+}NH_3$—CHR—COOH с суммарным положительным зарядом 1,0. При pH 2,34, когда мы имеем дело со смесью равных количеств ионов $^{+}NH_3$—CHR—COOH и $^{+}NH_3$—CHR—COO^{-}, средний, или суммарный, положительный заряд равен 0,5. Аналогичным образом можно предсказать знак и величину суммарного заряда для любой другой аминокислоты при любом значении pH.

Эта информация, как мы вскоре увидим, имеет важное практическое значение, так как из нее следует, что смесь аминокислот можно разделить, подвергнув ее воздействию электрического поля при определенном значении pH: в этих условиях различные аминокислоты движутся в разных направлениях и с разными относительными скоростями.

5.15. Аминокислоты различаются по своим кислотно-основным свойствам

Мы довольно подробно проанализировали кривую титрования аланина, изображенную на рис. 5-10. А как ведут себе другие 19 аминокислот? К счастью, есть возможность сделать некоторые упрощающие обобщения, касающиеся кислотно-основных свойств аминокислот различных классов.

Все аминокислоты, содержащие одну α-аминогруппу, одну карбоксильную группу и одну неионизируемую R-группу, дают кривые титрования, сходные с кривой титрования аланина. Вся эта группа аминокислот (см. табл. 5-3) характеризуется очень близкими, но не одинаковыми значениями pK'_1, лежащими в интервале от 2,0 до 3,0 и pK'_2, лежащими в интервале от 9,0 до 10,0, о чем свидетельствуют цифры, приведенные для некоторых из этих аминокислот в табл. 5-4. Таким образом, все аминокислоты этой группы ведут себя подобно аланину и дают кривые титрования такого же типа, как на рис. 5-10.

Таблица 5-4. Величины pK' ионизируемых групп некоторых аминокислот при 25°C

Аминокислота	pK'_1 —COOH	pK'_2 —NH_3^+	pK' R-группы
Глицин	2,34	9,6	
Аланин	2,34	9,69	
Лейцин	2,36	9,60	
Серин	2,21	9,15	
Треонин	2,63	10,43	
Глутамин	2,17	9,13	
Аспарагиновая кислота	2,09	9,82	3,86
Глутаминовая кислота	2,19	9,67	4,25
Гистидин	1,82	9,17	6,0
Цистеин	1,71	10,78	8,33
Тирозин	2,20	9,11	10,07
Лизин	2,18	8,95	10,53
Аргинин	2,17	9,04	12,48

Аминокислоты с ионизируемой R-группой (см. табл. 5-3) имеют более сложные кривые титрования, складывающиеся из трех участков, соответствующих трем возможным стадиям ионизации: следовательно, они имеют три значения pK'. Стадия, соответствующая титрованию ионизируемой R-группы, в какой-то степени сливается с двумя остальными. На рис. 5-12 показаны кривые титрования двух представителей этой группы — *глутаминовой кислоты* и *гистидина*. Изоэлектрические точки аминокислот этого класса определяются типом присутствующей в них ионизируемой R-группы. Например, глутаминовая кислота, содержащая две карбоксильные группы и одну аминогруппу, имеет изоэлектрическую точку 3,22 (среднее между двумя величинами pK' для двух карбок-

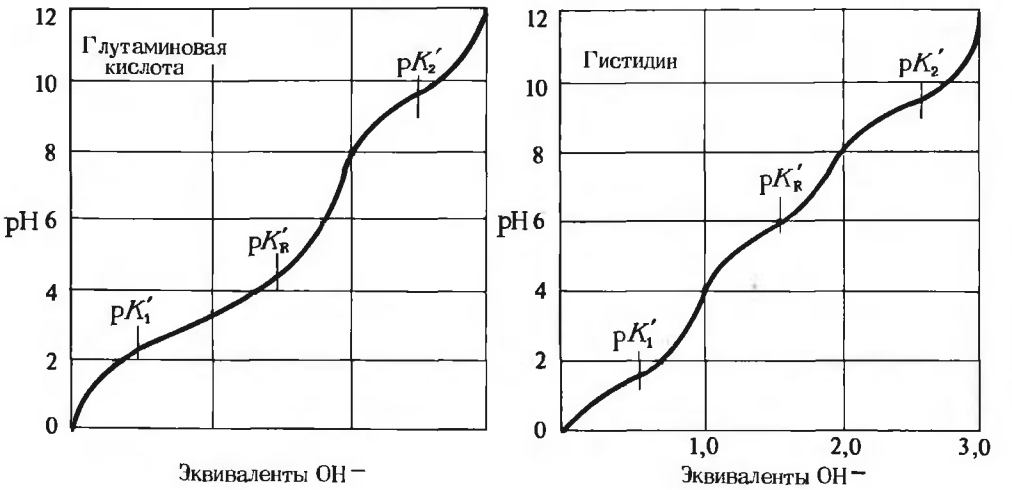


Рис. 5-12. Кривые титрования глутаминовой кислоты и гистидина. Величина pK' R-группы обозначена как pK'_R.

сильных групп), т.е. намного ниже, чем у аланина. Аналогичным образом изоэлектрическая точка у лизина, содержащего две аминогруппы, равна 9,74, что гораздо выше, чем у аланина.

Другое важное обобщение, касающееся кислотно-основных свойств 20 стандартных аминокислот, состоит в следующем. Практически только одна аминокислота, *гистидин*, обладает значительными буферными свойствами при значениях pH, близких к pH межклеточной жидкости и крови. Как можно видеть из табл. 5-4 и рис. 5-12, R-группа гистидина имеет pK' 6,0, что придает ей значительную буферную емкость при pH 7. Все остальные аминокислоты имеют величины pK' слишком далекие от pH 7, чтобы их растворы можно было использовать в качестве эффективных буферов при этом значении pH. Содержащийся в эритроцитах белок *гемоглобин*, выполняющий функцию переносчика кислорода, характеризуется очень высоким содержанием остатков гистидина. Это придает ему значительную буферную емкость при pH около 7, что весьма важно для той роли, которую играют эритроциты в переносе кровью кислорода и углекислого газа (гл. 25).

5.16. Кислотно-основные свойства аминокислот служат основой для аминокислотного анализа

Как мы увидим в гл. 6, первым шагом на пути установления структуры данного белка является его гидролитическое расщепление на составляющие аминокислоты. После этого необходимо определить, какое количество аминокислот каждого типа содержится в этом белке. Казалось бы, должно потребоваться много труда и терпения для того, чтобы разделить образовавшуюся после гидролиза смесь аминокислот, идентифицировать их и количественно определить содержание каждой из 20 аминокислот. Однако в настоящее время разработаны очень эффективные и чувствительные методы, позволяющие решать такие задачи достаточно быстро. К подобным методам относятся, в частности, *электрофорез* и *ионообменная хроматография*. Оба этих метода основаны на различиях в кислотно-основных свойствах аминокислот, т.е. на различиях в знаке и величине суммарного электрического заряда при данном значении pH, которые можно легко предсказать исходя из величин pK' и кривых титрования исследуемых аминокислот.

5.17. Электрофорез на бумаге позволяет разделять аминокислоты в соответствии с их электрическим зарядом

Простейшим методом разделения аминокислот служит *электрофорез на бумаге* (рис. 5-13). Каплю водного раствора, содержащего смесь аминокислот, наносят на полоску фильтровальной бумаги, смоченную буфером с данным значением pH. Далее к этой полоске прикладывают высокое напряжение, создающее сильное электрическое поле. Из-за различий в величинах pK' аминокислоты перемещаются вдоль полоски в том или

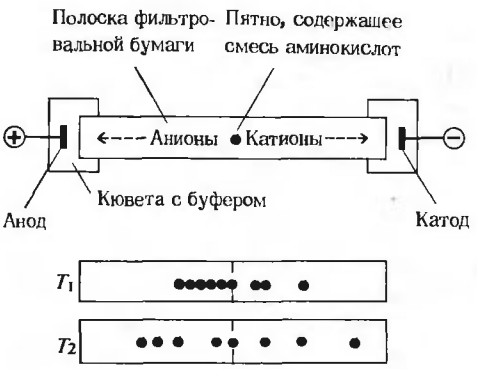


Рис. 5-13. Разделение аминокислот методом электрофореза на бумаге. На полоску бумаги наносят каплю раствора, содержащего смесь аминокислот. Ей дают высохнуть, после чего эту полоску бумаги смачивают буфером с заданным значением pH и помещают между охлаждающими пластинами. Концы полоски погружают в кюветы с электродами и включают высокое напряжение. В возникающем при этом постоянном электрическом поле аминокислоты разделяются в соответствии с их суммарным электрическим зарядом при выбранном pH. Аминокислоты, которые при этом значении pH представляют собой катионы, мигрируют к катоду (отрицательному полюсу), а аминокислоты, имеющие форму анионов, перемещаются к аноду (положительному полюсу), как это показано на схеме, изображающей электрофореграмму в момент времени T_1. В конце процесса (на схеме – в момент времени T_2) бумагу высушивают, опрыскивают нингидрином и нагревают, в результате чего на бумаге проступают пятна, соответствующие расположению различных аминокислот, которые можно идентифицировать путем сравнения их положения с положением аутентичных аминокислот, используемых в качестве «свидетелей».

ином направлении и с разными скоростями в зависимости от pH буферной системы и приложенного напряжения. Например, при pH 1,0 гистидин, аргинин и лизин несут заряд +2 и движутся к отрицательно заряженному катоду быстрее остальных аминокислот, заряд которых равен +1. С другой стороны, при pH 6,0 положительно заряженные аминокислоты (лизин, аргинин и гистидин) движутся к катоду, а отрицательно заряженные (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) – к аноду. Все остальные аминокислоты либо остаются на месте их нанесения, либо перемещаются лишь на незначительные расстояния, так как кроме α-аминогруппы и α-карбоксильной группы у них нет других ионизируемых групп; поэтому изоэлектрические точки всех этих аминокислот практически не различаются. Об этом свидетельствуют величины pK_1' и pK_2', приведенные в табл. 5-4. Чтобы установить положение разделенных аминокислот на электрофореграмме, полоску бумаги высушивают, опрыскивают *нингидрином* (см. ниже) и нагревают. Синие или лиловые пятна, проступающие на бумаге, указывают на присутствие той или иной аминокислоты. При тех же условиях проводят электрофорез известных образцов аминокислот, которые служат «маркерами», позволяющими определить характерное для каждой аминокислоты положение на электрофореграмме (см. рис. 5-13).

5.18. Ионообменная хроматография служит более эффективным способом разделения аминокислот

Для разделения смесей аминокислот, а также для идентификации и количественного определения разделенных аминокислот особенно широко применяется метод ионообменной хроматографии. Этот метод тоже основан на различиях кислотно-основных свойств аминокислот, но большой вклад в его эффективность вносят некоторые дополнительные факторы. Хроматографическая колонка представляет собой длинную стеклянную

трубку, заполненную гранулами синтетической смолы, содержащей прочно связанные с ней заряженные группы. Смолы со связанными анионными группами называются *катионообменными*, а смолы со связанными катионными группами – *анионообменными*. В наиболее простом варианте ионообменной хроматографии разделение аминокислот осуществляют на колонке с катионообменной смолой, в которой связанные анионные группы, например остатки сульфоновой кислоты ($-SO_3^-$), сначала «нагружают» ионами Na^+ (рис. 5-14). Затем на поверхность смолы наносят кислый раствор (pH 3,0), содержащий анализируемую смесь аминокислот,

Анионные центры



Рис. 5-14. Различные ионные формы катионообменной смолы. Отрицательно заряженные сульфогруппы ($—SO_3^-$) притягивают и связывают катионы, например H^+, Na^+, или катионные группы аминокислот. При pH 3 большинство аминокислот находятся в форме катионов, хотя и различаются по величине суммарного положительного заряда и, следовательно, по способности вытеснять ионы Na^+, связанные с фиксированными анионными группами. Особенно прочно связывается лизин, содержащий две $—\overset{+}{N}H_3$-группы, а наименее прочно – глутаминовая и аспарагиновая кислоты, которые при pH 3 несут наименьший положительный заряд. На связывание аминокислот ионообменными смолами влияет также их способность адсорбироваться на частицах смолы и растворяться внутри этих частиц.

и медленно пропускают его через колонку. При pH 3,0 аминокислоты представляют собой в основном катионы, несущие суммарный положительный заряд, но различающиеся по степени ионизации. По мере прохождения смеси через колонку положительно заряженные аминокислоты вытесняют ионы Na^+, связанные с группами $-SO_3^-$, которые прочно присоединены к частичкам смолы. Аминокислоты, имеющие при pH 3,0 наибольший положительный заряд (лизин, аргинин и гистидин), особенно активно вытесняют ионы Na^+ и вследствие этого очень прочно связываются со смолой. Аминокислоты, несущие при pH 3,0 наименьший положительный заряд (глутаминовая и аспарагиновая кислоты), связываются со смолой в наименьшей степени. Все другие аминокислоты несут в этих условиях промежуточный по величине положительный заряд и характеризуются соответственно промежуточной прочностью связывания со смолой. В результате различные аминокислоты продвигаются вниз по колонке со смолой с разными скоростями, которые зависят в основном от величин их pK', но отчасти также и от их способности адсорбироваться на частицах смолы или растворяться внутри них. Глутаминовая и аспарагиновая кислоты будут проходить через колонку с наибольшими скоростями, так как при pH 3,0 они связываются со смолой слабее всех других аминокислот, тогда как лизин, аргинин и гистидин будут двигаться медленнее остальных аминокислот. Выходящий из нижнего конца колонки раствор (элюат) собирают в виде небольших порций (фракций) объемом по нескольку миллилитров каждая и определяют количества содержащихся в них аминокислот. Весь этот процесс сейчас полностью автоматизирован, так что отдельные его стадии – элюирование, сбор фракций, их анализ и запись данных анализа – осуществляются по заданной программе в специальном приборе – *аминокислотном анализаторе*. На рис. 5-15 показана хроматограмма проанализированной таким способом смеси аминокислот.

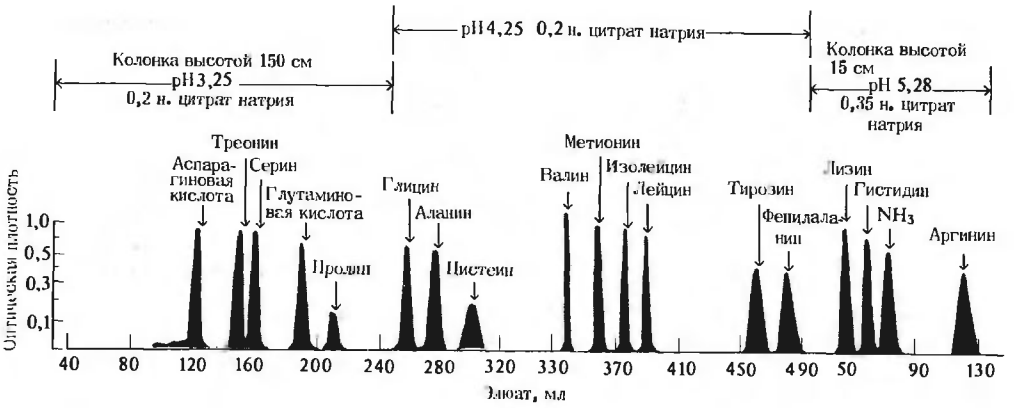


Рис. 5-15. Автоматическая регистрация результатов хроматографического разделения аминокислот на катионообменной смоле. Элюирование аминокислот проводят различными буферами с постепенно возрастающими значениями pH. Выходящий из колонки раствор собирают небольшими порциями в отдельные пробирки, после чего в каждой из них автоматически определяется содержание аминокислоты. Площадь под каждым пиком пропорциональна количеству соответствующей аминокислоты в анализируемой смеси.

5.19. Химические реакции, характерные для аминокислот

Способность аминокислот, как и всех других органических соединений, вступать в химические реакции определяется наличием в их составе функциональных групп (см. гл. 3). Поскольку все аминокислоты содержат аминогруппу и карбоксильную группу, каждая из них может вступать в химические реакции, характерные для этих групп. Например, аминогруппы могут быть ацетилированы, а карбоксильные группы – этерифицированы. Мы не будем рассматривать здесь все органические химические реакции, в которых способны участвовать аминокислоты, но отметим лишь две важные реакции, широко применяемые для обнаружения, идентификации и количественного анализа аминокислот.

Первая из них – это *нингидриновая реакция* (рис. 5-16), используемая для обнаружения и точного определения небольших количеств аминокислот. При нагревании аминокислот с избытком нингид-

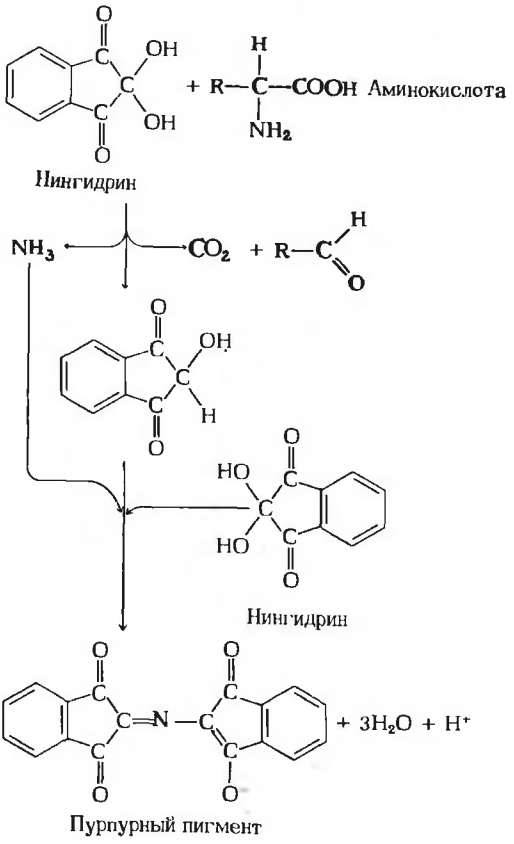


Рис. 5-16. Нингидриновая реакция, используемая для обнаружения и количественного определения содержания α-аминокислот. Атомы аминокислоты указаны красным цветом, что позволяет следить за их судьбой в ходе реакции. В конечном счете в составе лилового пигмента оказываются две молекулы нингидрина и атом азота аминокислоты.

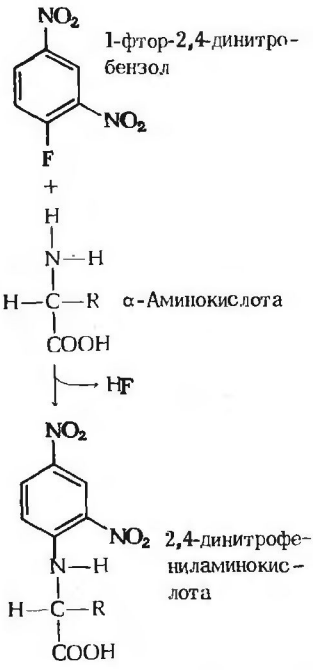


Рис. 5-17. Образование 2,4-динитрофенильных производных аминокислот.

рина образуется продукт лилового цвета, если аминокислота содержит свободную α-аминогруппу, и желтый продукт, если, как у *пролина*, ее α-аминогруппа замещена. При надлежащим образом подобранных условиях интенсивность окраски можно использовать для колориметрического определения концентраций аминокислот, так как этот метод обладает очень высокой чувствительностью.

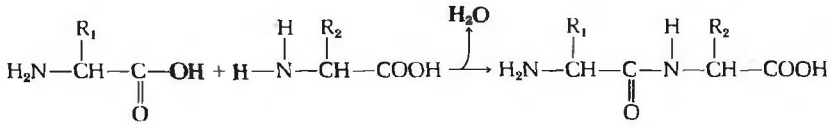
Вторая важная реакция аминокислот – это их взаимодействие с *1-фтор-2,4-динитробензолом*(ФДНБ). В мягком щелочном растворе ФДНБ реагирует с α-аминокислотами, в результате чего образуются *2,4-динитрофенильные* производные (рис. 5-17), которые можно использовать для идентификации индивидуальных аминокислот. Позднее мы увидим, какое важное значение имеет эта реакция для определения аминокислотной последовательности пептидов.

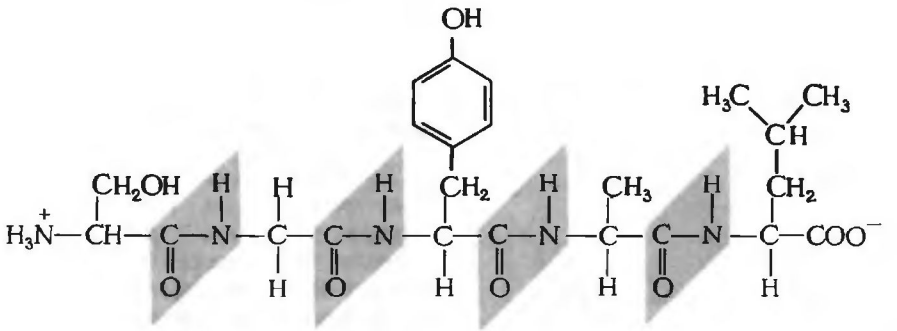
5.20. Пептиды – это цепочки аминокислот

Две молекулы одной и той же или разных аминокислот могут ковалентно связываться друг с другом при помощи замещенной амидной связи (см. табл. 3-4), называемой *пептидной связью*, с образованием молекулы *дипептида*. Пептидная связь образуется путем отщепления компонентов молекулы воды от карбоксильной группы одной аминокислоты и α-аминогруппы другой аминокислоты под действием сильных конденсирующих агентов (рис. 5-18). Три аминокислоты могут соединиться аналогичным образом при помощи двух пептидных связей и образовать *трипептид*; точно так же можно получить *тетрапептиды* и *пентапептиды*. Если таким способом соединить большое число аминокислот, то возникает структура, называемая *полипептидом*. Пептиды различной длины образуются при частичном гидролизе очень длинных полипептидных цепей белков, которые могут содержать сотни аминокислотных звеньев.

На рис. 5-19 изображена структура пентапептида. Аминокислотные звенья, входящие в состав пептида, обычно называют *остатками* (они уже не являются аминокислотами, так как у них не хватает одного атома водорода в каждой аминогруппе и двух атомов – кислорода и водорода – в каждой карбоксильной группе). Аминокислотный остаток, находящийся на том конце пептида, где имеется свободная α-аминогруппа, называется *аминоконцевым* (или *N-концевым*) *остатком*, а остаток на противоположном конце, несущем свободную карбоксильную группу,– *карбоксиконцевым*, или *С-кон-*

Рис. 5-18. Образование дипептида.





Серил-глицил-тирозинил-аланил-лейцин

Ser·Gly·Tyr·Ala·Leu

Рис. 5-19. Структура пентапептида серил-глицил-тирозинил-аланил-лейцина. Названия пептидов образуют из названий аминокислот, начиная с аминоконцевого остатка. Пептидные связи затенены, а R-группы выделены красным цветом.

цевым остатком. Названия пептидов образуют из названий входящих в них аминокислотных остатков в соответствии с их последовательностью, начиная с N-концевого остатка, как показано на рис. 5-19.

5.21. Разделение пептидов может быть основано на различиях в их ионизационных свойствах

При частичном гидролизе белков образуется огромное множество различных пептидов. Например, данная аминокислота может образовать дипептиды с каждой из 20 различных аминокислот; если при этом есть возможность разного расположения аминокислот в каждом дипептиде, то в общей сложности получим 39 различных дипептидов (рис. 5-20). Столько же пептидов может дать любая из 19 других аминокислот. Если мы посчитаем, сколько всего дипептидов может быть составлено из 20 аминокислот, то получим $20 \times 20 = 400$. Число возможных трипептидов и тетрапептидов с различным аминокислотным составом и разной последовательностью

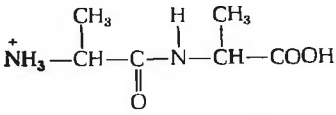
Gly·Gly	
Gly·Ala	Ala·Gly
Gly·Val	Val·Gly
Gly·Leu	Leu·Gly
Gly·Ile	Ile·Gly
Gly·Pro	Pro·Gly
Gly·Met	Met·Gly
Gly·Phe	Phe·Gly
Gly·Trp	Trp·Gly
Gly·Ser	Ser·Gly
Gly·Thr	Thr·Gly
Gly·Cys	Cys·Gly
Gly·Tyr	Tyr·Gly
Gly·Asn	Asn·Gly
Gly·Gln	Gln·Gly
Gly·Asp	Asp·Gly
Gly·Glu	Glu·Gly
Gly·Lys	Lys·Gly
Gly·Arg	Arg·Gly
Gly·His	His·Gly

Рис. 5-20. 39 возможных дипептидов, содержащих глицин. Для удобства использованы сокращенные трехбуквенные обозначения аминокислот. Аминоконцевые остатки указаны слева.

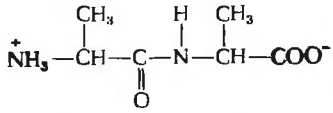
аминокислот во много раз больше. Поэтому количественное разделение коротких пептидов представляет собой намного более сложную задачу, чем разделение 20 аминокислот. Тем не менее сложную смесь пептидов тоже можно разделить, используя различия в их кислотно-основных свойствах и полярности.

Каждый пептид содержит только одну свободную α-аминогруппу и одну сво-

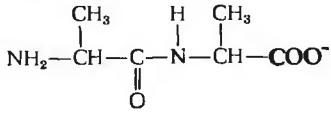
Катионная форма (при pH ниже 3)



Изоэлектрическая форма



Анионная форма (при pH выше 10)



Аланил-глутамил-глицил-лизин – тетрапептид, в котором два остатка содержат ионизируемые R-группы

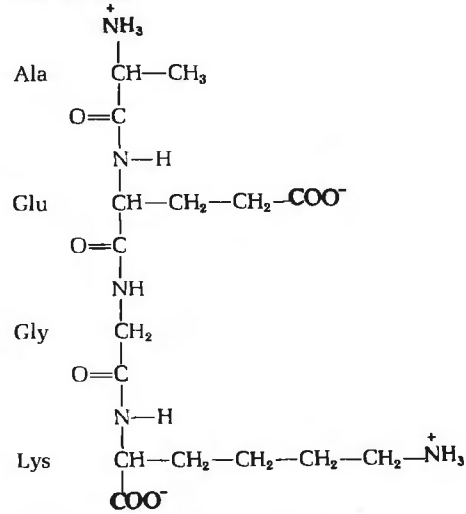


Рис. 5-21. Ионизация и электрические заряды пептидов. Группы, ионизирующиеся при pH 6,0, выделены красным цветом. На рисунке представлены катионная, изоэлектрическая и анионная формы дипептида аланил-аланина. Справа приведена структурная формула тетрапептида.

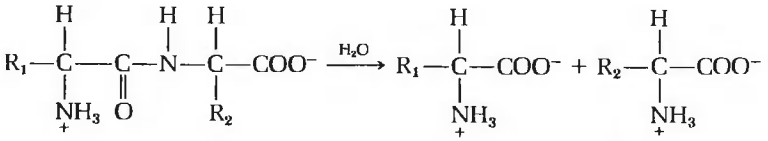
бодную α-карбоксильную группу, которые находятся в концевых остатках (рис. 5-21). Эти группы ионизируются в пептидах так же, как и в свободных аминокислотах. Что же касается α-аминогрупп и α-карбоксильных групп остальных аминокислот, входящих в состав пептидов, то они не вносят никакого вклада в кислотно-основные свойства пептидов, поскольку эти группы вовлечены в образование ковалентных пептидных связей и уже не способны к ионизации. Однако R-группы некоторых аминокислот могут быть ионизированы (см. табл. 5-4). Если такие аминокислоты входят в состав пептида, то их R-группы вносят определенный вклад в его кислотно-основные свойства (рис. 5-21). Таким образом, кислотно-основные свойства пептида в целом можно предсказать, исходя из наличия на концах цепи одной свободной α-аминогруппы и одной свободной α-карбоксильной группы, а также из природы и числа ионизируемых R-групп. Как и свободные аминокислоты, пептиды имеют характерные кривые титрования и определенные изоэлектрические точки, т.е. такие значения pH, при которых они не перемещаются в электрическом поле.

Несмотря на то что при неполном гидролизе белков образуется очень большое число различных пептидов, их сложные смеси можно разделять с помощью ионообменной хроматографии или электрофореза либо сочетанием обоих этих методов, поскольку при различных значениях pH пептиды обладают разными кислотно-основными свойствами и неодинаковой полярностью.

5.22. Химические реакции, характерные для пептидов

Как и другие органические соединения, пептиды могут вступать в химические реакции, определяемые наличием в них не только функциональных групп, например свободных аминогрупп и карбоксильных групп, но и R-групп.

Следует отметить две особенно важные реакции, характерные для пептидов. Прежде всего это гидролиз пептидных связей путем кипячения растворов пептидов в присутствии сильной кислоты или щелочи, в результате чего образуются свободные аминокислоты



Осуществленный таким способом гидролиз пептидных связей – это необходимый шаг в определении аминокислотного состава белков и последовательности составляющих их аминокислотных остатков. Пептидные связи могут быть гидролизованы также под действием некоторых ферментов, таких, как *трипсин* и *химотрипсин*, представляющие собой протеолитические (белок-расщепляющие) ферменты, секретируемые в кишечник и способствующие перевариванию, т.е. гидролитическому расщеплению, белков, входящих в состав пищи. Если кипячение пептидов с кислотой или щелочью приводит к гидролизу всех пептидных связей независимо от природы и последовательности соединенных при их помощи аминокислотных звеньев, то трипсин и химотрипсин осуществляют каталитическое расщепление пептидов избирательным образом. Трипсин гидролизует только те пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина или аргинина. Химотрипсин же атакует только те пептидные связи, которые были образованы с участием карбоксильных групп фенилаланина, триптофана и тирозина. Как мы увидим дальше, такой избирательный ферментативный гидролиз оказывается очень полезным при анализе аминокислотных последовательностей белков и пептидов.

Другая важная химическая реакция, в которую вступают пептиды и которая тоже используется для определения аминокислотной последовательности, – это реакция с *1-фтор-2,4-динитробензолом*. Мы уже видели (см. рис. 5-17), что это соединение реагирует с α-аминогруппой свободной аминокислоты с образованием 2,4-динитрофениламинокислоты. Этот реагент вступает в реакцию и с α-аминогруппой аминоконцевого остатка любого пептида независимо от длины пептидной цепи, что приводит к образованию динитрофенилпептида. При помощи этой реакции можно пометить аминоконцевой остаток пептида (рис. 5-22). В гл. 6 мы увидим, как эта и другие реакции, позволяющие пометить аминоконцевой остаток пептида, используются для определения аминокислотной последовательности полипептидных цепей.

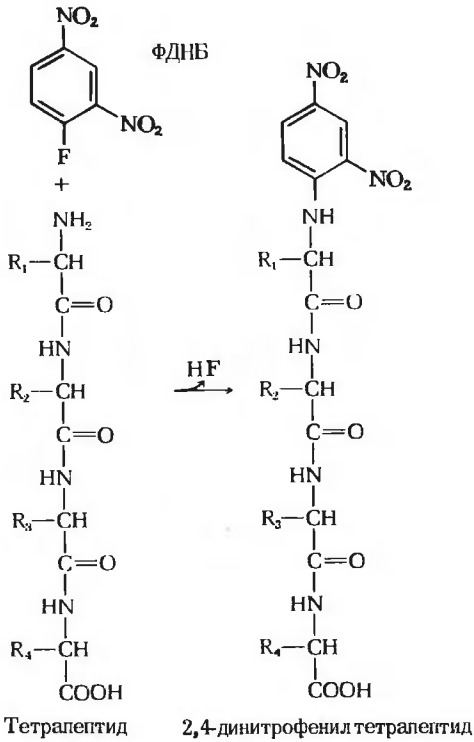


Рис. 5-22. Введение метки в аминоконцевой остаток тетрапептида. Меткой служит 1-фтор-2,4-динитробензол (ФДНБ).

5.23. Некоторые пептиды обладают высокой биологической активностью

Кроме пептидов, образующихся в результате частичного гидролиза молекул белка, существует много пептидов, встре-

чающихся в живых организмах как свободные соединения, не связанные со структурой белков. Особенно интересен тот факт, что многие свободные пептиды обладают высокой биологической активностью. Например, к пептидам или полипептидам относится ряд гормонов. Гормоны служат химическими медиаторами, вырабатываемыми специализированными секреторными клетками эндокринных желез – поджелудочной железы, гипофиза и надпочечников; с током крови гормоны переносятся в другие ткани или органы и регулируют их специфические функции. Гормон *инсулин*, вырабатываемый β-клетками поджелудочной железы, поступает с кровью в другие органы, особенно в печень и мышцы, где связывается с находящимися на поверхности клеток рецепторами и стимулирует способность этих клеток использовать глюкозу в качестве метаболического топлива. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей, одна из которых содержит 30 аминокислотных остатков, а другая – 21. К полипептидным гормонам относится также другой гормон поджелудочной железы, *глюкагон*, действующий как антагонист инсулина, и *кортикотропин*, вырабатываемый передней долей гипофиза и стимулирующий функционирование надпочечников. Кортикотропин состоит из 39 аминокислотных остатков.

Молекулы некоторых гормонов представляют собой гораздо более короткие пептидные цепи. В число таких гормонов входят *окситоцин* (девять аминокислотных остатков) – гормон, синтезируемый в задней доле гипофиза и стимулирующий сокращение матки; *брадикинин* (девять остатков) – гормон, подавляющий воспалительные процессы в тканях, и тиреолиберин (три остатка), синтезируемый в гипоталамусе и стимулирующий синтез другого гормона, *тиреотропина* (тиреотропного гормона), вырабатываемого передней долей гипофиза (рис. 5-23). Особого упоминания заслуживают *энкефалины* – короткие пептиды, синтезируемые в центральной нервной системе. Связывание энкефалинов со специфическими рецепторами некоторых клеток мозга приводит к анальгезии, т. е. ослаблению болевых ощущений. Энкефалины (что значит «находящиеся в голове») представляют собой наркотики (опиаты), вырабатываемые самим организмом; они связываются с теми же участками мозга, что и морфин, героин и другие наркотические вещества. К пеп-

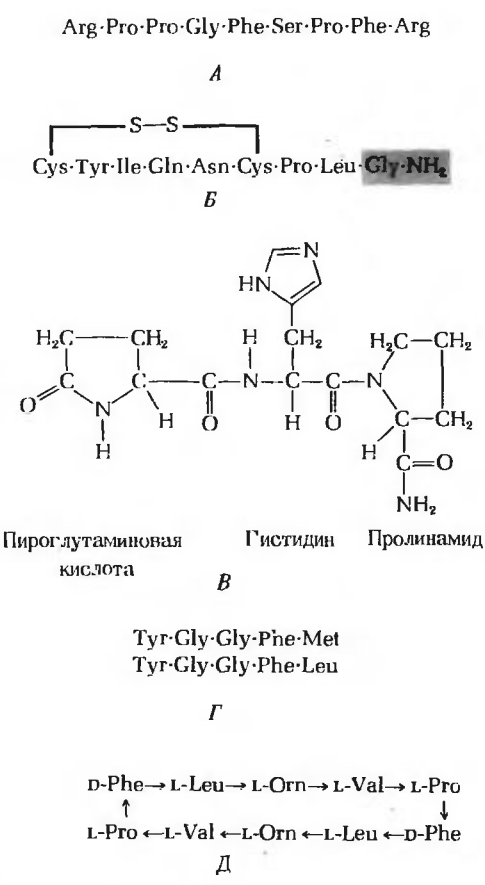


Рис. 5-23. Некоторые природные пептиды, обладающие высокой биологической активностью. Аминоконцевые остатки находятся слева. *А*. Брадикидин – гормоноподобный пептид с противовоспалительной активностью. *Б*. Окситоцин – гормон, образующийся в задней доле гипофиза. На цветном фоне – остаток глицинамида ($NH_2CH_2CONH_2$). *В*. Тиреолиберин – гормон, образующийся в гипоталамусе. *Г*. Энкефалины – пептиды мозга с опиатоподобной активностью. *Д*. Грамицидин С – антибиотик. Стрелки указывают направление от аминоконцевого к карбоксиконцевому остатку. Orn – обозначение орнитина – аминокислоты, не встречающейся в белках. Обратите внимание, что в состав грамицидина С входят два остатка D-аминокислоты.

тидам относятся и некоторые очень токсичные ядовитые вещества, содержащиеся в грибах, в частности *аманитин*, а также многие *антибиотики*, которые можно рассматривать как своего рода «химическое оружие», производимое одними микроорганизмами и «убивающее» другие микроорганизмы.

Особенно примечательно, что все эти пептиды, оказывающие столь сильное биологическое воздействие, состоят из аминокислот, которые сами по себе являются совершенно безвредными нетоксичными соединениями. Отсюда ясно, что биологическая активность и специфичность действия пептидов и полипептидов полностью определяются последовательностью составляющих их аминокислотных остатков.

Краткое содержание главы

Каждая из 20 аминокислот, которые обычно обнаруживают как продукты гидролиза белков, содержит α-карбоксильную группу, α-аминогруппу и специфическую для данной аминокислоты R-группу, замещающую водород при α-атоме углерода. α-Атом углерода во всех аминокислотах (за исключением глицина) является асимметрическим, и, следовательно, каждая из этих аминокислот может существовать по меньшей мере в двух стереоизомерных формах. В белках встречаются только L-стереоизомеры, соответствующие по своей конфигурации L-глицеральдегиду. Классификация аминокислот основана на различиях в полярности их R-групп. К классу неполярных аминокислот принадлежат аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. В класс полярных нейтральных аминокислот входят глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Класс отрицательно заряженных (кислых) аминокислот включает аспарагиновую и глутаминовую кислоты, а класс положительно заряженных (основных) аминокислот – аргинин, лизин и гистидин.

При низких значениях pH моноаминомонокарбоновые аминокислоты представляют собой двухосно́вные кислоты ($^+NH_3CHRCOOH$). При повышении pH примерно до 6, т.е. до изоэлектрической точки, от карбоксильной группы отщепляется протон, что приводит к образованию цвиттерионов – электрически нейтральных биполярных ионов типа $^+NH_3CHRCOO^-$. В результате дальнейшего повышения pH происходит отщепление второго протона с образованием ионов типа $NH_2CHRCOO^-$. Аминокислоты с ионизируемыми R-группами могут существовать и в других ионных формах, образование которых зависит от pH. При взаимодействии аминокислот с нингидрином образуются окрашенные продукты. Для разделения сложных смесей аминокислот, а также для идентификации и определения количества разделенных аминокислот используют методы электрофореза и ионообменной хроматографии.

Аминокислоты, ковалентно соединенные друг с другом при помощи пептидных связей, образуют пептиды, которые могут быть получены также как продукты неполного гидролиза полипептидов. Кислотно-осно́вные свойства пептида определяются его концевыми NH_2- и COOH-группами, а также входящими в его состав ионизируемыми R-группами. При полном гидролизе пептидов образуются свободные аминокислоты. Взаимодействие аминоконцевого остатка пептида с 1-фтор-2,4-динитробензолом приводит к образованию производного, имеющего характерную желтую окраску. Некоторые пептиды присутствуют в свободном состоянии в клетках и тканях и выполняют специфические биологические функции. К ним относятся многие гормоны, антибиотики и другие соединения, обладающие высокой биологической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry, pt. I. The Conformation of Biological Macromolecules, Freeman, San Francisco, 1980. Прекрасный учебник, в котором рассматриваются свойства биологических макромолекул и составляющих их строительных блоков.

Cooper T.G. The Tools of Biochemistry, Wiley, New York, 1977. Теория и практические указания по хроматографии и электрофорезу аминокислот.

Corrigan J.T. D-Amino Acids in Animals, Science, **164**, 142–148 (1969).

Dickerson R.E., Geis I. Proteins: Structure, Function and Evolution, 2d ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1983.

Haschemeyer R., Haschemeyer A.H. Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley, New York, 1973.

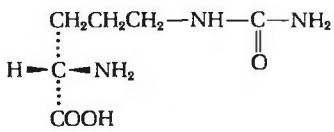
Lehninger A.L. Biochemistry, 2d ed., Worth, New York, 1975. Главы 4 и 5 содержат более подробное описание свойств аминокислот и пептидов.

Meister A.: Biochemistry of the Amino Acids, 2d ed., 2 vols., Academic, New York, 1965. Энциклопедическое изложение вопросов, касающихся свойств и распространения аминокислот, а также их участия в процессах метаболизма живых организмов.

Segel I.H. Biochemical Calculations, 2d ed., Wiley, New York, 1976.

Вопросы и задачи

1. *Удельное оптическое вращение аминокислоты, выделенной из арбуза.* Аминокислота цитруллин впервые была выделена из арбуза (*Citrullus vulgaris*), но она присутствует и в большинстве животных тканей. Хотя цитруллин не входит в состав белков, он служит предшественником аргинина, а также мочевины – экскретируемого конечного продукта метаболизма аминогрупп. Структурная формула цитруллина выглядит следующим образом:

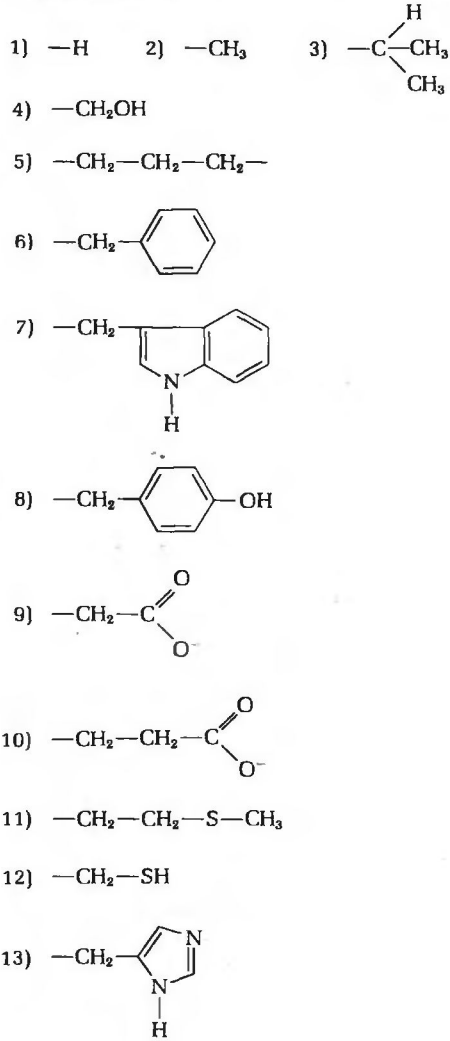


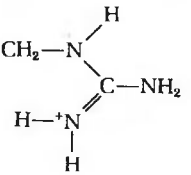
При 25°C стеклянная трубка длиной 20 см, заполненная 5%-ным раствором цитруллина в 0,3 н. HCl, вращает плоскость поляризации света на 1,79° вправо. Какова величина удельного оптического вращения цитруллина? Можно ли по удельному вращению цитруллина определить, является ли он D- или L-аминокислотой?

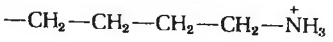
2. *Абсолютная конфигурация цитруллина.* Какую конфигурацию (D или L) имеет выделенный из арбуза цитруллин (см. формулу, приведенную в предыдущем вопросе)? Дайте обоснованный ответ.

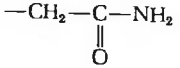
3. *Соотношение между структурой и химическими свойствами аминокислот.* Поскольку аминокислоты служат строительными блоками белков, знание их структуры и химических свойств имеет первостепенное значение для понимания того, как белки выполняют свои биологические функции. Ниже приведены структурные формулы боковых цепей (R-групп) 16 аминокислот (Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr и Val). Назовите аминокислоты, которым принадлежат изображенные здесь R-группы. Какие из перечисленных ниже свойств характерны для каждой из этих аминокислот? Некоторые из этих свойств можно использовать для характеристики более чем одной аминокислоты.

Свойства R-групп и соответствующих аминокислот.



14) 

15) 

16) 

а) Небольшая полярная R-группа, содержащая гидроксильную группу. Соответствующая аминокислота играет важную роль в функционировании активных центров некоторых ферментов.

б) R-группа создает наименьшие стерические ограничения.

в) R-группа имеет $pK' \approx 10{,}5$ и при физиологических значениях pH несет положительный заряд.

г) Серусодержащая R-группа; нейтральна при всех значениях pH.

д) Ароматическая R-группа; имеет гидрофобную природу и нейтральна при всех значениях pH.

е) R-группа, представляющая собой остаток насыщенного углеводорода; вносит важный вклад в гидрофобные взаимодействия.

ж) Единственная аминокислота, содержащая ионизируемую R-группу с величиной pK', близкой к 7. Играет важную роль в функционировании активных центров ряда ферментов.

з) Единственная аминокислота, содержащая замещенную α-аминогруппу. Влияет на процесс свертывания белковой цепи, так как служит местом вынужденного изгиба цепи.

и) R-группа имеет величину pK' около 4 и при pH 7 несет отрицательный заряд.

к) Ароматическая R-группа, способная участвовать в образовании водородных связей; имеет величину pK', близкую к 10.

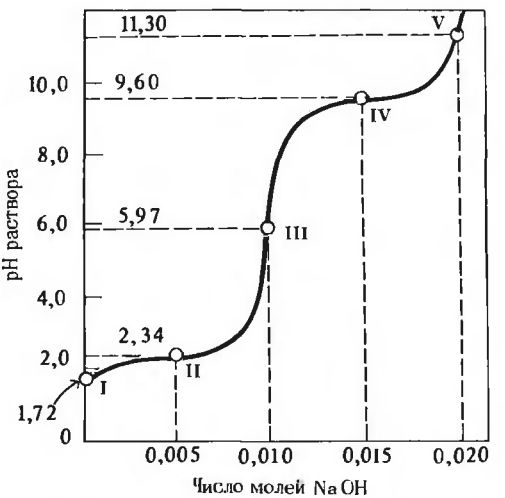
л) Образует дисульфидные поперечные связи между полипептидными цепями; величина pK' функциональной группы близка к 8.

м) R-группа с величиной $pK' \approx 12$; несет положительный заряд при всех физиологических значениях pH. В некоторых белках играет важную роль в связывании отрицательно заряженных фосфатных групп.

н) Если эту полярную, но незаряженную R-группу подвергнуть гидролизу, то содержащая ее аминокислота превращается в другую аминокислоту с отрицательно заряженной R-группой при pH около 7.

4. *Связь между кривой титрования и кислотно-основными свойствами глицина.* 0,1 М раствор глицина (100 мл), имеющий pH 1,72, был оттитрован 2 М раствором NaOH. В ходе титрования производилась регистрация pH, полученные данные были отложены на графике, представленном на рисунке. Наиболее важные точки на графике обозначены римскими цифрами от I до V. Какую из этих пяти точек на кривой титрования следует указать, отвечая на поставленные ниже вопросы? Поясните свой выбор.

Задача 4



а) Какая точка соответствует pH, при котором в 0,1 М растворе глицина эта аминокислота существует в форме ионов $^{+}NH_3—CH_2—COOH$?

б) В какой точке средний суммарный заряд молекулы глицина равен $+\frac{1}{2}$?

в) В какой точке аминогруппы ионизированы у половины молекул глицина?

г) В какой точке значение pH равно величине pK' ионизации карбоксильной группы глицина?

д) В какой точке значение pH равно величине pK' ионизации протонированной аминогруппы ($—\overset{+}{N}H_3$) глицина?

е) В какой точке глицин обладает максимальной буферной емкостью?

ж) В какой точке средний суммарный заряд глицина равен нулю?

з) В какой точке карбоксильная группа глицина оказывается полностью оттитрованной (первая точка эквивалентности)?

и) В какой точке ионизирована половина карбоксильных групп?

к) В какой точке глицин полностью оттитрован (вторая точка эквивалентности)?

л) В какой точке глицин существует преимущественно в форме ионов $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COO^-$?

м) В какой точке молекулы глицина превращаются на 50% в ионы $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COO^-$ и на 50% в ионы $H_2N-CH_2-COO^-$?

н) В какой точке средний суммарный заряд молекулы глицина равен -1?

о) В какой точке 50% молекул глицина превращаются в ионы $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COOH$, а остальные 50% – в ионы $H_3\overset{+}{N}-CH_2-COO^-$?

п) Какой точке соответствует изоэлектрическая точка глицина?

р) В какой точке средний суммарный заряд глицина равен $-\frac{1}{2}$?

с) Какой точке соответствует конец титрования?

т) Для того чтобы использовать глицин в качестве эффективного буфера, необходимо знать, при каких значениях pH раствор глицина обладает минимальной буферной емкостью. Укажите на кривой титрования глицина соответствующие точки.

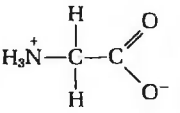
у) В какой точке в ходе титрования преобладающей формой глицина становятся ионы $H_2N-CH_2-COO^-$?

5. *Какую долю составляют полностью незаряженные формы глицина?* При значении pH, соответствующем изоэлектрической точке, суммарный заряд глицина равен нулю. Хотя нулевой суммарный заряд имеют две формы глицина (биполярная и незаряженная), его преобладающей формой в изоэлектрической точке является биполярная.

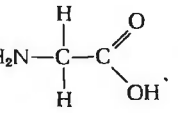
а) Объясните, почему в изоэлектрической точке глицин представлен главным образом биполярной, а не полностью незаряженной формой.

б) Определите долю молекул глицина, которые в изоэлектрической точке находятся в полностью незаряженной форме. Приведите свои соображения в пользу сделанной оценки.

Задача 5



Биполярная форма (цвиттерион)



Незаряженная форма

6. *Состояние ионизации аминокислот.* Каждая ионизируемая группа аминокислоты может находиться в одном из двух состояний – заряженном или нейтральном. Электрический заряд на функциональной группе определяется соотношением между величиной pK' этой группы и значением pH раствора. Это соотношение описывается уравнением Хендерсона – Хассельбаха.

а) Гистидин имеет три ионизируемые функциональные группы. Напишите уравнения для трех соответствующих процессов ионизации гистидина и укажите примерные величины констант равновесия (pK'), характеризующих каждый из этих процессов. Нарисуйте структуру гистидина во всех трех состояниях ионизации. Какой суммарный заряд имеет молекула гистидина в каждом из состояний ионизации?

б) Нарисуйте ионные структуры гистидина, преобладающие при pH 1, 4, 8 и 12; учтите, что состояние ионизации можно определить, рассматривая каждую ионизируемую группу независимо от остальных.

в) Каков суммарный заряд молекулы гистидина при pH 1, 4, 8 и 12? Куда будет двигаться гистидин при каждом из этих значений pH в ходе электрофореза – к аноду (+) или катоду (–)?

7. *Приготовление глицинового буфера.* Раствор глицина часто применяют в качестве буфера. Для приготовлеиия 0,1 М глицинового буфера используют 0,1 М растворы солянокислого глицина ($^+NH_3-CH_2-COOH\cdot Cl^-$) и глицина ($^+NH_3-CH_2-COOH^-$) – две формы глицина, имеющиеся в продаже. Какие объемы этих двух растворов следует смешать, чтобы приготовить 1 л 0,1 М глицинового буфера, имеющего pH 3,2?

8. *Электрофорез аминокислот на бумаге.* Каплю раствора, содержащего смесь глицина, аланина, глутаминовой кислоты, ли-

зина, аргинина и гистидина, нанесли на середину полоски бумаги и дали ей высохнуть. Затем бумагу смочили буфером с pH 6,0 и к концам полоски приложили электрическое напряжение.

а) Какая аминокислота(ы) будет двигаться к аноду?

б) Какая аминокислота(ы) будет двигаться к катоду?

в) Какая аминокислота(ы) останется на стартовой точке или вблизи нее?

9. *Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии.* Анализ смеси аминокислот начинают с разделения этой смеси на компоненты методом ионообменной хроматографии. Небольшое количество смеси вносят в верхнюю часть колонки, заполненной частицами полистирола, содержащими остатки сульфоновой кислоты (см. рис. 5-14). Затем через колонку пропускают буферный раствор. Аминокислоты проходят через колонку с разными скоростями, поскольку их движение тормозят два фактора: 1) электростатическое притяжение между отрицательно заряженными остатками сульфоновой кислоты и положительно заряженными функциональными группами аминокислот и 2) гидрофобное взаимодействие между боковыми цепями аминокислот и сильно гидрофобным остовом полистирольной смолы. Для каждой из выписанных ниже пар аминокислот определите, какая аминокислота данной пары будет сходить с колонки первой (т.е. испытывать наименьшее торможение) при пропускании через колонку буфера с pH 7,0.

а) Asp и Lys

б) Arg и Met

в) Glu и Val

г) Gly и Leu

д) Ser и Ala

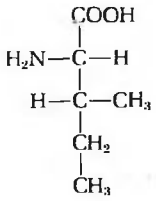
10. *Набор трипептидов.* Предположим, что вы хотите синтезировать трипептиды, используя в качестве строительных блоков глицин, аланин и серин.

а) Сколько различных трипептидов можно приготовить при условии, что любая из этих трех аминокислот может занимать любое из трех возможных положений, причем каждую аминокислоту можно использовать более одного раза?

б) Сколько различных трипептидов можно приготовить, если использовать каждую аминокислоту только один раз?

11. *Обозначение оптических изомеров изолейцина.* Структурная формула изолейцина изображена ниже

Задача 11



Изолейцин

а) Сколько хиральных центров имеет молекула изолейцина?

б) Сколько оптических изомеров может быть у изолейцина?

в) Нарисуйте перспективные формулы всех оптических изомеров изолейцина.

г) Как вы обозначите каждый из этих изомеров в рамках RS-системы? (Указание: по своему приоритету группа $CH_3CH_2^-$ занимает промежуточное положение между группами $C_6H_5^-$ и CH_3.

12. *Сравнение величин pK' аминокислоты в свободном виде и в составе пептидов.* Кривая титрования аминокислоты аланина отражает процессы ионизации двух функциональных групп с pK' 2,34 и 9,69, что отвечает ионизации соответственно карбоновой кислоты и протонированного амина. Титрование ди-, три- и олигопептидов аланина, содержащих более четырех остатков этой аминокислоты, свидетельствует об ионизации только двух функциональных групп, хотя экспериментально найденные величины их pK' различны.

Аминокислота или пептид	pK_1'	pK_2'
Ala	2,34	9,69
Ala-Ala	3,12	8,30
Ala-Ala-Ala	3,39	8,03
Ala-(Ala)$_n$-Ala, $n \geqslant 4$	3,42	7,94

а) Нарисуйте структурную формулу пептида Ala-Ala-Ala. Укажите функциональные группы, которым соответствуют величины pK_1' и pK_2'.

б) При переходе от Ala к олигопептидам, состоящим из остатков Ala, величина pK_1' возрастает. Объясните, почему это происходит?

в) При переходе от Ala к олигопептидам, состоящим из остатков Ala, величина pK_2' уменьшается. Объясните причину этого.

ГЛАВА 6

БЕЛКИ: КОВАЛЕНТНАЯ СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Белки, или протеины (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие»), количественно преобладают над всеми другими макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов. В предыдущей главе мы рассматривали аминокислоты – структурные элементы белков – и простые пептиды, состоящие из небольшого числа аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями. Теперь мы займемся структурой белков, молекулы которых представляют собой очень длинные полипептидные цепи, построенные из многих аминокислотных звеньев.

Белки служат теми инструментами, посредством которых генетическая информация получает свое реальное воплощение. В соответствии с тем что в клеточном ядре содержатся тысячи генов, каждый из которых определяет какой-то один характерный признак живого организма, в клетке существуют тысячи разновидностей белков и каждый из них выполняет специфическую функцию, определяемую соответствующим геном. Таким образом, белки – это не только наиболее многочисленные, но и исключительно разнообразные по своим функциям макромолекулы.

Особенно поразительно то, что все белки во всех организмах, независимо от их функции или биологической активности, построены из одного и того же основного набора 20 стандартных аминокислот, каждая из которых, взятая в отдельности, не обладает никакой биологической активностью. Что же тогда придает одному белку ферментативную активность, другому – гормональную, а третьему – свойства антитела? Как белки различаются химически? Ответ довольно прост: белки отличаются друг от друга тем, что каждый имеет свою, характерную для него одного *последовательность* аминокислотных звеньев. Аминокислоты – это алфавит белковой структуры; соединив их в различном порядке, можно получить почти бесконечное число последовательностей и, значит, почти бесконечное множество разнообразных белков (см. дополнение 6-1).

Дополнение 6-1. Сколько может существовать аминокислотных последовательностей?

У каждого вида организмов имеются тысячи различных белков, а число самих видов, вероятно, составляет около 10 миллионов. Можно ли всего из 20 аминокислот построить, скажем, 10^{11} (или более) различных последовательностей?

Ответ дает чисто математический расчет. Дипептид, состоящий из двух разных аминокислот, в зависимости от порядка их расположения может иметь две изомерные формы. Трипептид, состоящий из трех

различных аминокислот – A, B и C – может существовать в шести различающихся по последовательности вариантах: ABC, ACB, BAC, BCA, CAB и CBA. Общее выражение, позволяющее рассчитать число возможных последовательностей для выстроенных в ряд различных предметов, записывается как $n!$ (читается «эн факториал»), где n – число предметов. Тетрапептид из четырех разных аминокислот может иметь $4! = 4 \cdot 3 \cdot 2 \cdot 1 = 24$ различные последовательности. Для полипептида из 20 различных аминокислот, ни одна из которых не повторяется в нем дважды, число последовательностей составит $20! = 20 \cdot 19 \cdot 18 \ldots$, что даст в результате громадную цифру, равную примерно $2 \cdot 10^{18}$. Но это ведь очень короткий полипептид, состоящий всего из 20 остатков и имеющий молекулярную массу около 2600. Если же взять белок с молекулярной массой 34 000, в котором 12 различных аминокислот представлены в равных соотношениях, то получится 10^{300} возможных последовательностей. Если теперь допустить, что этот белок построен из 20 различных аминокислот, представленных в равных соотношениях, то число возможных последовательностей будет еще намного больше. Если бы существовало только по одной молекуле каждого из этих возможных изомеров такого белка, то общий вес всех этих молекул значительно превысил бы вес Земли!

Таким образом, двадцать аминокислот могут дать достаточное число последовательностей, чтобы их хватило не только для тысяч белков, присутствующих у каждого из ныне существующих видов организмов, но и для белков всех тех видов, которые когда-либо существовали в прошлом и появятся в будущем. Живущие сейчас на Земле виды составляют, по имеющимся оценкам, примерно одну тысячную всех видов, существовавших ранее на нашей планете. Молекулярная логика аминокислот и белков в достаточной степени предусматривает возможность возникновения новых видов, обусловленную дивергентной природой биологической эволюции.

В этой главе мы рассмотрим *первичную структуру* белковых молекул, под которой мы подразумеваем ковалентную структуру остова молекулы и последовательность аминокислотных остатков. Мы обсудим также некоторые соотношения между аминокислотной последовательностью и биологической функцией.

6.1. Белки обладают множеством различных биологических функций

Рассмотрим прежде всего в общих чертах весь диапазон выполняемых белками биологических функций. Ведь одна из важнейших задач современной биохимии как раз и состоит в том, чтобы понять, каким образом аминокислотные последовательности разных белков дают им возможность выполнять различные функции. Мы можем выделить несколько основных классов белков (табл. 6-1) в соответствии с их биологическими функциями (табл. 6-1).

a. Ферменты

Самый многообразный и наиболее высокоспециализированный класс белков составляют ферменты – белки, обладающие каталитической активностью. Почти все химические реакции, в которых участвуют присутствующие в клетке органические биомолекулы, катализируются ферментами. К настоящему времени открыто более 2000 различных ферментов, обнаруженных у разных организмов; каждый из этих ферментов служит катализатором какой-то определенной химической реакции.

Таблица 6-1. Классификация белков, основанная на их биологических функциях

Класс белков	Пример
Ферменты	Рибонуклеаза
	Трипсин
Транспортные белки	Гемоглобин
	Сывороточный альбумин
	Миоглобин
	β_1-липопротеин
Пищевые и запасные белки	Глиадин (пшеница)
	Яичный альбумин (яйцо)
	Казеин (молоко)
	Ферритин
Сократительные и двигательные белки	Актин
	Миозин
	Тубулин
	Динеин
Структурные белки	Кератин
	Фиброин
	Коллаген
	Эластин
	Протеогликаны
Защитные белки	Антитела
	Фибриноген
	Тромбин
	Ботулинический токсин
	Дифтерийный токсин
	Змеиные яды
	Рицин
Регуляторные белки	Инсулин
	Гормон роста
	Кортикотропин
	Репрессоры

б. Транспортные белки

Транспортные белки плазмы крови связывают и переносят специфические молекулы или ионы из одного органа в другой. Гемоглобин, содержащийся в эритроцитах, при прохождении крови через легкие связывает кислород и доставляет его к периферическим тканям, где кислород высвобождается и используется для окисления компонентов пищи – процесса, в ходе которого производится энергия. Плазма крови содержит *липопротеины*, осуществляющие перенос липидов из печени в другие органы. В клеточных мембранах присутствует еще один тип транспортных белков, способных связывать глюкозу, аминокислоты и другие пищевые вещества и переносить их через мембрану внутрь клетки.

в. Пищевые и запасные белки

В семенах многих растений запасены пищевые белки, потребляемые на первых стадиях развития зародыша. Наиболее известными примерами таких белков служат белки семян пшеницы, кукурузы и риса. К пищевым белкам относится также *яичный альбумин* – основной компонент яичного белка, и *казеин*, главный белок молока. В *ферритине*, встречающемся в животных тканях, запасено железо.

г. Сократительные и двигательные белки

Некоторые белки наделяют клетку или организм способностью сокращаться, изменять форму или передвигаться. *Актин* и *миозин* представляют собой нитевидные белки, функционирующие в сократительной системе скелетной мышцы, а также во многих немышечных клетках (разд. 2.13). Другим примером таких белков служит *тубулин* – белок, из которого построены микротрубочки. Они являются важными элементами ресничек и жгутиков (разд. 2.14). при помощи которых клетки передвигаются.

д. Структурные белки

Многие белки образуют волокна, навитые друг на друга или уложенные плоским слоем; они выполняют опорную или защитную функцию, скрепляя биологические структуры и придавая им прочность. Главным компонентом хрящей и сухожилий является фибриллярный белок *коллаген*, имеющий очень высокую прочность на разрыв. Выделанная кожа представляет собой почти чистый коллаген. Связки содержат *эластин* – струк-

турный белок, способный растягиваться в двух измерениях. Волосы, ногти и перья состоят почти исключительно из прочного нерастворимого белка *кератина*. Главным компонентом шелковых нитей и паутины служит белок *фиброин*.

е. Защитные белки

Многие белки защищают организм от вторжения других организмов или предохраняют его от повреждений. *Иммуноглобулины*, или *антитела*, образующиеся у позвоночных,– это специализированные белки, вырабатываемые в лимфоцитах; они обладают способностью распознавать проникшие в организм бактерии, вирусы или чужеродные белки других видов, а затем нейтрализовать их или связываться с ними, вызывая образование осадка. *Фибриноген* и *тромбин* – белки, участвующие в процессе свертывания крови; они предохраняют организм от потери крови при повреждении сосудистой системы. *Змеиные яды, бактериальные токсины* и токсичные белки растений, например *рицин*, по-видимому, также выполняют защитные функции.

ж. Регуляторные белки

Некоторые белки участвуют в системе регуляции клеточной или физиологической активности. К ним относятся многие *гормоны*, такие, как инсулин, регулирующий обмен глюкозы (при недостаточном его содержании в организме развивается сахарный диабет); *гормон роста*, синтезируемый в гипофизе, и *паратиреоидный гормон*, регулирующий транспорт ионов Ca^{2+} и фосфатов. Другие регуляторные белки, называемые *репрессорами*, регулируют биосинтез ферментов в бактериальных клетках.

з. Другие белки

Имеется много других белков, функции которых довольно необычны, что затрудняет их классификацию. *Монеллин* – белок, образующийся в одном из африканских растений, имеет очень сладкий вкус. Он стал предметом изучения как нетоксичное и не способствующее ожирению вещество, которое может быть использовано вместо сахара для подслащивания пищи. Плазма крови некоторых антарктических рыб содержит *белки со свойствами антифриза*, предохраняющие кровь этих рыб от замерзания. «Шарниры» в местах прикрепления крыльев у ряда насекомых состоят из белка *резилина*, обладающего почти идеальной эластичностью.

Поразительно, что все эти белки, столь различающиеся по свойствам и функциям, построены из одних и тех же 20 аминокислот.

6.2. Белки можно классифицировать также по форме их молекул

Белки могут быть разбиты на два больших класса в соответствии с формой их молекул и некоторыми физическими свойствами: глобулярные и фибриллярные белки (рис. 6-1). В *глобулярных белках* одна или большее число полипептидных цепей свернуты в плотную компактную структуру сферической, или глобулярной, формы. Обычно глобулярные белки растворимы в водных системах и легко диффундируют; одни из этих белков выполняют функции, обусловленные их подвижностью, а другие функционируют как динамические системы. К глобулярным белкам относятся почти все ферменты, равно как и транспортные белки крови, антитела и пищевые белки. *Фибриллярные белки* представляют собой нерастворимые в воде длинные нитевидные молекулы, полипептидные цепи которых не имеют глобулярной формы, а вытянуты вдоль одной оси. Большинство фибриллярных белков выполняет структурные или защитные функции. Типичными фибриллярными белками являются *α-кератин* волос и шерсти, *фиброин* шелка и *коллаген* сухожилий.

К этому классу относятся также нитевидные белки, присутствующие в сократительных системах мышечных и немышечных клеток, например актин и миозин, а также протофиламенты, из которых построены микротрубочки.

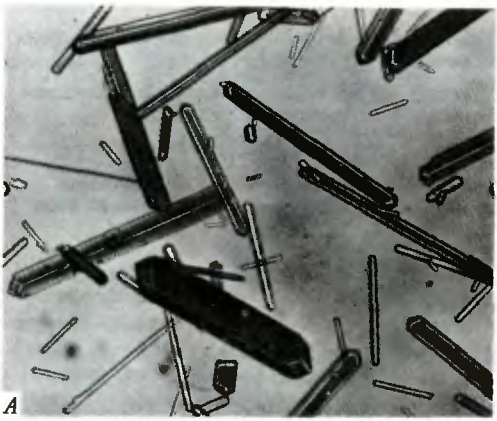


А

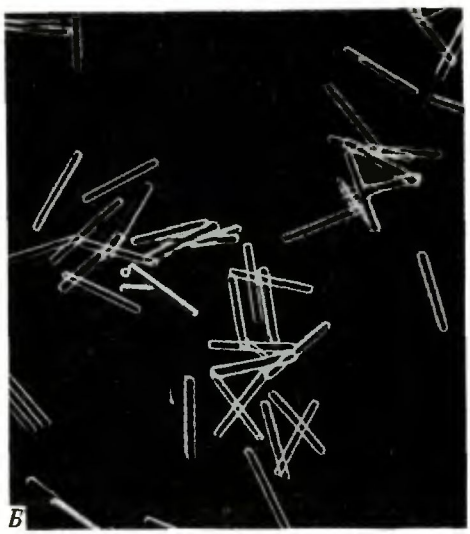


Б

Рис. 6-1. Глобулярные и фибриллярные белки. *А*. В глобулярных белках полипептидная цепь свернута так, что образуется компактная структура. Эти белки обычно растворимы в водной среде. *Б*. В кератине, фибриллярном белке волос, полипептидные цепи вытянуты вдоль одной оси. На рисунке показаны три молекулы кератина, навитые одна на другую наподобие каната. Фибриллярные белки нерастворимы в воде.



А



Б

Рис. 6-2. *А*. Кристаллы чистого цитохрома *с*, выделенного из сердца лошади. Цитохром *с* – это белок, который служит переносчиком электронов в митохондриях. *Б*. Кристаллы бычьего трипсина.

6.3. В ходе гидролиза белки распадаются на аминокислоты

Многие белки получены в чистом кристаллическом виде. На рис. 6-2 показаны кристаллы чистого *трипсина*, пищеварительного фермента, секретируемого в кишечник, и *цитохрома с*, митохондриального белка, играющего роль переносчика электронов. При кислотном или щелочном гидролизе белки так же, как и простые пептиды (разд. 5.22), расщепляются с образованием смеси свободных аминокислот, входивших в состав этих белков в качестве строительных блоков. Для каждого индивидуального белка характерно определенное соотношение различных аминокислот, образующихся в результате полного гидролиза этого белка. В табл. 6-2 приведены данные о составе смесей аминокислот, полученных

Таблица 6-2. Аминокислотный состав двух белков

Указано число остатков каждой аминокислоты на одну молекулу белка

Аминокислота	Цитохром *с* человека	Химотрипсиноген быка
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	2	10
Glu	8	5
Gly	13	23
His	3	2
Ile	8	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	3	2
Phe	3	6
Pro	4	9
Ser	2	28
Thr	7	23
Trp	1	8
Tyr	5	4
Val	3	23
Всего	104	245

при полном гидролизе *цитохрома с* и *бычьего химотрипсиногена* – неактивного предшественника пищеварительного фермента *химотрипсина*. Видно, что эти два белка, выполняющие совершенно разные функции, сильно различаются и по относительному содержанию в них различных аминокислот. 20 аминокислот никогда не входят в состав белка в эквимолярных количествах. Одни аминокислоты встречаются в каждой молекуле данного белка лишь по одному разу, тогда как другие значительно чаще. Более того, далеко не все белки содержат все 20 аминокислот. Каждому индивидуальному белку свойственно характерное для него соотношение аминокислотных строительных блоков.

6.4. Некоторые белки имеют в своем составе не только аминокислоты, но и другие химические группы

Многие белки, например ферменты рибонуклеаза и химотрипсин, состоят из одних только аминокислот и никаких других химических групп не содержат; их называют *простыми белками*. Однако есть белки, которые при гидролизе помимо аминокислот дают и другие химические компоненты. Эти белки носят название *сложных белков*. Неаминокислотную часть сложного белка обычно называют его *простетической группой*. Сложные белки классифицируются в зависимости от химической природы их простетических групп (табл. 6-3). *Липопротеины* содержат липиды, в состав *гликопротеинов* входят сахара (от греч. «glykos», что значит сладкий), а *металлопротеины* имеют в своем составе тот или иной характерный для каждого из них металл, например железо, медь или цинк. Обычно простетическая группа белка играет важную роль при выполнении белком его биологической функции.

Таблица 6-3. Сложные белки

Класс	Простетическая группа	Пример
Липопротеины	Липиды	β_1-Липопротеин крови
Гликопротеины	Углеводы	γ-Глобулин крови
Фосфопротеины	Фосфатные группы	Казеин молока
Гемопротеины	Гем (комплекс железа с протопорфирином)	Гемоглобин
Флавопротеины	Флавиновые нуклеотиды	Сукцинатдегидрогеназа
Металлопротеины	Железо	Ферритин
	Цинк	Алкогольдегидрогеназа

6.5. Белки – это очень крупные молекулы

Насколько длинными могут быть полипептидные цепи белков? Как следует из табл. 6-2, цитохром *c* человека состоит из 104 аминокислотных остатков, связанных в единую цепь; бычий химотрипсиноген имеет в своем составе 245 аминокислотных звеньев. В полипептидных цепях различных белков может содержаться самое разное число аминокислотных остатков – от 100 до 1800 и более. Белки – это не просто смеси полипептидов разной длины, с различным аминокислотным составом и различной последовательностью аминокислот. *Все молекулы данного индивидуального белка идентичны по аминокислотному составу, последовательности аминокислотных остатков и длине полипептидной цепи.*

В одних белках имеется только одна полипептидная цепь, тогда как в других, *олигомерных*, белках – две или большее число цепей (табл. 6-4). Например, фермент рибонуклеаза состоит из одной полипептидной цепи, а гемоглобин – из четырех.

Молекулярные массы белков, которые можно определить различными физико-химическими методами, лежат в диапазоне примерно от 12 000 для малых белков, таких, как цитохром *c*, содержащий лишь 104 аминокислотных остатка, до 10^6 и более для белков с очень длинными полипептидными цепями или для белков, состоящих из нескольких полипептидных цепей. Молекулярные массы некоторых типичных белков приведены в табл. 6-4. По-видимому, не существует простых закономерностей, связывающих молекулярные массы белков с их функциями. Например, ферменты очень сильно различаются по молекулярной массе.

Число аминокислотных остатков в простых белках, не содержащих простетических групп, можно приблизительно оценить, поделив значение молекулярной массы белка на 110. Хотя средняя молекулярная масса каждой из 20 аминокислот, содержащихся в белках, составляет около 138, в большинстве белков преобладают аминокислоты меньшего размера, и поэтому их средняя молекулярная масса оказывается ближе к 128. Однако при образовании каждой пептидной связи отщепляется молекула воды (мол. масса 18,0) и, таким образом, средняя масса аминокислотного остатка составляет $128 - 18 = 110$. В табл. 6-4 приведены данные о числе аминокислотных остатков в различных белках.

Таблица 6-4. Молекулярные характеристики некоторых белков

	Мол. масса	Число остатков	Число цепей
Инсулин (бычий	5 733	51	2
Рибонуклеаза (из поджелудочной железы быка)	13 683	124	1
Лизоцим (из яичного белка)	13 930	129	1
Миоглобин (из миокарда лошади)	16 890	153	1
Химотрипсин (из поджелудочной железы быка)	22 600	241	3
Гемоглобин (человека)	64 500	574	4
Сывороточный альбумин (человека)	68 500	~ 550	1
Гексокиназа (из дрожжей)	102 000	~ 800	2
γ-Глобулин (лошади)	149 900	~ 1250	4
Глутаматдегидрогеназа (из печени быка)	1 000 000	~ 8300	~ 40

6.6. Белки можно выделить и подвергнуть очистке

Клетки содержат сотни, если не тысячи различных белков, и для того чтобы определить аминокислотный состав или аминокислотную последовательность того или иного белка, его прежде всего

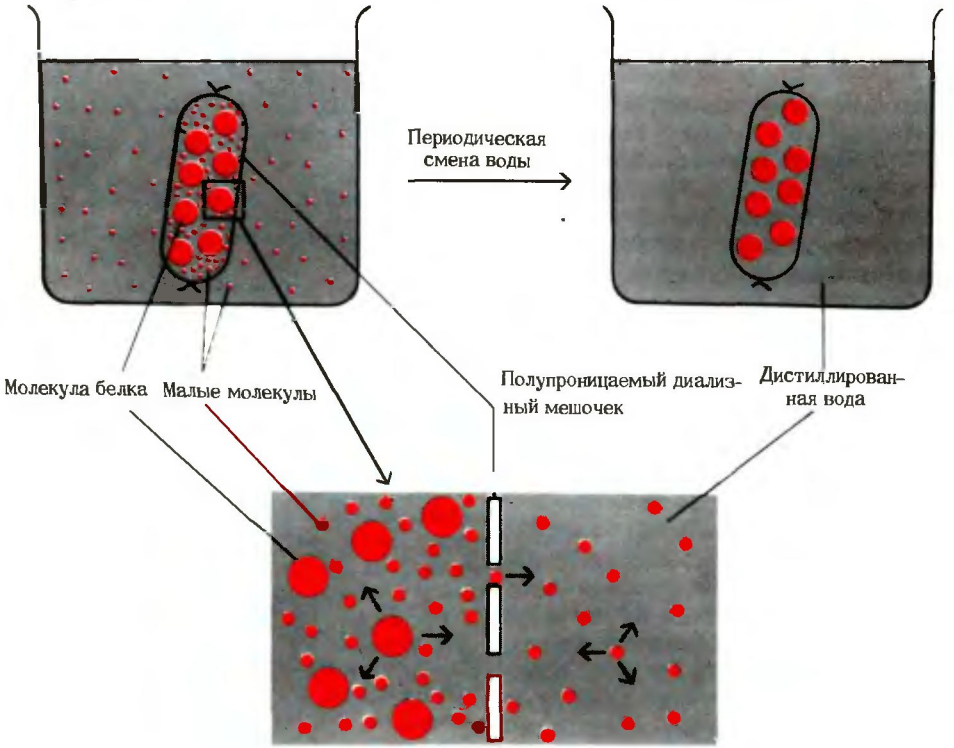


Рис. 6-3. Диализ. Мембрана, окружающая раствор белка, свободно пропускает воду и низкомолекулярные соединения, такие, как NaCl или глюкоза, но не пропускает большие молекулы, в частности молекулы белка. Малые молекулы диффундируют из диализного мешочка во внешний сосуд, так как в процессе диффузии молекулы стремятся перейти в зону с более низкой их концентрацией. Заменяя несколько раз водную фазу во внешнем сосуде на дистиллированную воду, можно снизить концентрацию низкомолекулярных соединений в растворе белка до сколь угодно малой величины.

необходимо получить в виде чистого препарата. Каким же образом один белок, например какой-нибудь фермент, можно отделить от сотен других белков, присутствующих в экстракте, полученном из клеток или ткани, и добиться нужной степени его чистоты?

Прежде всего, белки отделяют от низкомолекулярных веществ, содержащихся в клеточном или тканевом экстракте, путем *диализа* (рис. 6-3). Крупные молекулы, такие, как молекулы белков, остаются внутри диализного мешочка, сделанного из материала, содержащего ультрамикроскопические поры, например из целлофана. Если такой мешочек с клеточным или тканевым экстрактом погрузить в воду, то содержащиеся в экстракте малые молекулы, например соли, пройдут сквозь поры, а высокомолекулярные белки останутся в мешочке.

После того как смесь белков будет освобождена от малых молекул в ходе диализа, белки можно рассортировать по их размерам при помощи *гель-фильтрации*. В ходе этой операции, представляющей собой разновидность хроматографии, раствор, содержащий смесь белков, пропускают через колонку, заполненную очень мелкими пористыми гранулами высокогидратированного полимера. Молекулы белков, имеющие сравнительно небольшие размеры, проникают через поры внутрь этих гранул, в результате чего их прохождение через колонку замедляется (рис. 6-4), тогда как молекулы более крупных белков не могут проникнуть внутрь гранул и проходят через колонку значительно быстрее. Белки промежуточных размеров будут проходить через

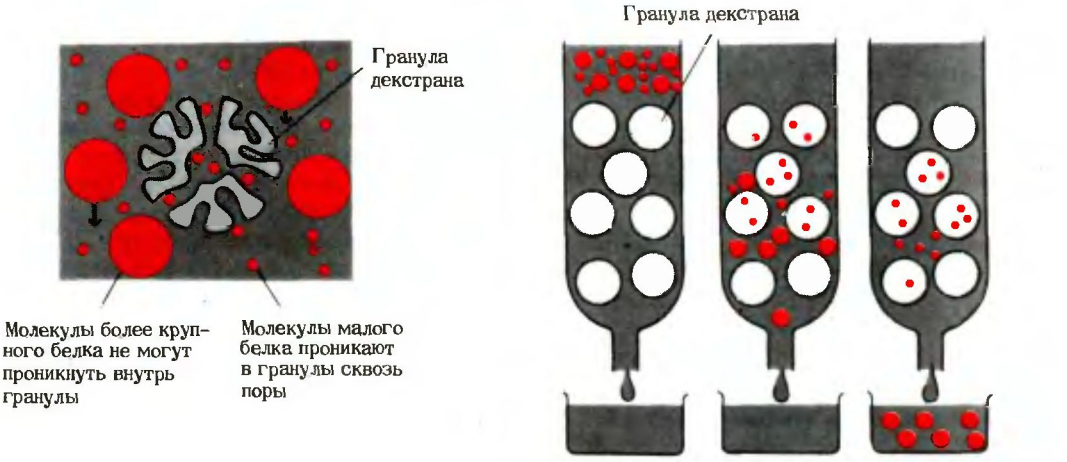


Рис. 6-4. Разделение белков в соответствии с размерами их молекул методом гель-фильтрации. Раствор, содержащий смесь белков, пропускают через колонку, заполненную очень мелкими пористыми гранулами гидрофильного полимера; широко используют для этой цели производные декстрана. Молекулы малых белков проникают внутрь гранул, тогда как более крупные молекулы не могут туда проникнуть. Молекулярную массу белка можно определить путем сравнения скорости его прохождения через колонку со скоростями прохождения других белков с известными молекулярными массами.

колонку с промежуточными скоростями в зависимости от их способности проникать внутрь гранул. Такая колонка, в которой осуществляется гель-фильтрация, представляет собой *молекулярное сито*.

Белки можно отделить друг от друга также методом *электрофореза* (разд. 5.16). Определяющую роль в этом методе играют знак и число электрических зарядов, локализованных на R-группах, концевой аминогруппе и концевой карбоксильной группе белков. Как и простые пептиды, полипептидные цепи белков характеризуются присущей им *изоэлектрической точкой*, которая определяется относительным числом кислых и основных R-групп (табл. 6-5). При данном значении pH у одних из присутствующих в смеси белков суммарный заряд будет отрицательным, у других – положительным, а у третьих – нулевым. Если такую смесь белков поместить в электрическое поле, то белки с положительным зарядом будут перемещаться в сторону отрицательного электрода,

Таблица 6-5. Изоэлектрические точки (pH_I) некоторых белков

	pH_I
Пепсин	< 1,0
Яичный альбумин	4,6
Сывороточный альбумин	4,9
Уреаза	5,0
β-Лактоглобулин	5,2
γ_1-Глобулин	6,6
Гемоглобин	6,8
Миоглобин	7,0
Химотрипсиноген	9,5
Цитохром *c*	10,7
Лизоцим	11,0

белки с отрицательным зарядом – в сторону положительного электрода, а белки с нулевым зарядом останутся на месте. При этом белковые молекулы с более высокой плотностью заряда будут двигаться по направлению к соответствующему электроду быстрее, чем белки с более низкой плотностью заряда. Электрофорез часто проводят не в растворе, а на носителе, представляющем собой либо по-

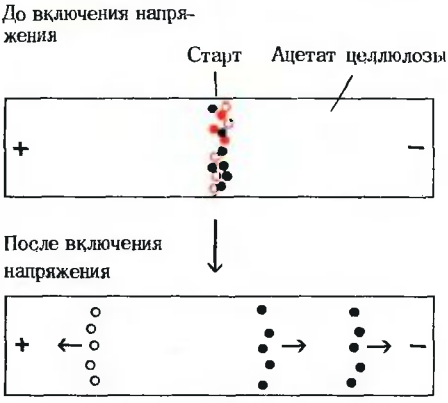


Рис. 6-5. Электрофорез смеси трех белков. Смесь белков наносят на полоску ацетата целлюлозы, смоченную буфером с заданным значением pH. Концы полоски опускают в кюветы с электродами. Ацетат целлюлозы служит носителем, предотвращающим беспорядочное перемещение молекул белка в результате диффузии. После нанесения смеси белков на середину полоски молекулы белков подвергают действию электрического поля, создаваемого разностью потенциалов между электродами. Каждый из трех белков перемещается в сторону положительного или отрицательного электрода с разной скоростью в зависимости от pH среды и кислотно-основных свойств каждого белка. По окончании электрофореза положение белков можно выявить при помощи красителей, связывающихся с белками.

лоску бумаги, либо пленку ацетата целлюлозы, либо пластину гидрофильного геля, что позволяет сильно замедлить диффузию молекул фракционируемых белков в водной фазе (рис. 6-5).

Еще одним эффективным методом разделения белков является *ионообменная хроматография*, основанная большей частью на различиях в плотности и знаке заряда белков при данном значении pH. Таким образом, метод ионообменной хроматографии можно применять для разделения не только аминокислот (разд. 5.18) и пептидов (разд. 5.21), но и белков.

Чтобы выделить какой-то один специфический белок из смеси многих белков, нужно найти удобный способ определения концентрации этого белка, который бы контролировал каждую стадию разделения. Например, если мы ведем очистку фермента, то, измеряя его каталитическую активность, мы можем отличать его от всех других белков.

6.7. Определение аминокислотной последовательности полипептидных цепей

Два больших открытия, сделанные в 1953 г., ознаменовали наступление новой эры в биохимии. В этом году Джеймс Д. Уотсон и Фрэнсис Крик в Кембридже (Англия) создали модель структуры ДНК (двойную спираль) и высказали предположение о структурной основе точной репликации ДНК. В этом предположении, по существу (хотя и не в явной форме), была выражена идея о том, что последовательность нуклеотидных звеньев ДНК содержит в себе закодированную генетическую информацию. В том же году Фредерик Сэнгер, работавший в Кембридже в той же лаборатории, расшифровал последовательность аминокислот в полипептидных цепях гормона инсулина. Это достижение само по себе имело большое значение, так как в течение долгого времени считалось, что определение аминокислотной последовательности полипептида представляет собой совершенно безнадежную по трудности задачу. Но, кроме того, результаты, полученные Сэнгером, практически одновременно с появлением гипотезы Уотсона–Крика, тоже наводили на мысль о существовании какой-то связи между нуклеотидной последовательностью ДНК и аминокислотной последовательностью белков. В следующее десятилетие эта идея привела к расшифровке всех содержащихся в ДНК и РНК нуклеотидных кодовых слов, которые однозначно определяют аминокислотную последовательность белковых молекул.

До работы Сэнгера, на выполнение которой ушло несколько лет, не было уверенности в том, что все молекулы данного белка являются строго идентичными по молекулярной массе и аминокислотному составу. В настоящее время известна аминокислотная последовательность многих сотен белков, выделенных из различных источников. Определение аминокислотной последовательности полипептидной цепи основано на принципах, которые впервые были развиты Сэнгером. Они используются еще и сегодня,

правда со всевозможными вариациями и усовершенствованиями. Чтобы расшифровать аминокислотную последовательность любого полипептида, необходимо осуществить шесть основных стадий.

а. Стадия 1: определение аминокислотного состава

Первым шагом на пути к расшифровке аминокислотной последовательности служит гидролиз всех пептидных связей чистого полипептида. Образующаяся смесь аминокислот анализируется затем при помощи ионообменной хроматографии (разд. 5.18), что позволяет определить, какие аминокислоты и в каком соотношении присутствуют в гидролизате.

б. Стадия 2: идентификация амино- и карбоксиконцевых остатков

Следующий шаг состоит в идентификации аминокислотного остатка, находящегося на конце полипептидной цепи, несущего свободную α-аминогруппу, т. е. на аминоконце (NH_2-конце, или N-конце). Для этой цели Сэнгер предложил использовать реагент, 1-фтор-2,4-динитробензол (разд. 5.22), который можно присоединить в качестве метки к аминоконцевому (N-концевому) остатку цепи, в результате чего образуется окрашенное в желтый цвет 2,4-динитрофенильное (ДНФ)-производное полипептида. При кислотном гидролизе все пептидные связи в таком ДНФ-производном полипептида расщепляются, однако ковалентная связь между 2,4-динитрофенильной группой и α-аминогруппой N-концевого остатка остается незатронутой. Следовательно, N-концевой остаток будет представлен в гидролизате в виде 2,4-динитрофенильного производного (рис. 6-6). Это производное легко отделить от незамещенных свободных аминокислот

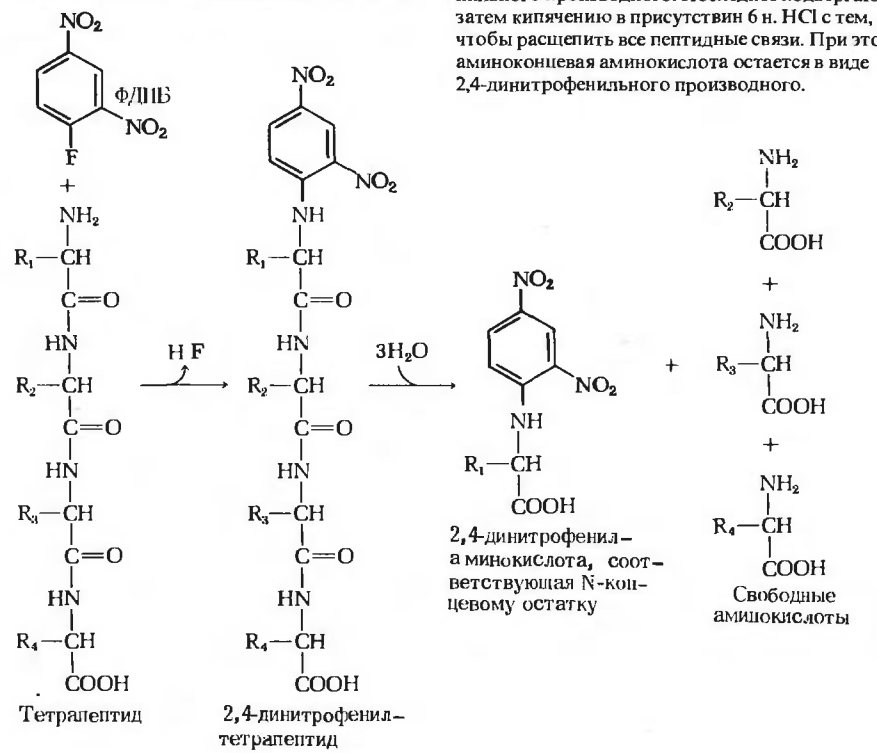


Рис. 6-6. Идентификация аминоконцевого остатка тетрапептида путем получения 2,4-динитрофенильного производного. Тетрапептид вступает в реакцию с 1-фтор-2,4-динитробензолом (ФДНБ) с образованием 2,4-дииитрофенильного производного. Последнее подвергают затем кипячению в присутствии 6 н. HCl с тем, чтобы расщепить все пептидные связи. При этом аминоконцевая аминокислота остается в виде 2,4-динитрофенильного производного.

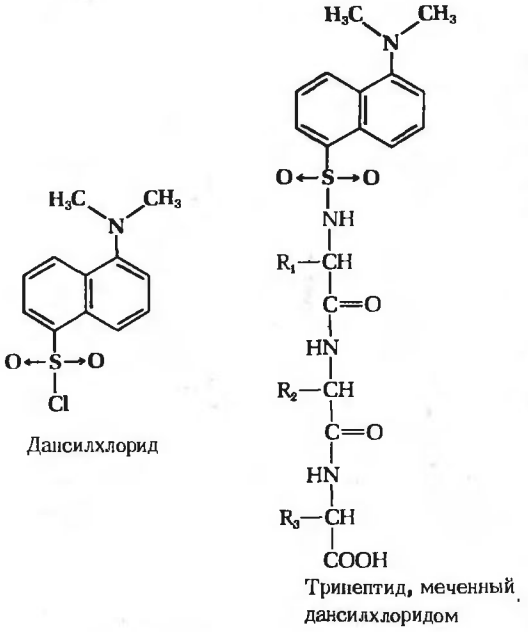


Рис. 6-7. Введение метки в аминоконцевой остаток трипептида с помощью дансилхлорида. После гидролитического расщепления всех пептидных связей дансильное производное аминоконцевой аминокислоты можно выделить и идентифицировать. Благодаря интенсивной флуоресценции дансильных групп они выявляются в значительно меньших количествах, чем динитрофенильные группы. Поэтому дансильный метод по чувствительности намного превосходит метод с использованием фтординитробензола.

и идентифицировать хроматографическим способом путем сравнения его с аутентичными динитрофенильными производными различных аминокислот.

Другим реагентом, используемым в качестве метки, позволяющей идентифицировать N-концевой остаток, служит *дансилхлорид* (рис. 6-7), который реагирует со свободной α-аминогруппой и дает дансильное производное. Последнее интенсивно флуоресцирует, вследствие чего его можно обнаружить и измерить при значительно более низких концентрациях, чем динитрофенильные производные.

Карбоксиконцевой (С-концевой) аминокислотный остаток полипептидной цепи тоже можно идентифицировать, используя тот или иной метод. Один из таких методов состоит в инкубировании полипептида с ферментом *карбоксипептидазой*, которая гидролизует только пептидную связь, находящуюся на карбоксильном конце (COOH-конце, или С-конце) цепи. Определив, какая из аминокислот первой отщепилась от полипептида при действии на него карбоксипептидазы, можно идентифицировать С-концевой остаток.

В результате идентификации N- и С-концевых остатков полипептида мы получаем две важные реперные точки для определения аминокислотной последовательности.

в. Стадия 3: расщепление полипептидной цепи на фрагменты

Теперь мы берем еще одну порцию анализируемого препарата, содержащего неповрежденные полипептидные цепи, и расщепляем их на более мелкие куски — короткие пептиды, состоящие в среднем из 10–15 аминокислотных остатков. Цель этой операции заключается в том, чтобы разделить полученные фрагменты и определить в каждом из них аминокислотную последовательность.

Для расщепления полипептидной цепи на отдельные фрагменты можно использовать несколько методов. Один из широко распространенных методов – это частичный ферментативный гидролиз полипептида под воздействием пищеварительного фермента *трипсина*. Каталитическое действие этого фермента отличается высокой специфичностью: гидролизу подвергаются только те пептидные связи, в образовании которых участвовала карбоксильная группа остатка лизина или аргинина независимо от длины и аминокислотной последовательности полипептидной цепи (табл. 6-6). Число более мелких пептидов, образующихся под действием трипсина, можно, следовательно, предсказать, исходя из общего числа остатков лизина и аргинина в исходном полипептиде. Полипептид, в котором содержатся пять остатков лизина и (или) аргинина, при расщеплении трипсином обычно дает шесть более мелких

Таблица 6-6. Специфичность, свойственная четырем важным методам фрагментации полипептидных цепей

Обработка	Точки расщепления (остатки, которым принадлежит карбонильная группа расщепляемой пептидной связи)
Трипсин	Лизин
	Аргинин
Химотрипсин	Фенилаланин
	Триптофан
	Тирозин
Пепсин	Фенилаланин
	Триптофан
	Тирозин
	Некоторые другие остатки
Бромциан	Метионин

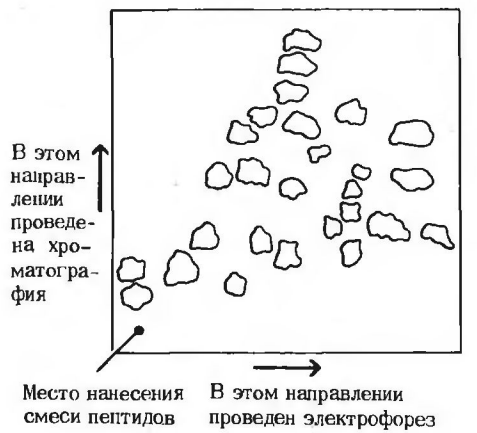


Рис. 6-8. Пептидная карта, полученная после расщепления нормального гемоглобина человека трипсином. Каждое пятно содержит один из пептидов. Чтобы получить такую двумерную карту, смесь пептидов наносят на лист бумаги квадратной формы, проводят электрофорез в одном направлении, параллельном одной из сторон квадрата, после чего бумагу высушивают, а затем проводят хроматографическое разделение пептидов в другом направлении, перпендикулярном первому. Ни один из этих двух процессов в отдельности не позволяет разделить пептиды полностью, однако последовательное их осуществление оказывается очень эффективным способом разделения сложных пептидных смесей.

пептидов, причем все эти пептиды, за исключением одного, имеют на карбоксильном конце остаток лизина или аргинина. Фрагменты, полученные под действием трипсина, разделяют либо методом ионообменной хроматографии на колонке, либо при помощи электрофореза и хроматографии на бумаге; при этом часто проводят двумерное хроматографическое разделение пептидов на листе бумаги, в результате чего получают хроматограмму с распределившимися на ней пептидами в виде *пептидной карты* (рис. 6-8).

г. Стадия 4: определение последовательности пептидных фрагментов

На этой стадии устанавливается аминокислотная последовательность в каждом из пептидных фрагментов, полученных на стадии 3. Обычно для этой цели используют химический метод, разработанный Пером Эдманом. *Расщепление по Эдману* сводится к тому, что метится и отщепляется только N-концевой остаток пептида, а все остальные пептидные связи не затрагиваются (рис. 6-9). После идентификации отщепленного N-концевого остатка метка вводится в следующий, ставший теперь N-концевым остаток, который точно так же отщепляется, проходя через ту же серию реакций. Так, отщепляя этим способом остаток за остатком, можно определить всю аминокислотную последовательность пептида, используя для этой цели всего одну пробу. На рис. 6-9 показано, каким образом осуществляется расщепление по Эдману. Вначале пептид взаимодействует с *фенилизотиоцианатом*, который присоединяется к свободной α-аминогруппе N-концевого остатка. Обработка пептида холодной разбавленной кислотой приводит к отщеплению N-концевого остатка в виде *фенилтиогидантоинового* производного, которое можно идентифицировать хроматографическими методами. Остальная часть пептидной цепи после удаления N-концевого остатка оказывается неповрежденной. Укороченный пептид снова подвергается той

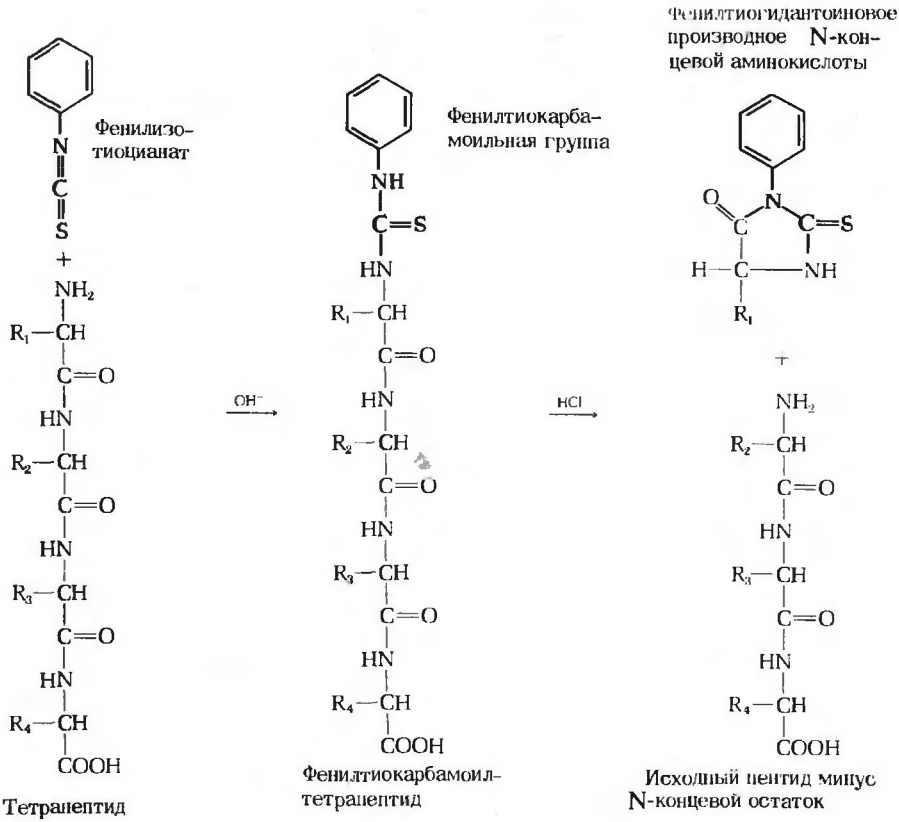


Рис. 6-9. Схема определения аминокислотной последовательности пептида путем его расщепления по Эдману. Исходный тетрапептид вступает в реакцию с фенилизотиоцианатом, в результате чего образуется фенилтиокарбамоильное производное аминоконцевого остатка. Этот остаток отщепляют от пептида без разрыва других пептидных связей и получают в виде фенилтиогидантоинового производного, которое можно идентифицировать хроматографическим способом. Оставшийся трипептид вновь проводят через тот же цикл реакций, что позволяет идентифицировать второй остаток. Эти операции повторяют до тех пор, пока не будут идентифицированы все остатки.

же серии реакций, что позволяет идентифицировать новый N-концевой остаток. Повторяя таким образом отщепление одного за другим N-концевых остатков, можно легко определить аминокислотную последовательность пептидов, состоящих из 10–20 остатков.

Определение аминокислотной последовательности проводится для всех пептидов, образовавшихся под действием трипсина. После этого сразу же возникает новая проблема – определить, в каком порядке трипсиновые фрагменты располагались в первоначальной полипептидной цепи.

д. Стадия 5: расщепление исходной полипептидной цепи еще одним способом

Чтобы установить порядок расположения пептидных фрагментов, образовавшихся под действием трипсина, берут новую порцию препарата исходного полипептида и расщепляют его на более мелкие фрагменты каким-либо иным способом, при помощи которого расщепляются пептидные связи, устойчивые к действию трипсина. В этом случае более предпочтительным часто оказывается не ферментативный, а химический метод. Особенно хорошие результаты дает реагент *бромциан*, расщепляющий толь-

ко те пептидные связи, в которых карбонильная группа принадлежит остатку метионина (табл. 6-6). Следовательно, если полипептид содержит восемь остатков метионина, то при обработке бромцианом обычно образуются девять пептидных фрагментов. Полученные таким способом фрагменты можно разделить методом электрофореза или хроматографии. Каждый из этих коротких пептидов подвергают расщеплению по Эдману, как было описано для стадии 4, и таким путем устанавливают их аминокислотную последовательность.

Итак, мы получили два набора пептидных фрагментов – один после обработки исходного полипептида трипсином и другой после химического расщепления того же полипептида бромцианом. Мы знаем также аминокислотную последовательность каждого пептида, входящего в состав этих двух наборов.

Рис. 6-10. Расположение пептидных фрагментов в правильном порядке на основе данных по перекрывающимся участкам. В приведенном здесь примере полипептид, состоящий из 16 аминокислотных остатков, после идентификации N- и С-концевых остатков был подвергнут фрагментации двумя способами. *Вверху* показаны полученные фрагменты, а *внизу* – воссоздание полной последовательности полипептида по перекрывающимся участкам.



е. Стадия 6: установление порядка расположения пептидных фрагментов по перекрывающимся участкам

Теперь сравнивают аминокислотные последовательности в пептидных фрагментах, полученных двумя способами из исходного полипептида, чтобы во втором наборе найти пептиды, в которых бы последовательности отдельных участков перекрывались (т. е. совпадали) с последовательностями тех или иных участков в пептидах первого набора. Принцип расположения пептидов показан на рис. 6-10. Пептиды из второго набора с перекрывающимися последовательностями позволяют соединить в правильном порядке пептидные фрагменты, полученные в результате первого расщепления исходной полипептидной цепи. Более того, эти два набора фрагментов позволяют выявить возможные ошибки в определении аминокислотной последовательности каждого фрагмента.

Иногда второго расщепления полипептида на фрагменты оказывается недостаточно, чтобы найти перекрывающиеся участки для двух или более пептидов, полученных после первого расщепления. В этом случае применяется третий, а то и четвертый способ расщепления, что позволяет в конце концов получить набор пептидов, обеспечивающих перекрывание всех участков, необходимых для установления полной последовательности исходной цепи. При этом для расщепления полипептида можно использовать другие протеолитические ферменты, например *химотрипсин* или *пепсин*; правда, эти ферменты расщепляют пептидные связи гораздо менее избирательно, чем трипсин (табл. 6-6).

6.8. Инсулин – это первый белок, для которого была установлена аминокислотная последовательность

Мы теперь знаем принципиальную схему определения аминокислотной последовательности полипептидных цепей. Рассмотрим результаты, полученные

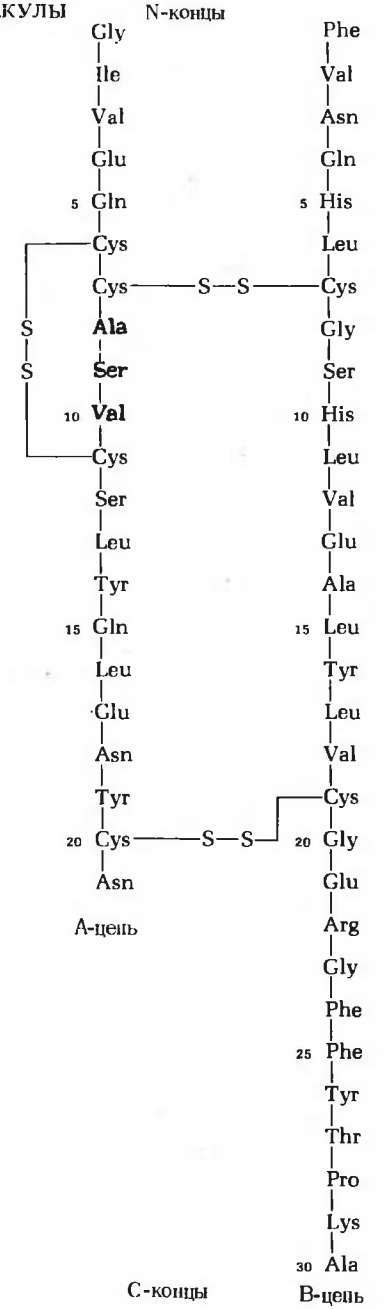


Рис. 6-11. Первичная структура бычьего инсулина. Показаны аминокислотные последовательности каждой из двух цепей и поперечные связи. А-цепи в молекулах инсулина человека, свиньи, собаки, кролика и кашалота идентичны. Идентичны также В-цепи инсулинов коровы, свиньи, собаки, козы и лошади. Аминокислотные замены в А-цепи обычно наблюдаются в положениях 8, 9 и 10 (выделены красным цветом).



Рис. 6-12. Расщепление дисульфидных поперечных связей надмуравьиной кислотой.

Сэнгером при установлении аминокислотной последовательности бычьего инсулина; эта последовательность приведена на рис. 6-11. Бычий инсулин имеет молекулярную массу около 5700. Его молекула состоит из двух полипептидных цепей: А-цепи, содержащей 21 аминокислотный остаток, и В-цепи, содержащей 30 аминокислотных остатков. Эти две цепи соединены двумя дисульфидными (—S—S—) поперечными связями, причем в одной из цепей имеется еще одна внутренняя дисульфидная связь. При определении последовательности вначале были разорваны поперечные дисульфидные связи, что позволило разделить цепи. Для этой цели Сэнгер использовал в качестве окислителя *надмуравьиную кислоту*, которая расщепляет каждый остаток цистина на два остатка цистеиновой кислоты (рис. 6-12), по одному в каждой цепи. После разделения цепей в них были определены аминокислотные последовательности. При этом не удалось обнаружить никаких закономерностей в расположении какой-либо аминокислоты, никаких периодических повторений того или иного аминокислотного остатка. Более того, последовательности двух цепей оказались совершенно разными.

Успешное определение аминокислотной последовательности в цепях инсулина способствовало интенсивному изучению взаимосвязи между структурой инсулинов, выделенных из различных видов, и их биологической активностью, связанной с регуляцией обмена глюкозы. Для биологической активности инсулина необходимы обе цепи – А и В. Более того, необходимо, чтобы обе поперечные дисульфидные связи оставались нерасщепленными. Удаление части остатков из той или другой цепи путем их избирательного отщепления приводит к частичной или полной потере активности. Хотя инсулины, выделенные из поджелудочной железы нескольких видов животных – коровы, свиньи, овцы и кашалота, сохраняют гормональную активность в организме человека и могут быть использованы для лечения больных диабетом, они все же не идентичны инсулину человека. Тем не менее весьма существенно то, что в каждой цепи инсулина в определенных положениях всегда присутствуют одни и те же аминокислоты независимо от вида, из которого был выделен данный инсулин. Однако в других положениях аминокислоты могут различаться у разных видов. Эти наблюдения убедительно свидетельствуют о том, что биологическая активность инсулина зависит от аминокислотной последовательности его цепей, а также от наличия в определенных положениях поперечных связей между цепями.

6.9. В настоящее время известны последовательности многих других белков

Успех Сэнгера сразу же побудил ряд других исследователей заняться определением аминокислотных последователь-

ностей еще более длинных полипептидных цепей. Очень скоро была установлена аминокислотная последовательность *адренокортикотропного гормона* (*кортикотропина, АКТГ*) – гормона передней доли гипофиза, стимулирующего рост и активность коры надпочечников. Этот гормон состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 39 аминокислотных остатков, с молекулярной массой около 4600. К концу 1950-х гг. была установлена последовательность первого фермента – *рибонуклеазы*; эту работу выполнили Стэнфорд Мур и Уильям Стейн из Рокфеллеровского института, а также Кристиан Анфинсен с группой сотрудников из Национальных институтов здравоохранения (США). Молекула бычьей рибонуклеазы содержит в своей единственной цепи 124 аминокислотных остатка и четыре внутрицепочечные —S—S— связи (рис. 6-13).

Следующим важным событием было определение аминокислотной последовательности в двух типах полипептидных цепей гемоглобина. Это была первая последовательность, установленная для олигомерного белка. Молекула гемоглобина состоит из четырех полипептидных цепей, называемых *глобинами* — двух идентичных α-глобинов (141 остаток) и двух идентичных β-глобинов (146 остатков). В молекуле гемоглобина эти цепи не соединены ковалентными связями, но тесно ассоциированы друг с другом посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий (гл. 7). После разделения α- и β-глобинов их аминокислотные последовательности были установлены двумя группами исследователей в Соединенных Штатах и одной – в ФРГ. Среди более длинных полипептидных цепей, для которых установлена полная аминокислотная последовательность, можно указать бычий трипсиноген (229 остатков), бычий химотрипсиноген (245 остатков), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (333 остатка) и состоящий из одной цепи сывороточный альбумин человека (582 остатка).

Многие стадии, через которые проходит определение аминокислотной последовательности длинных полипептидных цепей, и одновременная регистрация всех полученных результатов осуществляются в настоящее время автоматическими аминокислотными анализаторами с программным управлением. Даже расщепление по Эдману проводится при помощи специального прибора с программным

Кортикотропин человека

Ser·Tyr·Ser·Met·Glu·His·Phe·Arg·Trp·Gly·$_{10}$
Lys·Pro·Val·Gly·Lys·Lys·Arg·Arg·Pro·Val·$_{20}$
Lys·Val·Tyr·Pro·Asp·Ala·Gly·Glu·Asp·Gln·$_{30}$
Ser·Ala·Glu·Ala·Phe·Pro·Leu·Glu·Phe$_{39}$

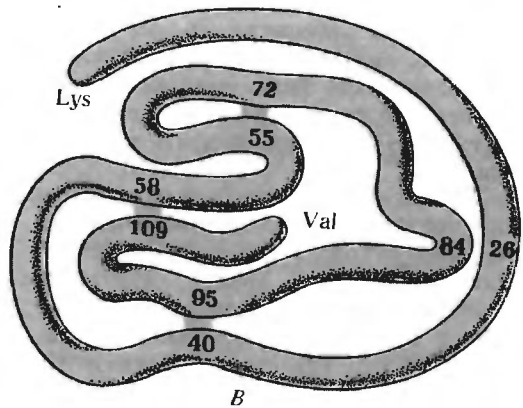
А

Рибонуклеаза из поджелудочной железы быка

Lys·Glu·Thr·Ala·Ala·Ala·Lys·Phe·Glu·Arg·$_{10}$
Gln·His·Met·Asp·Ser·Ser·Thr·Ser·Ala·Ala·$_{20}$
Ser·Ser·Ser·Asn·Tyr·Cys·Asn·Gln·Met·Met·$_{30}$
Lys·Ser·Arg·Asn·Leu·Thr·Lys·Asp·Arg·Cys·$_{40}$
Lys·Pro·Val·Asn·Thr·Phe·Val·His·Glu·Ser·$_{50}$
Leu·Ala·Asp·Val·Gln·Ala·Val·Cys·Ser·Gln·$_{60}$
Lys·Asn·Val·Ala·Cys·Lys·Asn·Gly·Gln·Thr·$_{70}$
Asn·Cys·Tyr·Gln·Ser·Tyr·Ser·Thr·Met·Ser·$_{80}$
Ile·Thr·Asp·Cys·Arg·Glu·Thr·Gly·Ser·Ser·$_{90}$
Lys·Tyr·Pro·Asn·Cys·Ala·Tyr·Lys·Thr·Thr·$_{100}$
Gln·Ala·Asn·Lys·His·Ile·Ile·Val·Ala·Cys·$_{110}$
Glu·Gly·Asn·Pro·Tyr·Val·Pro·Val·His·Phe·$_{120}$
Asp·Ala·Ser·Val$_{124}$

Б

Рис. 6-13. *А*. Аминокислотная последовательность адренокортикотропного гормона гипофиза (39 остатков). *Б*. Аминокислотная последовательность рибонуклеазы из поджелудочной железы быка (124 остатка). *В*. Схематическое изображение молекулы рибонуклеазы, показывающее расположение четырех дисульфидных поперечных связей, образованных остатками цистина.



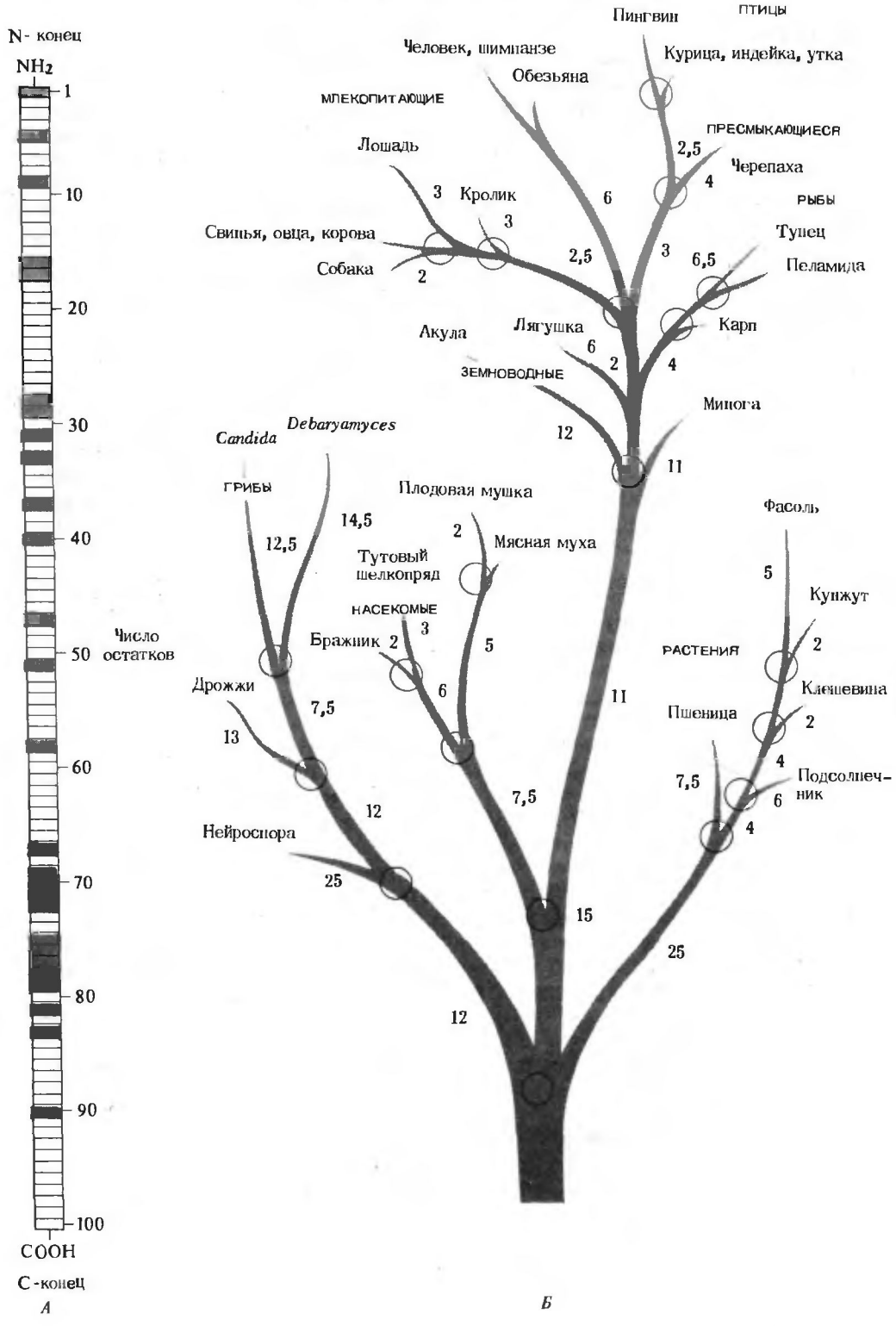
В

управлением – *секвенатора.* В этом приборе реагенты автоматически смешиваются в нужных пропорциях, продукты реакции разделяются и идентифицируются, а результаты регистрируются на ленте самописца. Применение таких приборов сильно сократило затраты труда и времени, необходимые для определения аминокислотной последовательности полипептидов. Более того, эти новые методы отличаются очень высокой чувствительностью. При помощи аминокислотных анализаторов можно быстро определить, какое количество каждой из аминокислот присутствует в одном отпечатке пальца! Для установления полной аминокислотной последовательности часто достаточно иметь всего один миллиграмм белка.

6.10. Гомологичные белки разных видов имеют гомологичные последовательности

При изучении аминокислотных последовательностей *гомологичных* белков, выделенных из разных видов, было сделано несколько важных выводов. К гомологичным белкам относятся те белки, которые у разных видов выполняют одинаковые функции. Примером может служить гемоглобин: у всех позвоночных он осуществляет одну и ту же функцию, связанную с транспортом кислорода. Гомологичные белки разных видов обычно имеют полипептидные цепи, идентичные или почти идентичные по длине. Более того, в аминокислотных последовательностях гомологичных белков во многих положениях всегда находятся одни и те же аминокислоты – их называют *инвариантными остатками.* Вместе с тем в других положениях таких белков наблюдаются значительные различия: в этих положениях аминокислоты варьируют от вида к виду; такие аминокислотные остатки называются *вариабельными.* Всю совокупность сходных черт в аминокислотных последовательностях гомологичных белков объединяют в понятие *гомология последовательностей*; наличие такой гомологии предполагает, что животные, из которых были выделены гомологичные белки, имеют общее эволюционное происхождение.

Биологический смысл, заключенный в гомологии последовательностей, лучше всего можно проиллюстрировать на примере *цитохрома с* – железосодержащего митохондриального белка, участвующего в качестве переносчика электронов в процессах биологического окисления в эукариотических клетках. Молекулярная масса этого белка у большинства видов составляет около 12 500; при этом его полипептидная цепь содержит 100 или несколько большее число аминокислотных остатков. Были установлены аминокислотные последовательности для цитохромов *с*, выделенных более чем из 60 видов, и во всех исследованных белках 27 положений в полипептидной цепи оказались занятыми одинаковыми аминокислотными остатками (рис. 6-14). Это указывает на то, что все эти остатки играют важную роль в определении биологической активности цитохрома *с.* В других положениях аминокислотные остатки могут варьировать от вида к виду. Второй важный вывод, сделанный на основе анализа аминокислотных последовательностей цитохромов *с*, состоит в том, что число остатков, по которым различаются цитохромы *с* любых двух видов, пропорционально филогенетическому различию между данными видами. Например, молекулы цитохромов *с* лошади и дрожжей (эволюционно весьма далеких видов) различаются по 48 аминокислотным остаткам, тогда как цитохромы *с* гораздо более близких видов – курицы и утки – только по двум остаткам. Что же касается цитохромов *с* курицы и индейки, то они имеют идентичные аминокислотные последовательности. Идентичны также цитохромы *с* свиньи, коровы и овцы. Сведения о числе различий в аминокислотных последовательностях гомологичных белков из разных видов используют для построения эволюционных карт, отражающих последовательные этапы возникновения и развития различных видов животных и растений в процессе эволюции (рис. 6-14).


N- конец
NH2
1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Число остатков
COOH
C-конец
А
Пингвин
ПТИЦЫ
Человек, шимпанзе
Курица, индейка, утка
Обезьяна
МЛЕКОПИТАЮЩИЕ
ПРЕСМЫКАЮЩИЕСЯ
Лошадь
2,5
Черепаха
3
Кролик
6
4
РЫБЫ
Свинья, овца, корова
3
Тунец
2,5
3
6,5
Собака
2
Пеламида
Акула
Лягушка
Карп
6
2
4
ЗЕМНОВОДНЫЕ
Минога
12
Candida
Debaryamyces
11
ГРИБЫ
Плодовая мушка
Фасоль
14,5
12,5
2
Мясная муха
5
Тутовый шелкопряд
Кунжут
5
НАСЕКОМЫЕ
3
2
Бражник
2
5
РАСТЕНИЯ
2
Клещевина
Дрожжи
6
11
Пшеница
7,5
2
13
4
Подсолнечник
7,5
6
12
4
Нейроспора
25
15
25
12
Б

6.11. Различия между гомологичными белками можно выявить по иммунной реакции

То, что гомологичные белки из разных видов обычно не идентичны, обнаруживается также при изучении особого класса белков, называемых *антителами* или *иммуноглобулинами*. Молекулы антител появляются у позвоночных в сыворотке крови и отдельных тканях в ответ на инъекцию *антигена* – белка или какого-то другого высокомолекулярного соединения, чужеродного для данного вида. Каждый чужеродный белок вызывает образование антител только одного определенного типа. Подобная реакция организма, высокоспецифическая по отношению к инъецированному белку, называется *иммунным ответом* или *иммунной реакцией*; она составляет основу целой научной области – иммунологии. Молекулы антител, формирующиеся в специализированных клетках – *лимфоцитах*, способны соединяться с молекулами антигенов, вызвавшими их появление, в результате чего образуется *комплекс антиген – антитело*. Иммунитет к инфекционным болезням во многих случаях можно создать путем инъекции очень малых количеств некоторых макромолекулярных компонентов (т. е. антигенов), входящих в состав микроорганизма или вируса – возбудителя данной болезни. При этом в лимфоцитах хозяина вырабатываются антитела к введенным антигенам. Если микроорганизм или вирус, несущий эти антигены, впоследствии вновь проникнет в кровь или лимфу иммунизированного животного, то антитела нейтрализуют или инактивируют его, связавшись с его антигенными компонентами. Способность к иммунному ответу свойственна только позвоночным и, следовательно, возникла на относительно поздних этапах биологической эволюции.

Образование антител можно исследовать количественно с помощью *реакции преципитации*. Животное, которое служит реципиентом – обычно это кролик, – иммунизируют каким-либо специфическим чужеродным белком, например яичным альбумином из куриных яиц. Затем сыворотку крови иммунизированного животного (*антисыворотку*), содержащую антитела, смешивают с небольшим количеством антигена, т. е. яичным альбумином. При этом происходит помутнение, так как образуется осадок (преципитат), содержащий комплекс антиген – антитело. Если же с антигеном смешивается сыворотка неиммунизированного животного, никакого осадка не образуется.

Антитела представляют собой молекулы Y-образной формы, состоящие из четырех полипептидных цепей. У них имеются участки связывания антигена, комплементарные определенным химическим структурам в молекуле антигена. Молекула антитела содержит два таких участка связывания, благодаря чему становится возможным образование трехмерной решетки из чередующихся молекул антигена и антитела (рис. 6-15).

Антитела обладают высокой специфичностью в отношении чужеродных белков, вызвавших их образование. Например, антитела, образовавшиеся у кролика в ответ на инъекцию сывороточного альбумина лошади, будут связываться с этим белком, но обычно не связываются с другими белками лошади, допустим с гемоглобином. Вырабатываемые у кролика антитела к сывороточному альбумину лошади лучше всего взаимодействуют именно с этим белком, однако они в значительной мере реагируют и с сывороточным альбумином близкородственных видов, таких, как зебра, корова, свинья и другие копытные, тогда как сывороточный альбумин грызунов, птиц

Рис. 6-14. *А*. Расположение 27 инвариантных остатков в цитохроме *с* более чем 60 видов, включая млекопитающих, рыб, пресмыкающихся, земноводных, птиц, насекомых и других беспозвоночных, а также растения и грибы. С увеличением числа исследованных цитохромов *с* число инвариантных остатков может несколько уменьшиться. *Б*. Основные ветви эволюционного древа, построенного на основе данных о числе аминокислотных замен в молекулах цитохрома *с* у различных видов. Цифры означают число остатков, по которым цитохром *с* данной линии организмов отличается от цитохромов *с* их предков. Кружками отмечены точки эволюционной дивергенции.

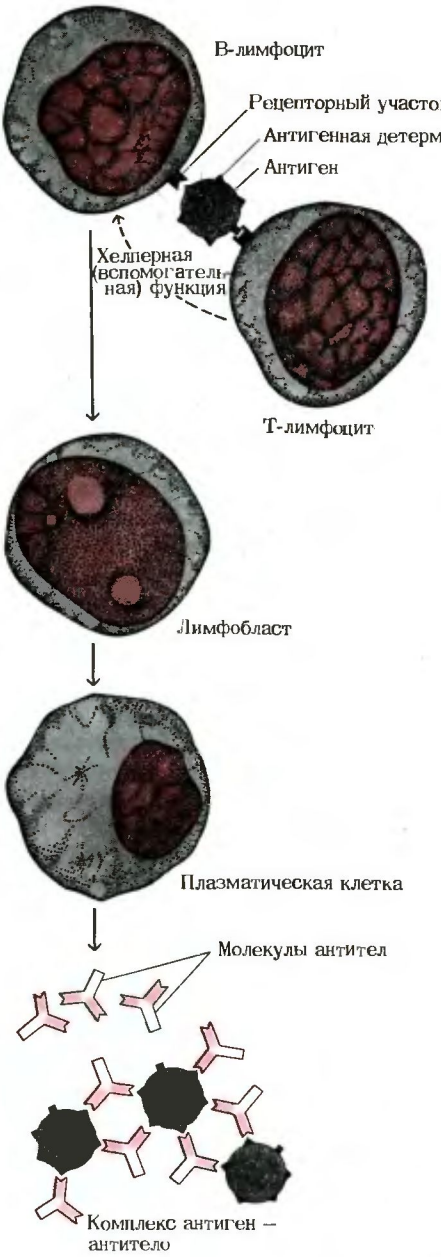


Рис. 6-15. Иммунный ответ и действие антител. Когда чужеродная для данного организма макромолекула (например, молекула белка из какого-то другого вида) попадает в кровь или ткань, она вызывает защитную реакцию, которая называется иммунным ответом. Чужеродная макромолекула, называемая антигеном, связывается с поверхностью лейкоцита особого типа – В-лимфоцитом. Эта клетка под воздействием антигена постепенно изменяется и превращается в плазматическую клетку, вырабатывающую большое количество антител против данного антигена. Образованию специфических антител способствуют также другие клетки, называемые Т-лимфоцитами. Антитела, или иммуноглобулины, представляют собой сложные высокомолекулярные белки, молекулы которых состоят из четырех полипептидных цепей и содержат несколько углеводных групп. Они могут специфически связываться с антигеном, вызвавшим образование антител, но не связываются ни с какими другими белками. Иммуноглобулины имеют Y-образную форму и содержат два участка для связывания антигена. Антитела вызывают преципитацию (выпадение в осадок) антигена благодаря образованию нерастворимого агрегата со структурой наподобие решетки. Каждый антиген стимулирует образование антител лишь одного определенного типа. Эти антитела распознают и связывают только данный антиген или близкородственные молекулы.

и земноводных дает намного менее выраженную реакцию. Эти наблюдения полностью согласуются с данными об аминокислотных последовательностях гомологичных белков. Они указывают также на то, что специфичность иммунной реакции связана с аминокислотными последовательностями белков. В дальнейшем мы еще обсудим и другие вопросы, касающиеся антител, так как эти белки имеют исключительно важное значение для медицины и с их помощью можно многое узнать о структуре белков и действии генов (гл. 30).

6.12. Белки претерпевают структурные изменения, называемые денатурацией

На протяжении всей этой главы мы подчеркивали взаимосвязь между аминокислотной последовательностью, биологической активностью и видоспецифичностью белков. Однако характеристика белков далеко не исчерпывается их *первичной структурой* – так обычно называют ковалентную структуру белка и его аминокислотную последовательность. Об этом ясно свидетельствует давно и хорошо известное свойство белков, о котором мы пока не упоминали. Если раствор белка, например яичного альбумина, медленно нагревать до температуры 60–70°С, он постепенно мутнеет и наконец превращается в вязкий сгусток.

Этот процесс хорошо всем знаком, поскольку он происходит при варке яиц. Яичный белок, содержащий альбумин, при нагревании свертывается (коагулирует), превращаясь в упругую белую массу. Свернувшийся таким образом яичный белок после охлаждения оказывается нерастворимым, и из него уже невозможно получить исходный прозрачный раствор. Нагревание яичного альбумина приводит к изменениям, носящим, по-видимому, необратимый характер. Такое же явление наблюдается при нагревании практически всех глобулярных белков независимо от размеров их молекул и биологической функции, хотя температура, при которой осуществляется этот процесс, неодинакова у разных белков. Изменения, происходящие с белками при нагревании, в совокупности называются *денатурацией*. Белки в их естественном состоянии носят название *нативных белков*, а после денатурации – *денатурированных белков*.

Еще одно важное следствие денатурации белка заключается в том, что белок почти всегда утрачивает характерную для него биологическую активность. Так, если водный раствор фермента кипятить в течение нескольких минут, а затем охладить, то фермент, как правило, становится нерастворимым и, что особенно важно, уже не обладает каталитической активностью. Денатурацию белков вызывает не только нагревание, но и воздействие экстремальных значений pH, добавление к раствору белка некоторых органических растворителей, таких, как спирт или ацетон, обработка мочевиной или детергентами и даже сильное взбалтывание белкового раствора на воздухе до тех пор, пока он не вспенится. Каждый из этих способов денатурации можно рассматривать как относительно мягкую обработку. В самом деле, прямые эксперименты показывают, что денатурация не сопровождается разрывом ковалентных связей в полипептидной цепи. Следовательно, аминокислотная последовательность белка после денатурации не изменяется; тем не менее большинство белков при этом утрачивает биологическую активность. Отсюда



Рис. 6-16. Тепловая обработка нативных глобулярных белков, а также некоторые другие виды воздействия приводят к денатурации этих белков, т. е. к развертыванию цепей без разрушения их ковалентной структуры. Денатурированный белок может принимать множество случайных конформаций и обычно не обладает биологической активностью.

мы должны заключить, что биологическая активность белка зависит не только от аминокислотной последовательности.

В чем же здесь разгадка? Ответ довольно прост: помимо первичной структуры белки обладают более высокими уровнями структурной организации. Если пояснить эту мысль коротко, то можно сказать, что ковалентно связанная полипептидная цепь нативного белка свертывается в пространстве определенным образом, вследствие чего возникает характерная для данного типа белка укладка полипептидной цепи. Благодаря

специфическому способу свертывания цепи в пространстве белок наделен характерной для него биологической активностью (рис. 6-16). В процессе денатурации белка свойственная ему трехмерная организация нарушается, полипептидная цепь развертывается и приобретает беспорядочную структуру, хотя ковалентные связи при этом остаются неповрежденными. Иными словами, нативные молекулы белка очень непрочны и легко утрачивают свою структуру при нагревании или других, казалось бы мягких, воздействиях. Если мы хотим заниматься изучением биологической активности какого-нибудь белка, мы должны при выделении и очистке этого белка обращаться с ним очень осторожно, чтобы избежать его денатурации.

В следующих двух главах будет показано, каким образом полипептидные цепи нативных белков свертываются и приобретают характерную для них специфическую конформацию и как эта конформация зависит от аминокислотной последовательности.

Краткое содержание главы

Белки – это самый многочисленный класс присутствующих в клетках макромолекул; они составляют свыше половины сухого веса клеток. Белки представляют собой очень длинные полипептидные цепи, содержащие от 100 до 1 000 и более аминокислотных звеньев, соединенных друг с другом пептидными связями. Простые белки в процессе гидролиза распадаются только на аминокислоты; сложные белки содержат еще и другие дополнительные компоненты – ионы металлов или органические простетические группы. Одни белки имеют волокнистую (фибриллярную) структуру и нерастворимы, тогда как другие состоят из плотно свернутых полипептидных цепей и имеют глобулярную форму.

Клетки содержат сотни и тысячи различных белков, предназначенных для выполнения самых разных биологических функций. Тем не менее все они построены из набора одних и тех же 20 аминокислот, расположенных в различной, но строго определенной для каждого белка последовательности. Аминокислотную последовательность полипептидной цепи можно установить путем расщепления ее на более мелкие фрагменты с последующим определением аминокислотной последовательности каждого фрагмента при помощи отщепления N-концевых аминокислотных остатков по Эдману. Затем пептидные фрагменты располагают в правильном порядке, находя в них участки с перекрывающимися последовательностями. Для этой цели исходный полипептид расщепляют на фрагменты каким-нибудь другим способом так, чтобы места расщепления цепи не совпадали с местами ее расщепления при использовании первого способа фрагментации. Аминокислотные последовательности второго набора фрагментов должны перекрывать места расщепления цепи, полученные первым способом.

Гомологичные белки, выделенные из организмов различных видов, обнаруживают гомологию последовательностей; это означает, что наиболее важные положения в полипептидных цепях гомологичных белков заняты одними и теми же аминокислотами независимо от вида организмов. В других положениях гомологичные белки могут содержать разные аминокислоты. Чем ближе в эволюционном отношении виды, тем более сходны аминокислотные последовательности их гомологичных белков. Таким образом, последовательности гомологичных белков указывают, что содержащие их организмы произошли от общего предка, но в ходе эволюции претерпели изменения и превратились в разные виды. Аналогичные выводы были сделаны исходя из результатов изучения специфичности антител по отношению к антигенам гомологичных видов.

Глобулярные белки при нагревании, под воздействием экстремальных значений pH и при обработке некоторыми реагентами обычно становятся нерастворимыми в воде и утрачивают свою биологическую активность, сохраняя, однако, неповрежденной ковалентную структуру полипептидной цепи. Этот

процесс, называемый денатурацией, обусловлен развертыванием полипептидных цепей.

ЛИТЕРАТУРА

Многие полезные сведения содержатся в литературе к главе 5

Книги

Cooper T.G. The Tools of Biochemistry, Wiley, New York, 1977. Руководство по экспериментальным методам биохимии белков.

Dayhoff M.O. Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suppl. 1–3, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., 1972–1979. Энциклопедия аминокислотных последовательностей белков.

Dickerson R.E., Geis I. Proteins: Structure, Function, and Evolution, 2d ed., Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1983. Прекрасно иллюстрированная книга о белках, которую можно рассматривать как введение в эту область.

Haschemeyer R., Haschemeyer A.H. Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley, New York, 1973.

Neurath H., Hill R.L. The Proteins, 3d ed., Academic, New York, 1977. Всестороннее и детальное изложение сведений о белках, представленное в виде многотомного сборника статей.

Schultz G.E., Schirmer R.H. Principles of Protein Structure, Springer, New York, 1979.

Статьи

Dickerson R.E. Structure and History of an Ancient Protein, Sci. Am., **226**, 58–72, April (1972).

Edelman G.M. The Structure and Function of Antibodies, Sci. Am., **223**, 34–42, August (1970).

Moore S., Stein W.H. Chemical Structures of Pancreatic Ribonuclease and Deoxyribonuclease, Science, **180**, 458–464 (1973).

O'Farrell P.H. High Resolution Two-Dimensional Analysis of Proteins, J. Biol. Chem., **250**, 4007–4021 (1975). Интересная попытка пересчитать все белки, присутствующие в клетке *E. coli*.

Srinavasan P.R., Fruton J.S., Edsall J.T. (eds.) The Origins of Modern Biochemistry. A Retrospective on Proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci., **325** (1979). Сборник очень интересных статей по истории исследования белков.

Вопросы и задачи

1. *Сколько молекул β-галактозидазы присутствует в клетке E. coli? E coli*–это палочкообразная бактерия длиной 2 мкм и диаметром 1 мкм. Если при выращивании клеток *E. coli* питательной средой служит лактоза (сахар молока), то бактерии синтезируют фермент β-галактозидазу (мол. масса 450 000), который катализирует реакцию расщепления лактозы. Средняя плотность бактериальной клетки составляет 1,2 г/мл; 14% всей массы клетки приходится на долю растворимых белков, среди которых β-галактозидаза составляет 1,0%. Подсчитайте число молекул β-галактозидазы в клетке *E. coli*, выросшей на лактозе.
2. *Число остатков триптофана в сывороточном альбумине быка.* По данным количественного аминокислотного анализа в сывороточном альбумине быка содержится 0,58% (по весу) триптофана, мол. масса которого равна 204.
   а) Рассчитайте минимальную молекулярную массу сывороточного альбумина быка.
   б) По данным гель-фильтрации молекулярная масса сывороточного альбумина быка составляет приблизительно 70 000. Сколько остатков триптофана присутствует в молекуле сывороточного альбумина?
3. *Молекулярная масса рибонуклеазы.* Содержание лизина в рибонуклеазе составляет 10,5% (по весу). Рассчитайте минимальную молекулярную массу рибонуклеазы. Молекула рибонуклеазы содержит 10 остатков лизина. Рассчитайте молекулярную массу рибонуклеазы.
4. *Суммарный электрический заряд полипептидов.* Полипептид, выделенный из мозга, имеет последовательность

   Glu—His—Trp—Ser—Tyr—
   Gly—Leu—Arg—Pro—Gly

   Определите суммарный заряд молекулы при pH 3. Каков ее суммарный заряд при pH 5,5? При pH 8? При pH 11? Значения pK' для R-групп Glu, His, Ser, Tyr и Arg равны соответственно 4,3, 6,0, 13,6, 10 и 12,48. Рассчитайте изоэлектрическую точку этого полипептида.
5. *Изоэлектрическая точка пепсина.* Пепсин желудочного сока (pH 1,5) имеет изоэлектрическую точку около 1, т.е. намного ниже, чем другие белки (см. табл. 6-5). Какие функциональные группы должны присутствовать в пепсине в относительно большом числе, чтобы этот фермент мог иметь

такую низкую изоэлектрическую точку? Какие аминокислоты имеют эти группы в своем составе?

6. *Изоэлектрическая точка гистонов.* Гистоны – это белки, содержащиеся в ядрах эукариотических клеток. Они прочно связаны с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК), которая содержит много фосфатных групп. Изоэлектрическая точка гистонов очень высока (около 10,8). Какие аминокислотные остатки должны присутствовать в гистонах в относительно больших количествах? Каким образом эти остатки обеспечивают прочное связывание гистонов с ДНК?
7. *Растворимость полипептидов.* В одном из методов разделения полипептидов используется различие в их растворимости. Как уже было сказано в тексте, растворимость крупных полипептидов в воде зависит от степени полярности их R-групп, особенно от числа ионизируемых групп: чем больше ионизируемых групп, тем выше растворимость полипептида. Какой полипептид из каждой пары приведенных ниже полипептидов более растворим в указанных условиях?
   а) $(Gly)_{20}$ или $(Glu)_{20}$ при pH 7,0;
   б) $(Lys—Ala)_3$ или $(Phe—Met)_3$ при pH 7,0;
   в) $(Ala—Ser—Gly)_5$ или $(Asn—Ser—His)_5$ при pH 9,0;
   г) $(Ala—Asp—Gly)_5$ или $(Asn—Ser—His)_5$ при pH 3,0.
8. *Расщепление полипептидной цепи на фрагменты под действием протеолитических ферментов.* Трипсин и химотрипсин – это специфические ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление полипептидов в определенных местах их цепи (табл. 6-6). Ниже приведена последовательность В-цепи полипептидного гормона инсулина. Учтите, что цистиновый поперечный мостик между А- и В-цепями уже разорван под действием надмуравьиной кислоты (см. рис. 6-12).

   Phe — Val — Asn — Gln — His — Leu — $CySO_3H$ — Gly — Ser — His — Leu — Val — Glu — Ala — Leu — Tyr — Leu — Val — $CySO_3H$ — Gly — Glu — Arg — Gly — Phe — Phe — Tyr — Thr — Pro — Lys — Ala

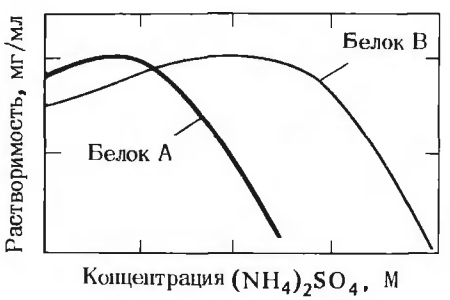
   Укажите те места в В-цепи, в которых происходит ее расщепление под действием а) трипсина и б) химотрипсина.
9. *Определение аминокислотной последовательности лей-энкефалина – выделенного из мозга пептида.* Из нормальной мозговой ткани была выделена группа полипептидов, влияющих на передачу нервного импульса в определенных участках мозга. Эти полипептиды известны под названием *опиоидов*, поскольку они присоединяются к специфическим рецепторам, которые связывают опиаты (алкалоиды опиума), такие, как морфин и налоксон. Таким образом, опиоиды имитируют некоторые свойства опиатов. Некоторые исследователи рассматривают эти полипептиды как содержащиеся в мозгу собственные средства обезболивания. Используя приведенные ниже сведения, определите аминокислотную последовательность опиоида лей-энкефалина. Объясните, как согласуется полученная вами структура с указанными ниже
   а) Полный гидролиз под действием 1 М HCl при 110°C с последующим аминокислотным анализом выявил присутствие Gly, Leu, Phe и Tyr в молярном отношении 2 : 1 : 1 : 1.
   б) После обработки полипептида 2,4-динитрофторбензолом с последующим полным гидролизом и хроматографическим разделением продуктов было выявлено присутствие 2,4-динитрофенильного производного тирозина. Свободного тирозина при этом не было обнаружено.
   в) Частичный гидролиз полипептида химотрипсином с последующим хроматографическим разделением полученных продуктов дал Leu, Tyr и более короткий пептид. Полный гидролиз последнего с последующим аминокислотным анализом выявил присутствие Gly и Phe в отношении 2 : 1.
10. *Электрофорез пептидов.* Если ионизированные аминокислоты и пептиды поместить в электрическое поле, то в зависимости от pH они движутся в сторону катода или анода (см. рис. 6-5). Этот метод широко используется для разделения пептидов, различающихся по величине суммарного заряда. Возможности метода особенно велики благодаря тому, что суммарный заряд пептида можно изменять, изменяя pH среды.
    а) Определите направление миграции (к аноду или катоду) для всех выписанных ниже аминокислот и пептидов при заданном значении pH
       1) Glu (pH 7)
       2) Glu (pH 1)
       3) Asp—His (pH 1)
       4) Asp—His (pH 10)
    б) При каком значении pH можно легко разделить с помощью электрофореза следующие три дипептида: Gly—Lys, Asp—Val и Ala—His?

11. *Растворимость: высаливание*

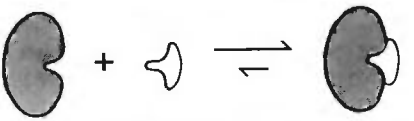
а) Чистые белки большей частью нерастворимы в дистиллированной воде, но растворяются в разбавленных солевых растворах. Однако при добавлении к водному раствору белка нейтральных солей в высокой концентрации белок выпадает в осадок. Это явление называют высаливанием. Например, бóльшая часть белков растворяется в 0,1 М $(NH_4)_2SO_4$, но выпадает в осадок, если концентрация $(NH_4)_2SO_4$ повышается до 3М. После удаления избытка $(NH_4)_2SO_4$ путем диализа белки снова растворяются. Попытайтесь объяснить на молекулярном уровне, почему добавление солей в высоких концентрациях приводит к понижению растворимости белка.

б) На графике показана зависимость растворимости двух белков от концентрации $(NH_4)_2SO_4$. Как можно использовать эти данные для разделения белков А и В?

Задача 11



12. *Аффинная хроматография: высокоспецифичный и эффективный метод выделения специфических белков.* Вследствие того что молекулы большинства белков легко разрушаются при использовании для их выделения и очистки многих традиционных методов, применяемых в органической химии, таких, как возгонка и экстрагирование различными растворителями, биохимики вынуждены были разработать для этой цели специальные методы. Нередко удается выделить какой-нибудь один белок, присутствующий в смеси, содержащей несколько тысяч других биомолекул, в концентрации 10^{-3}–10^{-6} М. Один из таких методов, известный под названием аффинной хроматографии, сыграл решающую роль при выделении и очистке ряда ферментов, иммуноглобулинов и рецепторных белков. В основе метода лежит тот хорошо известный факт, что белки, выполняя свойственные им биологические функции, *обратимо* связываются с другими специфическими видами молекул, называемых лигандами. В результате образуются прочные *нековалентные* белково-лигандные комплексы.



Белок Лиганд Комплекс белок – лиганд

По этому методу лиганд, специфически связывающийся с белком, который нам нужно выделить, ковалентно присоединяют к нерастворимым полимерным гранулам диаметром 10–50 мкм.



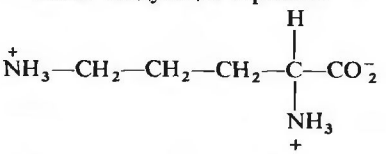
Для выделения этого белка из клеточного экстракта последний вносят в колонку, заполненную полимерными гранулами с присоединенным к ним лигандом, после чего колонку промывают несколько раз буферным раствором. При этом на колонке удерживаются лишь те белки, которые имеют высокое сродство к закрепленному на полимере лиганду; остальные же белки просто вымываются буфером. Поскольку сродство и специфичность белка к лиганду очень высоки, таким путем зачастую можно в один прием выделить и очистить чрезвычайно малые количества белка из клеточного экстракта, содержащего сотни других белков.

Каким образом можно получить белок, оставшийся на аффинной колонке, в чистом виде? Объясните, какие принципы лежат в основе предлагаемой операции.

13. *Структура полипептидного антибиотика, выделенного из Bacillus brevis.* Экстракты, полученные из бактериальной культуры *Bacillus brevis*, содержат пептид со свойствами антибиотика. Этот пептид образует комплексы с ионами металлов и, по-видимому, нарушает систему ионного транспорта через клеточную мембрану.

убивая таким образом определенные виды бактерий. Структура полипептида была установлена на основе следующих наблюдений:

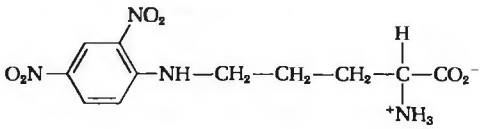
а) Полный кислотный гидролиз пептида, как показал последующий аминокислотный анализ, привел к образованию эквимолярных количеств Leu, Orn, Phe, Pro и Val. Orn – сокращенное обозначение орнитина – аминокислоты, не встречающейся в белках, но присутствующей в некоторых пептидах. Он имеет следующее строение:



б) Измерения молекулярной массы дали приблизительную величину 1200.

в) Пептид не подвержен гидролизу под действием фермента карбоксипептидазы.

г) Обработка исходного полипептида фтординитробензолом с последующим полным гидролизом образовавшегося производного и хроматографированием полученных продуктов дает лишь свободные аминокислоты и производное следующего строения:



(Подсказка: учтите, что 2,4-динитрофенильная группа присоединилась не к α-азоту, как это обычно имеет место, а к аминогруппе боковой цепи.)

д) Частичный гидролиз полипептида с последующим хроматографическим разделением полученных продуктов и определением в них аминокислотных последовательностей дал следующие ди- и трипептиды (N-концевая аминокислота всегда расположена слева);

Leu—Phe Phe—Pro Phe—Pro—Val
Val—Orn—Leu Orn—Leu
Val—Orn Pro—Val—Orn

Исходя из приведенной выше информации, попытайтесь восстановить аминокислотную последовательность полипептидного антибиотика. Поясните ваши рассуждения. После того как у вас будет готов ответ, вернитесь назад и проверьте, насколько установленная вами структура согласуется с каждым из описанных выше наблюдений.

ГЛАВА 7

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ БЕЛКИ

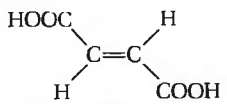
Белки можно разделить на два основных класса: *фибриллярные белки* – расположенные параллельно друг другу вытянутые полипептидные цепи, образующие длинные нити или слои, и *глобулярные белки*, в которых полипептидные цепи плотно свернуты в компактные структуры сферической формы – глобулы. В этой главе мы рассмотрим трехмерную структуру фибриллярных белков. В биологическом отношении фибриллярные белки играют очень важную роль, связанную с анатомией и физиологией животных. У крупных позвоночных на долю этих белков приходится одна треть (или более) общего содержания белков. Из фибриллярных белков — главных компонентов наружного слоя кожи, волос, перьев, когтей и рогов – формируются наружные защитные покровы тела животных и человека. Фибриллярные белки участвуют также в образовании опорных и формообразующих элементов, так как они служат главным органическим материалом соединительной ткани, включая хрящи, сухожилия, кости и более глубокие слои кожи.

Есть еще одна причина, по которой мы расскажем сначала о фибриллярных белках. Они имеют более простую структуру, чем глобулярные белки, и поэтому их трехмерная структура была определена методом рентгеноструктурного анализа немного раньше, чем трехмерная структура глобулярных белков. Результаты этих пионерских исследований не только привели к формированию новых представлений о структуре и функции фибриллярных белков, но и стали важной вехой на пути к изучению методом рентгеноструктурного анализа структуры и функции глобулярных белков.

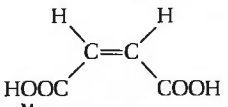
7.1. Термины «конфигурация» и «конформация» имеют разный смысл

В этой и следующей главе мы рассмотрим вопрос о пространственном расположении полипептидных цепей. Но прежде всего мы должны точно определить, что означают два термина, часто используемые при обсуждении пространственной структуры молекул: *конфигурация* и *конформация*. Эти слова – не синонимы. Под конфигурацией подразумевают пространственную организацию органической молекулы, определяемую наличием в ней 1) *двойных связей*, вокруг которых свободное вращение невозможно, и 2) *хиральных центров* с расположенными вокруг них в определенной последовательности замещающими группами. На рис. 7-1 показана конфигурация *фумаровой кислоты* – одного из промежуточных соединений углеводного обмена – и конфигурация ее изомера – *малеиновой кислоты*, встречающейся в некоторых растениях. Эти соединения представляют собой *геометрические*, или *цис-транс*-изомеры; они различаются расположением замещающих групп относительно двойной связи. Фумаровая кислота – это *транс*-изомер, а малеиновая кислота – *цис*-изомер; и в том и в другом случае мы имеем дело со строго определенным соединением, которое можно получить в чистом виде. На рис. 7-1 изображены

Геометрические (*цис-транс*) изомеры

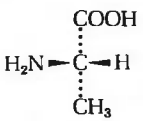


Фумаровая кислота
(*транс*-изомер)

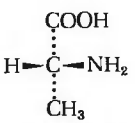


Малеиновая кислота
(*цис*-изомер)

Оптические изомеры (энантиомеры)



L-аланин



D-аланин

Рис. 7-1. Конфигурация стереоизомеров. Такие изомеры нельзя превратить один в другой без разрыва ковалентных связей.

также L- и D-изомеры аланина (см. рис. 3-8 и 5-4), в которых замещающие группы имеют две различные конфигурации относительно хирального центра. *Отличительным признаком конфигурационных изомеров является то, что их нельзя превратить один в другой без разрыва одной или большего числа ковалентных связей.*

Термин *конформация* используют для описания пространственного расположения в органической молекуле замещающих групп, способных свободно изменять свое положение в пространстве без разрыва каких бы то ни было связей благодаря свободному вращению вокруг одинарных углерод-углеродных связей. Например, для простого углеводорода *этана* характерна полная свобода вращения вокруг одинарной С—С-связи. Поэтому молекула этана может принимать множество различных конформаций в зависимости от угла поворота одного атома углерода относительно другого; однако все эти конформации легко переходят одна в другую в результате вращения замещающих групп вокруг С—С-связи. *Заторможенная* конформация этана (рис. 7-2) более устойчива по сравнению со всеми остальными и поэтому встречается чаще других, тогда как *заслоненная* конформация наименее устойчива. Ни одну из этих двух конформационных форм этана невозможно выделить в чистом виде, так как между ними существует равновесие и они свободно переходят одна в другую. Однако, как можно предположить, исходя из моделей, представленных на рис. 7-2, если в молекуле этана один или большее число атомов водорода, связанных с двумя атомами углерода, заменить на более крупные или электрически заряженные функциональные группы, то свобода вращения

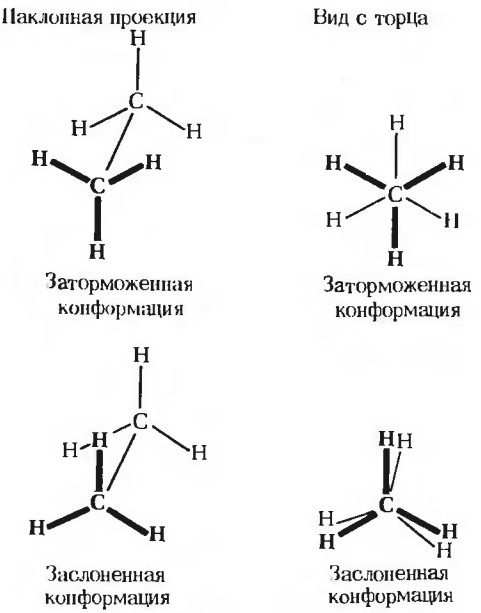


Рис. 7-2. Две крайние конформации молекулы этана. Благодаря свободному вращению вокруг одинарной С—С-связи возможны и многие другие конформации. Различные конформационные формы легко переходят одна в другую, и их нельзя отделить друг от друга. Заторможенная конформация наиболее устойчива и преобладает над всеми другими.

вокруг одинарной С—С-связи окажется сильно ограниченной, что существенно уменьшит число возможных конформаций молекулы этана.

7.2. Как это ни парадоксально, нативные белки имеют только одну или всего лишь несколько конформаций

Поскольку в ковалентном остове полипептидной цепи все связи одинарные, можно было бы ожидать, что полипептид способен принимать в пространстве бесконечное число конформаций. Более того, естественно было бы предположить, что конформация полипептида претерпевает постоянные изменения вследствие теплового движения и беспорядочного вращения участков цепи вокруг каждой из одинарных связей ковалентного остова. Поэтому может показаться парадоксальным тот факт, что полипептидная цепь нативного белка в нормальных биологических условиях – при обычной температуре и нейтральных значениях pH – имеет только одну или очень небольшое число конформаций. Эта *нативная конформация* достаточно устойчива: если выделение белка вести осторожно, избегая воздействий, приводящих к развертыванию цепей и денатурации, то выделенный белок может полностью сохранить свою биологическую активность. Это свидетельствует о том, что вокруг одинарных связей полипептидного остова в нативных белках свободное вращение невозможно. И мы скоро убедимся, что это действительно так. Но сначала мы вкратце ознакомимся с биологией *кератинов* – фибриллярных белков, структура которых дала ключ к изучению конформации белков.

7.3. α-Кератины – фибриллярные белки, синтезируемые клетками эпидермиса

α-Кератины – это основной тип фибриллярных белков, из которых образуются наружные защитные покровы позвоночных. На их долю приходится почти весь сухой вес волос, шерсти, перьев, рогов, ногтей, когтей, игл, чешуи, копыт и черепашьего панцыря (см. рис. 5-1), а также значительная часть сухого веса наружного слоя кожи. α-Кератины представляют собой целое семейство белков. Они, как правило, сходны по аминокислотному составу, содержат много остатков цистина и имеют одинаковое пространственное расположение полипептидных цепей.

Хотя волосы, перья, ногти и другие подобные им наружные образования можно было бы считать, исходя из их ме-



Рис. 7-3. Структура пера птицы. Хотя перья представляют собой почти чистый α-кератин, их полипептидные цепи образуют исключительно сложные структуры, формирующиеся в процессе их развития в клетках эпидермиса. Перья отличаются прочностью и гибкостью; они обеспечивают защиту от неблагоприятных воздействий окружающей среды, а благодаря их пигментации – в какой-то мере и от врагов. Однако прежде всего перья должны быть очень легкими. Для них характерна также микроскопическая адаптация к выполняемой ими биологической функции. Здесь показана фотография пера колибри, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. От стержня пера отходят тысячи бородок, на каждой из которых имеется множество бородочек. Бородочки на конце пера снабжены крошечными крючочками, зацепляющими бородочки соседних перьев. Когда птица чистит перья, она задевает клювом крючочки, в результате чего перья сходятся, как половинки застежки «молния», и все оперенье приобретает обтекаемую форму.

стоположения, внеклеточным материалом, на самом деле кератины синтезируются в клетках эпидермиса, из которого происходят и волосы, и перья, и ногти. В клетках волос полипептидные цепи кератина сначала организуются в волокна, из которых затем формируются структуры наподобие каната или скрученного кабеля, заполняющие в конце концов все пространство клетки. Клетки волос становятся при этом уплощенными и наконец отмирают, а клеточные стенки образуют вокруг каждого волоса трубчатый чехол, называемый *кутикулой*. Ногти и перья, а также чешуя пресмыкающихся развиваются аналогичным образом, хотя они и представляют намного более сложные структуры (рис. 7-3).

α-Кератин, особенно та его форма, которая встречается в составе волос и шерсти, сыграл очень важную роль в развитии наших представлений о структуре белков. Полипептидные цепи α-кератина образуют длинные регулярно скрученные волокна, структуру которых можно исследовать методом рентгеноструктурного анализа; поэтому изучение α-кератина и стало важнейшим этапом в создании наших сегодняшних представлений о значительно более сложных глобулярных белках.

7.4. Рентгеноструктурный анализ показывает, что в кератинах имеются повторяющиеся структурные единицы

Чтобы определить расстояния между атомами в кристалле, на него направляют пучок рентгеновских лучей определенной длины волны и измеряют углы отклонения рентгеновских лучей электронными оболочками атомов кристаллической решетки (углы дифракции); кроме того, измеряют интенсивности отклоненных (дифрагированных) лучей. Рентгеноструктурный анализ, например, кристаллов хлористого натрия показывает, что ионы Na^+ и Cl^- образуют простую кубическую решетку. Методами, основанными на дифракции рентгеновских лучей, можно установить также расстояния между атомами в сложных органических молекулах, даже в таких крупных, как белки. Однако это более трудная задача, чем исследование кристаллов простых солей, так как очень большое число атомов в молекуле белка дает тысячи дифракционных пятен, интенсивности которых можно проанализировать только при помощи вычислительных машин.

В начале 30-х годов Уильям Астбери в Англии провел первые рентгеноструктурные исследования белков, положившие начало новому научному направлению. Он показал, что пучок рентгеновских лучей, направленный на волос или шерстяную нитку, в состав которых входит в основном α-кератин, дает характерную дифракционную картину. На основе анализа этой картины Астбери заключил, что волос и шерсть обладают периодичностью, т.е. содержат повторяющиеся структурные единицы длиной около 0,54 нм, расположенные вдоль оси волоса. Его наблюдения привели в дальнейшем к предположению о том, что полипептидные цепи в белках этого семейства не вытянуты полностью, а скручены или свернуты каким-то регулярным образом.

Кроме того, Астбери обнаружил, что *фиброин* (белок из которого состоят нити шелка), представляющий собой β-кератин, дает несколько иную дифракционную картину, соответствующую структуре с периодом повторяемости 0,70 нм. Интересно, что дифракционная картина, полученная после вытягивания волос или шерсти под горячим паром, характеризуется периодичностью, близкой к 0,70 нм, и сходна с дифракционной картиной шелка. В течение ряда лет из этих наблюдений не удавалось сделать никаких дальнейших выводов из-за отсутствия сведений о трехмерной структуре полипептидов.

7.5. Рентгеноструктурные исследования пептидов свидетельствуют о жесткости и плоской конфигурации пептидных групп

Следующий шаг в развитии наших знаний о пространственной структуре бел-

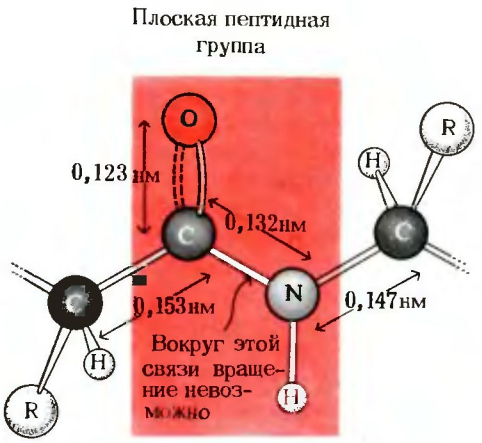


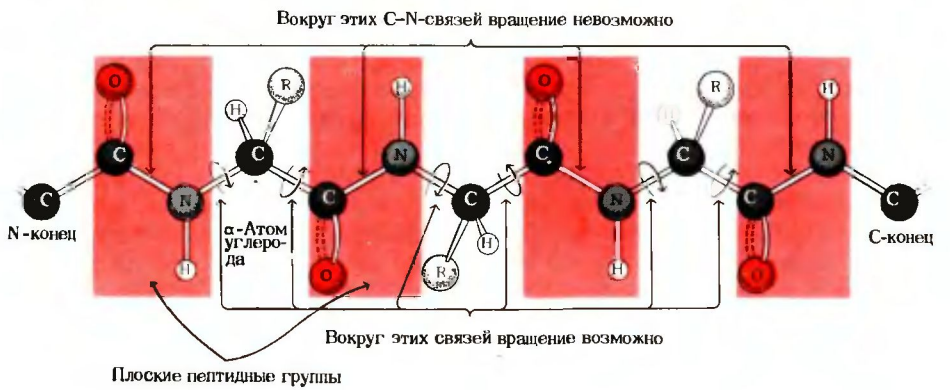
Рис. 7-4. Плоская пептидная группа. С—N-связь частично имеет характер двойной связи и поэтому вокруг нее свободное вращение невозможно. Обратите внимание, что атомы кислорода и водорода лежат в этой плоскости по разные стороны от С—N-связи. Это соответствует *транс*-конфигурации пептидной связи.

ков был сделан в 40-х и начале 50-х годов Лайнусом Полингом и Робертом Кори (США). Они получили дифракционные картины кристаллов аминокислот и простых ди- и трипептидов. На основе этих рентгенограмм им удалось установить точную структуру пептидной группы. Они обнаружили, что С—N-связь, соединяющая два аминокислотных остатка в пептидной цепи (рис. 7-4), короче большинства других С—N-связей, например С—N-связи в простых аминах. Более того, пептидная С—N-связь имеет в какой-то степени характер двойной связи и поэтому вокруг нее не может происходить свободного вращения. Далее эти ученые сделали вывод, что четыре атома пептидной группы лежат в одной плоскости, причем атом кислорода карбонильной группы и атом водорода—NH-группы находятся относительно пептидной связи в *транс*-положении (рис. 7-4). Исходя из всех этих исследований, они заключили, что С—N-связи, составляющие одну треть всех связей полипептидного остова, не допускают свободного вращения и имеют частично характер двойных связей. Таким образом, остов полипептидной цепи можно представить в виде ряда жестких плоскостей, разделенных замещенными метиленовыми группами (—CHR—), как показано на рис. 7.5. Теперь нам ясно, что жесткие пептидные связи накладывают некоторые ограничения на число возможных пространственных конформаций полипептидной цепи.

Рис. 7-5. Ограничения, налагаемые на вращение вокруг одинарных связей полипептидной цепи. С—N-связи, входящие в состав плоских пептидных групп (показанных на красном фоне) и составляющие третью часть всех связей остова, не допускают свободного вращения. Вращение вокруг других одинарных связей остова также в той или иной мере ограничено в зависимости от размеров и заряда R-групп.

7.6. В α-кератине полипептидные цепи имеют форму α-спирали

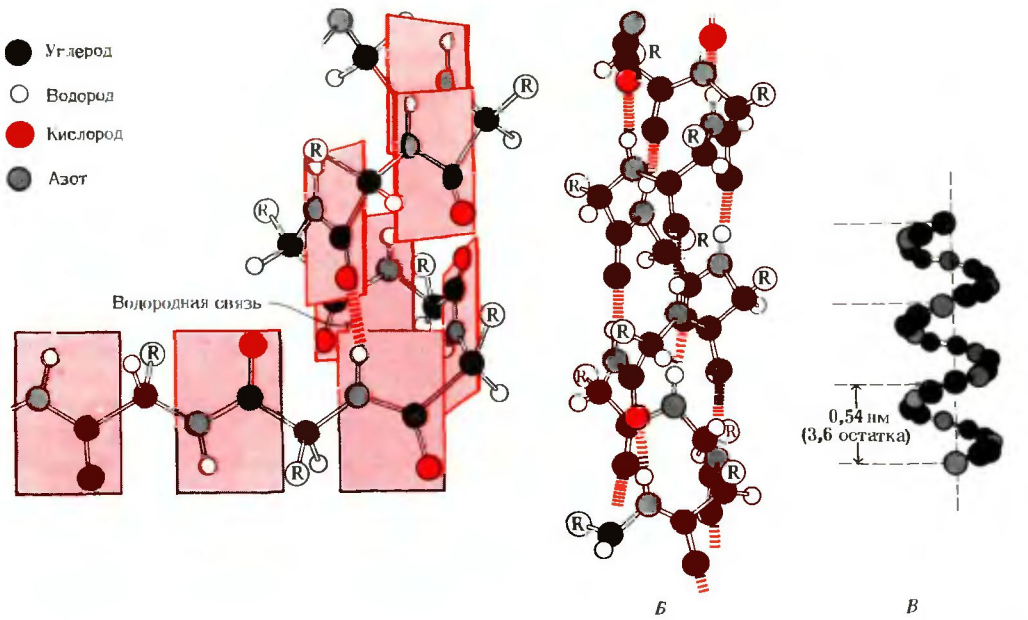
Используя специально изготовленные точные модели, Полинг и Кори изучили возможные способы скручивания или



свертывания полипептидной цепи с учетом ограничений, налагаемых присутствием жестких связей в плоских пептидных группах. Особый интерес они проявили к конформациям, которые могли бы объяснить существование в α-кератине волос периодически повторяющихся единиц длиной около 0,54 нм. Простейшая форма полипептидной цепи, содержащей жесткие пептидные связи (при том, что вокруг всех остальных одинарных связей свобода вращения сохраняется),– это показанная на рис. 7-6 спиральная структура, которую Полинг и Кори назвали α-*спиралью*. В этой структуре полипептидный остов образует плотные витки вокруг длинной оси молекулы, тогда как R-группы аминокислотных остатков выступают из спирального остова наружу. Периодически повторяющаяся единица соответствует одному витку спирали, шаг которой составляет приблизительно 0,54 нм, что хорошо согласуется с периодичностью, наблюдающейся при рентгеноструктурном исследовании кератина волос.

В связи с этим возникает вопрос: за счет каких сил стабилизируется конформация α-спирали? Почему из всех возможных конформаций реализуется именно такая спиральная форма? Ответ заключается в следующем: α-спираль– это устойчивая предпочтительная конформация полипептидной цепи в α-кератине потому, что она допускает образование водородных связей между каждым атомом водорода, соединенным с электроотрицательным атомом азота пептидной связи, и электроотрицательным атомом кислорода карбонильной группы четвертого (считая вдоль цепи назад) аминокислотного остатка (рис. 7-6). В образовании подобных водородных связей участвует каждая пептидная группа. Таким образом, каждый последующий виток α-спирали связан с предшествующим несколькими водородными связями, что придает всей структуре значительную устойчивость. Итак, мы видим, что α-спираль является устойчивой конформацией полипептид-

Рис. 7-6. Три модели α-спирали, показывающие различные особенности ее структуры. *А.* Формирование правой α-спирали. Плоскости жестких пептидных групп параллельны длинной оси спирали. Одна из водородных связей выделена красным цветом. *Б.* Модель α-спирали из стержней и шариков, на которой показаны внутрицепочечные водородные связи. *В.* Шаг спирали соответствует периоду 0,54 нм (3,6 аминокислотных остатков).



ной цепи благодаря существованию двух типов ограничений, не допускающих свободного вращения вокруг одинарных связей: 1) наличию плоских пептидных групп с жесткими связями, вокруг которых вращение невозможно, и 2) образованию большого числа внутрицепочечных водородных связей. В настоящее время имеется множество данных, убедительно свидетельствующих о том, что полипептидные цепи α-кератинов действительно имеют α-спиральную конформацию.

В ходе дальнейшей работы с использованием моделей было показано, что α-спираль может быть построена либо из L-, либо из D-аминокислот, но все аминокислоты должны представлять собой стереоизомеры одного и того же типа, так как пептидная цепь, состоящая из смеси остатков L- и D-аминокислот, не способна образовать спираль. Далее, если использовать только природные L-аминокислоты, то можно построить как правую, так и левую спираль; для большинства фибриллярных белков характерны правые спирали.

7.7. Некоторые аминокислотные остатки препятствуют образованию α-спирали

Хотя в α-кератинах полипептидная цепь имеет α-спиральную конформацию, не все полипептиды способны образовывать устойчивую α-спираль. Например, если в полипептидной цепи подряд расположено много остатков глутаминовой кислоты, то при pH 7,0 такой участок не примет α-спиральной конформации. Причина состоит в том, что сильное взаимное отталкивание отрицательно заряженных карбоксильных групп соседних остатков глутаминовой кислоты значительно превосходит стабилизирующее влияние водородных связей в α-спирали. По той же причине при pH 7,0 не будут иметь α-спиральной конформации участки цепи, содержащие большое число близко расположенных друг к другу остатков лизина или аргинина, R-группы которых несут при этом значении pH положительный заряд; взаимное отталкивание этих остатков будет препятствовать образованию α-спирали. Некоторые другие аминокислоты, например аспарагин, серин, треонин и лейцин, также мешают образованию α-спирали, если они расположены в цепи близко одна к другой; в этом случае причиной служат большие размеры и форма их R-групп.

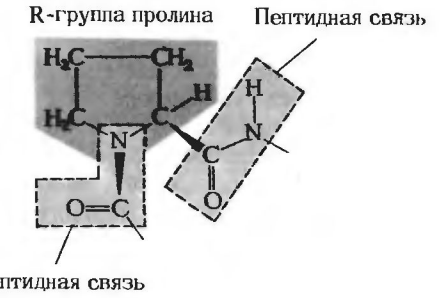


Рис. 7-7. Наличие остатка пролина в полипептидной цепи вызывает ее изгиб. Серым цветом выделены жесткие пептидные группы. Жесткая R-группа пролина показана на красном фоне.

Еще одним препятствием, мешающим образованию α-спирали, является присутствие в полипептидной цепи одного или большего числа остатков пролина. В пролине атом азота входит в состав жесткого кольца, что исключает возможность какого бы то ни было вращения вокруг N—C-связи (рис. 7-7). Кроме того, при атоме азота в остатке пролина, образующем пептидную связь с другой аминокислотой, нет атома водорода. Поэтому остаток пролина, входящий в состав полипептидной цепи, не способен образовать внутрицепочечную водородную связь. Вследствие этого везде, где в полипептидной цепи встречаются остатки пролина, α-спиральная структура нарушается и возникает петля или изгиб.

Итак, мы имеем четыре типа различных ограничений, налагаемых на пространственную конформацию полипептидной цепи: 1) жесткость и *транс*-конфигурация пептидных связей, 2) электростатическое отталкивание (или притяжение) аминокислотных остатков, содержащих заряженные R-группы; 3) близкое расположение в цепи громоздких

R-групп и 4) присутствие в полипептидной цепи остатков пролина.

Теперь мы введем новый важный термин. Мы уже упоминали, что ковалентные пептидные связи и аминокислотную последовательность полипептидных цепей называют *первичной структурой*. Под термином *вторичная структура* мы будем понимать пространственное расположение, т. е. *конформацию*, соседних аминокислотных остатков в полипептидной цепи. В случае α-кератина вторичная структура полипептидной цепи представляет собой α-спираль.

7.8. В α-кератинах содержится много аминокислот, способствующих образованию α-спиральной структуры

Остов полипептидной цепи автоматически принимает ту пространственную конформацию, которая хорошо соответствует целому ряду ограничений, налагаемых аминокислотным составом цепи и последовательностью аминокислотных остатков. В полипептидных цепях нативных α-кератинов аминокислотный состав и последовательность аминокислот благоприятствуют самопроизвольному образованию α-спирали со множеством стабилизирующих ее внутрицепочечных водородных связей. α-Кератины богаты аминокислотами, обеспечивающими образование α-спирали, и содержат очень мало аминокислот (например, пролина), не совместимых с существованием α-спиральной конформации. α-Кератины особенно богаты остатками цистина (рис. 7-8), способными, как мы уже знаем (разд. 5-7), образовывать поперечные дисульфидные (—S—S—) связи между соседними полипептидными цепями. Эти связи ковалентны и потому обладают большой прочностью. Такие ковалентные поперечные связи, в образовании которых участвует много остатков цистина, связывают воедино соседние α-спирали и наделяют волокна α-кератина способностью к прочному слипанию друг с другом.

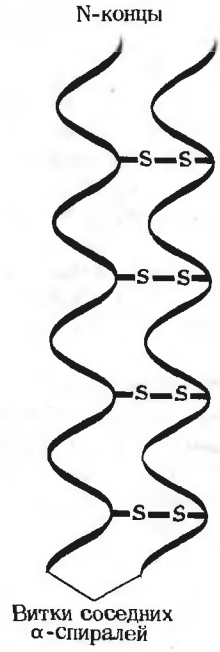


Рис. 7-8. Поперечные связи между соседними α-спиральными витками α-кератина обусловлены присутствием в них остатков цистина. В «твердых» кератинах, например в кератине панцыря черепахи, цистиновые поперечные связи весьма многочисленны.

7.9. В нативных α-кератинах α-спиральные полипептидные цепи скручены наподобие каната

Если волосы или шерсть исследовать с помощью электронного микроскопа, то можно увидеть (особенно в местах разрыва, где волос расщепляется на отдельные нити), что каждый волос состоит из множества фибрилл и что каждая фибрилла в свою очередь состоит из многих еще более тонких нитей, навитых друг на друга наподобие каната. Более детальные данные, полученные при помощи рентгеноструктурного анализа, позволили сделать вывод, что в волосе три α-спиральные полипептидные цепи скручены одна вокруг другой и образуют суперспирализованную структуру, напоминающую трехжильный кабель (рис. 7-9), в котором каждая жила представляет собой α-спираль. В структурах такого типа



Рис. 7-9. Структура волоса и входящего в его состав α-кератина. Основным элементом структуры служит полипептидная цепь α-кератина в нативной α-спиральной конформации. Три α-спиральные цепи образуют скрученный (суперспирализованный) трехжильный «канат»; 11 таких канатов составляют микрофибриллу волоса.

все составляющие их α-спиральные полипептиды расположены в одном направлении, так что все N-концевые остатки оказываются на одном и том же конце. В α-кератине волóс полипептидные цепи прочно соединены друг с другом ковалентными поперечными связями между остатками цистина, принадлежащими соседним полипептидным цепям. α-Кератины из разных источников различаются по содержанию цистина. Самые прочные и жесткие α-кератины, например α-кератины в панцыре черепахи, содержат до 18% цистина.

7.10. α-Кератины нерастворимы в воде из-за преобладания в их составе аминокислот с неполярными R-группами

α-Кератины замечательны не только своей физической прочностью, но и тем, что они полностью нерастворимы в воде при pH 7,0 и физиологической температуре. В этом отношении α-кератины составляют разительный контраст с глобулярными белками, такими, как сывороточный альбумин, из которого благодаря его хорошей растворимости в воде можно приготовить 60%-ный раствор. Как можно объяснить такую разницу между двумя белками, построенными из одного и того же набора 20 аминокислот?

Частично это обусловлено тем, что в каждом из этих белков преобладают разные типы аминокислот. α-Кератины особенно богаты аминокислотами, содержащими гидрофобные, нерастворимые в воде R-группы. К таким аминокислотам относятся фенилаланин, изолейцин, валин, метионин и аланин. Кроме того, мы видели, что в полипептидных цепях α-кератинов R-группы аминокислотных остатков расположены с наружной стороны обвитых одна вокруг другой спиралей. В результате на поверхности фибрилл α-кератина оказывается большое число гидрофобных R-групп, занимающих фиксированное положение и обращенных в сторону водной фазы. Именно этим и объясняется нерастворимость α-кератина. Хотя в глобулярных белках тоже может содержаться много гидрофобных R-групп, полипептидные цепи этих белков свернуты таким образом, что гидрофобные R-группы оказываются спрятанными внутри глобулы, где они не соприкасаются с водой, а на наружной поверхности распола-

гаются гидрофильные, или полярные, R-группы. Поэтому глобулярные белки, такие, как сывороточный альбумин, обычно хорошо растворимы в водных системах.

7.11. β-Кератины имеют другую конформацию полипептидной цепи, называемую β-структурой

β-Кератины, в частности *фиброин* (белок шелка и паутины), тоже принадлежат к категории нитевидных нерастворимых белков; хотя они более гибки, вместе с тем с трудом поддаются растяжению. Они отличаются от α-кератинов тем, что имеют другую периодичность структуры, элементы которой повторяются через каждые 0,70 нм. Еще одно различие между α- и β-кератинами сыграло важную роль в установлении структуры β-кератинов. При обработке α-кератина волос паром его можно растянуть почти вдвое по сравнению с исходной длиной. В этом растянутом состоянии он дает рентгенограммы, напоминающие рентгенограммы, характерные для фиброина шелка. Отсюда был сделан вывод, что при растяжении α-кератин волос утрачивает α-спиральную конформацию и его полипептидная цепь приобретает вытянутую конформацию, почти вдвое превышающую по длине α-спираль. Это происходит потому, что в обработанном паром волосе разрываются водородные связи, стабилизирующие α-спираль, витки спирали распрямляются и принимают более вытянутую конформацию. Если α-кератину, обработанному паром, снова дать остыть и снять нагрузку, он самопроизвольно возвращается к исходной α-спиральной конформации.

Более вытянутая конформация полипептидных цепей в шелке, растянутом волосе и шерсти была установлена методом рентгеноструктурного анализа и названа β-*конформацией*. Как показано на рис. 7-10, остов полипептидной цепи в β-конформации вытянут таким образом, что имеет уже не спиральную, а зигзагообразную структуру. В фиброине зигзагообразные полипептидные цепи уложены параллельно друг другу в виде целого ряда складок; поэтому такая структура называется *складчатым слоем* (рис. 7-10). Для β-конформации характерно отсутствие *внутрицепочечных* водородных связей. Вместо них образуются *межцепочечные* водородные связи между пептидными группами *соседних* полипептидных цепей, находящихся в вытянутой конформации. В образовании таких межцепочечных водородных связей участвуют все пептидные группы β-кератина. R-группы аминокислот выступают по обе стороны зигзагообразной структуры, что хорошо видно при изображении полипептидной цепи в боковой проекции. Существуют еще два важных различия между α- и β-кератинами. Во-первых, в β-кератинах нет поперечных цистиновых связей между соседними цепями, и, во-вторых, соседние полипеп-

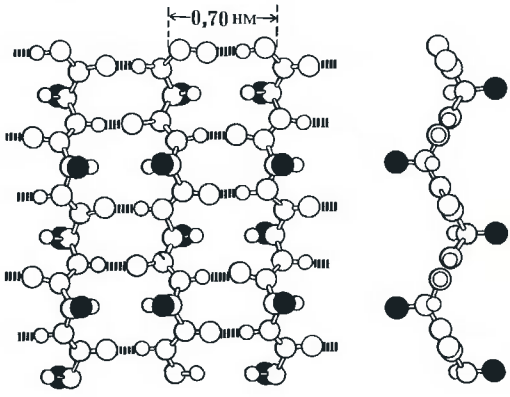


Рис. 7-10. β-Конформация полипептидных цепей в β-кератинах. *А*. Три цепи, образующие складчатый слой (вид сверху); показано расположение поперечных водородных связей между соседними цепями. R-группы выделены красным цветом. *Б*. Та же структура (вид сбоку): показано расположение R-групп, выступающих по обе стороны складчатого слоя.

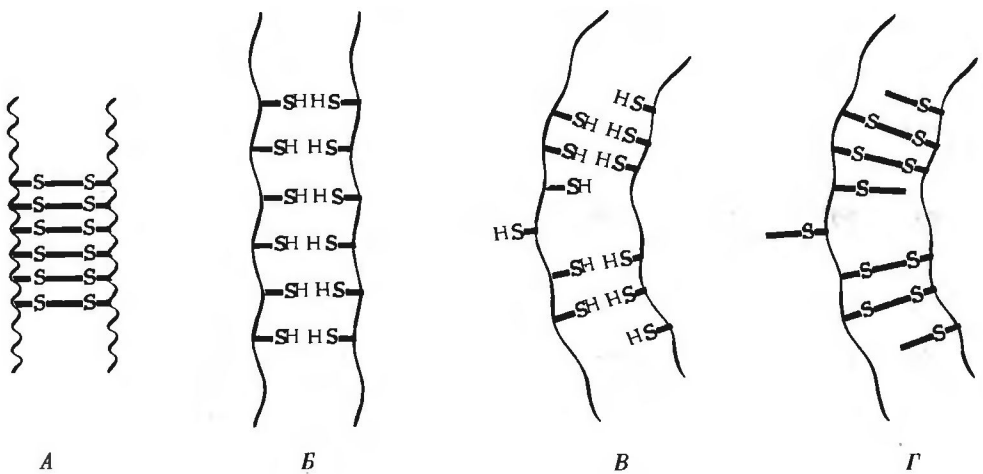
тидные цепи в β-кератинах обычно направлены в противоположные стороны, т.е. имеют *антипараллельную* ориентацию, тогда как для цепей α-кератина характерна *параллельная* ориентация (см. рис. 7-8).

β-Структура может образоваться только при наличии в составе полипептида соответствующих аминокислот, расположенных в определенной последовательности. Необходимо, в частности, чтобы R-группы аминокислотных остатков имели сравнительно небольшие размеры. Так, в фиброине шелка и других β-кератинах, например в белке паутины, наблюдается очень высокое содержание глицина и аланина – аминокислот с наименьшими по размеру R-группами. Примечательно, что в фиброине шелка каждой второй аминокислотой является глицин.

7.12. Перманентная завивка волос – пример биохимической технологии

Мы уже знаем, что α-кератины при нагревании в увлажненном состоянии могут растягиваться и принимать β-конформацию, но при остывании они самопроизвольно возвращаются в α-спиральную конформацию. Это происходит вследствие того, что в α-кератинах R-группы в среднем крупнее, чем в β-кератинах, и потому β-конформация α-кератинов оказывается неустойчивой. Это свойство α-кератинов наряду с высоким содержанием в них дисульфидных поперечных связей лежит в основе перманентной завивки волос (рис. 7-11). Сначала волосы накручивают на специальные трубочки (бигуди), чтобы придать им нужную форму, а затем смачивают их раствором восстанавливающего агента (обычно для этой цели используют соединение, содержащее тиоловую, или сульфгидрильную, группу) и прогревают. Восстанавливающий агент разрывает поперечные дисульфидные связи, восстанавливая цистин, который при этом превращается в два остатка цистеина – по одному в каждой цепи. Нагревание увлажненных волос приводит к разрушению водородных связей, вследствие чего α-спиральная структура полипептидных

Рис. 7-11. Последовательные стадии перманентной завивки волос. *А.* В прямом волосе α-спиральные витки кератина выстроены в одну прямую линию и стабилизированы поперечными дисульфидными связями. *Б.* Для того чтобы сделать волосы вьющимися, поперечные связи разрушают восстанавливающим агентом, под действием которого дисульфидные связи цистина превращаются в тиоловые группы остатков цистеина, расположенных в двух соседних цепях. *В.* Волосы механически изгибают, накручивая их на специальные трубочки. При изгибании полипептидных цепей соответствующие друг другу тиоловые группы смещаются. *Г.* При окислении —SH-групп возникают новые поперечные цистиновые связи; они и делают образовавшиеся завитки волос «перманентными».



цепей в кератине волос раскручивается и цепи растягиваются. Через некоторое время восстанавливающий раствор смывают и волосы обрабатывают окисляющим агентом, который способствует образованию *новых* дисульфидных связей между ближайшими парами остатков цистеина в соседних полипептидных цепях, но это уже не те пары, которые были соединены друг с другом в необработанном белке. После промывки и остывания волос полипептидные цепи вновь приобретают α-спиральную конформацию; однако теперь волосы образуют вьющиеся пряди желаемой формы, стабилизированные новыми дисульфидными поперечными связями, которые обеспечивают дополнительное скручивание или изгибание пучков α-спиралей в соответствии с формой прядей.

7.13. Коллаген и эластин – главные фибриллярные белки соединительных тканей

Соединительная ткань состоит из межклеточных элементов, выполняющих структурные и опорные функции; на ее долю приходится значительная часть всего органического вещества, содержащегося в теле высших животных. Сухожилия, связки, хрящи и органический матрикс костей – это наиболее знакомые нам элементы соединительной ткани. Соединительная ткань окружает кровеносные сосуды, образует важную в структурном отношении подкожную клетчатку, связывает между собой клетки отдельных тканей и заполняет пространство между клетками так называемым основным веществом. Существуют три главных молекулярных компонента соединительной ткани: два фибриллярных белка – *коллаген* и *эластин*, которые в разных соотношениях присутствуют в большинстве соединительных тканей, и *протеогликаны* – семейство гибридных молекул, представляющих собой белки, ковалентно связанные с полисахаридами.

Фибриллы коллагена не растягиваются, тогда как для фибрилл эластина характерна высокая степень растяжимости. Сухожилия, при помощи которых мышечное усилие передается костям, состоят в основном из коллагена. Связки, богатые эластином, соединяют кости скелета и удерживают их в суставах. Они должны быть гибкими и эластичными. Если связки коленного или плечевого сустава растянутся слишком сильно, то концы костей смещаются и выходят из суставов, однако их можно вправить обратно. Протеогликаны отличаются от гликопротеинов (разд. 6.4) тем, что содержат много полисахарида и относительно мало белка, тогда как в гликопротеинах значительно больше белка и меньше углевода. Протеогликаны выполняют функцию *основного вещества*, в которое погружены или которым покрыты волокнистые элементы соединительной ткани. Протеогликаны играют также роль межтканевых прослоек и служат смазочным материалом в суставах.

Коллаген, эластин и протеогликаны синтезируются в *фибробластах* и *хондроцитах* – специализированных клетках соединительной ткани. Затем эти белки выталкиваются из клеток и приобретают структурную организацию, свойственную различным элементам соединительной ткани.

7.14. Коллаген – самый распространенный белок у высших животных

На долю коллагена приходится почти треть всей массы белков позвоночных; в количественном отношении коллаген преобладает над всеми другими белками. Чем крупнее животное, тем большую часть всего белка составляет коллаген. Тело коровы, весящей 400 кг, скрепляется и поддерживается в основном системой прочных коллагеновых волокон, находящихся в коже, сухожилиях, хрящах и костях животного.

Коллагеновая соединительная ткань состоит из волокон, которые в свою очередь состоят из коллагеновых фибрилл, характеризующихся поперечно-исчерченной структурой (рис. 7-12). Эти фибриллы организованы различным образом в зависимости от биологической функции соединительной ткани. В сухо-

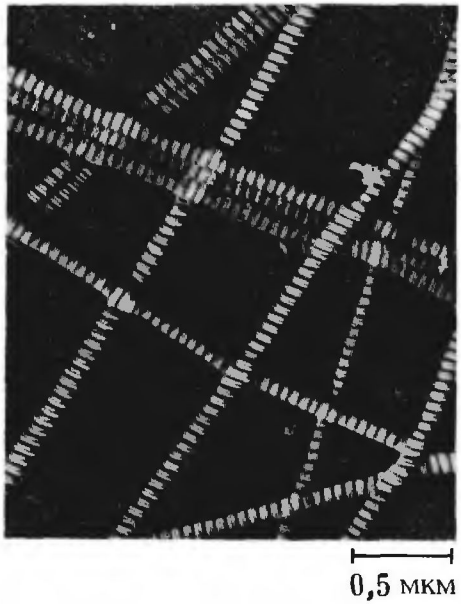


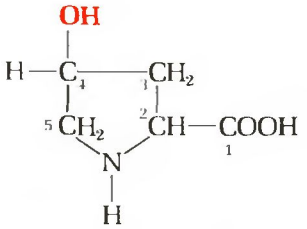
Рис. 7-12. Электронная микрофотография коллагеновых фибрилл соединительной ткани. Обратите внимание на периодичность поперечных полос в фибриллах. В коллагенах многих тканей эти полосы повторяются примерно через каждые 64 нм.

жилиях фибриллы коллагена расположены в виде поперечно-связанных параллельных пучков, обладающих очень большой прочностью на разрыв и практически нерастяжимых. Фибриллы коллагена могут выдерживать нагрузку, вес которой по меньшей мере в 10 000 раз превышает их собственный вес, т. е. по прочности они превосходят стальную проволоку равного поперечного сечения. В коже коровы фибриллы коллагена образуют нерегулярно сплетенную и очень густую сеть; напомним, что выделанная кожа представляет собой почти чистый коллаген. В роговице глаза имеются слои коллагеновых фибрилл, уложенных крест-накрест. Но каким бы ни было расположение фибрилл коллагена в различных соединительных тканях, на электронных микрофотографиях в них всегда обнаруживается характерная регулярно повторяющаяся поперечная исчерченность с периодом от 60 до 70 нм (в зависимости от источника получения коллагена). Точное значение периода может несколько варьировать, поскольку коллаген – это не индивидуальный белок, а семейство очень сходных белков с некоторыми структурными различиями, зависящими от анатомической функции этих белков и вида организма. Чаще всего коллаген имеет периодичность 64 нм.

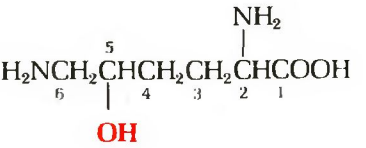
7.15. Коллаген обладает как обычными, так и необычными свойствами

При кипячении в воде волокнистый, нерастворимый и неперевариваемый коллаген превращается в *желатину* – растворимую смесь полипептидов, которую в кулинарии используют для приготовления желе. В ходе этого превращения происходит гидролиз некоторых ковалентных связей коллагена – одна из главных причин, по которой мясо приходится подвергать тепловой обработке, так как именно коллаген соединительной ткани и кровеносных сосудов делает мясо жестким. Имеющиеся в продаже специальные препараты для размягчения мяса содержат смесь растительных ферментов, способных гидролизовать некоторые пептидные связи коллагена, в результате чего он превращается в растворимые, легко усваиваемые полипептиды.

Коллагены содержат около 35% остатков *глицина* и примерно 11% остатков *аланина* (необычно большие количества этих аминокислот). Еще более характерным отличительным признаком коллагена служит высокое содержание *пролина* и *4-гидроксипролина* (рис. 7-13) – аминокислоты, которая, за исключением коллагена и эластина, редко встречается в белках. В сумме на долю пролина и гидроксипролина приходится около 21% всех аминокислотных остатков коллагена. Необычный аминокислотный состав коллагена с значительным преобладанием четырех аминокислот над всеми другими определяет относительно низкую питательную ценность желатины как пищевого белка. Самые лучшие пищевые белки содержат все 20 аминокислот, и в частности 10 аминокислот, образующих группу так называемых *незаменимых аминокислот*, которые должны



4-гидроксипролин



5-гидроксилизин

Рис. 7-13. Две нестандартные аминокислоты, присутствующие в коллагене. Они образуются из стандартных аминокислот – пролина и лизина – путем их гидроксилирования (введенные гидроксильные группы выделены красным цветом).

присутствовать в пище большинства животных.

Напомним, что пролин и гидроксипролин образуют изгибы в полипептидных цепях, и потому их присутствие в белках несовместимо с существованием α-спиральной структуры.

7.16. Полипептиды в коллагене представляют собой трехцепочечные спиральные структуры

Фибриллы коллагена состоят из повторяющихся полипептидных субъединиц, называемых *тропоколлагеном*. Эти субъединицы уложены вдоль фибриллы в виде параллельных пучков по типу «голова к хвосту» (рис. 7-14). Головки параллельно расположенных молекул тропоколлагена сдвинуты относительно друг друга ступенчатым образом на одно и то же расстояние в продольном направлении. Этим объясняется характерная для коллагеновых волокон поперечная исчерченность, которой соответствует период 64 нм.

Коллагеновые волокна дают рентгенограмму, отличающуюся от рентгенограмм α- и β-кератинов. На основе данных рентгеноструктурного анализа был сделан вывод, что тропоколлагеновые субъединицы состоят из трех полипептидных цепей, плотно скрученных в виде трехжильного каната.

Тропоколлаген представляет собой палочкообразную молекулу длиной 300 нм и толщиной всего лишь 1,5 нм. Его молекулярная масса составляет приблизительно 300 000. Три спирально навитые друг на друга полипептидные цепи имеют равную длину, и в каждой из них

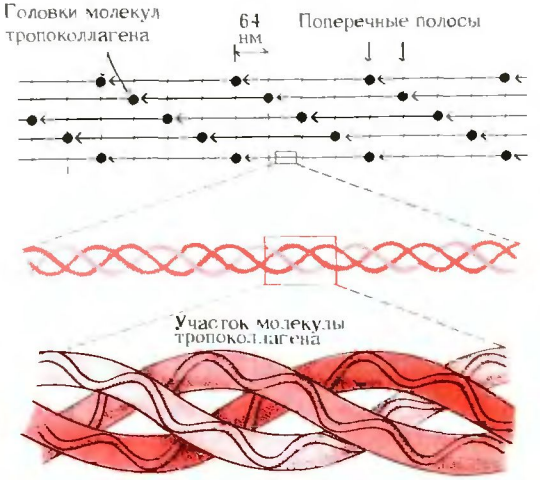


Рис. 7-14. Расположение молекул тропоколлагена в коллагеновых фибриллах. В каждой молекуле тропоколлагена обнаруживаются четыре поперечные полосы, повторяющиеся с интервалом 64 нм. Головки молекул тропоколлагена расположены так, что они сдвинуты относительно друг друга на 64 нм. Ниже схематического изображения фибриллы показан участок молекулы тропоколлагена в виде остова тройной спирали. В самом низу дано еще более сильно увеличенное изображение тройной спирали, показывающее, что каждая из полипептидных цепей тропоколлагена также представляет собой спираль; шаг и период этой спирали определяются геометрией жестких R-групп многочисленных остатков пролина и гидроксипролина.

содержится около 1000 аминокислотных остатков. В одних коллагенах все три цепи имеют одинаковую аминокислотную последовательность, тогда как в других идентичны только две цепи, а третья отличается от них. Достигнут весьма значительный прогресс в определении аминокислотной последовательности основных типов коллагеновых цепей, которые относятся к числу наиболее длинных из известных полипептидных цепей белков.

Рентгеноструктурные исследования показали, что каждая полипептидная цепь тропоколлагена тоже представляет собой спираль, хотя ее периодичность и размеры весьма отличаются от соответствующих параметров α-спирали. Полипептидная цепь тропоколлагена образует левую спираль, на один виток которой приходится только три аминокислотных остатка. Поскольку в коллагене присутствует много остатков пролина и гидроксипролина, что придает цепи жесткую изогнутую конформацию, три спиральные полипептидные цепи плотно обвиты одна вокруг другой. Они соединены между собой также поперечными водородными связями. Кроме того, в коллагене обнаружены ковалентные связи необычного типа, образующиеся между двумя остатками лизина, находящимися в соседних цепях (рис. 7-15). Расположенные рядом друг с другом тропоколлагеновые тройные спирали тоже соединены поперечными связями. Тропоколлаген практически нерастяжим вследствие очень плотной скрученности его тройных спиралей, а также из-за наличия поперечных связей. Тропоколлаген содержит боковые углеводные цепи, присоединенные к гидроксильным группам гидроксилизина.

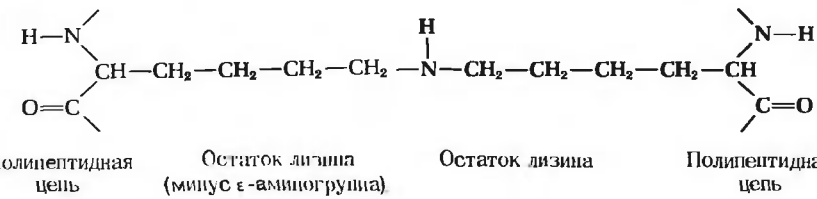
По мере того как мы становимся старше, в тропоколлагеновых субъединипах и между ними образуется все большее число поперечных связей, что делает фибриллы коллагена в соединительной ткани более жесткими и хрупкими. Поскольку коллаген присутствует в очень многих структурах, его увеличивающиеся при старении хрупкость и жесткость изменяют механические свойства хрящей и сухожилий, делают более ломкими кости и понижают прозрачность роговицы глаза.

Коллагеновая спираль уникальна, так как не встречается ни в каких других белках, кроме коллагена, в отличие от α-спирали и β-конформации, которые хотя бы в виде небольших участков обнаруживаются во многих глобулярных белках.

7.17. Структура эластина придает особые свойства эластической ткани

К основным типам соединительной ткани, богатой эластином, но содержащей также небольшое количество коллагена, относятся желтая эластическая ткань связок и эластический слой соединительной ткани в стенках крупных артерий. Упругие артериальные стенки помогают распределять нагнетаемую сердцем кровь по кровеносным сосудам и сглаживать пульсовые колебания давления крови, создаваемые сокращениями сердца. В состав эластической соединительной ткани входит фибриллярный белок, который по ряду свойств напоминает коллаген, но по некоторым свойствам сильно от него отличается. Основная субъединица фибрилл эластина – *тропоэластин* – имеет молекулярную массу, равную приблизительно 72 000, и содержит

Рис. 7-15. Один из типов поперечных связей между параллельными цепями коллагена. Такие связи образуются ферментативным путем при соединении двух остатков лизина, принадлежащих соседним цепям.



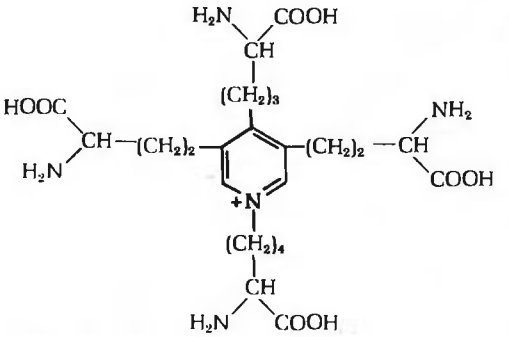
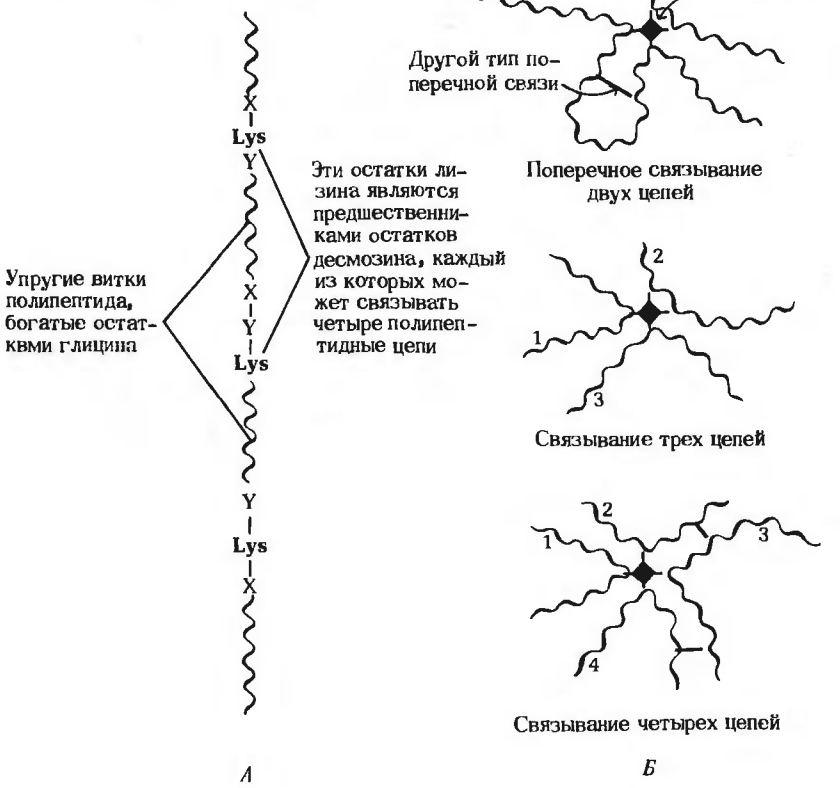


Рис. 7-16. Остаток десмозина – особой аминокислоты, обнаруженной только в эластине. Ее центральная циклическая структура образуется путем взаимодействия R-групп (выделены красным цветом) четырех остатков лизина, что приводит к возникновению поперечных связей между полипептидными цепями эластина (см. рис. 7-17).

около 800 аминокислотных остатков. Подобно коллагену, эластин богат глицином и аланином. Тропоэластин отличается от тропоколлагена тем, что содержит много остатков лизина, но мало остатков пролина. Тропоэластин образует спираль особого типа, отличающуюся как от α-спирали, так и от коллагеновой спирали. Молекула тропоэластина состоит из богатых остатками глицина спиральных участков, разделенных более короткими участками, содержащими остатки лизина и аланина.

Рис. 7-17. Молекулы тропоэластина, из которых формируется сеть связанных между собой полипептидиых цепей эластина.
А. Сегмент молекулы тропоэластина. *Б.* Точная структура эластина не установлена. Известно, однако, что молекулы тропоэластина соединены поперечными связями и образуют единую двумерную или трехмерную сеть, обладающую высокой степенью эластичности. Помимо остатков десмозина (выделенных цветом), связывающих между собой две, три или четыре молекулы тропоэластина, как показано на рисунке, в эластине имеются и другие виды поперечных связей (тоже выделенных красным цветом).



Спиральные участки растягиваются при натяжении, но возвращаются к исходной длине при снятии нагрузки. Области, содержащие остатки лизина, принимают участие в формировании ковалентных поперечных связей. Четыре R-группы лизина сближаются друг с другом и ферментативным путем превращаются в *десмозин* (разд. 5.10), структура которого показана на рис. 7-16, или в сходный по структуре *изодесмозин*. Таким путем полипептидные цепи тропоэластина могут объединяться в системы, способные обратимо растягиваться во всех направлениях (рис. 7-17).

7.18. Что говорят нам фибриллярные белки о структуре белков?

Исследование фибриллярных белков, о которых шла речь в этой главе, позволяет сделать три главных вывода, касающиеся структуры белков. Прежде всего, мы видим, что белки обладают не только первичной структурой, т. е. ковалентным остовом, но и характерной вторичной структурой, которая определяется пространственным расположением последовательных аминокислотных остатков, образующих полипептидную цепь.

Второй важный вывод заключается в том, что вторичная структура полипептидов, в частности α-спираль и β-конформация, возникает самопроизвольно и автоматически вследствие того, что данный полипептид имеет определенный аминокислотный состав и определенную аминокислотную последовательность. Характерная вторичная структура белка – это его наиболее устойчивая форма при заданных биологических условиях. α-Спираль и β-структура стабилизируются множеством водородных связей – *внутрицепочечных* в случае α-спирали и *межцепочечных* в случае β-структуры. Хотя водородные связи, взятые в отдельности, относительно слабы, все вместе они придают α-спирали и β-структуре значительную устойчивость.

Третий вывод состоит в том, что трехмерные конформации фибриллярных белков приспособлены к выполнению белками специфических биологических функций. Так, α-спиральная структура α-кератина хорошо приспособлена к тому, чтобы образовывать наружные защитные структуры – волосы, перья, рога и чешую позвоночных; β-конформация способствует образованию гибких и нерастяжимых нитей шелка и паутины, а конформация коллагена обеспечивает высокую прочность на разрыв, необходимую для сухожилий (табл. 7-1). В конечном счете все эти специфические биологические свойства возникают благодаря определенной последовательности аминокислотных остатков в фибриллярных белках. Изучение вторичной структуры фибриллярных белков стало важной вехой на пути к пониманию значительно более сложной трехмерной структуры глобулярных белков. Как мы увидим в следующей главе, сегменты α-спиралей и β-структуры часто обнаруживаются и в глобулярных белках.

Таблица 7-1. Вторичная структура и свойства фибриллярных белков

Структура	Характеристики	Примеры
α-Спираль с поперечными связями, образованными остатками цистина	Прочные нерастворимые защитные структуры различной твердости и гибкости	Волосы, перья, ногти
β-Конформация	Мягкие гибкие нити	Шелк
Тройная коллагеновая спираль	Выдерживает высокую нагрузку без растяжения	Сухожилия, костный матрикс
Цепи эластина с поперечными связями, образованными остатками десмозина	Эластичное растяжение в двух измерениях	Связки

7.19. Другие типы фибриллярных или нитевидных белков, встречающихся в клетках

Скелетные мышцы, равно как и многие немышечные клетки, содержат два белка – *миозин* и *актин*, образующие характерные фибриллярные или нитевидные структуры. По своей биологической функции они представляют собой не столько структурные белки, сколько белки, участвующие в зависимых от энергии процессах сокращения.

Миозин – это очень длинная палочковидная молекула с хвостом, состоящим из двух навитых друг на друга α-спиральных полипептидов; она имеет также сложную по своему строению «головку», обладающую ферментативной активностью (рис. 7-18). Общая молекулярная масса миозина составляет 450 000, молекула имеет в длину около 160 нм и содержит шесть полипептидных цепей. Длинный хвост состоит из двух цепей, каждая с молекулярной массой 200 000; это *тяжелые цепи*, в которых находятся гибкие шарнирные участки. Головка имеет глобулярную форму и содержит концы тяжелых цепей, а также четыре легкие цепи, свернутые в виде глобул, каждая с молекулярной массой около 18 000. Головка молекулы миозина обладает ферментативной активностью; она катализирует гидролитическое расщепление ATP на ADP и фосфат. Многочисленные молекулы миозина, регулярно уложенные в виде пучка, образуют *толстые нити* скелетной мышцы. Миозин встречается и в немышечных клетках (см. рис. 2-15 и разд. 2.13).

С толстыми нитями в скелетной мышце тесно взаимодействуют *тонкие нити*, состоящие из белка актина. Актин существует в двух формах: в виде *глобулярного актина* (G-актин) и *фибриллярного актина* (F-актин). Фибриллярный актин представляет собой длинную цепочку из молекул G-актина (мол. масса 46 000), связанных друг с другом в одну нить. Две нити F-актина навиваются одна на другую и образуют двухнитевую скрученную структуру (рис. 7-18).

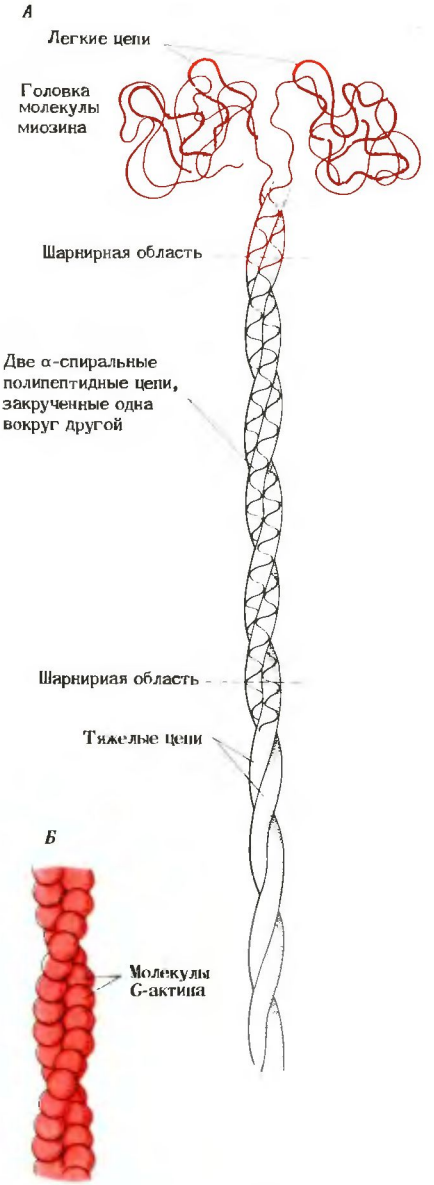


Рис. 7-18. Миозин и актин – два нитевидных белка сократительной системы. *А*. Молекула миозина имеет длинный хвост, состоящий из двух суперспирализованных α-спиральных полипептидных цепей (тяжелые цепи). Головка молекулы, содержащая четыре легкие цепи, обладает ферментативной активностью: она способна отщеплять от ATP фосфатную группу. *Б*. Схема строения F-актина, состоящего из двух обвитых одна вокруг другой цепей G-актина.

В сократительной системе мышцы толстые нити (состоящие из молекул миозина) и тонкие нити (состоящие из G-актина) уложены параллельными рядами. Как мы увидим ниже (гл. 14 и 25), сокращение скелетной мышцы происходит благодаря скольжению тонких нитей вдоль толстых, причем это скольжение индуцируется в присутствии некоторых других мышечных белков и ионов Ca^{2+}. Скольжение нитей, обусловливающее укорочение скелетной мышцы в процессе сокращения, осуществляется только при наличии в системе АТР.

Еще одна система длинных нитевидных белков имеется в *микротрубочках*, о которых речь шла выше (разд. 2.14 и 2.15). Микротрубочки – это длинные полые трубки, каждая из которых построена из 13 белковых нитей, уложенных параллельно друг другу вокруг центральной полости. Каждая нить состоит из чередующихся молекул двух глобулярных белков – α-тубулина и β-тубулина. Микротрубочки входят в состав ресничек и жгутиков эукариот; их взаимное скольжение или скручивание относительно друг друга сообщает ресничкам и жгутикам характерное винтообразное, вращательное или волнообразное движение, обеспечивающее перемещение клеток. Микротрубочки участвуют во многих других видах клеточной активности, например в делении клеток; некоторым клеткам они придают ту или иную форму. Движение микротрубочек в жгутиках тоже зависит от гидролиза АТР.

Краткое содержание главы

Существуют четыре типа фибриллярных белков, выполняющих в животных организмах защитную или структурную роль: α-кератин, β-кератин, коллаген и эластин. При их изучении были получены важные сведения о соотношении между структурой и функцией молекул белков. α-Кератины – это нерастворимые и плотные белки, входящие в состав волос, шерсти, перьев, чешуи, рогов и копыт, а также панцыря черепахи. Рентгеноструктурный анализ показывает, что фибриллы α-кератина имеют период повторяемости около 0,54 нм и что их полипептидные цепи скручены в спираль. Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют также о жесткости и плоской конфигурации пептидных групп. Это обусловлено тем, что C—N-связи полипептидного остова частично имеют характер двойных связей. На основе этих наблюдений был сделан вывод, что полипептидные цепи α-кератина существуют в форме правых α-спиралей, на каждый виток которых приходится 3,6 аминокислотных остатков, при этом шаг спирали составляет 0,54 нм. Все пептидные группы участвуют в образовании внутрицепочечных водородных связей, стабилизирующих α-спираль. Дестабилизирующее действие на α-спираль оказывают расположенные по соседству R-группы, несущие электрический заряд одного и того же знака или имеющие большие размеры, а также остатки пролина, которые изгибают цепь и искажают α-спираль. Волосы представляют собой скрученные наподобие каната многожильные структуры, образованные α-спиральными полипептидными цепями, обвитыми одна вокруг другой в виде суперспирали. В α-кератинах имеется много поперечных связей, в образовании которых участвуют остатки цистина.

β-Кератины (наиболее типичным примером может служить фиброин шелка) имеют периодичность около 0,70 нм. Такую же периодичность приобретает обработанный паром и растянутый α-кератин. В β-кератинах полипептидная цепь вытянута вдоль одной оси в виде зигзагообразной структуры. Соседние полипептидные цепи β-кератинов соединены между собой водородными связями; они антипараллельны, т.е. ориентированы в противоположных направлениях, и образуют складчатый слой, по обе стороны которого выступают R-группы. β-Кератины содержат много остатков глицина и аланина.

Коллаген – наиболее распространенный из всех белков, обнаруженных у позвоночных. Он содержится в сухожилиях, волокнистой соединительной ткани кожи, кровеносных сосудах, костях и хрящах. Фибриллы коллагена состоят из

трех навитых друг на друга полипептидных цепей, каждая из которых образует изломанную спираль особого типа, содержащую около 21% остатков пролина и гидроксипролина. Фибриллы коллагена нерастяжимы и имеют очень большую прочность на разрыв. При частичном гидролизе коллаген превращается в желатину – растворимую и перевариваемую смесь полипептидов. Эластин, специфический белок эластической соединительной ткани, существует в виде сети полипептидных цепей, поперечно-связанных остатками десмозина. Он обладает большой упругостью. Миозин, актин и тубулин представляют собой примеры внутриклеточных нитевидных белков, участвующих в зависимых от энергии АТР процессах мышечного сокращения и перемещения клеток.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

См. также библиографию к главам 6 и 8

Cantor C.R., Schimmel P.R., Biophysical Chemistry, p. I. The Conformation of Biological Macromolecules, Freeman, San Francisco, 1980.

Dickerson R.E., Geis I. Proteins: Structure, Function, and Evolution, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1983.

Schultz G.E., Schirmer R.H, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1979.

Некоторые интересные статьи

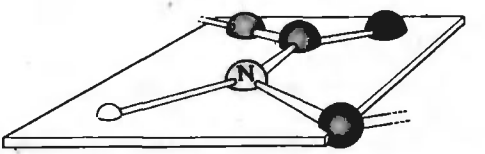
Eyre D.R. Collagen: Molecular Diversity in the Body's Protein Scaffold, Science, **27**, 1315, March (1980).

Fraser R.D.B. Keratins, Sci. Am., **221**, 86–96. August (1969).

Gross J. Collagen, Sci. Am., **204**, 120–130, May (1961).

Вопросы и задачи

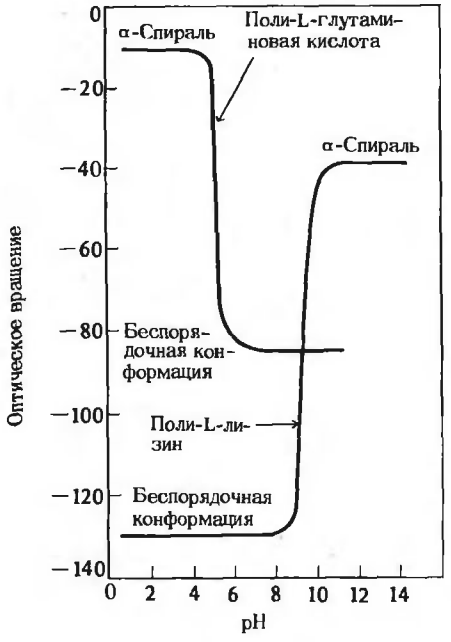
1. *Свойства пептидной связи.* При рентгеноструктурном исследовании кристаллических пептидов Лайнус Полинг и Роберт Кори обнаружили, что C—N-связь пептидной группы по длине (0,132 нм) занимает промежуточное положение между типичными одинарными C—N-связями (0,149 нм) и двойными C=N-связями (0,127 нм). Кроме того, они установили, что пептидная группа имеет плоскую конфигурацию, т.е. все четыре атома, присоединенные к C—N-группе, лежат в одной плоскости, причем два α-атома углерода, связанные с C—N-группой, всегда находятся в *транс*-положении, т.е. по разные стороны от пептидной связи.



   а) Какой вывод можно сделать исходя из длины C—N-связи в пептидной группе относительно прочности этой связи и ее кратности (т.е. является ли она одинарной, двойной или тройной)?
   б) Продолжив ответ на предыдущий вопрос, объясните, почему такая C—N-связь занимает по своей длине промежуточное положение между двойными и одинарными связями.
   в) Что можно сказать на основе данных Полинга и Кори о возможности вращения вокруг пептидной C—N-связи?
2. *Ранние данные о структуре шерсти.* Уильям Астбери первым заметил, что рентгенограмма шерсти указывает на присутствие структурной единицы, повторяющейся вдоль волокна с интервалом около 0,54 нм. После растяжения шерсти, подвергнутой действию пара, на рентгенограмме появлялись признаки изменения периодичности структуры: новая структурная единица повторялась через каждые 0,70 нм. После того как обработанная паром шерсть укорачивалась, на рентгенограмме снова возникала периодичность около 0,54 нм. Хотя эти наблюдения послужили ключом к пониманию молекулярной структуры шерсти, Астбери не смог в то время их интерпретировать. Исходя из современных данных о структуре шерсти, объясните эти наблюдения.
3. *Скорость синтеза α-кератина волос.* По нашим меркам во́лос растет относительно медленно – со скоростью 15–20 см в год. Зона роста находится у основания волоса, где в клетках эпидермиса синтезируются α-кератиновые нити, скручивающиеся затем наподобие канатов (см. рис. 7-9). Основным структурным элементом α-кератина является α-спираль, шаг которой составляет 0,54 нм, а на виток приходится 3,6 аминокислотных остатков (см. рис. 7-6). В предположении, что фактором, лимитирующим рост волос, служит биосинтез α-спиральных цепей кератина, рас-

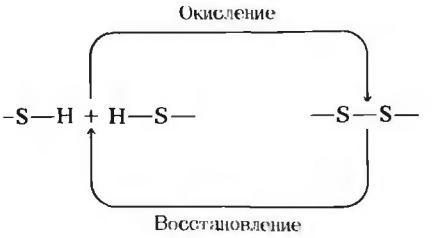
считайте скорость образования пептидных связей в цепях α-кератина (число пептидных связей в 1 с), которая могла бы обеспечить наблюдаемое удлинение волóс за 1 год.

4. *Влияние pH на конформацию полиглутаминовой кислоты и полилизина.* Развертывание полипептидной цепи, имеющей α-спиральную конформацию, с образованием беспорядочного клубка сопровождается резким понижением удельного оптического вращения. Полиглутаминовая кислота – полипептид, состоящий только из остатков глутаминовой кислоты – при pH 3 имеет α-спиральную конформацию. Однако при повышении pH до 7 величина удельного оптического вращения раствора сильно понижается. Аналогичная картина наблюдается в случае полилизина, который при pH 10 имеет α-спиральную конформацию, но при понижении pH до 7 его удельное оптическое вращение сильно уменьшается, как показано на графике.



Как объяснить подобное влияние pH на конформацию полиглутаминовой кислоты и полилизина? Почему переход из одной конформации в другую происходит в таком узком интервале значений pH?

5. *Содержание цистина определяет механические свойства многих белков.* В молекулах целого ряда природных белков содержится большое число остатков цистина. При этом наблюдается корреляция между механическими свойствами белков (прочностью на разрыв, вязкостью, твердостью и т. д.) и содержанием цистина. Например, глутенин (богатый цистином белок пшеницы) определяет вязкость и эластичность теста, приготовленного из пшеничной муки. Точно так же твердый и прочный панцирь черепахи обязан этими свойствами высокому содержанию цистина в α-кератине, из которого он состоит. Какова молекулярная основа наблюдаемой корреляции между содержанием цистина и механическими свойствами белка?
6. *Почему шерсть садится?* Если шерстяной свитер или шерстяные носки постирать в горячей воде, а затем высушить в электросушилке, они становятся меньше. Исходя из того, что известно о структуре α-кератина, как объяснить это явление? Вместе с тем шелк при тех же условиях не дает такой усадки. Объясните, почему.
7. *Устойчивость цистин-содержащих белков к нагреванию.* Большинство глобулярных белков при кратковременном нагревании до 65°C денатурирует (претерпевает процесс разворачивания цепей) с полной потерей активности. Однако те глобулярные белки, в которых содержится много остатков цистина, денатурируют только при более длительном нагревании до более высоких температур. Одним из таких белков является рибонуклеаза, содержащая 124 аминокислотных остатка в единственной полипептидной цепи, в которой имеется четыре поперечные дисульфидные связи, образованные остатками цистина. Чтобы полипептидная цепь рибонуклеазы развернулась, необходимо нагреть содержащий ее раствор до высокой температуры; если затем быстро охладить его, то ферментативная активность восстанавливается. Можете ли вы указать молекулярную основу такого поведения?
8. *Разрыв цистиновых поперечных связей.* Поперечные —S—S-связи образуются в белках в тех случаях, когда два остатка цистеина в одной и той же цепи или в разных цепях подвергаются действию окислителя. При определении аминокислотной последовательности белка по ряду практических соображений сначала следует разорвать все —S—S-связи. Поскольку это процесс, обратный окислению, его проводят при помощи восстановителя.



а) Один из стандартных способов разрыва дисульфидных мостиков состоит в обработке белка избытком 2-меркаптоэтанола ($HSCH_2CH_2OH$). Объясните, на чем основан этот способ.

б) Один из недостатков указанного способа заключается в том, что после разрыва поперечных цистиновых связей они могут образоваться вновь. Почему это происходит?

9. *Периодичность расположения β-слоев в нитях шелка.* Химическое исследование продукта, полученного в результате частичного гидролиза фиброина шелка, вырабатываемого гусеницами шелкопряда *Bombyx mori*, показало, что в полипептидной цепи этого белка много раз повторяется сегмент из шести остатков

$$(\text{—Gly—Ser—Gly—Ala—Gly—Ala—})_n .$$

Вместе с тем из данных рентгеноструктурного анализа следует, что основная структурная единица повторяется в фиброине с интервалом 0,70 нм (см. текст). Однако при этом были выявлены еще две повторяющиеся единицы с периодами 0,35 и 0,57 нм, соответствующие расстояниям между β-слоями. Предложите схему расположения указанных сегментов из шести остатков, из которой бы следовали эти расстояния между β-слоями в фиброине шелка.

10. *Бактериородопсин – белок пурпурной мембраны.* При благоприятных внешних условиях бактерия *Halobacterium halobium*, растущая в среде, содержащей высокие концентрации солей, синтезирует мембранный белок (мол. масса 26 000), известный под названием бактериородопсин. Молекулы этого белка, имеющего пурпурный цвет, обусловленный присутствием в них ретиналя, образуют в клеточной мембране агрегаты в виде пурпурных «заплаток». Бактериородопсин действует как активируемый светом протонный насос и таким образом снабжает клетки энергией. Было показано, что этот белок состоит из семи параллельных α-спиральных сегментов, пронизывающих мембрану бактериальной клетки толщиной 4,5 нм. Рассчитайте минимальное число аминокислот, которое должно содержаться в одном сегменте α-спирали, чтобы он мог полностью пронизывать мембрану. Оцените, какая доля аминокислотных остатков бактериородопсина участвует в образовании α-спиральных сегментов (средняя молекулярная масса одного аминокислотного остатка равна 110). Приведите обоснование ваших расчетов.

11. *Биосинтез коллагена.* Коллаген, количественно преобладающий над всеми другими белками в организме млекопитающих, имеет необычный аминокислотный состав. В отличие от большинства других белков он очень богат пролином и гидроксипролином (см. рис. 7-13). Поскольку гидроксипролин не входит в число 20 аминокислот, обычно присутствующих в белках, его включение в коллаген может идти двумя путями: 1) путем ферментативного гидроксилирования пролина в гидроксипролин перед его включением в коллаген и 2) путем гидроксилирования пролина, уже включенного в состав коллагена. Для того чтобы сделать выбор между этими двумя возможностями, были выполнены следующие эксперименты. Сначала в организм крысы с пищей вводили ^{14}C-пролин и из хвоста выделяли коллаген. При этом оказалось, что новосинтезированный коллаген радиоактивен. Затем точно так же вводили ^{14}C-гидроксипролин, но в этом случае в новосинтезированном коллагене радиоактивности не было обнаружено. Как на основе этих экспериментов сделать выбор между двумя рассматриваемыми возможностями?

12. *Патогенное действие бактерий, вызывающих газовую гангрену.* Патогенные анаэробные бактерии *Clostridium perfringens*, являющиеся возбудителями газовой гангрены, при которой происходит разрушение тканей, выделяют фермент, эффективно катализирующий гидролиз пептидной связи (красный цвет) в изображенной ниже последовательности:

$$\text{—X—Gly—Pro—Y—} \xrightarrow[\text{ферм.}]{H_2O} \text{—X—}CO_2^- + H_3N\text{—Gly—Pro—Y—}$$

где X и Y – любая из 20 аминокислот. Каким образом этот секретируемый фермент помогает бактерии проникать в ткани человека? Почему этот фермент не приносит вреда самой бактерии?

ГЛАВА 8

ГЛОБУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ: СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ГЕМОГЛОБИНА

В глобулярных белках полипептидная цепь свернута в компактную глобулу. Белки этого класса, значительно более сложные по конформации, чем фибриллярные белки, способны выполнять самые разнообразные биологические функции, причем их активность носит не статический, а динамический характер. К глобулярным белкам относятся почти все из 2000 или даже большего числа известных ферментов. Некоторые глобулярные белки выполняют транспортные функции: вместе с током крови они переносят кислород, питательные вещества и неорганические ионы; к этому же классу белков принадлежат антитела, гормоны, а также компоненты мембран и рибосом.

Из этой главы мы узнаем, как свертываются в пространстве полипептидные цепи некоторых глобулярных белков и каким образом аминокислотная последовательность определяет их трехмерную структуру. Мы увидим также, что нативная свернутая конформация глобулярных белков служит необходимой предпосылкой их биологической активности. Далее мы рассмотрим химические и биологические свойства содержащегося в эритроцитах белка гемоглобина, который играет роль переносчика кислорода, и в связи с этим коснемся некоторых медицинских вопросов. На примере гемоглобина мы проиллюстрируем, каким образом трехмерная структура глобулярных белков приспособлена к выполнению их важных биологических функций.

8.1. Полипептидные цепи глобулярных белков свернуты в плотную компактную структуру

Существуют две группы данных, которые с очевидностью свидетельствуют о том, что полипептидные цепи глобулярных белков плотно свернуты и что такая конформация важна для выполнения этими белками их биологических функций. Первая группа данных касается *денатурации* нативных глобулярных белков, происходящей при их нагревании, воздействии экстремальными значениями pH или при обработке их мочевиной (разд. 6.12). В процессе денатурации структура ковалентного остова глобулярного белка остается неповрежденной, но полипептидная цепь развертывается и принимает беспорядочную, нерегулярную и подверженную изменениям пространственную конформацию. Денатурированный глобулярный белок, как правило, становится нерастворимым в водных системах при pH около 7 и обычно утрачивает свою биологическую активность.

Вторым доказательством свернутой конформации глобулярных белков служит сравнение длины их полипептидных цепей с реальными размерами их молекул, рассчитанными по результатам физико-химических измерений. Например, сывороточный альбумин (мол. масса 64 500) имеет одну полипептидную цепь, состоящую из 584 аминокислотных остатков. Если бы эта цепь находилась в полностью вытянутой β-конформации,

ее длина составляла бы почти 200 нм, а толщина – около 0,5 нм. Если бы она была свернута в сплошную α-спираль, она имела бы длину примерно 90 нм и толщину 1,1 нм (рис. 8-1). Однако физико-химические измерения показывают, что максимальный размер молекулы нативного сывороточного альбумина составляет около 13 нм, а диаметр – примерно 3 нм (рис. 8-1). Отсюда ясно, что полипептидная цепь сывороточного альбумина должна быть очень плотно свернута, иначе молекула этого белка не могла бы иметь указанные выше размеры. В настоящее время твердо установлено, что *все* глобулярные белки компактно свернуты специфическим образом, благодаря чему и возникает их биологическая активность. *Способ свертывания полипептидных цепей глобулярных белков в компактную сферическую глобулу мы будем называть третичной структурой.*



Рис. 8-1. Размеры молекулы бычьего сывороточного альбумина в его нативной глобулярной конформации. Сывороточный альбумин содержит 584 остатка в своей единственной полипептидной цепи. Слева показаны приблизительные размеры, которые имела бы эта полипептидная цепь, если бы она представляла собой сплошную α-спираль или целиком находилась в вытянутой β-конформации. Действительные размеры молекулы натнвного сывороточного альбумина показаны справа.

Возникает ряд очевидных вопросов. Как можно установить способ свертывания цепей в глобулярных белках? Одинакова ли укладка полипептидных цепей во всех глобулярных белках? Какие силы удерживают цепь в свернутой конформации?

8.2. Рентгеноструктурный анализ миоглобина – выдающееся достижение в исследовании белков

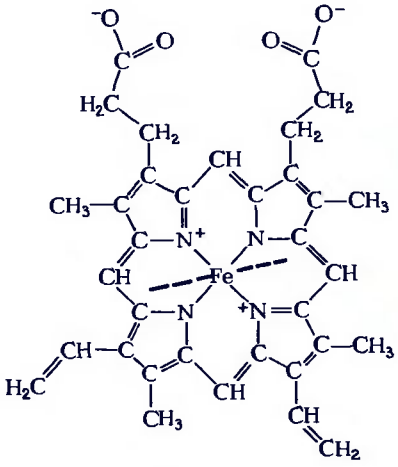
Ответ на поставленные выше вопросы дал один из самых эффективных методов – метод рентгеноструктурного анализа, при помощи которого, как мы уже видели, удалось установить структуру ряда фибриллярных белков. Однако рентгеноструктурный анализ глобулярных белков представляет значительно более трудную задачу, чем рентгеноструктурный анализ фибриллярных белков, вытянутых вдоль одной оси и, как правило, имеюших периодическую структуру. Чтобы установить трехмерную структуру глобулярных белков по их рентгенограммам, необходимо сделать множество расчетов с привлечением мощной вычислительной техники.

Первый значительный успех в изучении трехмерной структуры глобулярных белков был достигнут в результате рентгеноструктурного исследования *миоглобина*, проведенного в 50-х годах в Англии Джоном Кендрью и его коллегами. Миоглобин – относительно небольшой кисло-

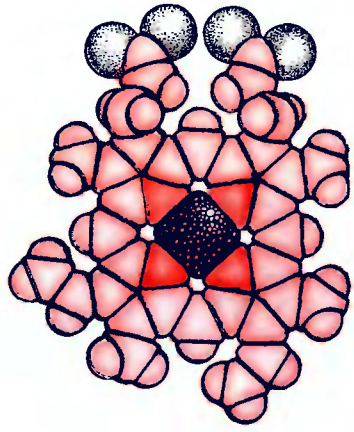
род-связывающий белок (мол. масса 16 700), присутствующий в мышечных клетках. Его функция состоит в том, что он запасает связанный кислород и способствует его переносу в митохондрии, которые потребляют кислород в процессе окисления поступающих в клетку питательных веществ. В молекуле миоглобина имеется одна полипептидная цепь, состоящая из 153 аминокислотных остатков с установленной последовательностью, и одна *гемогруппа*, или *гем*,– комплекс протопорфирина с железом (рис. 8-2), содержащийся также в гемоглобине – кислород-связывающем белке эритроцитов. Присутствием гемогруппы объясняется густой красно-коричневый цвет, характерный для миоглобина и гемоглобина. Миоглобина особенно много в мышцах морских млекопитающих – ки-

Рис. 8-2. Гемогруппа, присутствующая в миоглобине, гемоглобине и многих других гемопротеинах. Она представляет собой сложную полициклическую структуру, называемую протопорфирином, с которой связан атом железа в [Fe(II)]-форме (ферроформа). Атом железа имеет шесть координационных связей, четыре из которых участвуют в образовании комплекса железа с плоской молекулой порфирина, а две другие направлены перпендикулярно порфириновому кольцу. В миоглобине и гемоглобине одна из этих двух связей занята атомом азота, принадлежащим остатку гистидина. Другая связь свободна и служит для связывания молекулы кислорода, как это показано в боковой проекции внизу справа. В миоглобине и гемоглобине за эту свободную связь помимо молекулы O_2 может конкурировать молекула окиси углерода (CO), которая образует с атомом железа в 200 раз более прочную связь, чем O_2. При отравлении угарным газом (окисью углерода) значительная часть гемоглобина переходит в форму карбоксигемоглобина, что препятствует переносу O_2 из легких в ткани.

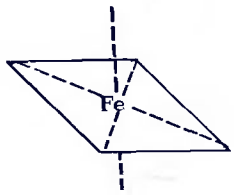
Структура гема



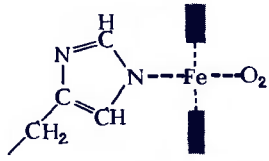
Пространственная модель гема



Координационные связи железа



Боковая проекция



Остаток гистидина

Плоскость молекулы порфирина

та, тюленя и дельфина: высокое содержание миоглобина придает их мышцам коричневый цвет. Миоглобин позволяет этим животным запасать в мышцах необходимое количество кислорода при погружении на длительное время в воду.

Рентгенограммы, которые Кендрью использовал для исследования структуры миоглобина из мышц кашалота (рис. 8.3), носили очень сложный характер и содержали почти 25 000 рефлексов. Расчеты, связанные с анализом интенсивностей всех этих дифрагированных рентгеновских лучей, проводили последовательными этапами. На первом этапе, завершенном в 1957 г., трехмерная структура миоглобина была рассчитана с разрешением 0,6 нм. При такой степени разрешения, еще не достаточной для определения точных положений индивидуальных атомов, удалось выяснить, как свернута полипептидная цепь в молекуле миоглобина. Оказалось, что она уложена довольно причудливым и нерегулярным образом, так что очертания третичной структуры миоглобина напоминают свернутую колбасу (рис. 8-4). Поскольку R-групп на рисунке нет, структура молекулы выглядит намного более рыхлой, чем она есть на самом деле. На рисунке изображена также плоская гемогруппа, плотно прилегающая к полипептидной цепи, хотя и не связанная с ней ковалентно. На втором этапе рентгеноструктурный анализ миоглобина был выполнен при разрешении 0,2 нм, достаточно высоком, чтобы идентифицировать большинство R-групп. На третьем этапе была проведена идентификация всех аминокислотных остатков при разрешении 0,14 нм. Полученная аминокислотная последовательность довольно хорошо соответствовала данным химического анализа.

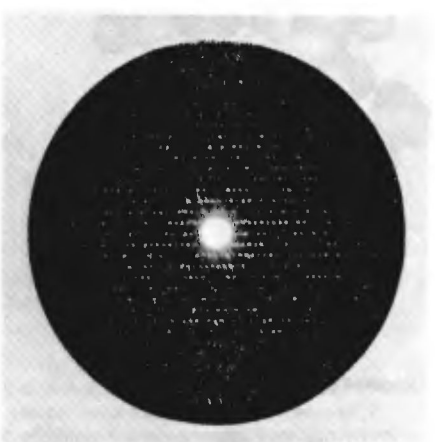


Рис. 8-3. Фотоотпечаток рентгенограммы кристаллического миоглобина кашалота. По расположению и интенсивности дифракционных пятен, возникающих в результате взаимодействия рентгеновского пучка с атомами миоглобина в кристалле, была рассчитана точная трехмерная структура миоглобина.

На рис. 8-4 показана детальная, с учетом каждого остатка, *вторичная структура* полипептидного остова миоглобина, изображенного внутри общего контура молекулы, свернутой наподобие колбасы, а также его *третичная структура*, т. е. укладка всей цепи в трех измерениях. Остов молекулы миоглобина построен из восьми относительно прямолинейных сегментов, чередующихся с изогнутыми участками полипептидной цепи. Каждый прямолинейный сегмент – это отрезок α-спирали, причем самый длинный из них содержит 23 аминокислотных остатка, а самый короткий – всего лишь 7. Оказалось, что все α-спиральные сегменты представляют собой правую α-спираль. На долю α-спиральных участков в молекуле миоглобина приходится почти 80% всех аминокислотных остатков. Рентгеноструктурный анализ позволил также установить точное расположение каждой из R-групп, выступающих из изображенных на рисунке контуров и занимающих практически все свободное пространство между изогнутыми петлями молекулы.

Исходя из точных моделей молекулы миоглобина, построенных в соответствии с рентгеноструктурными данными, было сделано еще несколько важных выводов.

1. Молекула миоглобина настолько компактна, что внутри нее может уместиться всего четыре молекулы воды.
2. Все полярные R-группы, за исключением двух, расположены на внешней поверхности молекулы, причем все

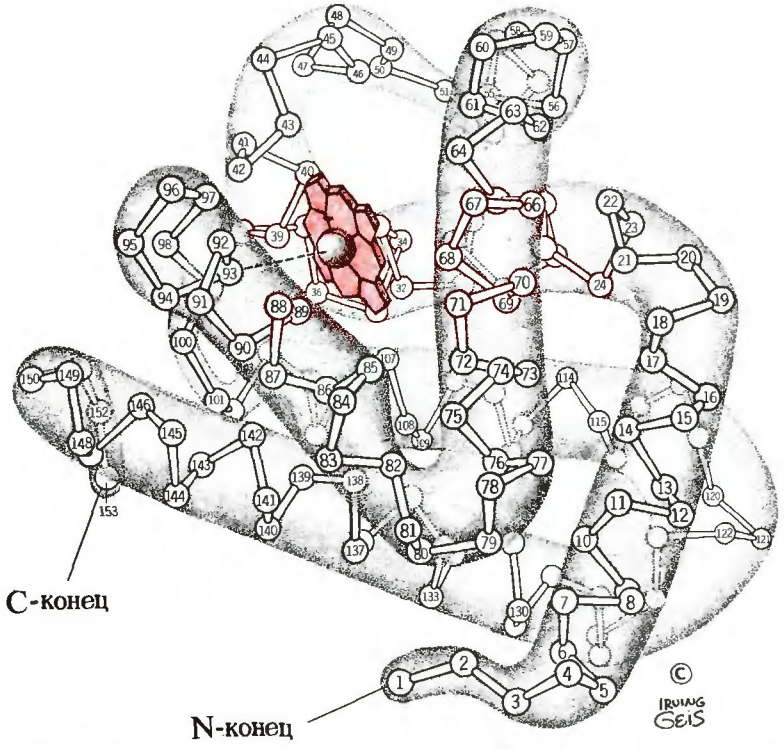


Рис. 8-4. Третичная структура миоглобина кашалота, установленная методом рентгеноструктурного анализа. Показана структура остова молекулы, полученная при разрешении 0,2 нм. Полипептидная цепь, в которой изображен только α-углеродный остов, по своему контуру напоминает колбасу. Пространство между петлями цепи не свободно, а заполнено R-группами (на рисунке не показаны). Молекула миоглобина содержит восемь α-спиральных сегментов. Порфириновое кольцо гемогруппы выделено красным цветом.

они находятся в гидратированном состоянии.

3. Бóльшая часть гидрофобных R-групп расположена внутри молекулы миоглобина и таким образом защищена от соприкосновения с водой (см. табл. 8-1, в которой перечислены аминокислоты с наиболее гидрофобными и наиболее гидрофильными R-группами, а также аминокислоты с R-группами, занимающими по своим свойствам промежуточное положение).
4. Каждый из четырех остатков пролина в молекуле миоглобина находится в месте изгиба полипептидной цепи

Таблица 8-1. Классификация аминокислот в соответствии с их полярностью и расположением в молекулах глобулярных белков

Высокогидрофильные аминокислоты, почти всегда расположенные на внешней поверхности молекул глобулярных белков

Аспарагиновая кислота	Лизин
Глутаминовая кислота	Аргинин
Аспарагин	Гистидин
Глутамин	

Высокогидрофобные аминокислоты, расположенные в основном внутри молекул глобулярных белков

Фенилаланин	Метионин
Лейцин	Валин
Изолейцин	Триптофан

Аминокислоты, занимающие по степени полярности промежуточное положение; они могут находиться как внутри, так и на поверхности глобулярных белков

Пролин	Аланин
Треонин	Глицин
Серин	Тирозин
Цистеин	

(напомним, что жесткие R-группы пролина не могут быть уложены в α-спираль; разд. 7.7). В других местах изгиба или поворота цепи расположены остатки серина, треонина и аспарагина, т.е. такие аминокислотные остатки, которые не допускают образования α-спиральной структуры, если находятся рядом друг с другом (разд. 7.7).

5. Все пептидные группы имеют плоскую *транс*-конфигурацию (разд. 7.5).
6. Плоская гемогруппа лежит в полости (кармане) вблизи поверхности молекулы. Атом железа, находящийся в центре гемогруппы, имеет две координационные связи, направленные перпендикулярно плоскости гема. Одна из них связана с R-группой остатка гистидина 93, а другая служит для связывания молекулы O_2.

8.3. Миоглобины, выделенные из разных видов, имеют сходную конформацию

Мы уже видели, что в гомологичных белках из разных видов, например в ряду цитохромов *c*, в определенных положениях полипептидных цепей находятся *инвариантные*, т.е. всегда одни и те же, аминокислотные остатки, тогда как в других положениях аминокислотные остатки могут быть разными (см. рис. 6-14). То же справедливо и для миоглобинов, выделенных из разных видов китов, тюленя и некоторых наземных позвоночных. Это уже само по себе является серьезным основанием считать, что все миоглобины произошли от общего предшественника и потому имеют определенное сходство в укладке полипептидных цепей. Но еще более веским подтверждением гипотезы об общем происхождении миоглобинов служат результаты рентгеноструктурного анализа миоглобинов некоторых других видов; они показали, что по третичной структуре все эти белки сходны с миоглобином кашалота. Сходство третичной структуры различных миоглобинов и гомология их аминокислотных последовательностей позволяют сделать вывод, что аминокислотная последовательность миоглобина должна каким-то образом определять трехмерную укладку полипептидной цепи. Аналогичная ситуация имеет место также и в случае других гомологичных белков: в каждом ряду таких белков наблюдается как гомология аминокислотных последовательностей, так и сходство третичных структур.

8.4. Глобулярные белки различных типов имеют неодинаковую структуру

Может быть, и все другие глобулярные белки свернуты точно так же, как миоглобин? На этот вопрос ответ уже получен, так как методом рентгеноструктурного анализа установлена третичная структура целого ряда других, небольших по размеру белков, состоящих из одной полипептидной цепи. Особенно интересны результаты, полученные при изучении митохондриального белка *цитохрома c*, который служит переносчиком электронов. Аминокислотная последовательность цитохрома *c* была определена более чем для 60 видов (разд. 6.10). Как и миоглобин, цитохром *c* – это небольшой гемсодержащий белок (мол. масса 12 400), имеющий одну полипептидную цепь, состоящую приблизительно из 100 аминокислотных остатков, и одну гемогруппу, которая в этом случае ковалентно связана с полипептидом. Подобно миоглобину, цитохром *c* тоже свернут в компактную глобулу, причем большинство его гидрофильных R-групп расположено снаружи, а большинство гидрофобных R-групп – внутри глобулярной структуры. Поскольку и цитохром *c*, и миоглобин – гемсодержащие белки, можно было бы думать, что они сходны и по третичной структуре. Но это не так. Рентгеноструктурный анализ цитохрома *c* показал, что он имеет совсем иную трехмерную структуру (рис. 8-5 и табл. 8-2). Если в миоглобине почти 80% аминокислотных остатков содержится в α-спиральных сегментах, то в цитохроме *c* на долю α-спиралей приходится только 40% остатков. В остальной части полипептидной цепи цитохрома *c*

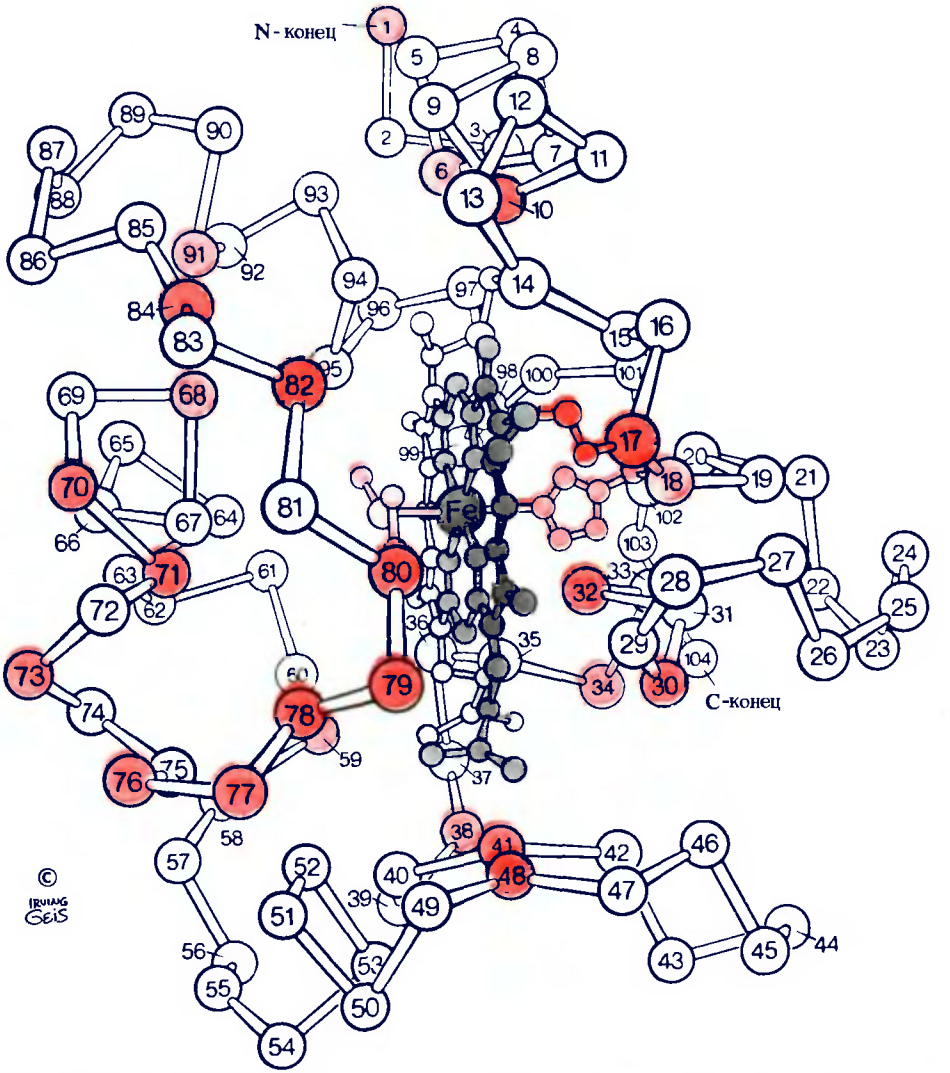


Рис. 8-5. Остов молекулы цитохрома *c*. Ковалентно связанная гемогруппа, показанная серым цветом, помещается в полости внутри молекулы. Красным цветом выделены инвариантные аминокислотные остатки. В цитохроме *c* пятая и шестая координационные связи атома железа заняты R-группами остатков 18 и 80. В нормально функционирующем цитохроме *c*, участвующем в системе переноса электронов, атом железа попеременно находится в ферро- и ферриформе, т. е. в [Fe(II)]- и [Fe(III)]-форме.

находятся всевозможные изгибы, повороты, нерегулярные витки и сегменты в вытянутой конформации. Таким образом, хотя и цитохром *c*, и миоглобин оба представляют собой гемсодержащие белки, они сильно различаются как по вторичной и третичной структурам, так и по аминокислотным последовательностям в соответствии с их совершенно разными биологическими функциями.

Для сравнения можно рассмотреть третичную структуру еще двух небольших белков. *Лизоцим* – это фермент, содержащийся в яичном белке, а также в слезах человека. Он катализирует гидролитическое расщепление сложных полисахаридов, присутствующих в клеточных стенках некоторых бактерий. Лизоцим назван так потому, что он вы-

Таблица 8-2. Приблизительное содержание α-спиралей и участков с β-структурой в некоторых одноцепочечных белках[1)]

Белок	Общее число остатков	Число остатков, %	
		α-спирали	β-структура
Миоглобин	153	78	0
Цитохром *c*	104	39	0
Лизоцим	129	40	12
Рибонуклеаза	124	26	35
Химотрипсин	241	14	45
Карбоксипептидаза	307	38	17

[1)] Участки полипептидных цепей, не относящиеся ни к α-спиралям, ни к β-структуре, представляют собой изгибы или обратные повороты цепи, а также нерегулярно скрученные или вытянутые ее отрезки. α-Спиральные и β-структурные сегменты иногда имеют слегка искаженные размеры и геометрию, отличающиеся от соответствующих нормальных параметров. Данные взяты из книги Cantor C. R. and Schimmel P. R., Biophysical Chemistry, pt. I, p. 100, Freeman, San Francisco, 1980.

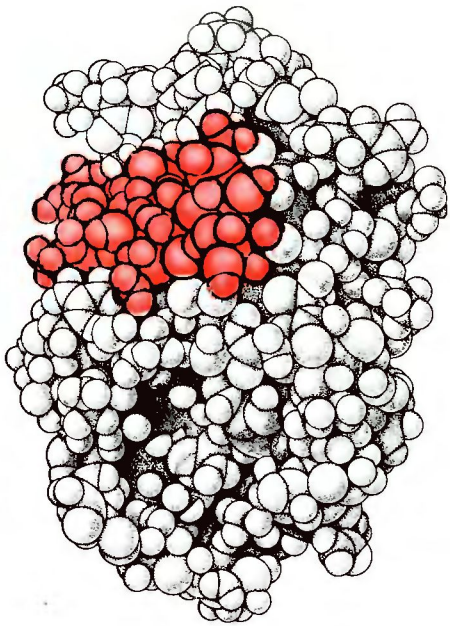


Рис. 8-6. Пространственная модель молекулы лизоцима, с которой прочно связана молекула полисахаридного субстрата (показана красным цветом). Обратите внимание на очень компактную форму молекулы лизоцима, внутри которой почти не остается свободного пространства. Другое изображение молекулы лизоцима см. на рис. 1 к дополнению 9-4 в гл. 9.

зывает лизис, т. е. растворение, бактериальных клеточных стенок и, следовательно, может служить бактерицидным агентом. Подобно миоглобину и цитохрому *c*, лизоцим имеет компактно свернутую конформацию, причем бóльшая часть его гидрофобных R-групп находится внутри глобулярной структуры, где они защищены от контактов с водой, а гидрофильные группы выступают наружу, в водную среду. Около 40% всех 129 аминокислотных остатков лизоцима содержится в α-спиральных сегментах (табл. 8-2), которые выстилают длинную полость, находящуюся на одной стороне молекулы. Эта полость представляет собой каталитический центр фермента. Как мы увидим в гл. 9, каждый фермент имеет каталитический центр, который связывает *субстрат* – молекулу, подвергающуюся действию данного фермента. Во время каталитического акта бактериальный полисахарид, на который действует лизоцим, располагается в этой полости, плотно прилегая к ее внутренней поверхности. На рис. 8-6 представлена пространственная структура лизоцима, иллюстрирующая компактность структуры глобулярных белков.

Рибонуклеаза, еще один глобулярный белок небольшого размера, представляет собой фермент, секретируемый клетками поджелудочной железы в тонкий кишечник, где он катализирует гидролиз некоторых связей в молекулах рибонуклеиновых кислот, содержащихся в перевариваемых пищевых продуктах. Третичная структура рибонуклеазы, установленная методом рентгеноструктурного анализа (рис. 8-7), характеризуется тем, что в ее полипептидной цепи имеется очень мало α-спиральных участков, но зато в ней есть достаточно большое число сегментов, находящихся в β-конформации. В этом отношении рибонуклеаза отличается от миоглобина, цитохрома *c* и ли-

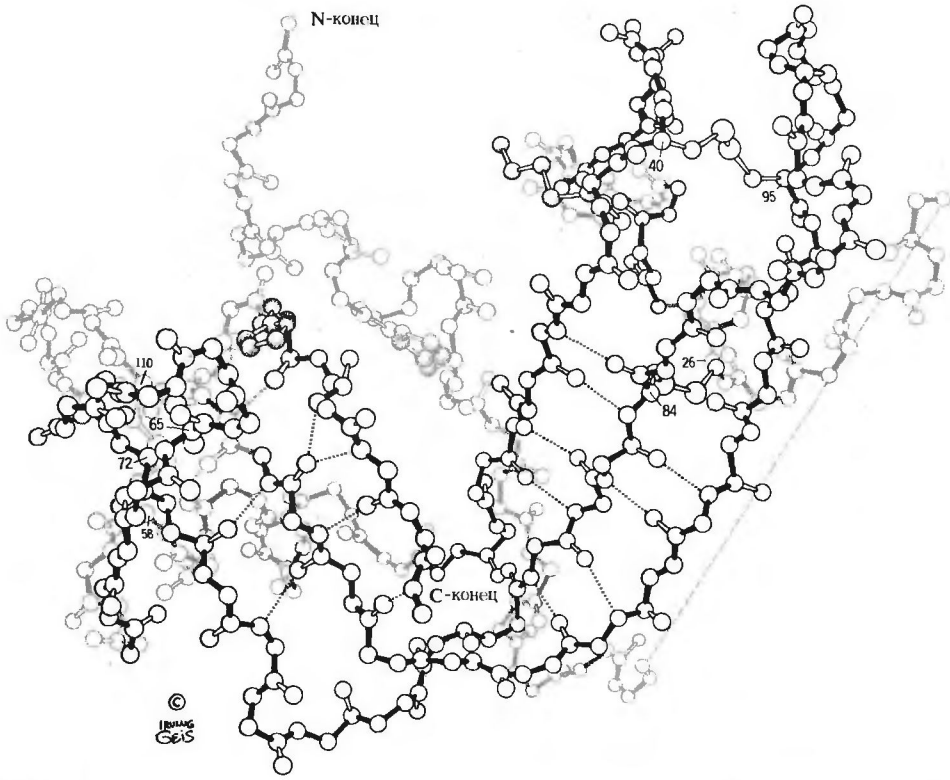


Рис. 8-7. Конформация молекулы рибонуклеазы, установленная методом рентгеноструктурного анализа. Пунктирными линиями показаны водородные связи между петлями полипептидной цепи, уложенными в виде складчатого β-слоя. Полость в середине верхней части молекулы служит центром связывания субстрата. Расположение внутрицепочечных дисульфидных поперечных связей показано на рис. 8-8.

зоцима. Однако, подобно лизоциму, она содержит четыре остатка цистина, образующих ковалентные дисульфидные связи между петлями полипептидной цепи. Это придает прочность всей нативной третичной структуре фермента (рис. 8-7). Такие внутрицепочечные дисульфидные связи имеются во многих белках, особенно в тех, которые функционируют вне клетки.

Совершенно очевидно, что эти четыре одноцепочечных глобулярных белка небольших размеров существенно отличаются друг от друга (см. табл. 8-2). В них содержится разное число α-спиральных участков и сегментов, имеющих β-конформацию; поэтому они различным образом свертываются в пространстве. Эти белки различаются также по аминокислотным последовательностям и выполняют совершенно разные биологические функции. Из данных, полученных при рентгеноструктурных исследованиях и определении аминокислотных последовательностей глобулярных белков многих типов, теперь хорошо известно, что каждый тип белков имеет характерную для него трехмерную конформацию, специально приспособленную для выполнения определенной биологической функции.

8.5. Аминокислотная последовательность белка определяет его третичную структуру

Как мы уже поняли из рассмотрения α-спирали и β-конформации, вторичная структура полипептидной цепи, характеризующая взаимное расположение сосед-

них аминокислотных остатков, определяется ее аминокислотной последовательностью. α-Спираль и β-конформация возникают самопроизвольно и остаются устойчивыми лишь в том случае, если набор расположенных по соседству аминокислотных остатков в полипептидной цепи имеет соответствующую последовательность R-групп. Третичная структура глобулярных белков тоже обусловлена их аминокислотной последовательностью. Но если вторичная структура определяется последовательностью R-групп в близких участках цепи (т. е. ближним порядком), то третичная структура зависит от аминокислотной последовательности далеко расположенных друг от друга участков цепи (т. е. от дальнего порядка). Образование изгибов полипептидной цепи, а также направление и угол поворота цепи в этих изгибах обусловлены числом и положением определенных аминокислотных остатков, таких, как пролин, треонин и серин, которые способствуют образованию изгибов. Более того, как мы увидим дальше, петли плотно свернутой полипептидной цепи сохраняют характерное для них положение в пространстве также благодаря разного рода взаимодействиям между R-группами соседних петель.

Многие инвариантные аминокислотные остатки гомологичных белков, т. е. остатки, присутствующие всегда в определенных положениях полипептидных цепей независимо от вида организма, из которого получен белок, по всей вероятности, занимают наиболее важные в структурном отношении места в полипептидной цепи. Одни из инвариантных остатков встречаются вблизи изгибов цепи или в самих изгибах, тогда как другие, например остатки цистина, находятся в тех местах цепи, где между близко расположенными петлями третичной структуры возникают поперечные связи. Ряд инвариантных аминокислотных остатков занимает строго определенное положение в каталитических центрах ферментов или в местах связывания простетических групп, например гемогруппы в цитохроме *c*.

Но наиболее убедительное доказательство того, что третичная структура глобулярного белка определяется его аминокислотной последовательностью, получено в экспериментах, в которых было показано, что денатурация некоторых белков – это обратимый процесс. У большинства глобулярных белков при нагревании или под воздействием экстремальных значений pH происходит развертывание цепей и утрата биологической активности без разрыва ковалентных связей полипептидного остова. Многие годы процесс денатурации белков считался необратимым; например, белок, свернувшийся при варке яиц, после охлаждения уже не возвращается в исходное растворимое состояние. Однако было обнаружено, что у некоторых глобулярных белков, денатурированных путем нагревания или под воздействием экстремальных значений pH, нативная структура и биологическая активность восстанавливаются при медленном охлаждении раствора белка или медленном изменении его pH до нормального значения; такой процесс называется *ренатурацией*.

Классический пример ренатурации представляет ренатурация рибонуклеазы, одноцепочечного белка с четырьмя внутрицепочечными дисульфидными связями. Кристаллическая рибонуклеаза может денатурировать при обработке ее концентрированным раствором мочевины в присутствии восстановителя, который разрывает дисульфидные связи четырех остатков цистина с образованием восьми остатков цистеина. В этих условиях полипептидная цепь полностью развертывается, образуя множество беспорядочных петель, и фермент утрачивает каталитическую активность (рис. 8-8). Если мы теперь поместим раствор денатурированной рибонуклеазы в диализный мешочек (стр. 144) и погрузим этот мешочек в воду, то низкомолекулярные вещества (мочевина и восстановитель) в результате диффузии будут выходить из раствора рибонуклеазы во внешнюю среду. По мере постепенного удаления этих веществ беспорядочно скрученная денатурированная рибонуклеаза будет самопроизвольно и медлен-

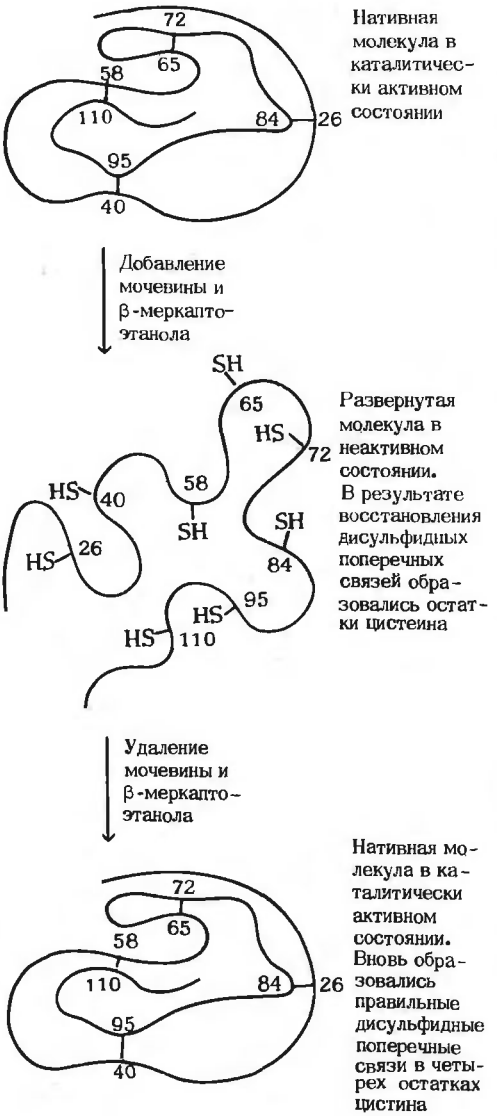


Рис. 8-8. Ренатурация развернутой (денатурированной) рибонуклеазы с воссозданием правильно расположенных дисульфидных поперечных связей. При добавлении мочевины в молекуле рибонуклеазы разрушаются водородные связи, а последующая обработка белка меркаптоэтанолом (CH_3CH_2SH) приводит к восстановлению и тем самым к разрыву дисульфидных связей четырех остатков цистина, которые при этом превращаются в восемь остатков цистеина.

но возвращаться к нативному состоянию, приобретая присущую ей правильную трехмерную третичную структуру с полным восстановлением каталитической активности (рис. 8-8). Этот эксперимент доказывает, что информация, необходимая для правильного свертывания полипептидной цепи рибонуклеазы, заложена в первичной структуре полипептидной цепи, т.е. в ее аминокислотной последовательности.

В ходе того же эксперимента было получено еще одно доказательство точности свертывания рибонуклеазы при ее ренатурации. Оказалось, что восемь остатков цистеина, образовавшихся в реакции восстановления остатков цистина в полностью развернутой рибонуклеазе, постепенно окисляются под действием атмосферного кислорода, в результате чего образуются четыре внутрицепочечные дисульфидные связи точно в тех же положениях, что и в исходной нативной рибонуклеазе. Это замечательное явление. Случайная комбинация восьми остатков цистеина с образованием остатков цистина теоретически может дать 105 различных вариантов, однако в ходе ренатурации реализуется один-единственный специфический набор дисульфидных поперечных связей, характерный для нативной рибонуклеазы (рис. 8-8). Таким образом, полипептидная цепь денатурированной рибонуклеазы свертывается очень точно, что и приводит к формированию уникальной биологически активной конформации, исключая образование какой бы то ни было «неправильной» конформации. Этот классический эксперимент, выполненный Кристианом Анфинсеном в 50-х годах, доказал, что аминокислотная последовательность полипептидной цепи содержит всю информацию, необходимую для того, чтобы цепь свернулась в нативную трехмерную структуру.

8.6. Силы, стабилизирующие третичную структуру глобулярных белков

Мы уже знаем, каким образом формируется и поддерживается вторичная структура полипептидов. *Внутрицепо-*

чечные водородные связи скрепляют α-спираль, а *межцепочечные* водородные связи стабилизируют β-конформацию цепей, образующих складчатые слои (разд. 7.11). При наличии соответствующей аминокислотной последовательности α-спираль и β-конформация – это самые устойчивые структуры, которые может иметь данный участок цепи; иными словами, они являются структурами с наименьшей свободной энергией. Какие силы стабилизируют третичную структуру глобулярных белков? Существуют четыре типа взаимодействий, сочетание которых обеспечивает правильное взаимное расположение всех витков и петель в глобулярных белках (рис. 8-9) при соблюдении нормальных биологических условий (температура, pH, концентрация ионов).

1. *Водородные связи между R-группами остатков, расположенных в соседних петлях полипептидной цепи.* Например, гидроксильная группа остатка серина в одном участке полипептидной цепи может образовать водородную связь с атомом азота в кольце остатка гистидина, находящегося в соседней петле той же цепи.

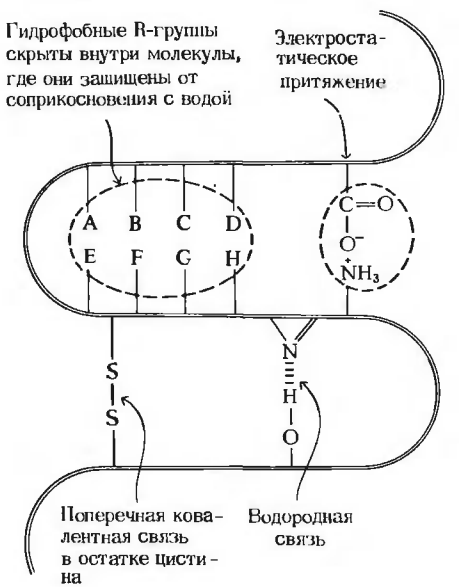


Рис. 8-9. Силы, стабилизирующие третичную структуру глобулярных белков.

2. *Электростатическое притяжение между противоположно заряженными R-группами.* Например, отрицательно заряженная карбоксильная группа (—COO—) остатка глутаминовой кислоты может притягиваться положительно заряженной ε-аминогруппой ($—\overset{+}{N}H_3$) остатка лизина, расположенного в соседней петле.
3. *Гидрофобные взаимодействия.* Гидрофобные R-группы некоторых аминокислотных остатков (см. табл. 8-1) избегают контактов с водным окружением и стремятся собраться вместе внутри глобулярной структуры, где они защищены от соприкосновения с водой.
4. *Ковалентные поперечные связи.* Соседние петли полипептидной цепи в некоторых белках, например в рибонуклеазе, содержат остатки цистина, которые образуют внутрицепочечные ковалентные поперечные связи между соседними петлями. Такие ковалентные поперечные связи, конечно, намного прочнее, чем перечисленные выше нековалентные взаимодействия, однако они встречаются не во всех белках. Следовательно, те белки, у которых нет дисульфидных поперечных связей, поддерживают свойственную им третичную структуру при помощи множества слабых нековалентных взаимодействий и разного рода контактов, в совокупности придающих структуре достаточную прочность.

Хотя нативная третичная структура каждого глобулярного белка отвечает минимуму свободной энергии и потому является самой устойчивой конформацией, какую только может принять данная полипептидная цепь, третичную структуру глобулярных белков не следует считать абсолютно жесткой и неподвижной. Многие глобулярные белки в норме претерпевают конформационные изменения при выполнении ими биологических функций. Например, молекула гемоглобина, о котором мы будем говорить дальше, изменяет свою конформацию при связывании кислорода и возвращается к исходной конформа-

ции после его освобождения. Кроме того, молекулы многих ферментов претерпевают конформационные изменения при связывании субстратов – это составляет часть их каталитического действия. Полипептидный остов глобулярных белков характеризуется определенной степенью гибкости, вследствие чего эти белки подвержены локальным внутренним флуктуациям, т.е. они как бы «дышат».

8.7. Свертывание полипептидных цепей происходит с очень высокой скоростью

В живых клетках белки образуются из аминокислот с очень высокой скоростью. Например, в клетках *E. coli* полная биологически активная молекула белка, содержащая 100 аминокислотных остатков, может быть построена за 5 с при 37°С. Однако расчеты показывают, что если полипептидная цепь из 100 аминокислотных остатков будет беспорядочно «перебирать» все возможные углы вращения вокруг каждой одинарной связи остова, пока не «найдет» свойственную ей биологически активную конформацию, то на это потребуется по меньшей мере 10^{50} лет!

Таким образом, белки не могут принимать правильную конформацию, сворачиваясь совершенно случайным образом по принципу «проб и ошибок». Должны существовать более короткие и прямые пути. Мы не знаем в точности, как и по какому пути проходит процесс самопроизвольного свертывания белка; начинается ли этот процесс на одном из концов цепи, в середине или же в нескольких точках одновременно. Однако самопроизвольное свертывание полипептидных цепей в правильную третичную структуру, очевидно, должно быть *высококооперативным*. Это означает, что если какой-то минимальный отрезок цепи свернулся надлежащим образом, то это сильно увеличивает вероятность правильной укладки всех остальных участков цепи.

8.8. Олигомерные белки имеют как третичную, так и четвертичную структуру

Олигомерными называются белки, содержащие две или большее число полипептидных цепей. Одни из них имеют только две цепи, другие – несколько цепей, но есть белки, состоящие из десятков полипептидных цепей (табл. 8-3). Полипептидные цепи в олигомерных белках могут быть либо одинаковыми, либо разными. Число полипептидных цепей в олигомерном белке можно установить по числу аминоконцевых остатков, приходящихся на одну молекулу белка. С этой целью к N-концевым остаткам присоединяют какую-нибудь подходящую химическую метку, например 2,4-динитрофторбензол (разд. 6.7, б). Олигомерный белок, состоящий из четырех полипептидных цепей, скажем гемоглобин, должен иметь четыре N-концевых остатка, по одному на каждую цепь. В молекуле инсулина имеется две цепи, связанные друг с другом ковалентными поперечными связями.

Олигомерные белки превосходят одноцепочечные белки по молекулярным массам и по сравнению с ними выполняют более сложные функции. К самым известным олигомерным белкам относится гемоглобин. Он содержится в эритроцитах и служит для переноса кислорода, причем выполнение им этой функции, как мы увидим, зависит от значения pH крови и концентрации CO_2. К числу еще более крупных и сложных олигомерных белков принадлежит фермент РНК-полимераза из *E. coli* (пять субъединичных цепей), ответственный за инициацию и синтез цепей РНК; фермент аспартат – карбамоилтрансфераза (двенадцать цепей), играющий важную роль в синтезе нуклеотидов; и как крайний случай, огромный митохондриальный *пируватдегидрогеназный комплекс* – ансамбль из трех ферментов, включающий в общей сложности 72 цепи (табл. 8-3).

В олигомерных белках каждая из полипептидных цепей, образующая субъединицу, характеризуется своей вторичной и третичной пространственной структу-

Таблица 8-3. Некоторые олигомерные белки[1)]

Белок	Мол. масса	Число цепей на молекулу
Гемоглобин (из крови млекопитающих)	64 500	4
Аденилаткиназа (из печени крысы)	18 000	3
Гексокиназа (из дрожжей)	102 000	2
Лактатдегидрогеназа (из сердца быка)	140 000	4
Цитохромоксидаза	200 000	7
Глутаматдегидрогеназа (из печени быка)	320 000	6
F_1-АТРаза	380 000	9 или 10
РНК-полимераза (из *E. coli*)	400 000	5
Аспартат-карбамоилтрансфераза (из *E. coli*)	310 000	12
Изоцитратдегидрогеназа (из сердца быка)	1 000 000	10
Глутаминсинтетаза (из *E. coli*)	600 000	12
Пируватдегидрогеназный комплекс	4 600 000	72

[1)] Большинство из них имеет четное число цепей. Данные взяты из Darnall D. W., Klotz I. M., „Subunit Constitution of Proteins: A Table", Arch. Biochem. Biophys., **166**, 651–682 (1975).

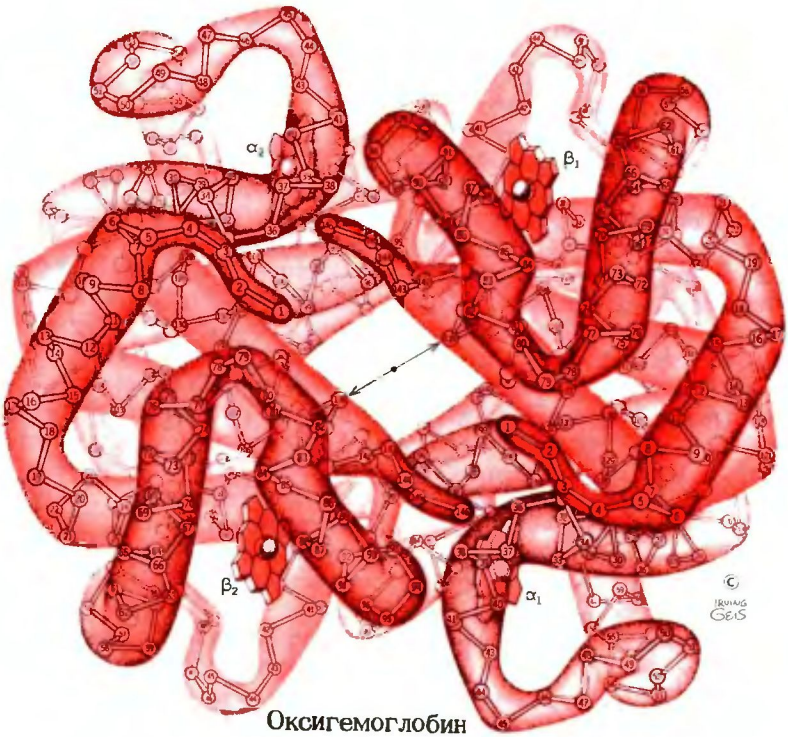
рой. Однако у этих белков есть еще один конформационный уровень, называемый *четвертичной структурой. Под этим термином понимают расположение полипептидных цепей, входящих в состав отдельных субъединиц, относительно друг друга, т. е. способ их совместной укладки и упаковки с образованием нативной конформации олигомерного белка.*

Рентгеноструктурный анализ олигомерных белков представляет намного более сложную задачу по сравнению с аналогичными исследованиями одноцепочечных белков. Тем не менее мы уже располагаем достаточно большой информацией, позволяющей приблизиться к пониманию чрезвычайно важных закономерностей, определяющих биологическую активность олигомерных белков.

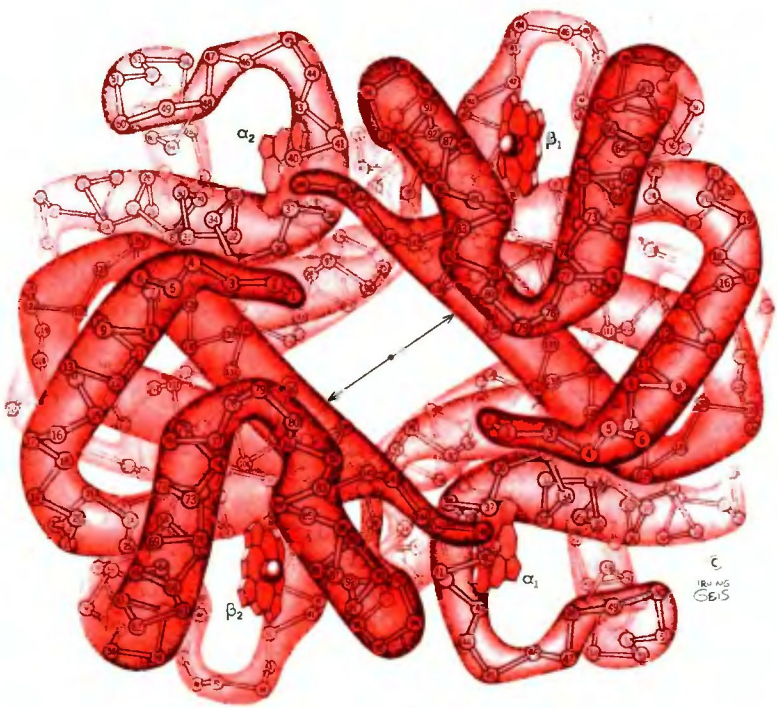
8.9. Метод рентгеноструктурного анализа позволил установить как третичную, так и четвертичную структуру гемоглобина

Первым олигомерным белком, ставшим объектом рентгеноструктурного анализа, был гемоглобин (мол. масса 64 500), содержащий четыре полипептидные цепи и четыре простетические гемогруппы, в которых атомы железа находятся в закисной форме [Fe(II)]. Белковая часть молекулы, называемая *глобином*, состоит из двух α-цепей (по 141 остатку в каждой) и двух β-цепей (по 146

Рис. 8-10. Трехмерная структура окси- и дезоксигемоглобина, установленная методом рентгеноструктурного анализа. Показана четвертичная структура молекулы, т. е. способ совместной укладки четырех субъединиц. Субъединицы объединены в пары $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Между идеитичными субъединицами двух типов (α и β) имеется мало точек соприкосновения друг с другом, тогда как между разными субъединицами возникает множество контактов, стабилизирующих пары $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Несмотря на нерегулярную форму, молекула обладает осью симметрии 2-го порядка: при повороте молекулы на 180° вокруг оси, проходящей через центр молекулы перпендикулярно плоскости рисунка, субъединица α_1 совмещается с субъединицей α_2, а β_1 – с β_2. В каждой цепи указаны номера остатков. Важная роль принадлежит центральной сквозной полости, о чем говорится в дополнении 8-1. Обратите внимание на сравнительно большие расстояния между гемогруппами. Различия между оксигемоглобином и дезоксигемоглобином невелики, но очень важны для функционирования гемоглобина. Вопрос о них будет обсуждаться в этой главе несколько позже.



Оксигемоглобин



Дезоксигемоглобин

остатков). Поскольку молекула гемоглобина по своим размерам в четыре раза крупнее молекулы миоглобина, для расшифровки его трехмерной структуры, выполненной Максом Перутцем и его коллегами в Кембридже (Англия), потребовалось намного больше времени и труда. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, молекула гемоглобина по своей форме приближается к сфере с диаметром около 5,5 нм. Каждая из четырех цепей имеет характерную для нее *третичную структуру*. Подобно миоглобину, α- и β-цепи гемоглобина содержат несколько α-спиральных сегментов, разделенных участками, образующими изгибы цепи. Четыре полипептидные цепи уложены относительно друг друга приблизительно в виде тетраэдра, в результате чего возникает характерная *четвертичная структура* гемоглобина (рис. 8-10). С каждой цепью связана одна гемогруппа. Гемы разных цепей сравнительно далеко (на расстоянии около 2,5 нм) расположены друг от друга и имеют разный угол наклона. Каждый гем частично погружен в «карман», выстланный гидрофобными R-группами, и соединен с полипептидной цепью координационной связью между атомом железа и R-группой остатка гистидина, как показано на рис. 8-2. Шестая координационная связь атома железа в каждом из гемов свободна и используется для связывания молекулы O_2.

Тщательный анализ четвертичной структуры гемоглобина с помощью моделей показывает, что между двумя α-цепями или двумя β-цепями образуется мало прямых контактов, тогда как между α- и β-цепями возникают многочисленные контакты типа $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. В образовании таких контактов принимают участие в основном гидрофобные R-группы аминокислотных остатков. Вследствие нерегулярной формы полипептидных цепей две пары субъединиц $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$ не могут плотно прилегать друг к другу, так что в центре между ними остается канал (или полость), проходящий сквозь всю молекулу гемоглобина, что хорошо видно, если смотреть на молекулу сверху (рис. 8-10). Ниже мы еще вернемся к вопросу об этом канале.

8.10. По своей третичной структуре α- и β-цепи гемоглобина очень сходны с миоглобином

Рентгеноструктурный анализ и химические исследования гемоглобина выявили ряд важных закономерностей. Прежде всего, было обнаружено, что α- и β-цепи гемоглобина имеют почти одинаковую третичную структуру. Обе они более чем на 70% состоят из α-спиралей, причем все эти α-спиральные участки почти одинаковы по длине и образуют в местах изгибов примерно одни и те же углы.

Вторая закономерность состоит в том, что гемоглобины у разных видов позвоночных характеризуются приблизительно одинаковой третичной структурой их полипептидных цепей. Более того, они очень сходны и по четвертичной структуре.

Третий важный вывод заключается в том, что третичная структура α- и β-цепей гемоглобина имеет много общего с третичной структурой миоглобина. Сходство третичной структуры этих двух белков можно сопоставить с присущей обоим белкам способностью связывать кислород, лежащей в основе их биологической функции.

О принадлежности миоглобина и цепей гемоглобина к одному семейству белков свидетельствует также сравнение аминокислотных последовательностей миоглобина кашалота и α- и β-цепей гемоглобина лошади. Как показано на рис. 8-11, во всех трех цепях имеются 27 эквивалентных положений, в которых находятся идентичные аминокислотные остатки; кроме того, в других 40 положениях обнаруживаются близкие по своим свойствам остатки аминокислот, например аспарагиновая и глутаминовая кислоты, или изолейцин и валин. Таким образом, и здесь мы видим, что в аминокислотных последовательностях гомологичных белков имеется ряд инвариантных аминокислотных остатков и что для гомологичных белков характерно сходство их трехмерной структуры.

Из структурных данных по миоглобину и гемоглобину вытекает еще один вы-

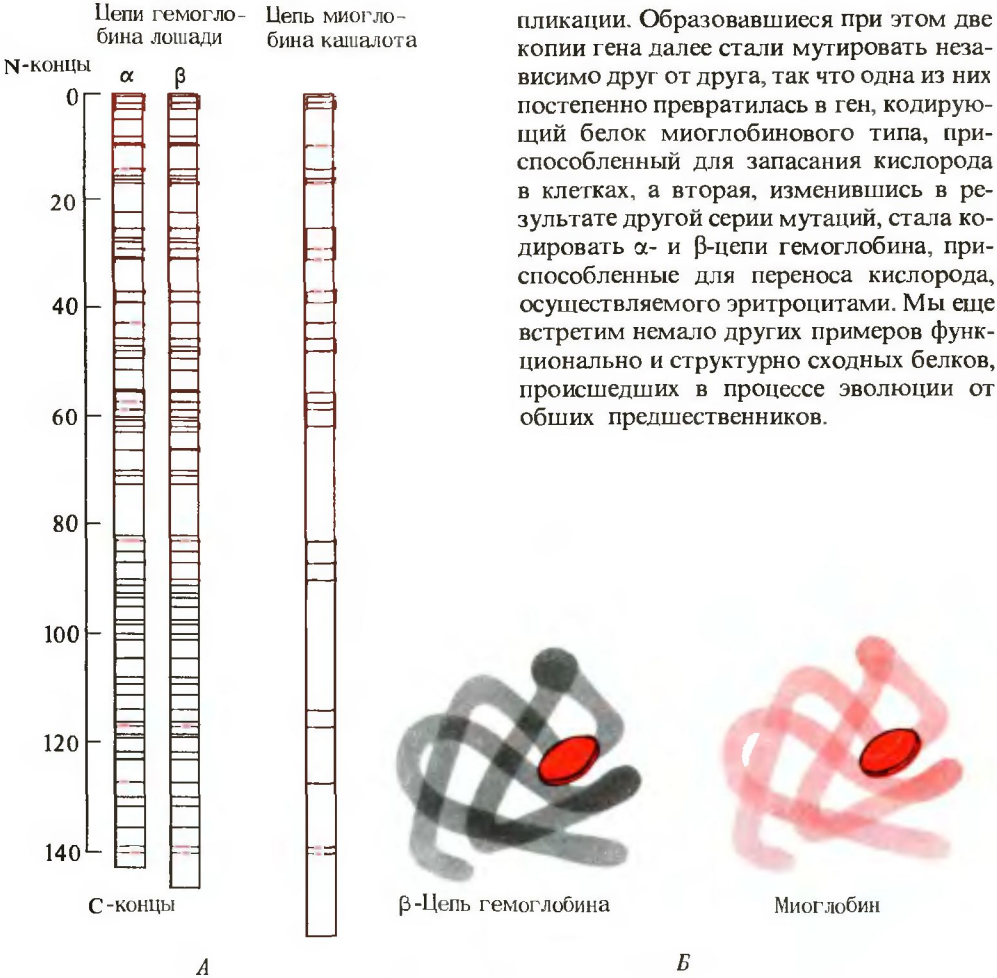


Рис. 8-11. *А*. Положение инвариантных аминокислотных остатков (красные черточки), общих для α- и β-цепей гемоглобина лошади и миоглобина кашалота. Черными черточками показаны положения, занятые идентичными аминокислотными остатками в α- и β-цепях гемоглобина. *Б*. Сходство третичных структур β-цепи гемоглобина лошади и миоглобина кашалота. Красный диск – гемогруппа.

вод. Представляется весьма вероятным, что миоглобин и гемоглобин произошли от одного и того же предкового кислород-связывающего гемопротеина (рис. 8-12), который скорее всего состоял из одной полипептидной цепи. В какой-то момент последующей эволюции видов ген, кодировавший предковый кислород-связывающий белок, подвергся дупликации. Образовавшиеся при этом две копии гена далее стали мутировать независимо друг от друга, так что одна из них постепенно превратилась в ген, кодирующий белок миоглобинового типа, приспособленный для запасания кислорода в клетках, а вторая, изменившись в результате другой серии мутаций, стала кодировать α- и β-цепи гемоглобина, приспособленные для переноса кислорода, осуществляемого эритроцитами. Мы еще встретим немало других примеров функционально и структурно сходных белков, происшедших в процессе эволюции от общих предшественников.

8.11. Была установлена четвертичная структура и некоторых других олигомерных белков

Рентгеноструктурные исследования были проведены также для нескольких других олигомерных белков. В качестве примера можно привести фермент *гексокиназу* дрожжей, катализирующий реакцию

$$\text{ATP} + \text{D-глюкоза} \rightarrow \text{ADP} + \text{D-глюкозо-6-фосфат}.$$

Эта важная реакция протекает практически во всех организмах, так как является

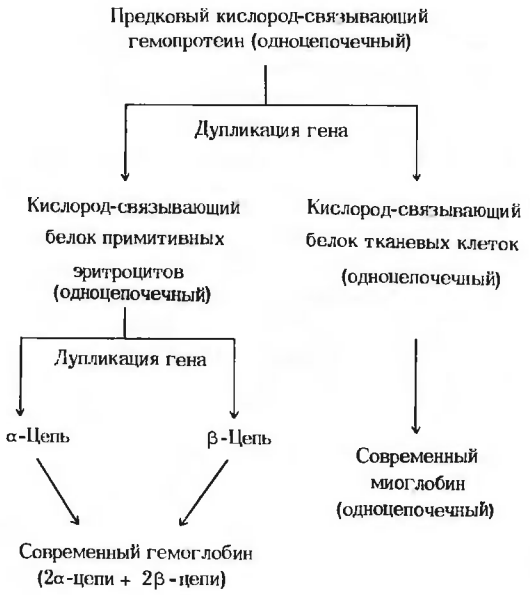


Рис. 8-12. Эволюция миоглобина и гемоглобина, возникших из предкового кислород-связывающего гемопротеина. Во всех миоглобинах, а также в α- и β-цепях всех современных гемоглобинов (исследовано в общей сложности 145 последовательностей) имеются шесть инвариантных остатков и большое число близких по свойствам аминокислот, занимающих в этих белках одинаковые положения. Можно предположить, что ген, кодировавший предковый одноцепочечный гемопротеин, подвергся дупликации. Одна из образовавшихся копий дала начало миоглобиновому гену, а другая – первоначальному гемоглобиновому гену. Оба этих гена в дальнейшем подвергались независимым мутациям. Гемоглобиновый ген мог в какой-то момент еще раз подвергнуться дупликации, в результате чего образовались современные гены α- и β-цепей. Кроме генов, кодирующих α- и β-цепи нормального гемоглобина, присутствующего в крови взрослого человека, существует ген, кодирующий γ-цепь, которая входит в состав гемоглобина плода. Этот гемоглобин, имеющий состав $\alpha_2\gamma_2$, обладает более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин взрослого человека. В эритроцитах взрослого организма содержится также очень небольшое количество гемоглобина с δ-цепями, имеющего состав $\alpha_2\delta_2$.

необходимой стадией метаболизма глюкозы. Гексокиназа дрожжей имеет молекулярную массу около 102 000 и содержит две полипептидные цепи. С помощью рентгеноструктурного анализа была установлена как третичная структура этих двух полипептидных цепей, так и четвертичная структура гексокиназы, образующаяся в результате соединения двух цепей в единую плотно упакованную глобулу (рис. 8-13). Особый интерес представляет строение каталитического центра этого фермента, т.е. участка молекулы, к которому одновременно присоединяются АТР и глюкоза, вовлекаемые в каталитический процесс. Как мы увидим в гл. 9, в ходе каталитического цикла конформация молекулы гексокиназы изменяет свою геометрию.

Другой олигомерный белок, структуру которого также удалось определить – это фермент *лактатдегидрогеназа* из скелетной мышцы, катализирующий последнюю стадию метаболического превращения глюкозы в лактат. Лактатдегидрогеназа имеет молекулярную массу 140 000 и содержит четыре полипептидные цепи. По третичной структуре эти цепи очень сильно отличаются от цепей гемоглобина.

Еще один белок с установленной четвертичной структурой представляет собой фермент *глутаминсинтетазу* из *E. coli*, катализирующий образование глутамина из глутамата и аммиака за счет энергии АТР (гл. 19). По сравнению с гемоглобином или гексокиназой это намного более сложный олигомерный белок. На рис. 8-14 показано взаимное расположение 12 субъединиц глутаминсинтетазы.

Эти три олигомерных белка – три фермента – имеют с гемоглобином одно общее свойство. Все они участвуют в биологической регуляции того или иного типа, и в этом состоит неотъемлемая часть их функции. Гексокиназа, лактатдегидрогеназа и глутаминсинтетаза из *E. coli* – представители особого класса ферментов, носящих название *регуляторных ферментов*. Как мы увидим в следующей главе, они не только катализируют специфические реакции, но и помогают регулировать скорость того метаболического пути, в котором принимают участие как катализаторы. Гемоглобин тоже играет

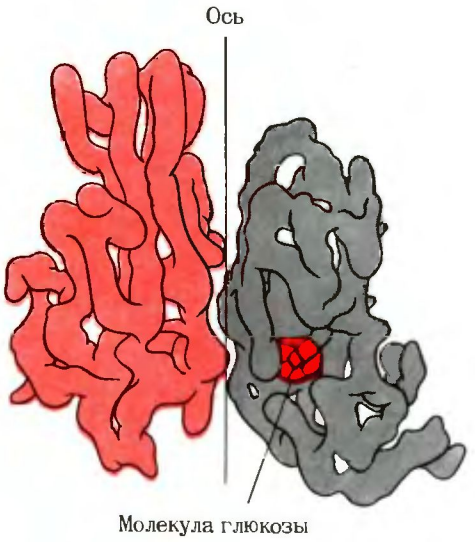


Рис. 8-13. Структура олигомерного белка гексокиназы, выделенного из дрожжей. Две субъединицы белка связаны винтовой осью симметрии. Если повернуть молекулу на 180° вокруг вертикальной оси и одновременно поднять ее вверх, то нижняя субъединица совместится с контуром верхней субъединицы. Гексокиназа – регуляторный фермент, контролирующий скорость вовлечения глюкозы в процессы клеточного метаболизма. Правая субъединица содержит молекулу глюкозы, связанную с каталитическим центром фермента. Другое изображение гексокиназы представлено на рис. 12 к дополнению 9-4 в гл. 9.

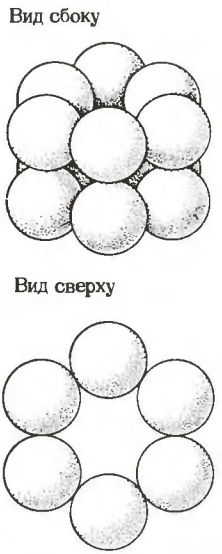


Рис. 8-14. Субъединичная структура глутаминсинтетазы *E. coli*. Этот регуляторный фермент состоит из 12 субъединиц, взаимное расположение которых показано на рисунке.

регуляторную роль. Он не только переносит кислород из легких к периферическим тканям, но и регулирует связывание кислорода в легких и высвобождение его в тканях в ответ на определенные сигналы, в частности на изменение величины pH и концентрации CO_2. Такая регуляторная функция свойственна, по-видимому, многим олигомерным ферментам.

Теперь мы рассмотрим гемоглобин более подробно и попытаемся выяснить, чем определяется его способность переносить кислород из легких в ткани, а ионы H^+ и молекулы CO_2 – из тканей в легкие. Мы увидим, каким образом четвертичная структура гемоглобина помогает регулировать выполнение этих важных транспортных функций. Гемоглобин представляет собой прототип или модель многих других регуляторных олигомерных белков.

8.12. Эритроциты – специализированные клетки, переносящие кислород

В организме взрослого человека содержится 5–6 литров крови. Примерно от одной трети до половины всего объема крови приходится на эритроциты, которые взвешены в богатой белками *плазме крови*. Кровь должна ежедневно переносить от легких к тканям около 600 л кислорода, но лишь небольшая доля этого количества переносится плазмой крови, так как кислород плохо растворим в водных растворах. Почти весь переносимый кровью кислород связан с гемоглобином эритроцитов. Гемоглобин, содержащийся в 100 мл крови, связывает около 20 мл газообразного кислорода.

Нормальные эритроциты человека представляют собой небольшие по размерам (6–9 мкм) двояковогнутые диски (рис. 8-15). В них нет ни ядра, ни митохондрий, ни эндоплазматического ретикулума, ни каких-либо других органелл. Эритроциты образуются из клеток-предшественников, называемых *ретикулоцитами*. В процессе созревания ретикуло-

циты утрачивают обычные внутриклеточные органеллы и синтезируют большое количество гемоглобина. Таким образом, эритроциты – это не совсем полноценные, рудиментарные клетки, не способные к самовоспроизведению; в организме человека они живут всего лишь около 120 дней. Главная функция этих клеток – перенос гемоглобина, растворенного в их водном цитозоле в очень высокой концентрации – около 34%.

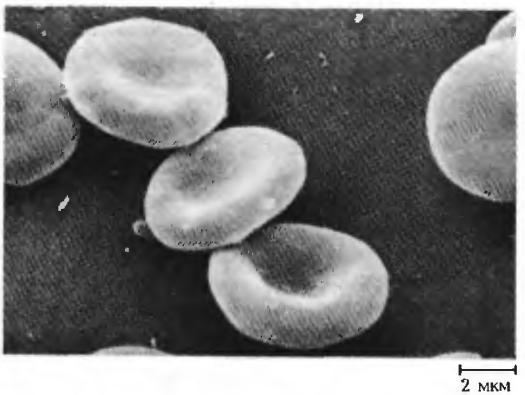


Рис. 8-15. Фотография нормальных эритроцитов человека, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа.

Гемоглобин эритроцитов в артериальной крови, протекающей от легких к периферическим тканям, насыщен кислородом приблизительно на 96%. В венозной же крови, возвращающейся в сердце, гемоглобин насыщен кислородом лишь на 64%. Таким образом, каждые 100 мл крови, проходящие через ткань, оставляют в ней около одной трети содержащегося в них кислорода, что составляет около 6,5 мл газообразного кислорода при атмосферном давлении и температуре человеческого тела.

8.13. Для миоглобина и гемоглобина характерны разные кривые связывания кислорода

Особые свойства молекулы гемоглобина, которые делают его столь эффективным переносчиком кислорода в крови, легче всего уяснить из сравнения миоглобина и гемоглобина в отношении их сродства к кислороду. На рис. 8-16 показаны *кривые насыщения кислородом* для гемоглобина и миоглобина, характеризующие степень насыщения этих белков кислородом (т.е. отношение числа участков молекулы, связывающих кислород, к общему числу участков, способных к такому связыванию) в зависимости от парциального давления газообразного кислорода, находящегося в равновесии с раствором белка.

Прежде всего из графика ясно, что миоглобин имеет очень высокое сродство к кислороду: при парциальном давлении кислорода, равном всего лишь 1–2 мм рт. ст., он уже на 50% насыщен кислородом. Кроме того, мы видим, что кривая насыщения миоглобина кислородом имеет вид простой *гиперболы*, как и следует ожидать из закона действующих масс применительно к равновесной реакции:

$$\text{Миоглобин} + O_2 \rightleftharpoons \text{Оксимиоглобин}$$

При парциальном давлении кислорода, равном 20 мм рт. ст., миоглобин оказывается насыщенным кислородом более чем на 95%. В отличие от миоглобина гемоглобин характеризуется значительно более низким сродством к кислороду; кроме того, кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет *сигмоидную*, т.е. S-образную, форму (рис. 8-16). Это означает, что при связывании первой молекулы кислорода (нижняя часть S-образной кривой, соответствующая парциальным давлениям кислорода ниже 10 мм рт. ст.), гемоглобин имеет очень низкое сродство к кислороду, тогда как при связывании следующих молекул кис-

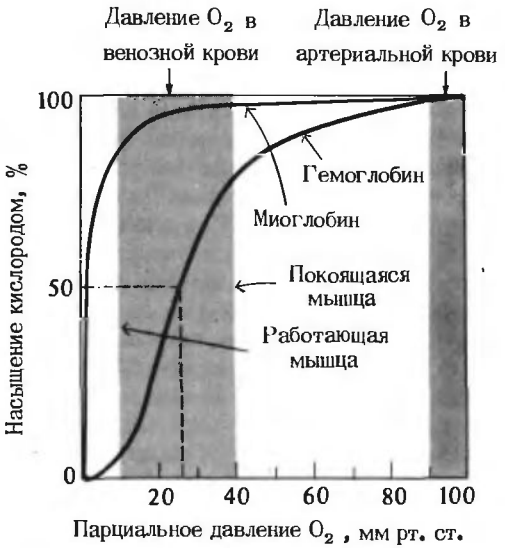


Рис. 8-16. Кривые насыщения кислородом для миоглобина и гемоглобина. Миоглобин обладает намного более высоким сродством к кислороду, чем гемоглобин. 50%-ное насыщение миоглобина кислородом достигается уже тогда, когда парциальное давление O_2 составляет всего 1–2 мм рт. ст., тогда как для гемоглобина такое насыщение кислородом наступает лишь при парциальном давлении кислорода около 26 мм рт. ст. Обратите внимание, что в артериальной крови, вытекающей из легких (при парциальном давлении кислорода около 100 мм рт. ст.) оба белка – и миоглобин и гемоглобин – насыщены кислородом более чем на 95%, тогда как в покоящейся мышце, где парциальное давление кислорода равно 40 мм рт. ст., гемоглобин насыщен кислородом лишь на 75%, а в работающей мышце при парциальном давлении кислорода всего около 10 мм рт. ст. – только на 10%. Таким образом, гемоглобин очень эффективно отдает свой кислород в мышцах и других периферических тканях. Что же касается миоглобина, то при парциальном давлении кислорода, равном всего 10 мм рт. ст., он все еще остается насыщенным кислородом почти на 90% и поэтому даже при столь низких парциальных давлениях кислорода отдает очень малую часть связанного с ним кислорода. Таким образом, сигмоидная кривая насыщения гемоглобина кислородом является результатом молекулярной адаптации гемоглобина к выполнению им транспортной функции в составе эритроцитов.

лорода его сродство к ним становится намного выше, о чем свидетельствует крутая часть S-образной кривой. Фактически после связывания первой молекулы кислорода сродство повышается почти в 500 раз. Таким образом, четыре гемсодержащие полипептидные субъединицы гемоглобина различаются по степени их сродства к кислороду и зависят друг от друга в процессе его связывания.

Как только первая гемсодержащая полипептидная субъединица свяжет молекулу кислорода, она передает информацию об этом остальным субъединицам, у которых сразу же резко повышается сродство к кислороду. Такой обмен информацией между четырьмя гемсодержащими полипептидными субъединицами гемоглобина обусловлен *кооперативным взаимодействием* между субъединицами. Поскольку связывание первой молекулы кислорода одной из субъединиц гемоглобина увеличивает вероятность связывания следующих молекул кислорода остальными субъединицами, мы говорим, что гемоглобин имеет *положительную кооперативность*. Для положительной кооперативности характерны сигмоидные кривые связывания, подобные кривой насыщения гемоглобина кислородом. При связывании кислорода миоглобином, содержащим одну гемогруппу, молекула белка может присоединить только одну молекулу кислорода; в этом случае кооперативного связывания не наблюдается и кривая насыщения имеет вид простой гиперболы. Теперь мы понимаем, почему миоглобин и гемоглобин столь сильно различаются между собой по кислород-связывающей способности.

Мы будем использовать термин *лиганд* для обозначения специфической молекулы, связывающейся с белком; это может быть, например, молекула кислорода, если речь идет о гемоглобине (слово «лиганд» происходит от латинского слова, которое переводится как «связывать», «присоединять» и буквально означает «то, что присоединяется»). Многие другие олигомерные белки тоже имеют по нескольку лиганд-связывающих центров и, подобно гемоглобину, проявляют положительную кооперативность. Однако есть олигомерные белки, проявляющие *отрицательную кооперативность*: в этом случае связывание одной молекулы лиганда уменьшает вероятность связывания других молекул лиганда.

8.14. Кооперативное связывание кислорода делает гемоглобин более эффективным переносчиком кислорода

В легких, заполненных воздухом, парциальное давление кислорода равно приблизительно 100 мм рт. ст.; при этом давлении гемоглобин насыщен кислородом примерно на 96%. В клетках же работающей мышцы парциальное давление кислорода составляет всего лишь около 26 мм рт. ст., так как мышечные клетки очень быстро расходуют кислород и его локальная концентрация соответственно снижается. По мере протекания крови через капилляры в мышцах кислород из содержащегося в эритроцитах гемоглобина, почти полностью насыщенного кислородом, поступает в плазму крови и далее в мышечные клетки. Из кривой насыщения гемоглобина кислородом, показанной на рис. 8-16, видно, что при прохождении крови через капилляры мышц высвобождается примерно одна треть связанного кислорода, так что выходящий из мышечной ткани гемоглобин насыщен кислородом только на 64%. Когда кровь снова поступает в легкие, где парциальное давление кислорода намного выше (100 мм рт. ст.), гемоглобин быстро связывает дополнительное количество кислорода и опять насыщается до 96%.

Теперь представим себе, что гемоглобин в эритроцитах заменен на миоглобин. Из гиперболической кривой насыщения миоглобина кислородом (рис. 8-16) видно, что понижение парциального давления от 100 мм рт. ст. в легких до 26 мм рт. ст. в мышцах должно приводить к высвобождению из миоглобина всего 1–2% связанного кислорода. Поэтому миоглобин мало пригоден для переноса кислорода от легких к тканям: сродство к кислороду у него намного выше, чем у гемоглобина, и при парциальных давлениях кислорода, существующих в мышцах и других периферических тканях, он отдает им очень мало кислорода. Гемоглобин же, наоборот, очень эффективно выполняет эту функцию, поскольку характерная для него кривая связывания кислорода позволяет при существующих в тканях низких парциальных давлениях кислорода отдавать им значительную часть связанного с ним кислорода.

Из этого сравнения вовсе не следует, что миоглобин вообще неэффективный и плохо устроенный белок. Для той биологической функции, которую он выполняет в мышечной ткани (запасает кислород и обеспечивает им митохондрии), миоглобин приспособлен значительно лучше, чем гемоглобин, так как его высокое сродство к кислороду при низких парциальных давлениях кислорода дает ему возможность более эффективно связывать и запасать кислород. Таким образом, гемоглобин и миоглобин специально приспособлены для выполнения различных кислород-связывающих функций. Вместе с тем, как мы сейчас увидим, гемоглобину свойственна еще и другая функция.

8.15. Гемоглобин служит также переносчиком CO_2 и ионов H^+

Кроме переноса кислорода от легких к тканям гемоглобин осуществляет перенос двух конечных продуктов тканевого дыхания, H^+ и CO_2, доставляемых из тканей к легким и почкам – двум органам, обеспечивающим выделение этих продуктов. В клетках периферических тканей органическое топливо окисляется в митохондриях с использованием кислорода, доставляемого гемоглобином из легких; при этом в качестве продуктов образуются углекислый газ, вода и другие соединения. Образование CO_2 приводит к повышению в тканях концентрации ионов H^+ (т.е. к понижению pH), поскольку при гидратации CO_2 образуется H_2CO_3 – слабая кислота, диссоциирующая на ионы H^+ и бикарбонат-ионы

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-.$$

Гемоглобин переносит значительную долю (около 20%) общего количества CO_2 и ионов H^+, образующихся в тканях и поступающих в легкие и почки.

Много лет назад было обнаружено, что на связывание кислорода гемоглоби-

ном очень сильное влияние оказывает pH и концентрация CO_2: связывание CO_2 и ионов H^+ снижает способность гемоглобина связывать O_2. В периферических тканях с относительно низким значением pH и высокой концентрацией CO_2 сродство гемоглобина к кислороду падает по мере связывания CO_2 и ионов H^+. И наоборот, в легочных капиллярах выделение CO_2 и сопутствующее ему повышение pH крови приводит к увеличению сродства гемоглобина к кислороду. Это влияние величины pH и концентрации CO_2 на связывание и освобождение кислорода гемоглобином называют *эффектом Бора* в честь датского физиолога Христиана Бора, впервые открывшего этот эффект.

Эффект Бора обусловлен реакцией, в которой помимо кислорода участвуют еще два лиганда, способные связываться с гемоглобином, а именно ионы H^+ и CO_2. Реакция связывания кислорода гемоглобином в том виде, в каком мы ее до сих пор записывали:

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2,$$

в действительности отражает неполную картину. Чтобы объяснить влияние концентрации ионов H^+ на связывание кислорода гемоглобином, мы должны записать эту реакцию в иной форме:

$$HHb^+ + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+,$$

где HHb^+ – протонированная форма гемоглобина. Из этого уравнения следует, что кривая насыщения гемоглобина кислородом зависит от концентрации ионов H^+ (рис. 8-17). Гемоглобин связывает и кислород, и ионы H^+, но между этими двумя процессами существует обратная зависимость. Если парциальное давление кислорода велико, что наблюдается, например, в легких, то гемоглобин связывает его, освобождая при этом ионы H^+. При низком парциальном давлении кислорода, что имеет место в тканях, связываться с гемоглобином будут ионы H^+. Однако ионы H^+ и кислород связываются с разными участками молекулы гемоглобина. Кислород связывается с атомами железа в гемах, а ионы H^+ – с R-группами остатков гистидина-146 в β-цепях и с двумя другими остатками в α-цепях. Таким образом, четыре полипептидные цепи гемоглобина передают друг другу информацию не только о связывании кислорода гемогруппами, но и о связывании ионов H^+ специфическими аминокислотными остатками.

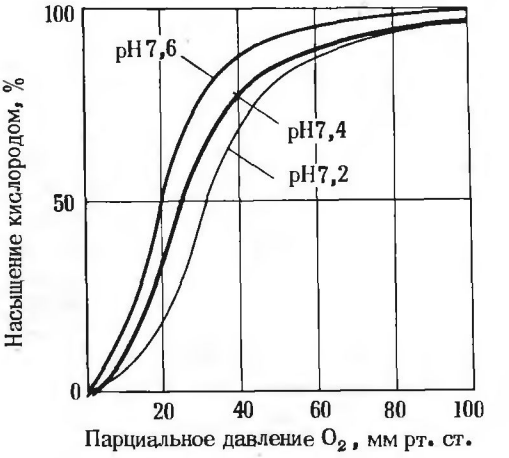
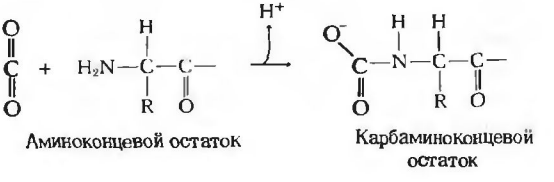


Рис. 8-17. Влияние pH на кривую насыщения гемоглобина кислородом. При низком значении pH, характерном для тканей (pH 7,2), кислород освобождается легче, чем при более высоком значении (pH 7,6), характерном для легких, где кислород легче связывается.

Но это еще не все, так как гемоглобин связывает, кроме того, и углекислый газ, причем опять-таки этот процесс находится в обратной зависимости от связывания кислорода. CO_2 присоединяется к концевой α-аминогруппе каждой из четырех полипептидных цепей, в результате чего образуется *карбаминогемоглобин*



При высоких концентрациях CO_2, наблюдающихся в тканях, часть CO_2 связывается с гемоглобином и его сродство к O_2 снижается, что приводит к освобождению O_2. И наоборот, когда в легких с гемоглобином связывается O_2, уменьшается сродство гемоглобина к CO_2. Из сказанного следует, что кривая насыщения гемоглобина кислородом зависит как от pH, так и от концентрации CO_2. Такая обратная зависимость между связыванием O_2, с одной стороны, и связыванием CO_2 и ионов H^+ с другой, дает организму большие преимущества. В тканях при низких pH и высоких концентрациях CO_2 кислород обычно освобождается из гемоглобина, тогда как в легких высокая концентрация кислорода способствует выделению CO_2 и ионов H^+. Таким образом, благодаря способности молекулы гемоглобина передавать информацию о связывании лигандов от одной полипептидной субъединицы к другой эта молекула оказывается великолепно приспособленной к осуществлению совместного переноса эритроцитами O_2, CO_2 и ионов H^+.

Но теперь снова возникает ряд вопросов. В чем состоит особенность структуры гемоглобина, обеспечивающая эти выгодные для организма изменения сродства гемоглобина к кислороду, находящиеся в обратной зависимости от его сродства к CO_2 и ионам H^+? Как информация о связывании лиганда передается от одной полипептидной субъединицы гемоглобина к другой? Почему гемоглобин обладает такими свойствами, а миоглобин нет?

8.16. Оксигенация гемоглобина вызывает изменение его пространственной конформации

Ответ на эти вопросы был получен после того, как выяснилось, что молекула дезоксигемоглобина при связывании кислорода претерпевает конформационные изменения. Первое указание на существование таких изменений относится к тому времени, когда было обнаружено, что кристаллы дезоксигемоглобина, выращенные в бескислородной атмосфере, разрушаются, как только вступают в контакт с кислородом. Это наблюдение наводило на мысль о том, что при связывании кислорода молекулы гемоглобина изменяются в своих размерах и уже не укладываются в кристаллическую решетку дезоксигемоглобина. Это предположение было полностью подтверждено результатами сравнительного рентгеноструктурного анализа, которые показали, что дезоксигемоглобин и оксигемоглобин имеют разные пространственные конформации (рис. 8-10 и 8-18). При оксигенации дезоксигемоглобина *третичная структура* α- и β-цепей практически не изменяется, поскольку они остаются плотно пригнанными друг к другу и образуют димеры $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Однако, как только кислород присоединяется к гемогруппам дезоксигемоглобина, половинки молекулы $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$, сохраняя свойственную им жесткую конформацию, изменяют свое положение относительно друг друга и теснее сближаются между собой. Иными словами, оксигенация гемоглобина вызывает изменение его *четвертичной структуры*, т.е. упаковки субъединиц. В результате молекула оксигемоглобина приобретает несколько более компактную структуру по сравнению с дезоксигемоглобином, и центральная полость уменьшается. Гемы двух β-цепей сближаются друг с другом, а гемы двух α-цепей раздвигаются, что и приводит к сигмоидной форме кривой насыщения кислородом. Вследствие этих изменений аминокислотные остатки в α- и β-цепях, связывающие ионы H^+, перемещаются из относительно гидрофильного окружения в более гидрофобное, что облегчает отщепление ионов H^+ от протонированных групп; иначе говоря, при оксигенации гемоглобина протонированные группы приобретают свойства более сильных кислот, чем и объясняется эффект Бора. Таким образом, изменение четвертичной структуры гемоглобина в результате его оксигенации находится в прямой связи с существованием обратного соотношения между сродством гемоглобина к кислороду и его сродством к CO_2 и ионам H^+.

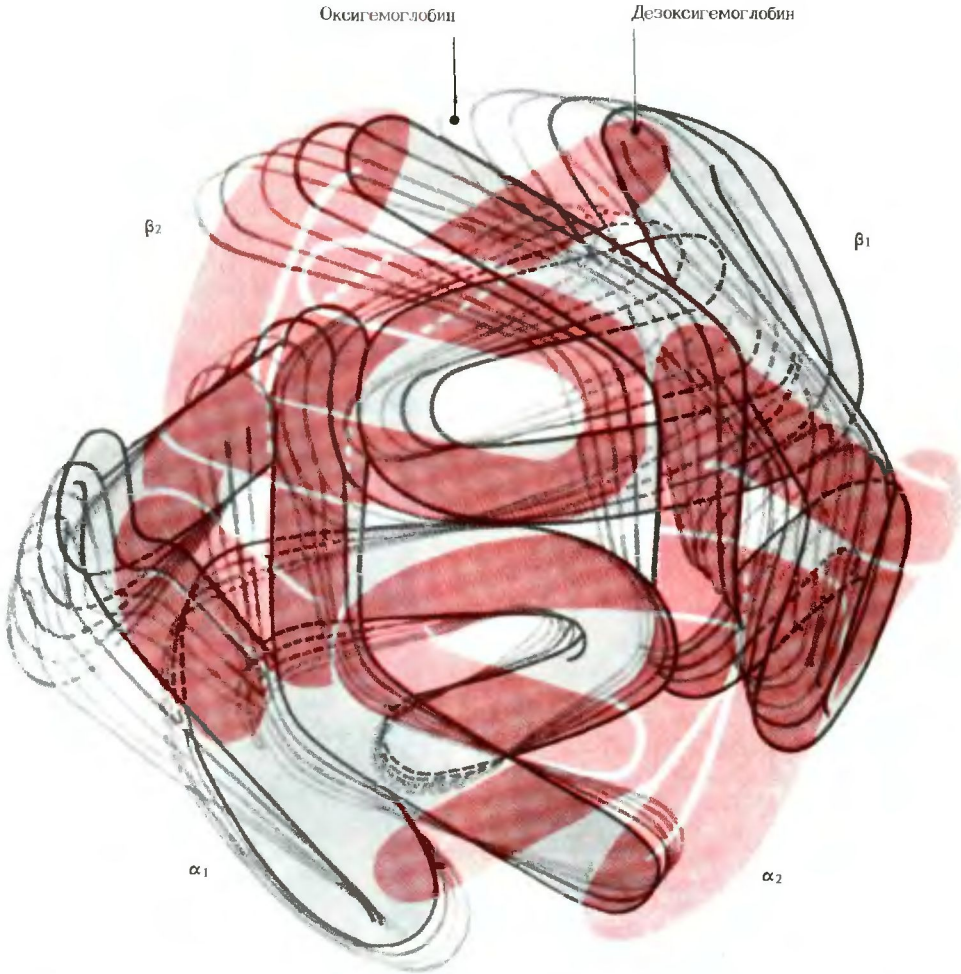


Рис. 8-18. Схематическое изображение (в виде «стоп-кадров») изменений в четвертичной структуре гемоглобина, обусловленных перемещением пары субъединиц $\alpha_1\beta_1$ относительно неподвижной пары $\alpha_2\beta_2$ в процессе освобождения кислорода из оксигемоглобина, переходящего в форму дезоксигемоглобина.

Наконец, еще одну особенность регуляторных свойств гемоглобина выявили Рейнгольд Бенеш и Руфь Бенеш, обнаружившие *четвертый* лиганд гемоглобина – *2,3-дифосфоглицерат*. Об этой интересной особенности рассказывается в дополнении 8-1.

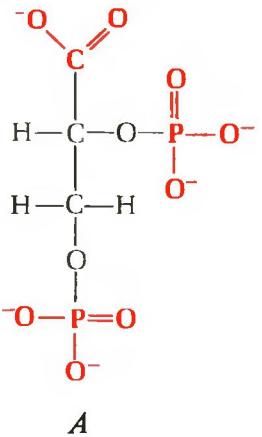
Дополнение 8-1. Дифосфоглицерат и сродство гемоглобина к кислороду

Уже давно известно, что *2,3-дифосфоглицерат* (рис. 1) присутствует в эритроцитах в довольно высоких концентрациях, однако функция этого соединения оставалась загадкой до тех пор, пока не было обнаружено, что он оказывает сильное влияние на сродство гемоглобина к кислороду. При добавлении 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ) к раствору

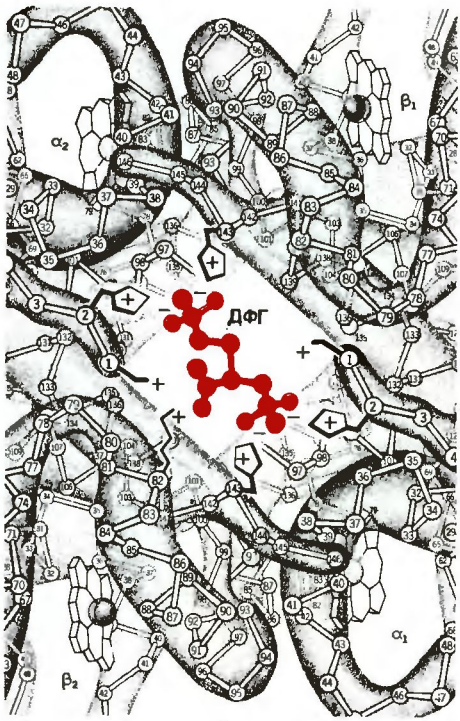
чистого гемоглобина сродство гемоглобина к кислороду значительно снижается. Этот эффект обусловлен тем, что ДФГ сам связывается с дезоксигемоглобином. Следовательно, можно написать уравнение еще одной (четвертой по счету) реакции связывания гемоглобина с лигандом:

$$Hb\text{-ДФГ} + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + \text{ДФГ}.$$

Таким образом, наблюдается обратная зависимость между двумя процессами – связыванием кислорода и ДФГ (присоединяющихся к разным участкам молекулы гемоглобина).



А



Б

Рис. 1. *А*. Структура 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ). Красным цветом выделены заряженные группы, взаимодействующие с двумя β-цепями. *Б*. Расположение молекулы ДФГ (выделена красным цветом) в центральной полости гемоглобина. Отрицательно заряженные группы ДФГ притягиваются к находящимся поблизости положительно заряженным R-группам β-цепей (показаны жирными черными линиями).

Регулирующее влияние ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду в эритроцитах зависит от величины парциального давления кислорода в легких. После того как здоровый человек поднимется, скажем, на высоту 4000 м над уровнем моря, в течение первых нескольких часов концентрация ДФГ в его эритроцитах будет возрастать; при этом число молекул ДФГ, связанных с гемоглобином, увеличится, а сродство гемоглобина к кислороду снизится. На большой высоте парциальное давление кислорода значительно ниже, чем на уровне моря. Поэтому и в тканях парциальное давление кислорода снижается. Увеличение содержания ДФГ в эритроцитах при восхождении на большую высоту облегчает освобождение кислорода из гемоглобина в тканях. Изменения противоположного характера наблюдаются у людей, акклиматизировавшихся к условиям высокогорья, например у жителей Гималаев или Андов, когда они спускаются в долины. Повышение концентрации

ДФГ в эритроцитах наблюдается также у людей при *гипоксии*; это патологическое состояние возникает вследствие недостаточного снабжения тканей кислородом, что может быть обусловлено заболеваниями органов дыхания или нарушениями в системе кровообращения.

С каким участком молекулы гемоглобина связывается ДФГ? В молекуле гемоглобина имеется открытая центральная полость, или канал, который хорошо виден на рис. 8-10. Этот канал, выстланный многими положительно заряженными R-группами, и служит местом связывания ДФГ, который присоединяется к дезоксигемоглобину и образует поперечную связь (солевой мостик) между двумя β-субъединицами. При связывании гемоглобином кислорода ДФГ вытесняется из полости. Гемоглобин связывает только одну молекулу ДФГ (рис. 1); напомним, что он может связывать по четыре молекулы O_2 или CO_2 и примерно четыре иона H^+.

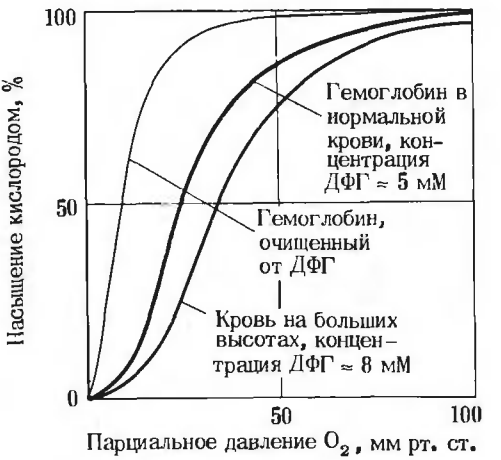


Рис. 2. Влияние ДФГ на кривую насыщения гемоглобина кислородом.

При обычном выделении гемоглобина из крови он содержит довольно большое количество ДФГ, от которого трудно освободиться полностью. При полном удалении ДФГ из гемоглобина кривая связывания его с кислородом в значительной степени утрачивает свою сигмоидную форму и гемоглобин приобретает намного более высокое сродство к кислороду. После добавления избытка ДФГ к гемоглобину способность последнего к связыванию кислорода понижается (рис. 2). Таким образом, присутствие ДФГ весьма существенно для нормального освобождения кислорода из гемоглобина в тканях. В эритроцитах некоторых птиц содержится не ДФГ, а другое фосфатсодержащее соединение – *инозитолгексафосфат*, который даже еще более эффективно, чем ДФГ, снижает сродство гемоглобина к кислороду.

Гемоглобин можно рассматривать как молекулярную автоматическую систему управления, которая отзывается на изменение концентрации любого из его четырех лигандов, передает соответствующую информацию, преобразуя ее в конформационные изменения молекулы, и таким путем регулирует свое

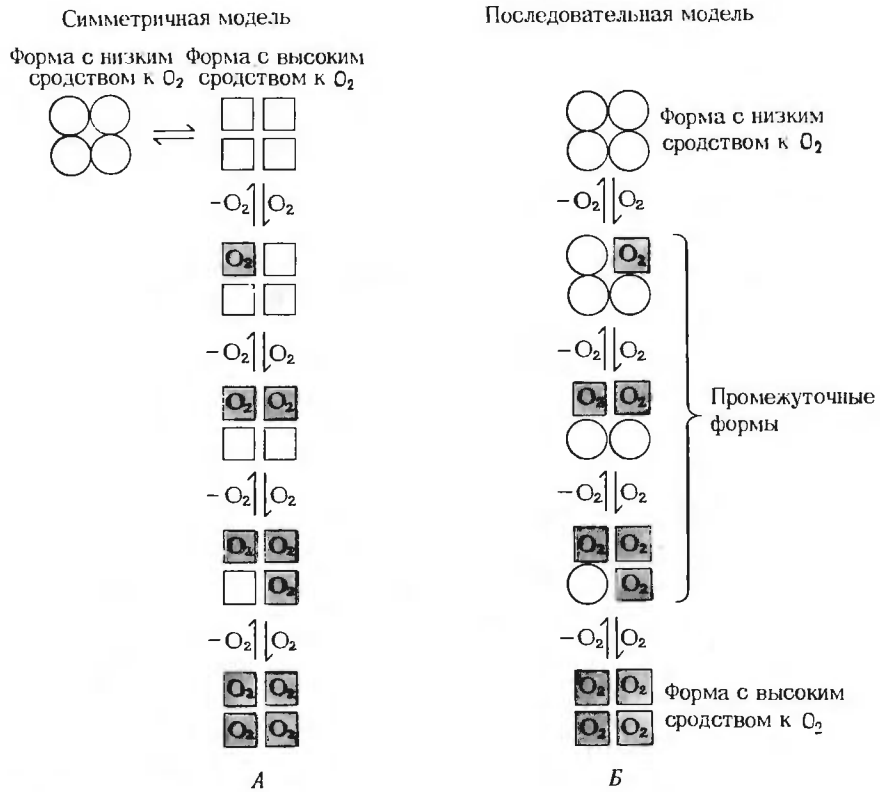


Рис. 8-19. Симметричная («все или ничего») и последовательная (индуцированное соответствие) модели кооперативного связывания кислорода гемоглобином. В обеих моделях субъединицы могут находиться в двух различных состояниях. Кружками обозначено состояние, в котором субъединицы имеют низкое сродство к кислороду, а квадратами – состояние с высоким сродством к кислороду. *А.* Согласно симметричной модели («все или ничего»), гемоглобин может находиться только в двух формах: в одной из них все субъединицы имеют низкое сродство к кислороду, а в другой – высокое. При отсутствии кислорода обе эти формы находятся в равновесии, но форма с низким сродством к кислороду доминирует. Если же кислород присутствует, то он связывается преимущественно с формой гемоглобина, имеющей высокое сродство; при этом равновесие сдвигается вправо и вероятность связывания с гемоглобином оставшегося кислорода увеличивается. В симметричной модели не предусматривается существования промежуточных форм по отношению к формам с низким и высоким сродством к кислороду. *Б.* В последовательной модели (модели индуцированного соответствия) имеется несколько промежуточных конформаций, последовательно приближающихся к форме с высоким сродством к кислороду. Связывание молекулы кислорода с одной из субъединиц, имеющей низкое сродство к кислороду, индуцирует переход этой субъединицы в форму с высоким сродством. Такой переход в свою очередь повышает вероятность того, что последовательное присоединение кислорода к другим субъединицам будет индуцировать их переход в форму с высоким сродством.

сродство к другим лигандам. Считается, что связывание кислорода с одной или двумя субъединицами вызывает в них небольшие конформационные изменения, способствующие конформационным перестройкам пустых (не заполненных кислородом) субъединиц, в результате чего изменяется четвертичная структура всей молекулы; при этом ее сродство к кислороду повышается, а сродство к CO_2 и ионам H^+ понижается. Наоборот, при освобождении кислорода четвертичная структура вновь принимает исходную форму, способствующую связыва-

нию CO_2 и ионов H^+. Были предложены различные теории для детального объяснения всех структурных изменений гемоглобина, наблюдаемых в процессе его оксигенации и дезоксигенации, а также происходящих при этом изменений в его способности к связыванию лигандов (рис. 8-19). Но каковы бы ни были детали всех этих изменений, ясно одно – гемоглобин может служить моделью автоматической регулирующей системы при рассмотрении других олигомерных белков, например ферментов, особенно тех из них, которые обладают как каталитической, так и регуляторной активностью. Многие белки, наделенные такими регуляторными свойствами, состоят из двух или большего числа пригнанных одна к другой полипептидных цепей, образующих характерную четвертичную структуру, способную изменяться при переходе белка из одного активного состояния в другое в процессе его функционирования.

8.17. Серповидноклеточная анемия – «молекулярная болезнь» гемоглобина

Насколько важную роль играет аминокислотная последовательность в формировании вторичной, третичной и четвертичной структур глобулярных белков, а следовательно, и в возникновении у них биологической активности, было особенно наглядно показано на примере *серповидноклеточной анемии* – наследственного заболевания, связанного с генетической аномалией гемоглобина. У таких больных периодически (чаще под влиянием физической нагрузки) возникают приступы резкой слабости, тошноты и одышки; эти симптомы сопровождаются тахикардией и появлением шумов в сердце. Содержание гемоглобина в крови таких больных резко снижено – вдвое против нормы, которая составляет 15–16 г на 100 мл; поэтому и говорят об «анемии» (малокровии). При исследова-

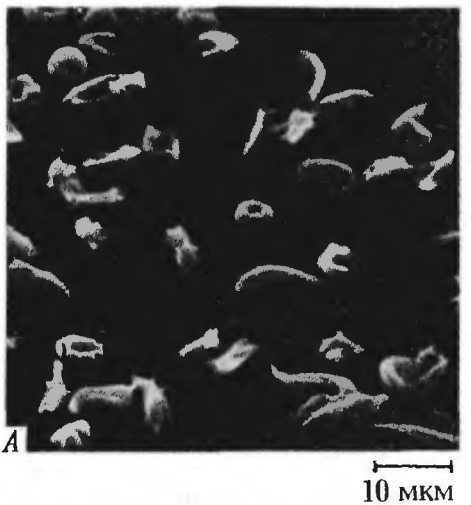


Рис. 8-20. *А.* Фотография серповидных эритроцитов, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Для сравнения в центре помещена нормальная клетка (см. также рис. 8-15). *Б.* Несколько серповидных клеток причудливой формы, показанные при большом увеличении. *В.* Электронная микрофотография серповидного эритроцита, снятая в проходящем пучке; видны продольные ряды полимерных молекул серповидноклеточного гемоглобина, придающих клетке необычную форму.

нии крови таких больных обращает на себя внимание не только резкое уменьшение числа эритроцитов, но и неправильная их форма. Наряду с необычно большим количеством незрелых эритроцитов часто попадаются удлиненные и тонкие – серповидные – клетки (рис. 8-20). Число таких эритроцитов сильно возрастает при недостатке кислорода в крови. Серповидные клетки очень хрупки, легко разрываются, чем и объясняется низкий уровень гемоглобина у таких больных. Наблюдаются и еще более серьезные последствия: кровеносные капилляры там, где они особенно узки, блокируются удлиненными эритроцитами неправильной формы, что и служит главной причиной ранней смерти во многих случаях этой болезни.

Серповидноклеточная анемия – это генетическая болезнь, при которой больной наследует мутантные гены от обоих родителей. В тех случаях, когда мутантный ген унаследован только от одного из родителей, его обладатель становится носителем признака *серповидноклеточности* без явных патологических симптомов. При такой форме серповидноклеточности (ею поражено примерно 8% негритянского населения Соединенных Штатов) серповидные эритроциты составляют всего около 1% их общего числа. Люди со скрытой формой серповидноклеточности могут вести вполне нормальный образ жизни, но должны избегать больших физических нагрузок и всякого рода неблагоприятных воздействий на систему кровообращения.

Необычная форма эритроцитов у больных серповидноклеточной анемией обусловлена присутствием в них аномального гемоглобина. Гемоглобин серповидных клеток получил название *гемоглобина S*, тогда как гемоглобин, содержащийся в эритроцитах нормальных взрослых людей, называется *гемоглобином A*. При дезоксигенации гемоглобин S становится нерастворимым и образует пучки трубчатых волокон (рис. 8-21), что совершенно несвойственно гемоглобину A, сохраняющему растворимость и после освобождения кислорода. Именно нерастворимые волокна дезоксигемоглобина S приводят к деформации эритроцитов, принимающих серповидную форму.

8.18. Гемоглобин больных серповидноклеточной анемией имеет измененную аминокислотную последовательность

В конце 40-х годов Лайнус Полинг и Гарвей Итано обнаружили, что серповидноклеточный и нормальный гемоглобины, помещенные в электрическом поле, т.е. подвергнутые электрофорезу (разд. 6.6), мигрируют к положительно заряженному электроду с разными скоростями: гемоглобин S немного отстает от гемо-

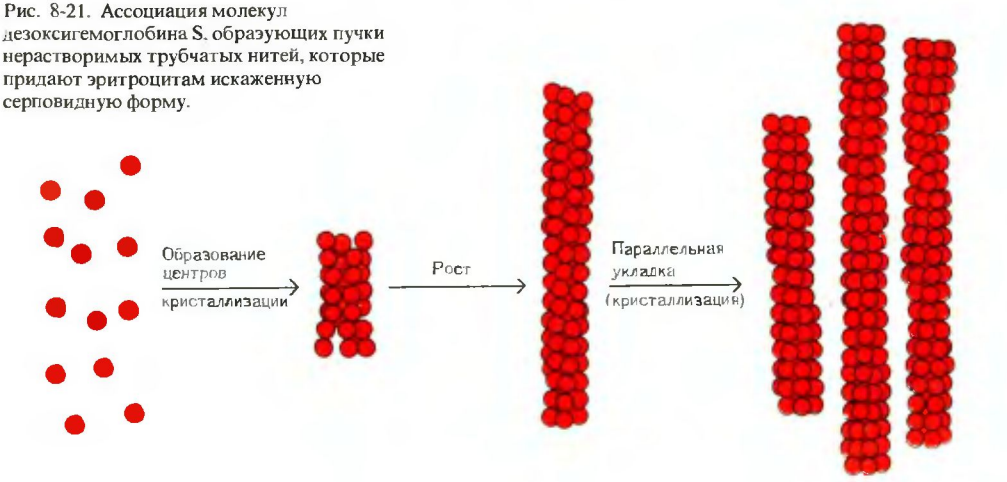


Рис. 8-21. Ассоциация молекул дезоксигемоглобина S, образующих пучки нерастворимых трубчатых нитей, которые придают эритроцитам искаженную серповидную форму.

глобина А. Исследователи сделали вывод, что гемоглобин S должен содержать несколько меньше отрицательно заряженных R-групп, чем гемоглобин А. Позднее Вернон Инграм придумал довольно простой экспериментальный способ, позволяющий более точно локализовать различия в полипептидных цепях гемоглобина S и гемоглобина А. Предложенный им метод *пептидных карт* и поныне широко используется для выявления генетических разновидностей не только гемоглобинов, но и других белков. Инграм обработал оба гемоглобина, S и А, трипсином, который разрывает только те пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит остаткам аргинина или лизина (разд. 6.7,в). Это привело к образованию пептидных фрагментов 28 сортов, поскольку в α- и β-цепях содержится в общей сложности 27 остатков лизина и аргинина. Смесь пептидов, полученных при расщеплении каждого гемоглобина, была нанесена на фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором, и подвергнута электрофорезу, в результате чего пептидные фрагменты разделились, хотя и не полностью, на отдельные зоны. После того как фильтровальная бумага была высушена, через нее пропустили буферный раствор с другим значением pH для хроматографического разделения пептидных фрагментов в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза (разд. 5.21). Когда бумага была снова высушена и в прогретом состоянии обработана нингидрином (разд. 5.19), получилась характерная двумерная пептидная карта со всеми пептидными фрагментами. Как видно из рис. 8-22, гемоглобин S отличается от гемоглобина А по положению на пептидных картах только одного пятна, из чего следует, что в гемоглобине S содержится всего лишь один пептид, отличающийся по своему заряду от соответствующего пептида гемоглобина А. Анализ элюированных из бумаги пептидов позволил Инграму сделать вывод, что они различаются только по одному аминокислотному остатку: *в том положении полипептидной цепи, в котором пептид из нормального гемоглобина А содержит остаток глутаминовой кислоты, в смещенном пептиде из гемоглобина S находится остаток валина* (рис. 8-22). Все остальные аминокислотные остатки в цепях гемоглобина S идентичны остаткам гемоглобина А. Оказалось, что «неправильный» остаток находится в положении 6 β-цепей. Поскольку R-группа валина не имеет электрического заряда, а R-группа глутаминовой кислоты несет при pH 8 отрицательный заряд (рис. 8-23), ясно, что серповидноклеточный гемоглобин должен содержать на два отрицательных заряда меньше, чем гемоглобин А – по одному на каждую из двух β-цепей молекулы гемоглобина. Из-

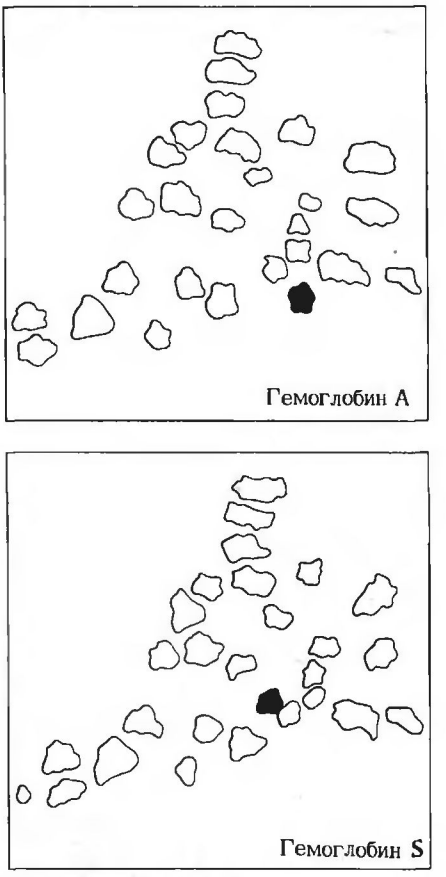
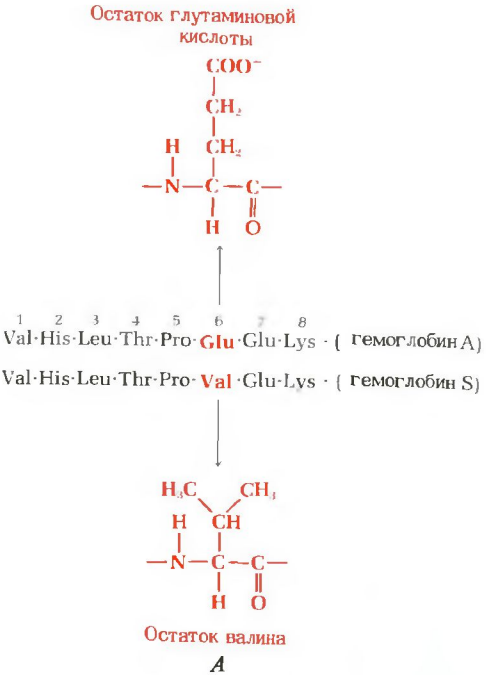


Рис. 8-22. Пептидные карты трипсиновых пептидов гемоглобина А и гемоглобина S. На карте гемоглобина S смещено положение всего одного пептида (показанного красным цветом), содержащего генетически измененную аминокислоту.

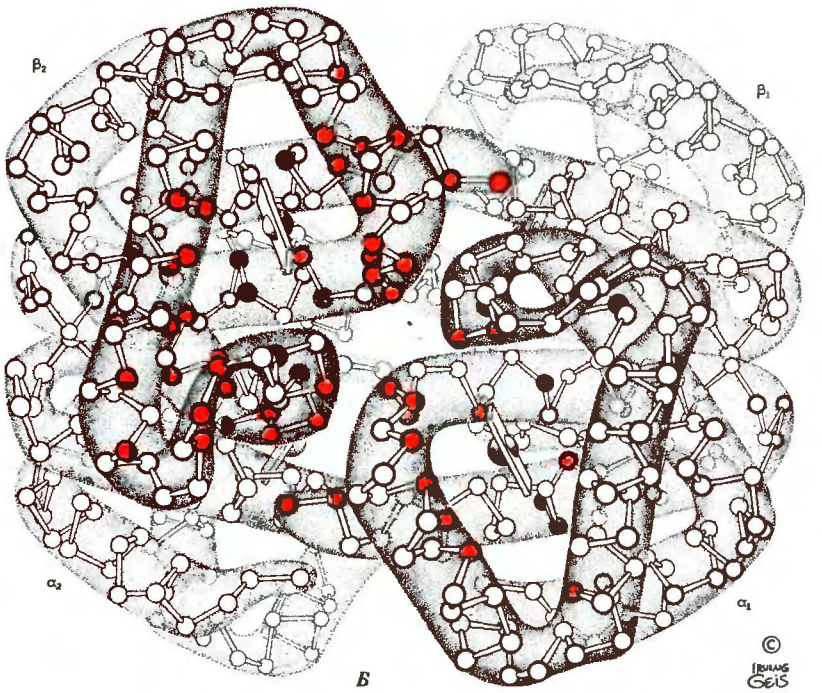
за этой разницы гемоглобин S движется в электрическом поле несколько медленнее гемоглобина A.



8.19. Серповидная форма эритроцитов обусловлена склонностью молекул гемоглобина S к агрегации

Замена двух остатков глутаминовой кислоты остатками валина в молекуле белка, содержащей 574 аминокислотных остатка, на первый взгляд кажется не очень значительным изменением, однако остаток, занимающий шестое положение в β-цепи, оказывает весьма сильное влия-

Рис. 8-23. *А.* Генетическое нарушение в серповидноклеточном гемоглобине. В результате мутации гена, кодирующего β-цепь, остаток глутаминовой кислоты, присутствующий в положении 6 β-цепи нормального гемоглобина A, замещен на остаток валина. Такая замена приводит к утрате одного отрицательного заряда в каждой из двух β-цепей. *Б.* Расположение 163 мутаций (кружки, обведенные черной линией), зарегистрированных в гемоглобинах человека к 1979 г. 105 мутаций находится в β-цепях и 58 мутаций – в α-цепях. Инвариантные для обеих цепей остатки обозначены красными кружками. Мутации, локализованные в окрестности гемогруппы, с большой степенью вероятности приводят к серьезным функциональным нарушениям гемоглобина.



ние на четвертичную структуру гемоглобина. Появление валина в положении, нормально занимаемом остатком глутаминовой кислоты, приводит к возникновению «липкого» гидрофобного контакта на поверхности молекулы, где расположен шестой остаток β-цепи. В результате молекулы дезоксигемоглобина S слипаются и образуют аномально длинные нитевидные агрегаты, которые и обусловливают серповидную форму эритроцитов (рис. 8-21).

8.20. «Неправильные» аминокислоты появляются в белках в результате генных мутаций

У людей, страдающих серповидноклеточной анемией, ген, ответственный за синтез β-цепи гемоглобина, вследствие необратимой мутации кодирует включение остатка валина в положение, где в нормальном гемоглобине находится остаток глутаминовой кислоты; при этом все остальные аминокислоты β-цепи занимают свои обычные положения. Серповидноклеточный гемоглобин – это результат только одной из более 300 различных мутаций, обнаруженных в гемоглобиновых генах человека, причем в большинстве случаев такие мутации приводят к замене какой-нибудь одной аминокислоты в α- или β-цепи гемоглобина (рис. 8-23; табл. 8-4). Многие из этих мутаций были выявлены при помощи электрофоретических тестов, а также из анализа пептидных карт гемоглобина, выделенного из крови больных, у которых эритроциты имели те или иные отклонения от нормы.

Гемоглобин – не единственный белок, содержащийся в организме человека, который претерпевает генетические изменения, обусловленные мутациями. Все белки, глобулярные и фибриллярные, подвержены мутациям. Гемоглобину уделяют значительно больше внимания просто потому, что многие изменения молекулярной структуры гемоглобина вызывают у людей выраженные нарушения кровообращения или дыхания. Кроме того, гемоглобин легко выделить из небольших проб крови, взятых для анализа. Мутации, ведущие к изменениям в аминокислотной последовательности, обнаружены и во многих других белках человека, включая разного рода ферменты, участвующие в процессах обмена, а также фибриллярные белки, например коллаген.

Хотя мутации, вызывающие те или иные изменения в молекулах белка, рассматриваются обычно как генетические «дефекты», в генах, содержащих информацию о структуре белковых молекул, могут происходить и такие мутации, ко-

Таблица 8-4. Некоторые мутантные гемоглобины человека[1)]

Мутантный гемоглобин	Нормальный остаток и его положение в цепи	Остаток, появляющийся в мутантном белке
	α-цепь	
I	16 Lys	Glu
$G_{Гонолулу}$	30 Glu	Gln
Норфолк	57 Gly	Asp
$M_{Бостон}$	58 His	Tyr
$G_{Филадельфия}$	68 Asn	Lys
$O_{Индонезия}$	116 Glu	Lys
	β-цепь	
C	6 Glu	Lys
S	6 Glu	Val
$G_{Сан\text{-}Хосе}$	7 Glu	Gly
E	26 Glu	Lys
$M_{Саскатун}$	63 His	Tyr
Цюрих	63 His	Arg
$M_{Милуоки}$	67 Val	Glu
$D_{Пенджаб}$	121 Glu	Gln

[1)] Мутации чаще всего обозначают название города или местности, где они были обнаружены. Серповидную форму клеток вызывает только гемоглобин S. Другие мутантные гемоглобины характеризуются иными функциональными изменениями.

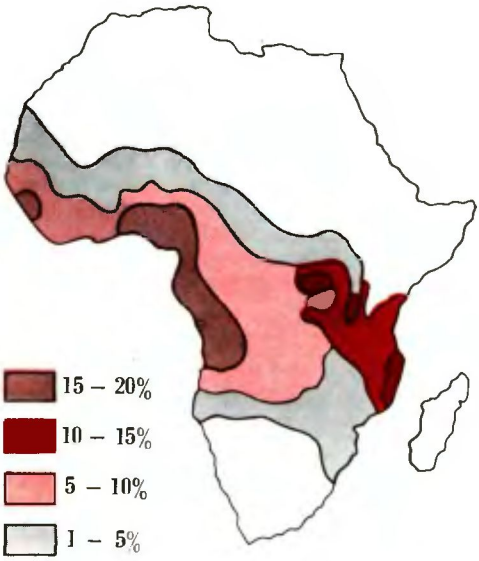


Рис. 8-24. Относительная частота распространения гена серповидноклеточности в различных частях Африки. Зоны, соответствующие наибольшему распространению этого гена, находятся в тех областях, где когда-то основной причиной смертности была малярия.

торые «улучшают» белок, т.е. способствуют более эффективному выполнению им его функции, вследствие чего организм, несущий такой ген, оказывается лучше приспособленным к условиям его существования. В определенной степени это относится и к мутации, обусловившей возникновение серповидноклеточного гемоглобина. В некоторых районах Африки до 40% негритянского населения являются носителями гена серповидноклеточности. Это указывает на то, что данная мутация должна иметь приспособительное значение. Действительно, коренные африканцы, несущие ген серповидноклеточности, значительно меньше подвержены малярии, вызываемой переносимыми комарами паразитами, которые проникают в эритроциты человека и размножаются в них. В серповидных эритроцитах условия для развития малярийных паразитов менее благоприятны, чем в нормальных. Географические районы Африки, в которых чаще всего встречаются носители серповидноклеточности,–это как раз те местности, где когда-то наиболее широко была распространена малярия (рис. 8-24). Таким образом, ген серповидноклеточности увеличивал шансы на выживание у жителей тех районов Африки, где малярия была эндемическим заболеванием и причиной высокой детской смертности.

8.21. Можно ли найти «молекулярное лекарство» для серповидноклеточного гемоглобина?

Хотя ген серповидноклеточности, по всей вероятности, давал определенные преимущества его носителям в тех районах Африки, в которых свирепствовала малярия, в настоящее время он, безусловно, «вреден» для его обладателей, особенно для негров, переселившихся из Африки в другие районы мира, где малярия редко встречается и средняя продолжительность жизни намного выше. На основе полученных сведений о структуре и конформации гемоглобина предпринимаются попытки найти способ рационального лечения серповидноклеточной анемии. Они сводятся к поиску таких лекарственных веществ или химических соединений, которые не оказывали бы неблагоприятных воздействий на организм и были бы способны взаимодействовать с одной или несколькими функциональными группами молекулы гемоглобина S, предотвращая тем самым вредные последствия замены в β-цепях глутаминовой кислоты на валин. Уже найдено несколько химических соединений, которые при добавлении их в пробирку с эритроцитами почти полностью препятствуют образованию клеток серповидной формы. Например, *цианат калия* реагирует с определенными аминогруппами молекулы гемоглобина S, что приводит к образованию карбамоил-производных гемоглобина (рис. 8-25), при дезоксигенации которых эритроциты не принимают серповидной формы. Однако введение цианата калия больным серповидноклеточной анемией небезопасно, так как это соединение вызывает побочные токсические эффекты. Тем не ме-

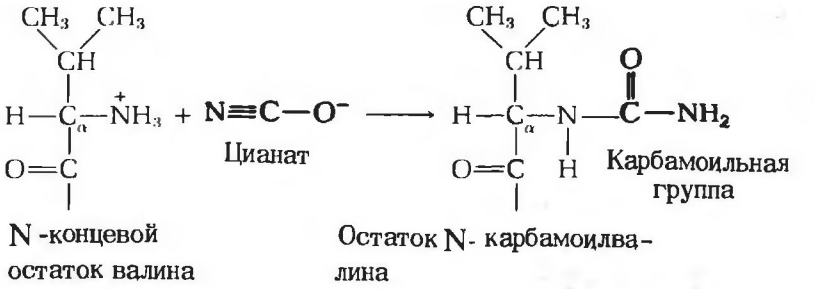


Рис. 8-25. Образование N-карбамоилпроизводного N-концевого остатка валина в β-цепи гемоглобина S при обработке его in vitro цианатом калия. После такой химической модификации только одного аминокислотного остатка эритроциты больных серповидноклеточной анемией при дезоксигенации уже не принимают серповидной формы.

нее поиски эффективных средств против серповидноклеточной анемии вселяют некоторую надежду на то, что в конце концов методы биохимической инженерии позволят сконструировать соединение, которое не только предотвратит вредное влияние гемоглобина S, но и не будет оказывать никаких неблагоприятных воздействий на другие белки организма.

Краткое содержание главы

Глобулярные белки, судя по результатам исследования их формы и размеров, имеют компактно свернутые полипептидные цепи. Рентгеноструктурный анализ миоглобина и других небольших по размерам одноцепочечных белков, таких, как цитохром *c*, лизоцим и рибонуклеаза, показывает, что для каждого из этих белков характерна определенная третичная структура, т.е. специфический способ свертывания полипептидной цепи в пространстве. Во всех глобулярных белках полипептидные цепи очень плотно свернуты, так что внутри молекулы белка если и остается, то лишь немного места для молекул воды. Почти все гидрофобные R-группы скрыты внутри молекулы и экранированы от взаимодействия с водой, большинство же ионных R-групп находится на поверхности в гидратированном состоянии и обращено в сторону водного окружения. Третичная структура свернутой полипептидной цепи стабилизируется целым рядом нековалентных взаимодействий (особенно гидрофобными взаимодействиями между неполярными R-группами), электростатическим притяжением между противоположно заряженными R-группами и водородными связями. Все эти взаимодействия, будучи слабыми по своей природе, в совокупности оказываются очень прочными. В некоторых глобулярных белках определенную роль в формировании и стабилизации третичной структуры играют дисульфидные поперечные связи. Информация, определяющая третичную структуру белков, заложена в аминокислотной последовательности их полипептидных цепей, о чем свидетельствует тот факт, что гомологичные белки из разных видов имеют не только много общих инвариантных аминокислотных остатков, но и одинаковую конформацию. Доказательством этого утверждения служит то, что многие денатурированные глобулярные белки, утратившие свойственную им биологическую активность, способны самопроизвольно ренатурировать с полным восстановлением их биологической активности.

Олигомерные глобулярные белки, содержащие две или большее число полипептидных цепей, представляют собой более крупные по сравнению с одноцепочечными белками молекулы с более сложной структурой, часто наделенные регуляторными свойствами. Способ упаковки отдельных полипептидных цепей (субъединиц) в молекуле олигомерного белка называется его четвертичной структурой. Рентгеноструктурный анализ гемоглобина и других олигомерных

белков позволил установить, что они тоже имеют очень компактную структуру, причем большинство гидрофобных R-групп находится внутри глобулы, а большинство гидрофильных R-групп – снаружи. В молекуле гемоглобина, состоящей из двух α-цепей и двух β-цепей, возникает лишь небольшое число контактов между одинаковыми цепями и множество контактов, соединяющих вместе α- и β-субъединицы с образованием пар $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_2\beta_2$. Кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет сигмоидную форму, поэтому гемоглобин хорошо приспособлен для связывания кислорода в легких и его освобождения в периферических тканях. Миоглобин в отличие от гемоглобина обладает значительно более высоким сродством к кислороду и характеризуется гиперболической кривой насыщения кислородом, благодаря чему он наделен способностью запасать кислород в мышцах. Кислород легче связывается гемоглобином при более высоких значениях pH и низкой концентрации CO_2; освобождению же кислорода из гемоглобина благоприятствуют более низкие значения pH и высокие концентрации CO_2. Эти соотношения, равно как и регулирующее воздействие связывающегося с гемоглобином 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ) на сродство гемоглобина к кислороду, обусловлены наличием у гемоглобина четырех специфических центров связывания с O_2, CO_2, ионами H^+ и ДФГ, а также изменениями в четвертичной структуре гемоглобина в цикле оксигенация–дезоксигенация. Таким образом, субъединицы гемоглобина, подобно субъединицам других олигомерных белков, способны передавать сигналы о регуляторных взаимодействиях посредством конформационных изменений молекулы белка. Изменения в аминокислотной последовательности глобулярных белков, обусловленные генными мутациями, например замена двух аминокислотных остатков в молекуле гемоглобина при серповидноклеточной анемии, могут вызвать значительные изменения конформации белка и, следовательно, сказаться на его биологических функциях.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Cantor C.R., Schimmel P.R. Biophysical Chemistry, p. 1, The Conformation of Biological Macromolecules, Freeman, San Francisco, 1980.

Dickerson R.E., Geis I. Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1982.

Fermi G., Perutz M. Atlas of Molecular Structures in Biology, vol. 2, Hemoglobin and Myoglobin, Oxford University Press, New York, 1981.

Glusker J.P., Trueblood K.N. Crystal Structure Analysis: A Primer. Oxford University Press, New York, 1972.

Haschemeyer R., Haschemeyer A.H. Proteins: A Guide to Study by Physical and Chemical Methods, Wiley, New York, 1973.

Schultz G.E., Schirmer R.H. Principles of Protein Structure. Springer-Verlag, New York, 1979.

Статьи

Anfinsen C.B. Principles That Govern the Folding of Polypeptide Chains, Science, **181**, 223–230 (1973).

Cerami A., Peterson C.M. Cyanate and Sickle Cell Disease, Sci. Am., **232**, 44, April (1975) (offprint 1319).

Dickerson R.E. Cytochrome C and the Evolution of Energy Metabolism, Sci. Am. **242**, 236, March (1980).

Ingram V.M. Gene Mutation in Hb: The Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hemoglobin, Nature, **180**, 326–328 (1957). Открытие аминокислотной замены в гемоглобине S.

Kendrew J.C. The Three-Dimensional Structure of a Protein Molecule, Sci.Am., **205**, 96–111, December (1961) (offprint 121).

Koshland D.E., Jr. Protein Shape and Biological Control. Sci.Am., **229**, 52, October (1973).

Pauling L., Itano H., Singer S.J., Wells I.C. Sickle Cell Anemia: A Molecular Disease, Science, **110**, 543–548 (1949). Классическое описание электрофоретических различий между гемоглобинами A и S.

Perutz M.F. Hemoglobin Structure and Respiratory Transport, Sci.Am., **239**, 92, December (1978).

Perutz M.F., Lehmann H. Molecular Pathology of Human Hemoglobin, Nature, **219**, 902–909 (1968).

Вопросы и задачи

1. *Образование изгибов и внутрицепочечных поперечных связей в полипептидных цепях.*

Укажите, где в изображенном ниже полипептиде возможно образование изгибов или поворотов цепи. Где могут образоваться внутрицепочечные дисульфидные поперечные связи?

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ile ·	Ala ·	His ·	Thr ·	Tyr ·	Gly ·	Pro ·	Phe ·	Glu ·	Ala ·	Ala ·

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Met ·	Cys ·	Lys ·	Trp ·	Glu ·	Ala ·	Gln ·	Pro ·	Asp ·	Gly ·	Met ·

23	24	25	26	27	28
Glu ·	Cys ·	Ala ·	Phe ·	His ·	Arg

2. *Расположение специфических аминокислот в глобулярных белках.* По данным рентгеноструктурного анализа миоглобина и других одноцепочечных глобулярных белков небольших размеров был сделан ряд обобщений, касающихся укладки полипептидных цепей растворимых белков. Исходя из этих обобщений, укажите наиболее вероятное расположение (внутри или на поверхности молекулы нативного глобулярного белка) аминокислотных остатков аспарагиновой кислоты, лейцина, серина, валина, глутамина и лизина. Поясните свой ответ.
3. *Образование функционирующих белков из линейных полимеров.* Белок обладает биологической активностью лишь в том случае, если он имеет правильную трехмерную структуру. Синтез белков основан на информации, содержащейся в линейной, т.е. одномерной кодирующей последовательности ДНК. В соответствии с этой информацией рибосомы осуществляют сборку линейной, одномерной, последовательности аминокислот. Учитывая эти факты, объясните, каким образом в клетках могут формироваться биологически активные белки, обладающие специфической трехмерной структурой. Приведите какие-нибудь экспериментальные данные, подтверждающие ваши объяснения.
4. *Дисульфидные поперечные связи и укладка полипептидной цепи белка.* Гипотезу о том, что характер свертывания полипептидной цепи белка (т.е. его вторичная и третичная структуры) определяются его линейной аминокислотной последовательностью, можно проверить, если дать развернутым белковым молекулам снова самопроизвольно свернуться. Определив биологическую активность белка до развертывания его цепей и после их свертывания (ренатурации), можно вычислить долю белковых молекул, вернувшихся в нативное состояние. Например, рибонуклеаза полностью развертывается после разрыва ее четырех дисульфидных поперечных связей и последующей обработки 8 М мочевиной. Если затем удалить мочевину путем диализа и создать подходящие условия для образования новых дисульфидных поперечных связей, то активность рибонуклеазы восстанавливается на 95–100%. Схема этого эксперимента показана на рис. 8-8. Ниже приведены результаты аналогичных опытов по ренатурации других белков:

Белок	Число дисульфидных связей	Активность, %	
		наблюдаемая	предсказанная[1)]
Рибонуклеаза	4	95–100	~ 1
Лизоцим	4	50–80	~ 1
Щелочная фосфатаза	2	80	~ 33
Инсулин (бычий)	3	5–10	~ 6–7

[1)] Исходя из предположения о случайном образовании дисульфидных связей.

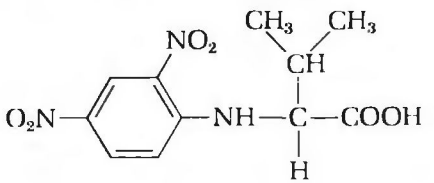
а) Если бы образование четырех дисульфидных поперечных связей в процессе свертывания цепи рибонуклеазы происходило в результате совершенно случайного взаимодействия остатков цистеина, то можно было бы ожидать, что активность фермента после ренатурации составит всего 1% исходной активности. Почему она была бы столь низкой?

б) Активность рибонуклеазы, лизоцима и щелочной фосфатазы, восстанавливающаяся после ренатурации этих белков, оказывается гораздо выше той, которую следовало бы ожидать, исходя из предположения о случайном образовании дисульфидных поперечных связей. Объясните это наблюдение.

в) Один из белков, приведенных в таблице, а именно инсулин, явно выделяется из

всех других. Наблюдаемая активность инсулина после его ренатурации оказывается очень низкой и практически совпадает с активностью, предсказанной исходя из предположения о случайном образовании дисульфидных связей. Что можно сказать о нативной структуре инсулина на основе этого наблюдения? Попробуйте представить себе, как формируется нативная структура инсулина.

5. *Число полипептидных цепей в олигомерном белке.* Некоторое количество (660 мг) олигомерного белка с молекулярной массой 132 000 обрабатывали избытком 2,4-динитрофторбензола в слабощелочной среде вплоть до завершения химической реакции. Затем пептидные связи белка были подвергнуты полному гидролизу путем нагревания белка в присутствии концентрированной HCl. В гидролизате содержалось 5,5 мг следующего соединения:



Никаких других 2,4-динитрофенильных производных, образующихся в реакции с α-аминогруппами аминокислот, обнаружено не было.

а) Объясните, почему эти данные можно использовать для определения числа полипептидных цепей в олигомерном белке.

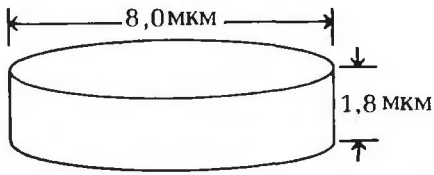
б) Рассчитайте число полипептидных цепей в этом белке.

6. *Молекулярная масса гемоглобина.* Первое указание на то, что белки по молекулярной массе намного превосходят известные в то время органические соединения, было получено более 100 лет назад. Например, уже тогда было известно, что гемоглобин содержит 0,34 вес. % железа.

а) Исходя из этой информации, определите минимальную молекулярную массу гемоглобина.

б) Последующие эксперименты показали, что истинная молекулярная масса гемоглобина равна 64 500. Какую информацию отсюда можно извлечь о числе атомов железа в гемоглобине?

7. *Упаковка гемоглобина в эритроцитах человека.* В крови человека содержится 160 г гемоглобина на 1 л крови. На 1 мл крови приходится около $5{,}0 \cdot 10^9$ эритроцитов. Хотя каждый эритроцит имеет форму двояковогнутого диска, для простоты расчетов мы будем рассматривать их просто как цилиндры следующих размеров:



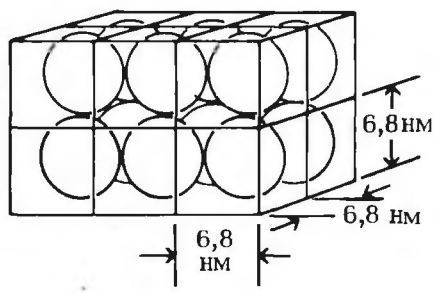
а) Рассчитайте, какое количество гемоглобина (по весу) содержится в одном эритроците.

б) Сколько молекул гемоглобина содержится в одном эритроците?

в) Рассчитайте объем одного эритроцита.

г) Гемоглобин – глобулярный белок, молекула которого имеет диаметр 6,8 нм. Какую долю объема всех эритроцитов занимает гемоглобин?

д) Отношение общего объема гемоглобина к общему объему эритроцита (см. выше пункт г) не дает четкого представления о том, насколько тесно упакованы в клетке молекулы гемоглобина. Следует помнить, что при упаковке сферических молекул пустое пространство между сферами всегда составляет значительную долю общего объема. Исходя из предположения, что гемоглобин в эритроците упакован в виде кубической решетки, как показано на рисунке

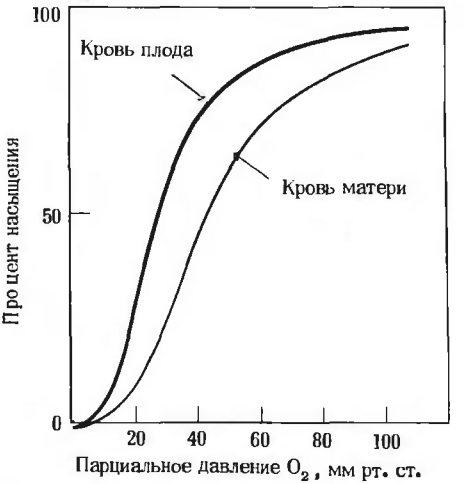


рассчитайте общий объем решетки, занятой молекулами гемоглобина в одном эритроците, и сравните его с объемом эритроцита. Насколько тесно упакованы молекулы гемоглобина в эритроците?

е) В свете вашего ответа на предыдущий вопрос (пункт д) оцените, расположены ли молекулы гемоглобина в эритроцитах достаточно близко друг от друга, чтобы

взаимодействовать между собой. Если да, то может ли взаимодействие между молекулами гемоглобина S в серповидных эритроцитах повлиять на их форму?

8. *Роль миоглобина в запасании тканями кислорода.*
   а) Ткани животных содержат около 70% (по весу) воды. Концентрация кислорода в тканевой воде в норме составляет $3{,}5 \cdot 10^{-5}$ М. Рассчитайте, какое количество кислорода может быть запасено в 1 кг ткани в виде растворенного в воде газа.
   б) В большинстве тканей млекопитающих содержится миоглобин, предназначенный для запасания кислорода. У человека наибольшее количество миоглобина содержится в ткани сердца, где он составляет 0,7% (по весу) всей массы ткани. Рассчитайте, какое количество кислорода (в граммах) может быть запасено в 1 кг сердечной мышечной ткани человека. Сравните полученное значение с ответом на вопрос, поставленный в пункте *а*.
   в) В скелетных мышцах морских млекопитающих, способных длительно находиться под водой, содержится намного больше миоглобина, чем у всех остальных позвоночных, причем его концентрация пропорциональна длительности погружения животного в воду. В свежем тюленьем мясе, находившемся какое-то время на воздухе, оказалось 0,15 г кислорода на 1 кг сырого веса. Рассчитайте процентное содержание миоглобина в мышцах тюленя.
9. *Сравнение свойств гемоглобинов, содержащихся в эритроцитах матери и плода.* При изучении транспорта кислорода у беременных самок было показано, что кривые насыщения гемоглобина кислородом в крови матери и плода, полученные в одних и тех же условиях, сильно различаются. Это явление обусловлено присутствием в эритроцитах плода гемоглобина (гемоглобин F, $\alpha_2\gamma_2$), который по своей структуре отличается от обычного гемоглобина A ($\alpha_2\beta_2$), содержащегося в эритроцитах матери.
   а) Какой гемоглобин обладает при физиологических условиях более высоким сродством к кислороду – гемоглобин A или гемоглобин F? Поясните ответ.
   б) Какое физиологическое значение имеет тот факт, что два гемоглобина обладают разным сродством к кислороду? Поясните ответ.
   в) Если из препаратов гемоглобина A и F тщательно удалить весь 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ), кривые их насыщения кислородом сместятся влево (т.е. сродство гемоглобинов к кислороду повысится). Однако у гемоглобина A сродство к кислороду при этом становится выше, чем у гемоглобина F. Если в препараты гемоглобина вновь добавить ДФГ, то кривые насыщения кислородом примут прежний вид, показанный на рисунке. Какое влияние оказывает ДФГ на сродство гемоглобина к кислороду? Как на основе приведенной выше информации можно объяснить различие в сродстве к кислороду у гемоглобинов матери и плода?



10. *Идентификация мутантного гемоглобина.* Препарат мутантного гемоглобина подвергли трипсиновому гидролизу, а затем получили пептидную карту. При этом выяснилось, что мутантный гемоглобин отличается от нормального гемоглобина A тем, что содержит в одном из пептидов вместо остатка аспарагина остаток лизина.
    а) Для чего проводится гидролиз гемоглобина трипсином?
    б) Каким из перечисленных в табл. 8-4 мутантных гемоглобинов мог бы быть исследуемый гемоглобин?
    в) Как можно было бы выявить этот мутантный гемоглобин более быстрым и простым способом?
11. *Как отличить гемоглобин C от гемоглобина S?* При хранении в холодильнике двух проб крови, одна из которых содержала гемоглобин C, а другая – гемоглобин S, были потеряны соответствующие наклейки. Как определить, в какой пробе содержится гемоглобин C, а в какой – гемоглобин S (см. табл. 8-4)?

ГЛАВА 9

ФЕРМЕНТЫ

В этой главе речь пойдет о самых замечательных и наиболее специализированных белках – ферментах, т. е. белках, обладающих каталитической активностью. Ферменты являются необычайно мощными катализаторами, как правило, намного превосходящими по своей эффективности синтетические катализаторы. Они высокоспецифичны по отношению к своим субстратам и ускоряют строго определенные химические реакции без образования побочных продуктов; ферменты функционируют в разбавленных водных растворах при физиологических значениях температуры и pH. Лишь немногие катализаторы небиологического происхождения обладают всеми этими свойствами.

Ферменты – это функциональные единицы клеточного метаболизма. Действуя в строго определенной последовательности, они катализируют сотни многостадийных реакций, в ходе которых расщепляются молекулы питательных веществ, запасается и преобразуется химическая энергия и из простых молекул-предшественников строятся макромолекулы, входящие в состав клетки. Из большого числа ферментов, принимающих участие в метаболизме, можно выделить особый класс *регуляторных ферментов*, которые могут воспринимать различные метаболические сигналы и в соответствии с ними изменять свою каталитическую активность. Благодаря действию таких ферментов все ферментные системы в клетке функционируют координированно, что обеспечивает гармоническое равновесие между различными метаболическими процессами, необходимыми для поддержания жизнеспособности отдельных клеток и целых организмов.

Некоторые болезни человека, особенно генетически обусловленные наследственные заболевания, связаны с недостаточностью или полным отсутствием одного или нескольких ферментов в тканях. С другой стороны, патологические состояния могут быть вызваны избыточной активностью того или иного фермента; в таких случаях иногда удается подобрать лекарственный препарат, ингибирующий активность этого фермента. Измерение активности некоторых ферментов в плазме крови, эритроцитах или образцах тканей имеет важное значение для диагностики многих заболеваний. В наше время ферменты широко используются не только в медицине, но и в химической и пищевой промышленности, а также в сельском хозяйстве. Ферменты играют определенную роль даже в повседневном домашнем хозяйстве.

В этой главе мы не ставим перед собой цель классифицировать почти 2000 различных известных в настоящее время ферментов; вместо этого мы рассмотрим свойства и характеристики, общие для большинства ферментов. В последующих главах, когда речь пойдет о метаболических процессах в клетках, мы подробно остановимся на свойствах и функциях отдельных ферментов, а также приведем некоторые примеры их практического применения.

9.1. История биохимии – это в значительной мере история исследования ферментов

Первые указания на то, что в биологических системах происходят какие-то каталитические процессы, были получены в начале XIX в. при изучении переваривания мяса под действием желудочного сока и превращения крахмала в сахар под действием слюны и различных экстрактов из тканей растений. Вслед за этим были зарегистрированы и другие случаи биологического катализа, который теперь называется ферментативным. В 50-х годах прошлого века Луи Пастер пришел к выводу, что сбраживание дрожжами сахара в спирт катализируется «ферментами». Он считал, что эти *ферменты* (впоследствии для их обозначения был введен еще один термин – *энзимы*, что в переводе означает «в дрожжах») неотделимы от структуры живой клетки дрожжей. Эта точка зрения господствовала в науке в течение длительного времени. Поэтому важной вехой в истории биохимии стало открытие, которое сделал в 1897 г. Эдвард Бухнер; ему удалось экстрагировать из дрожжевых клеток в водный раствор набор ферментов, катализирующих расщепление сахара до спирта в процессе брожения. Тем самым было доказано, что столь важные ферменты, катализирующие один из основных метаболических путей, приводящих к высвобождению энергии, сохраняют способность функционировать и после выделения их из живых клеток. Это открытие вдохновило биохимиков на новые поиски, направленные на выделение разнообразных ферментов и изучение их каталитических свойств.

В начале XX в. Эмиль Фишер провел первые систематические исследования по изучению специфичности ферментов. Тогда же начали появляться работы, посвященные кинетике ферментативных реакций, и были сформулированы теории действия ферментов. Но лишь в 1926 г. впервые был получен очищенный фермент в кристаллическом виде. Это была уреаза, которую выделил из семян канавалии сотрудник Корнеллского университета Джеймс Самнер. Самнер обнаружил, что кристаллы уреазы целиком состоят из белка. Поэтому он высказал предположение, что все ферменты представляют собой белки, однако против этой точки зрения активно возражал известный, пользовавшийся большим авторитетом немецкий биохимик Рихард Вильштеттер, который отстаивал мнение о том, что ферменты являются низкомолекулярными соединениями, а обнаруженный в кристаллах уреазы белок – это просто загрязнение. И только в 30-е годы, после того как Джон Нортроп и его сотрудники получили в кристаллическом виде пепсин и трипсин и установили, что эти ферменты тоже представляют собой белки, точка зрения о белковой природе ферментов получила всеобщее признание. Вслед за этим наступил период активного изучения ферментов, катализирующих различные реакции клеточного метаболизма. К настоящему времени идентифицировано около 2000 различных ферментов, каждый из которых катализирует какую-то одну определенную химическую реакцию. Сотни ферментов получены в чистом кристаллическом виде (рис. 9-1).



Рис. 9-1. Кристаллы хнмотрипсина быка.

Но даже в наши дни многие вопросы, касающиеся ферментов, еще не получили полного ответа. Почему именно белки играют роль катализаторов в клетках? Почему молекулы ферментов намного крупнее молекул субстратов, на которые они действуют? Каким образом аминокислоты, сами по себе не способные ускорять химические реакции, после соединения в специфические последовательности создают столь мощные каталитические системы? Как регулируется действие ферментов?

9.2. Ферменты обнаруживают все свойства белков

Все известные в настоящее время ферменты представляют собой белки, причем их каталитическая активность зависит от степени сохранности нативной структуры белка. Например, разрушение полипептидных цепей в результате кипячения фермента в растворе сильной кислоты или обработки трипсином обычно приводит к потере его каталитической активности. Это свидетельствует о том, что первичная структура белка необходима для проявления его ферментативной активности. Более того, стоит нам только нарушить характерную для нативной молекулы фермента упаковку полипептидной цепи (цепей), нагревая белок или воздействуя на него экстремальными значениями pH или денатурирующими агентами, как каталитическая активность фермента исчезает. Таким образом, для ферментативной активности белков важное значение имеет сохранение их первичной, вторичной и третичной структур.

Молекулярные массы ферментов, как и всех остальных белков, лежат в пределах от 12 000 до 1 000 000, так что их размеры намного превышают размеры их субстратов или функциональных групп, на которые они действуют (рис. 9-2). Некоторые ферменты состоят только из полипептидных цепей и не содержат никаких других химических групп, кроме тех, которые входят в состав аминокислотных остатков; к подобным ферментам относится, например, *рибонуклеаза из поджелудочной железы*. Однако для



Рис. 9-2. Относительные размеры молекулы фермента (мол. масса 100 000, диаметр 7 нм) и типичной молекулы субстрата (мол. масса 250, длина 0,8 нм). Активный центр занимает лишь незначительную часть поверхности молекулы фермента. Для сравнения показана также молекула воды.

каталитической активности многих ферментов необходим еще и дополнительный химический компонент – *кофактор*. Роль кофакторов могут играть неорганические вещества, например ионы Fe^{2+}, Mn^{2+} или Zn^{2+} (табл. 9-1), или сложные органические вещества, которые в этом случае носят названия *коферментов* (табл. 9-2). Для каталитической активности ряда ферментов требуется как кофермент, так и какой-нибудь один или даже несколько ионов металлов. У одних ферментов коферменты или ионы металлов связываются с белком временно и непрочно, тогда как у других эти связи могут быть прочными и постоянными; в последнем случае небелковую часть фермента называют *простетической группой*. Весь каталитически активный фермент вместе с коферментом или ионом металла носит название *голофермента*. Коферменты и ионы металлов термостабильны, тогда как белковая

Таблица 9-1. Некоторые ферменты, для действия которых необходимы в качестве кофакторов ионы и атомы металлов

Fe^{2+} или Fe^{3+}	Цитохромоксидаза
	Каталаза
	Пероксидаза
Cu^{2+}	Цитохромоксидаза
Zn^{2+}	ДНК-полимераза
	Карбоангидраза
	Алкогольдегидрогеназа
Mg^{2+}	Гексокиназа
	Глюкозо-6-фосфатаза
Mn^{2+}	Аргиназа
K^{+}	Пируваткиназа (нуждается также в ионах Mg^{2+})
Ni^{2+}	Уреаза
Mo	Нитратредуктаза
Se	Глутатионпероксидаза

часть фермента, называемая *апоферментом*, денатурирует при нагревании. Коферменты, которые мы рассмотрим в гл. 10, функционируют как переносчики специфических функциональных групп (табл. 9-2).

Таблица 9-2. Коферменты, выполняющие роль промежуточных переносчиков некоторых атомов или функциональных групп[1)]

Кофермент	Переносимые группы
Тиаминпирофосфатаза	Альдегиды
Флавинадениндинуклеотид	Атомы водорода
Никотинамидадениндинуклеотид	Гидрид-ионы (H^-)
Кофермент А	Ацильные группы
Пиридоксальфосфат	Аминогруппы
5'-дезоксиаденозилкобаламин	Атомы водорода и алкильные группы
Биоцитин	CO_2
Тетрагидрофолат	Другие одноуглеродные группы

[1)] Их структура и механизм действия описаны в гл. 10.

9.3. Ферменты классифицируются на основе реакций, которые они катализируют

Названия многих ферментов образуются путем прибавления суффикса-аза к названию их субстрата. Так, фермент, катализирующий гидролиз мочевины, называется *уреазой* (от англ. «urea»), а фермент, гидролизующий аргинин,– *аргиназой*. Однако многие ферменты имеют названия, не связанные с названиями их субстратов, например *пепсин* и *трипсин*. Случается также, что один и тот же фермент имеет по меньшей мере два названия или же два разных фермента носят одно и то же название. Из-за этих и других затруднений терминологического характера, а также вследствие все возрастающего числа вновь открываемых ферментов было принято международное соглашение о создании систематической номенклатуры и классификации ферментов. В соответствии с этой системой все ферменты в зависимости от типа катализируемых ими реакций делятся на шесть основных классов, каждый из которых включает ряд подклассов (табл. 9-3). Каждый фермент имеет четырехзначный кодовый номер (шифр) и систематическое название, которое позволяет идентифицировать катализируемую этим ферментом реакцию. В качестве примера можно привести название фермента, катализирующего следующую реакцию:

$$\text{ATP} + \text{D-глюкоза} \rightleftarrows \text{ADP} + \text{D-глюкозо-6-фосфат}.$$

Формальное систематическое название этого фермента – *ATP: гексоза 6-фосфотрансфераза*, из которого следует, что этот фермент катализирует перенос фосфатной группы с ATP на гексозу. Согласно табл. 9-3, этот фермент относится к классу 2; ему присвоен кодовый номер 2.7.1.1, где первая цифра (2) обозначает класс (трансферазы), вторая (7) – подкласс (фосфотрансферазы), третья (1) – подподкласс (фосфотрансферазы с гидроксильной группой в качестве акцептора) и четвертая цифра (1) – порядковый номер фермента в его подподклассе; она по-

Таблица 9-3. Международная классификация ферментов, основанная на катализируемых ими реакциях

Большинство ферментов катализирует перенос электронов, атомов или функциональных групп. Поэтому при классификации им присваивают кодовые номера и названия, из которых можно определить тип катализируемой ими реакции переноса, а также группы, играющие роль донора и акцептора. Существуют шесть основных классов.

№ Класс	Тип катализируемой реакции
1. Оксидоредуктазы	Перенос электронов
2. Трансферазы	Реакции с переносом групп
3. Гидролазы	Реакции гидролиза (перенос функциональных групп на молекулу воды)
4. Лиазы	Присоединение групп по двойным связям и обратные реакции
5. Изомеразы	Перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм
6. Лигазы	Образование C—C-, C—S-, C—O- и C—N-связей за счет реакций конденсации, сопряженных с распадом ATP

казывает, что акцептором фосфатной группы служит D-гексоза. В тех случаях, когда фермент имеет длинное или труднопроизносимое систематическое название, можно пользоваться его тривиальным названием. Например, тривиальное название обсуждаемого нами фермента – *гексокиназа.*

9.4. Ферменты ускоряют химические реакции, снижая энергию активации

Ферменты – это истинные катализаторы. Они значительно повышают скорость строго определенных химических реакций, которые в отсутствие фермента протекают очень медленно. Ферменты не могут влиять на положение равновесия ускоряемых ими реакций, при этом в ходе реакций они не расходуются и не претерпевают необратимых изменений.

Каким образом катализаторы, в частности ферменты, повышают скорость химических реакций? Прежде всего мы должны вспомнить о том, что в любой популяции молекул индивидуальные молекулы при постоянной температуре сильно различаются по количеству содержащейся в них энергии и что распределение общей энергии между молекулами описывается колоколообразной кривой. Одни молекулы обладают высокой энергией, а другие более низкой, но в большинстве из них содержится количество энергии, близкое к среднему значению. Химическая реакция типа $A \rightarrow P$ протекает потому, что в любой момент времени некоторая доля молекул A обладает большей внутренней энергией по сравнению с другими молекулами данной популяции, и этой энергии оказывается достаточно для достижения ими вершины энергетического барьера (рис. 9-3) и перехода в активную форму, называемую *переходным состоянием.* Энергией активации называется количество энергии в калориях, необходимое для того, чтобы все молекулы 1 моля вещества при определенной температуре достигли переходного состояния, соответствующего вершине энергетического (активационного) барьера. В этой точке существует равная вероятность того, что достигшие ее молекулы вступят в реакцию с образованием продукта P или вернутся обратно на уровень непрореагировавших молекул A (рис. 9-3). Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул, находящихся в переходном состоянии. Следовательно, скорость химической реакции будет очень высокой, если на вершине энергетического барьера находится значительная доля молекул A, и очень низкой, если доля таких молекул невелика.

Существуют два основных пути повышения скорости химической реакции. Первый путь – повышение температуры, т. е. ускорение теплового движения моле-

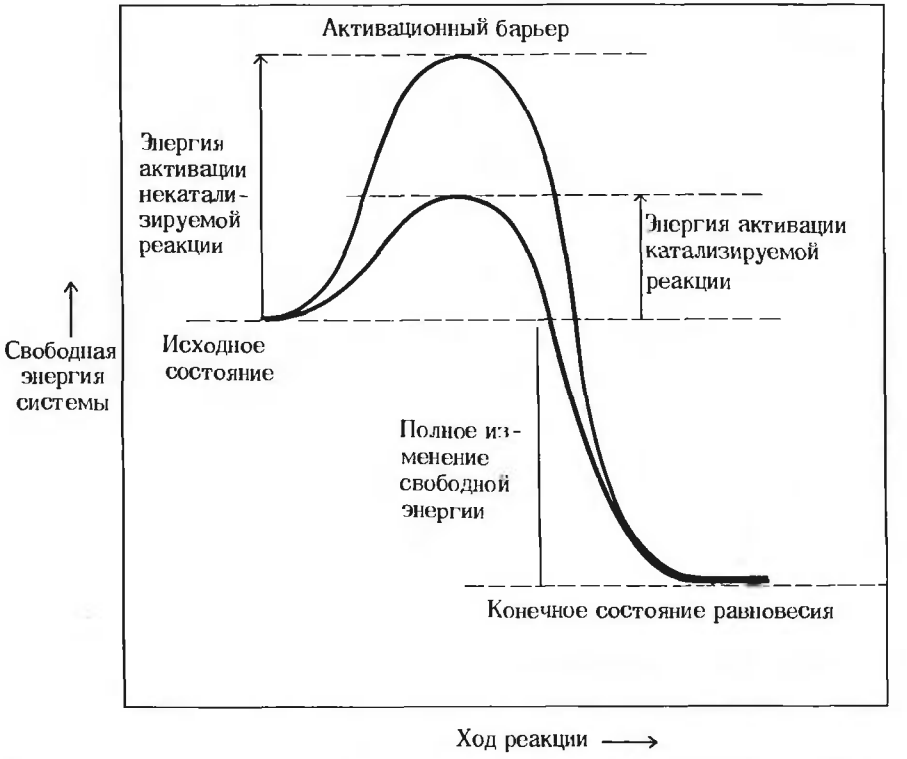


Рис. 9-3. Катализаторы снижают энергию активации (энергетический, или активационный, барьер) химических реакций, не влияя при этом на полное изменение свободной энергии в ходе реакции и на конечное состояние равновесия. Вершина энергетического барьера соответствует переходному состоянию.

кул, которое приводит к увеличению доли молекул, обладающих достаточной внутренней энергией для достижения переходного состояния. Как правило, повышение температуры на 10°С вызывает ускорение химической реакции приблизительно в два раза.

Второй путь ускорения химической реакции – добавление катализатора. Катализаторы ускоряют химические реакции, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне. Катализатор (обозначим его буквой С) на промежуточной стадии реакции взаимодействует с реагентом А с образованием нового комплекса или соединения СА, переходному состоянию которого соответствует значительно более низкая энергия активации по сравнению с переходным состоянием реагента А в некатализируемой реакции (рис. 9-3). Затем комплекс реагент–катализатор (СА) распадается на продукт Р и свободный катализатор, который может опять соединиться с другой молекулой А и повторить весь цикл. Именно таким образом катализаторы снижают энергию активации химической реакции; в их присутствии гораздо более значительная доля молекул данной популяции вступает в реакцию в единицу времени. Ферменты, так же как и другие катализаторы, соединяются с своими субстратами в ходе каталитического цикла.

9.5. Концентрация субстрата оказывает огромное влияние на скорость реакций, катализируемых ферментами

Давайте рассмотрим влияние изменения концентрации субстрата на начальную скорость ферментативной реакции при постоянной концентрации фермента

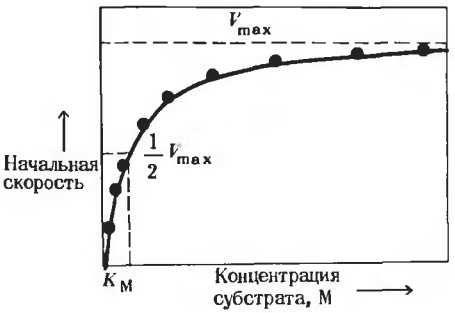


Рис. 9-4. Влияние концентрации субстрата на начальную скорость катализируемой ферментом реакции. Из такого графика можно определить величину V_{max} только путем аппроксимирования. Точное определение этой величины в данном случае невозможно, так как по мере повышения концентрации субстрата начальная скорость реакции лишь приближается к V_{max}, но никогда ее не достигает. Концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной, численно равна K_M – константе Михаэлиса – Ментен.

(рис. 9-4). При очень низких концентрациях субстрата скорость реакции очень мала, но постепенно возрастает по мере повышения концентрации субстрата. Если мы будем измерять начальную скорость каталитической реакции при разных, все возрастающих концентрациях субстрата, то обнаружим, что приращения скорости становятся с каждым разом все меньше и меньше. Наконец, наступает момент, когда любое увеличение концентрации субстрата вызывает лишь бесконечно малое ускорение реакции (рис. 9-4). Как бы ни увеличивалась при этом концентрация субстрата, скорость реакции может лишь приближаться к плато, но никогда его не достигнет. На этом плато, называемом *максимальной скоростью реакции* (V_{max}), фермент «насыщен» субстратом и не может функционировать быстрее.

Такой эффект насыщения свойствен почти всем ферментам. Это наблюдение позволило Виктору Генри сделать в 1903 г. вывод, что необходимой стадией ферментативного катализа является соединение фермента с субстратом, в результате чего образуется фермент-субстратный комплекс. Развитие этой идеи привело в дальнейшем к созданию общей теории действия ферментов; особенно большой вклад в эту теорию внесли Леонор Михаэлис и Мод Ментен. В 1913 г. они постулировали, что фермент E сначала обратимо и относительно быстро соединяется со своим субстратом S в реакции

$$E + S \rightleftarrows ES.$$

Образовавшийся при этом фермент-субстратный комплекс затем распадается во второй более медленной обратимой реакции с образованием продукта реакции P и свободного фермента E

$$ES \rightleftarrows E + P.$$

Поскольку эта вторая, более медленная реакция представляет собой стадию, лимитирующую скорость всего процесса, общая скорость катализируемой ферментом реакции должна быть пропорциональна концентрации фермент-субстратного комплекса ES. В ходе каталитической реакции в любой момент времени фермент существует в двух формах: в свободной, или несвязанной, форме и в связанном виде, т. е. в составе комплекса ES. Скорость каталитической реакции, очевидно, будет максимальной, когда фактически весь фермент перейдет в комплекс ES, а концентрация свободного фермента E станет предельно низкой. Это условие выполняется только при очень высоких концентрациях субстрата, так как, согласно закону действующих масс, при повышении концентрации S равновесие первой реакции сдвигается вправо

$$E + S \rightleftarrows ES.$$

Если мы повысим концентрацию S до достаточно высокого уровня, то практически весь фермент E перейдет в форму ES. В ходе второй реакции каталитического цикла комплекс ES непрерывно и быстро распадается на продукт P и свободный фермент. Но если концентрация S достаточно высока, свободный фермент будет сразу же взаимодействовать с другой молекулой S. В этих условиях устанавливается некое стационарное состояние,

при котором фермент полностью насыщен субстратом и реакция протекает с максимальной скоростью.

9.6. Существует количественная связь между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции

На рис. 9-4 показана кривая, характеризующая зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Из рисунка видно, что по этой кривой, которая только приближается к точке, соответствующей максимальной скорости реакции, но никогда ее не достигнет, трудно определить точно, при какой концентрации субстрата устанавливается V_{max}. Однако благодаря тому, что эта кривая, представляющая собой гиперболу, имеет одинаковую форму для большинства ферментов, Михаэлис и Ментен определили константу, обозначаемую в настоящее время через K_M, при помощи которой удобно выражать точное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью катализируемой ферментом реакции. Величину K_M, иначе константу Михаэлиса–Ментен, можно определить просто как *концентрацию специфического субстрата, при которой данный фермент обеспечивает скорость реакции, равную половине ее максимальной скорости* (рис. 9-4).

Характерная форма кривой насыщения фермента субстратом (рис. 9-4) может быть выражена математически *уравнением Михаэлиса–Ментен*

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]},$$

где v_0 – начальная скорость при концентрации субстрата [S], V_{max} – максимальная скорость и K_M – константа Михаэлиса–Ментен для данного фермента, соответствующая определенному субстрату.

Это уравнение было выведено Михаэлисом и Ментен исходя из основного предположения о том, что стадией, лимитирующей скорость ферментативных реакций, является распад комплекса ES на продукт и свободный фермент. В дополнении 9-1 представлен современный вариант вывода уравнения Михаэлиса–Ментен. Это уравнение составляет основу для анализа кинетики всех ферментативных реакций. Если известны величины K_M и V_{max}, то можно рассчитать скорость ферментативной реакции при любой заданной концентрации субстрата.

Дополнение 9-1. Уравнение Михаэлиса–Ментен

Для многих ферментов характерна гиперболическая кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 9-4), постепенно приближающаяся к точке, соответствующей насыщению фермента субстратом. Мы уже видели, что такие кривые имеют две основные точки: 1) K_M – концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине ее максимальной скорости, и 2) V_{max} – максимальная скорость, т.е. предельное значение, к которому приближается скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата. Михаэлис и Ментен показали, что из гиперболических кривых насыщения ферментов можно извлечь много дополнительной полезной информации, если перевести их в простую математическую форму. *Уравнение Михаэлиса–Ментен* представляет собой алгебраическое выражение гиперболической формы таких кривых. Членами этого важнейшего уравнения являются: концентрация субстрата S, начальная скорость v_0, V_{max} и K_M. Уравнение Михаэлиса–Ментен лежит в основе всех кинетических исследований ферментативных реакций, так как

оно позволяет рассчитывать количественные характеристики ферментов и проводить анализ их ингибирования.

Теперь мы рассмотрим подробнее основные логические и алгебраические этапы, через которые проходит вывод уравнения Михаэлиса–Ментен на современном уровне. Прежде всего напишем две основные реакции образования и распада фермент-субстратного комплекса

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES, \qquad (а)$$

$$ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} E + P. \qquad (б)$$

Введем следующие обозначения: $[E_t]$ – общая концентрация фермента (суммарное количество свободного и связанного фермента), [ES] – концентрация фермент-субстратного комплекса и $[E_t] - [ES]$ – концентрация свободного, т.е. несвязанного, фермента. Поскольку концентрация субстрата [S] обычно гораздо больше, чем $[E_t]$, количество субстрата S, связанного с ферментом E в любой момент времени, можно считать пренебрежимо малым по сравнению с общим количеством субстрата S. Вывод уравнения начинается с определения скоростей образования и распада фермент-субстратного комплекса ES.

1. *Скорость образования* ES. Скорость образования ES в реакции (а) равна

$$\text{Скорость образования} = k_1([E_t] - [ES])[S] \qquad (в)$$

где k_1 – константа скорости реакции (а). Скорость образования ES из E + P в обратной реакции (б) очень мала по сравнению со скоростью прямой реакции и поэтому ею можно пренебречь.

2. *Скорость распада* ES. Скорость распада ES равна

$$\text{Скорость распада} = k_{-1}[ES] + k_2[ES],$$

где k_{-1} и k_2 – константы скорости соответственно обратной реакции (а) и прямой реакции (б).

3. *Стационарное состояние.* Когда скорость образования фермент-субстратного комплекса ES равна скорости его распада, концентрация ES постоянна, и реакция протекает в стационарном режиме:

$$\text{Скорость образования ES} = \text{Скорость распада ES}$$

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]. \qquad (г)$$

4. *Разделение констант скоростей.* Преобразование левой части уравнения (г) дает

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S].$$

При упрощении его правой части получаем $(k_{-1} + k_2)[ES]$. Следовательно,

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

Если перенести член $-k_1[ES][S]$ в правую часть уравнения и изменить его знак, то получим

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

Дальнейшее упрощение дает

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

Теперь мы можем решить это уравнение относительно [ES]

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

Это уравнение можно упростить, объединив константы скоростей в одном уравнении:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}. \qquad (д)$$

5. *Определение начальной скорости v_0 через* [ES]. Согласно теории Михаэлиса–Ментен, начальная скорость определяется как скорость распада фермент-субстратного комплекса, т. е. скорость реакции (б), константа скорости которой равна k_2. Таким образом, мы можем написать

$$v_0 = k_2[ES].$$

Поскольку, однако, величина [ES] равна правой части уравнения (д), мы имеем:

$$v_0 = \frac{k_2[E_t][S]}{[S] + (k_2 + k_{-1})/k_1}. \qquad (е)$$

Полученное уравнение можно упростить, если $(k_2 + k_{-1})/k_1$ обозначить через K_M (константа Михаэлиса–Ментен), а $k_2[E_t]$ – через V_{max}. V_{max} – это максимальная скорость реакции, наблюдаемая в условиях, когда весь фермент E находится в форме фермент-субстратного комплекса ES. Подставив эти две величины в уравнение (е), получим:

$$\boxed{v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M}}$$

Это и есть уравнение Михаэлиса–Ментен, т. е. *уравнение скорости* односубстратной ферментативной реакции. Оно выражает количественное соотношение между начальной скоростью реакции v_0, максимальной скоростью реакции V_{max} и исходной концентрацией субстрата, связанных между собой через константу Михаэлиса–Ментен K_M.

В специальном случае, когда начальная скорость реакции в точности равна половине максимальной скорости, т. е. когда $v_0 = \frac{1}{2}V_{max}$ (рис. 9-4), можно, исходя из уравнения Михаэлиса–Ментен, получить важное численное соотношение:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}.$$

Если разделить обе части этого уравнения на V_{max}, то будем иметь

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}.$$

Решая это уравнение относительно K_M, получаем:

$$K_M + [S] = 2[S]$$

$$K_M = [S] \text{ (при условии, что } v_0 \text{ точно равно } \frac{1}{2} V_{max})$$

Уравнение Михаэлиса–Ментен можно преобразовать алгебраическим способом и выразить в виде ряда эквивалентных уравнений, которые полезны для практического определения величин K_M и V_{max} и используются также при изучении действия ингибиторов (дополнение 9-2).

Теория Михаэлиса–Ментен позволяет количественно описать большинство ферментативных реакций, включая реакции с участием двух или более субстратов. Это служит еще одним убедительным подтверждением того, что ферменты катализируют реакции, временно присоединяясь к своим субстратам, в результате чего снижается энергия активации всей реакции в целом. Образование фермент-субстратных комплексов можно доказать с помощью прямых физико-химических методов, например по характерным изменениям спектра поглощения фермента при добавлении субстрата.

Дополнение 9-2. Преобразование уравнения Михаэлиса – Ментен: график в двойных обратных координатах

Уравнение Михаэлиса – Ментен

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M} \qquad \text{(а)}$$

можно преобразовать алгебраическим способом в другие формы, более удобные для анализа экспериментальных данных. Одно часто применяемое преобразование состоит просто в том, что обе части уравнения Михаэлиса – Ментен (а) выражают в виде обратных величин

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{max}[S]}.$$

Разделив числитель в правой части уравнения на его составляющие, получаем

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}[S]} + \frac{[S]}{V_{max}[S]}.$$

Упрощение этого уравнения дает

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}. \qquad \text{(б)}$$

Уравнение (б), представляющее собой преобразованное уравнение Михаэлиса – Ментен, называется *уравнением Лайнуивера – Бэрка*. Для ферментов, строго подчиняющихся кинетике Михаэлиса – Ментен, зависи-

мость $1/v_0$ от $1/[S]$ выражается прямой линией (рис. 1). Тангенс угла наклона этой линии численно равен величине K_M/V_{max}, отрезок, отсекаемый на оси ординат,– величине $1/V_{max}$, а отрезок, отсекаемый на оси абсцисс,– $1/K_M$. График, построенный в двойных обратных координатах (график Лайнуивера – Бэрка) имеет то преимущество, что позволяет более точно определить величину V_{max}, которая на графике зависимости v_0 от [S] может быть лишь аппроксимирована (как показано на рис. 2). Существуют и другие способы преобразования уравнения Михаэлиса – Ментен. Каждый из них имеет свои преимущества при исследовании кинетики ферментативных реакций.

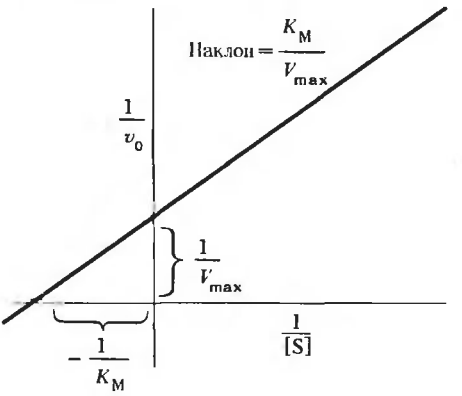


Рис. 1.

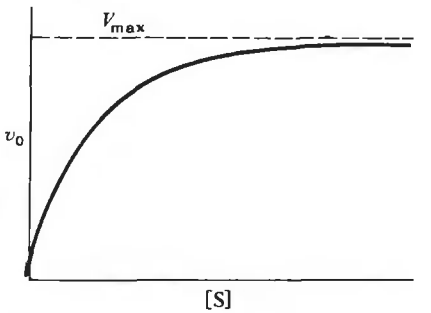


Рис. 2.

Как мы увидим дальше, графики в двойных обратных координатах с большой пользой применяются также при изучении ингибирования ферментативных реакций.

9.7. Каждый фермент имеет характерную величину K_M для данного субстрата

Величина K_M – это ключевой пункт уравнения Михаэлиса–Ментен. Она характеризует поведение данного фермента по отношению к тому или иному субстрату при определенных значениях температуры и pH. Приблизительное значение K_M можно получить простым графическим способом, как показано на рис. 9-4. Однако из кривой такого типа трудно определить точно величину V_{max}, поскольку эта величина соответствует точке, к которой стремится кривая, но которую она никогда не достигнет. Используя алгебраические преобразования уравнения Михаэлиса–Ментен, описанные в дополнении 9-2, можно получить более точное значение K_M из графика, построенного по тем же данным, но в дру-

гих координатах, называемых *двойными обратными координатами*.

В табл. 9-4 приведены величины K_M для нескольких ферментов. Заметим, что одни ферменты, такие, как карбоангидраза и каталаза, требуют относительно высокой концентрации субстрата для достижения скорости, равной половине максимальной. Другие же ферменты, например гексокиназа из мозга, катализирующая перенос фосфатной группы от ATP на глюкозу, достигают скорости, равной половине максимальной, при очень низкой концентрации субстрата. Ферменты, имеющие два или более субстрата, такие, как гексокиназа или аспартатаминотрансфераза, катализирующая обратимую реакцию

$$\text{Аспартат} + \alpha\text{-Кетоглутарат} \rightleftarrows \text{Оксалоацетат} + \text{Глутамат},$$

могут иметь различные значения K_M для разных субстратов. Если фермент, например химотрипсин, действует на несколько разных субстратов, имеющих какую-то общую структурную особенность, то величины K_M для всех этих субстратов могут значительно различаться (табл. 9-4).

Таблица 9-4. Значения констант Михаэлиса–Ментен (K_M) для некоторых ферментов

Фермент	Субстрат	K_M, мМ
Каталаза	H_2O_2	25
Гексокиназа (мозг)	ATP	0,4
	D-глюкоза	0,05
	D-фруктоза	1,5
Карбоангидраза	HCO_3^-	9
Химотрипсин	Глицил-тирозинил-глицин	108
	N-бензоил-тирозинамид	2,5
β-Галактозидаза	D-лактоза	4,0
Треониндегидратаза	L-треонин	5,0

В тех условиях, которые существуют в клетке, ферменты обычно не насыщены субстратом и, значит, функционируют, как правило, не с максимально возможными скоростями. Изменяя внутриклеточные концентрации субстратов, можно в какой-то степени регулировать скорость ферментативных реакций в клетке.

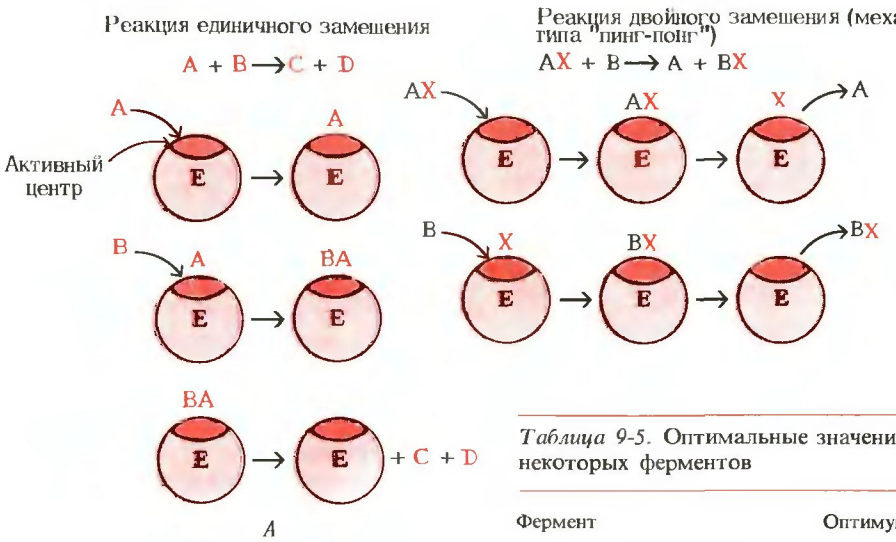
9.8. Многие ферменты катализируют реакции с участием двух субстратов

Мы уже рассмотрели вопрос о том, как концентрация субстрата влияет на скорость простой ферментативной реакции типа $A \rightarrow P$, в которой участвует одна молекула субстрата. Однако на самом деле во многих ферментативных реакциях метаболизма принимают участие и связываются с ферментом две (а иногда даже и три) молекулы разных субстратов. Например, в реакции, катализируемой гексокиназой, ATP и глюкоза – это субстраты, а ADP и глюкозо-6-фосфат – продукты:

$$\text{ATP} + \text{Глюкоза} \rightarrow \text{ADP} + \text{Глюкозо-6-фосфат}.$$

Для определения скорости таких двухсубстратных реакций также можно использовать подход Михаэлиса–Ментен. Как мы уже видели, гексокиназа характеризуется разными значениями K_M для каждого из ее двух субстратов (табл. 9-4).

Ферментативные реакции с участием двух субстратов обычно включают перенос атома или функциональной группы от одного субстрата к другому. Такие реакции могут протекать по двум различным механизмам (рис. 9-5). В реакциях первого типа, называемых реакциями *единичного замещения*, два субстрата A и B связываются с ферментом E либо специфическим, либо случайным образом с образованием комплекса EAB, который затем распадается на продукты C и D. Второй класс двухсубстратных реакций составляют реакции, протекающие по механизму *двойного замещения* (механизм типа «пинг-понг»). В этих реакциях



А

Рис. 9-5. Схематическое изображение двухсубстратных реакций, относящихся к двум разным классам. *А*. Реакция единичного замещения. В одних реакциях этого типа субстраты А и В могут связываться с ферментом в любой последовательности, в других существует определенный порядок присоединения А и В. *Б*. Реакция двойного замещения (механизм типа «пинг-понг»). Первый субстрат АХ передает группу Х ферменту. Затем, после того как А высвобождается, субстрат В (акцептор группы Х) связывается с ферментом.

с каталитическим центром фермента в каждый момент времени связан только один из двух субстратов. Присоединение первого субстрата сопровождается переносом его функциональной группы на молекулу фермента. Только после удаления продукта, образовавшегося из первого субстрата, второй субстрат может связаться с ферментом и принять функциональную группу.

9.9. Каждый фермент имеет определенный оптимум pH

Для каждого фермента характерна определенная область оптимальных значений pH (оптимум pH), при которых он проявляет максимальную активность (рис. 9-6 и табл. 9-5). Форма кривых, описывающих зависимость активности фермента от pH, отражает способность

Таблица 9-5. Оптимальные значения pH для некоторых ферментов

Фермент	Оптимум pH
Пепсин	1,5
Трипсин	7,7
Каталаза	7,6
Аргиназа	9,7
Фумараза	7,8
Рибонуклеаза	7,8

важных для данного фермента протон-донорных или протон-акцепторных групп в каталитическом центре фермента переходить при определенных значениях pH в состояние с требуемой степенью ионизации. Оптимум pH фермента не обязательно совпадает со значением pH, характерным для нормального внутриклеточного окружения этого фермента; последнее может быть как выше, так и ниже оптимума pH. Таким образом, каталитическую активность фермента в клетках можно в какой-то мере регулировать, изменяя pH окружающей среды.

9.10. Количество фермента можно определить по его активности

Количество фермента в данном растворе или экстракте ткани можно определить исходя из каталитического действия этого фермента. Для этого необходимо знать: 1) суммарное уравнение катализируемой реакции, 2) какой аналитический метод наиболее пригоден для определе-

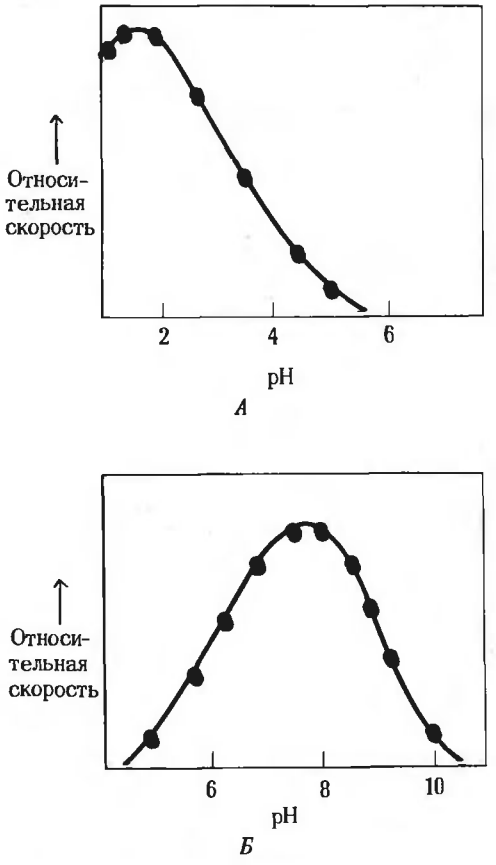


Рис. 9-6. Кривые, характеризующие зависимость активности фермента от pH. Такие кривые строятся на основе данных, получеиных при измерении начальиых скоростей реакции, протекающей в буфериых растворах с разными значениями pH. *А.* Кривая, описывающая pH-зависимость активности пепсина, который гидролизует определенные пептидные связи в белках во время их переваривания в желудке. Величина pH желудочного сока лежит между 1 и 2. *Б.* Кривая, описывающая pH-зависимость активности глюкозо-6-фосфатазы из клеток печени, ответственной за выделение глюкозы в кровь. В норме величина pH цитозоля клеток печени составляет около 7,2.

ния расхода субстрата или образования продуктов реакции, 3) нуждается ли фермент в таких кофакторах, как ионы металлов или коферменты, 4) зависимость активности фермента от концентрации субстрата, т. е. величину K_M для данного субстрата, 5) оптимум pH фермента и 6) температурный интервал, в котором фермент стабилен и обладает высокой активностью. Обычно активность ферментов измеряют при оптимальном значении pH, какой-либо определенной, удобной в том или ином отношении температуре (как правило, в интервале от 25 до 38°C) и при концентрации субстрата, близкой к насыщающей. В этих условиях начальная скорость реакции обычно пропорциональна концентрации фермента, по крайней мере в заданном диапазоне концентраций фермента (рис. 9-7).

Согласно международному соглашению, *за единицу активности фермента принимается такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоля субстрата (1 мкмоль = 10^{-6} моля) в 1 мин при 25°C в оптимальных условиях действия фермента. Удельной активностью* называется число единиц ферментативной активности в расчете на 1 мг белка. Удельная активность – это мера чистоты ферментного препарата: она возрастает в процессе очистки фермента и становится максимальной и постоянной, когда фермент находится в чистом состоянии.

Числом оборотов фермента называется число молекул субстрата, претерпевающих превращение в единицу времени в расчете на одну молекулу фермента (или один каталитический центр) в условиях, когда концентрация фермента является единственным фактором, лимитирующим скорость реакции (табл. 9-6). Карбонат-дегидратаза (карбоангидраза) – важный фермент, присутствующий в больших концентрациях в эритроцитах, – представляет собой один из наиболее активных ферментов с числом оборотов 36 000 000 в 1 мин в расчете на одну молекулу фермента. Этот фермент катализирует обратимую реакцию гидрата-

Таблица 9-6. Число оборотов некоторых ферментов (число молекул субстрата, претерпевающих превращение за 1 мин при 20–38°C)

Карбоангидраза	36 000 000
β-Амилаза	1 100 000
1 100 000	12 500
Фосфоглюкомутаза	1 240

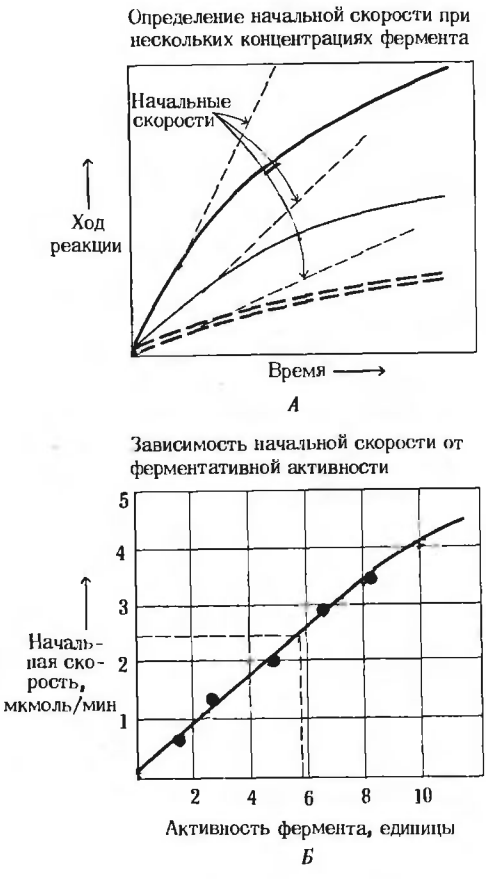


Рис. 9-7. Количественное определение ферментативной активности. Эта процедура проводится в три этапа: 1) определение K_M (рис. 9-4 и дополнение 9-2), 2) измерение начальных скоростей (*А*) при различных концентрациях фермента и при концентрации субстрата, близкой к насыщающей, например при концентрации, равной $10 \cdot K_M$, 3) построение графика (*Б*), по оси абсцисс которого откладывается концентрация фермента, а по оси ординат – начальная скорость. Используя линейную часть кривой, можно определить количество фермента в неизвестном образце, обеспечивающем данную начальную скорость. В этом примере неизвестный образец дает начальную скорость 2,5 мкмоль/мин и содержит 5,8 единиц ферментативной активности.

ции растворенной в воде двуокиси углерода с образованием угольной кислоты (в отсутствие фермента – очень медленно протекающую реакцию)

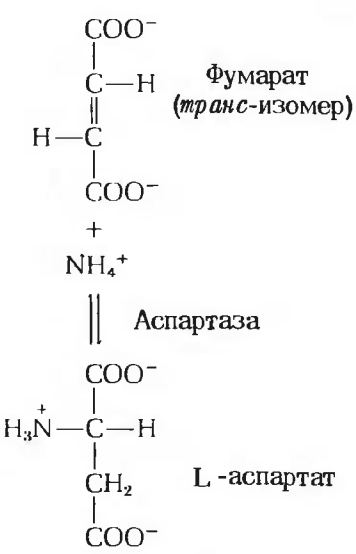
$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3.$$

Гидратация CO_2 в эритроцитах – важный этап в процессе переноса CO_2 от тканей, в которых она образуется, к легким, где она освобождается и выделяется в окружающую среду при выдохе (разд. 4.11, гл. 24).

9.11. Ферменты проявляют специфичность по отношению к своим субстратам

Некоторые ферменты обладают почти абсолютной специфичностью по отношению к определенным субстратам и не взаимодействуют даже с очень близкими по строению молекулами. Хорошим примером этого может служить фермент *аспартаза*, обнаруживаемый во многих растениях и бактериях. Он катализирует обратимое присоединение аммиака по двойной связи фумаровой кислоты с образованием L-аспартата (рис. 9-8). Однако под действием аспартазы аммиак не присоединяется ни к какой другой ненасыщенной кислоте. Аспартаза обладает также строгой специфичностью по отношению к оптическим и геометрическим изомерам: она не действует на D-аспартат и не присоединяет аммиак к малеату – геометрическому *цис*-изомеру фумарата.

С другой стороны, известны ферменты, которые проявляют относительно широкую специфичность и взаимодействуют со многими веществами, имеющими общие структурные особенности. Например, химотрипсин катализирует гидролиз многих пептидов и полипептидов, но разрывает только те пептидные связи, в которых карбонильная группа принадлежит остаткам фенилаланина, тирозина или триптофана (табл. 6-6). Несколько иная ситуация имеет место в случае кишечной фосфатазы, катализирующей гидролиз самых разных эфиров фосфорной кислоты, хотя скорости их расщепления сильно различаются. Изучение субстратной специфичности ферментов привело к возникновению идеи о комплементарности молекулы субстрата и специфического участка на поверхности молекулы фермента, которые подходят друг к другу, как ключ к замку. К этому участ-



Аспартаза не действует на следующие изомеры:

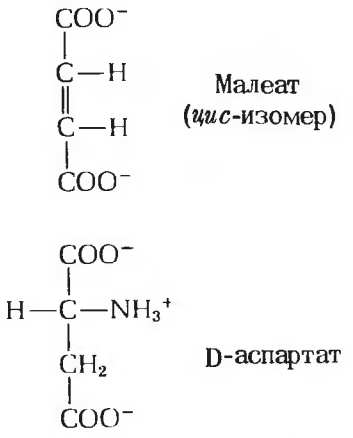


Рис. 9-8. Реакция, катализируемая аспартазой, и субстратная специфичность фермента. Аспартаза абсолютно специфична по отношению к фумарату в прямой реакции и к L-аспартату – в обратной. Она не атакует ни малеат (*цис*-изомер фумарата), ни D-аспартат.

ку, называемому *активным*, или *каталитическим, центром* присоединяется молекула субстрата, претерпевающая превращение в ходе каталитического акта.

При исследовании специфичности ферментов выяснилось, что молекула субстрата должна обладать двумя основными структурными особенностями. Во-первых, она должна содержать специфическую химическую связь, которую фермент мог бы атаковать, и, во-вторых, в ней должна присутствовать та или иная функциональная группа, называемая *связывающей группой*, которая способна связываться с ферментом и ориентировать молекулу субстрата в активном центре таким образом, чтобы атакуемая связь субстрата была правильно расположена по отношению к каталитической группе фермента. На рис. 9-9 показана субстратная специфичность химотрипсина, гидролизующего обычно только те пептидные связи в белках и простых пептидах, в которых карбонильная группа принадлежит остаткам ароматических аминокислот, т. е. остаткам триптофана, тирозина и фенилаланина. Однако при проверке десятков различных синтетических субстратов выяснилось, что химотрипсин может расщеплять также простые амидные и сложно-эфирные связи. Более того, оказалось, что ароматические R-группы тирозина, триптофана и фенилаланина, по отношению к которым химотрипсин проявляет специфичность в полипептидах, служат только гидрофобными связывающими группами. Это подтверждается тем, что химотрипсин способен расщеплять синтетические пептиды, в которых ароматические кольца природных аминокислот заменены на большие по размерам гидрофобные алкильные группы.

Исследования субстратной специфичности ферментов, а также ингибирования ферментативных реакций дают информацию о строении активных центров.

9.12. Ферменты можно ингибировать определенными химическими соединениями

Действие большинства ферментов можно подавить, или ингибировать, определенными химическими реагентами. Изучение ингибиторов ферментов позволяет получать ценные сведения о субстратной специфичности ферментов, природе функциональных групп активного центра и механизмах каталити-

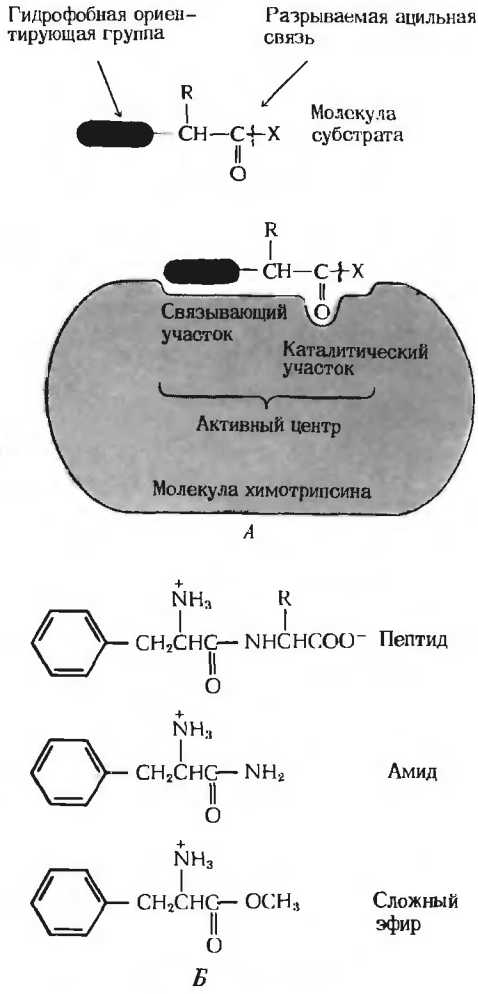
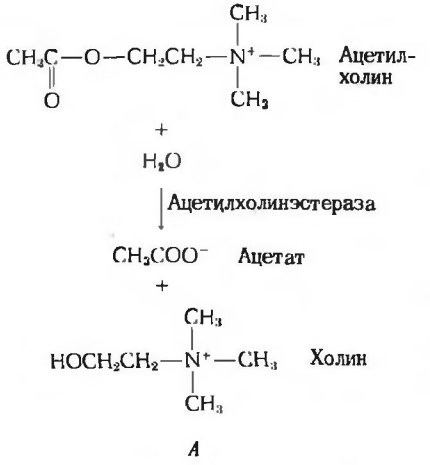


Рис. 9-9. Субстратная специфичность химотрипсина. *А*. Хотя в биологических системах химотрипсин действует как пептидаза, он способен гидролизовать также амиды, сложные эфиры и некоторые синтетические соединения небиологического происхождения, если у них есть чувствительная к действию фермента связь и ориентирующая гидрофобная группа. *Б*. Некоторые синтетические соединения, гидролизуемые химотрипсином. У каждого из них есть гидрофобная ориентирующая группа и подверженная расщеплению ацильная связь (обе показаны красным цветом).

ческой активности ферментов. Ингибиторы ферментов служат также очень полезными инструментами при исследовании метаболических путей в клетках. Более того, механизм действия некоторых лекарственных препаратов состоит именно в том, что они ингибируют определенные ферменты в клетках с нарушенными функциями.

Существуют ингибиторы двух основных типов: *необратимые* и *обратимые*. Необратимые ингибиторы связывают или разрушают функциональную группу молекулы фермента, необходимую для проявления его каталитической активности. Примером необратимого ингибитора может служить соединение *диизопропилфторфосфат* (ДФФ), которое ингибирует фермент *ацетилхолинэстеразу*, играющий важную роль в передаче нервных импульсов. Ацетилхолинэстераза катализирует гидролиз *ацетилхолина* (рис. 9-10), функционирующего в качестве нейромедиатора в определенных отделах нервной системы. Ацетилхолин выделяется стимулированной нервной клеткой (нейроном) в *синапс*, т.е. место соединения одного нейрона с другим. В синапсе ацетилхолин связывается с рецепторами следующего нейрона, вынуждая его проводить нервный импульс. Однако, прежде чем второй импульс будет передан через синапс следующему нейрону, ацетилхолин, выделившийся после первого импульса, должен быть гидролизован ацетилхолинэстеразой в месте соединения нервных клеток. Продукты его распада – ацетат и холин – не способны действовать как нейромедиаторы (рис. 9-10). Необратимый ингибитор ДФФ, обладающий высокой реакционной способностью, присоединяется к гидроксильной группе остатка серина в активном центре ацетилхолинэстеразы, что приводит к образованию каталитически неактивного производного. В результате фермент перестает функционировать. ДФФ, одно из первых отравляющих веществ нервно-паралитического действия, в опытах на животных вызывает нарушение некоторых функций вследствие того, что пораженные нейроны утрачивают способность проводить нервные импульсы. Однако ДФФ обладает и полезными свойствами. На его основе был создан ряд относительно нетоксичных для людей и животных инсектицидов, например *малатион*. Сам по себе



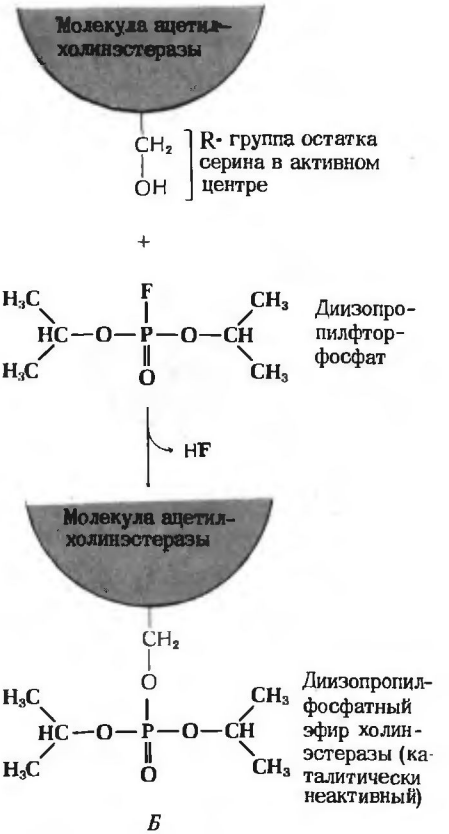


Рис. 9-10. Необратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы диизопропилфторфосфатом. *А.* Реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой. *Б.* Реакция между диизопропилфторфосфатом и гидроксильной группой серина.

малатион неактивен и в организме высших животных разлагается на продукты, которые считаются безвредными. В организме же насекомых малатион превращается под действием ферментов в активный ингибитор их собственной ацетилхолинэстеразы.

Выяснилось, что ДФФ ингибирует целый класс ферментов, многие из которых способны катализировать гидролиз пептидов или эфирных связей. К этим ферментам относится не только *ацетилхолинэстераза*, но и *трипсин*, *химотрипсин*, *эластаза*, *фосфоглюкомутаза* и *коконаза* (фермент, выделяемый личинкой тутового шелкопряда и используемый ею для гидролиза шелковых нитей и освобождения из кокона). Характерная особенность всех ферментов, ингибируемых ДФФ, состоит в том, что они содержат в активном центре остаток серина, принимающий участие в каталитическом акте (рис. 9-10).

Другой необратимый ингибитор некоторых ферментов, *иодацетамид* (рис. 9-11), может взаимодействовать с сульфгидрильными (—SH) группами остатков цистеина или с имидазольными группами остатков гистидина, содержащихся в активных центрах этих ферментов. С помощью таких ингибиторов было установлено, что гидроксильная группа серина, тиоловая группа цистеина и имидазольная группа гистидина участвуют в каталитической активности ферментов, принадлежащих к разным классам.

9.13. Существуют обратимые ингибиторы двух типов – конкурентные и неконкурентные

Изучение обратимых ингибиторов ферментов также позволило получить весьма важные сведения о структуре активных центров различных ферментов.

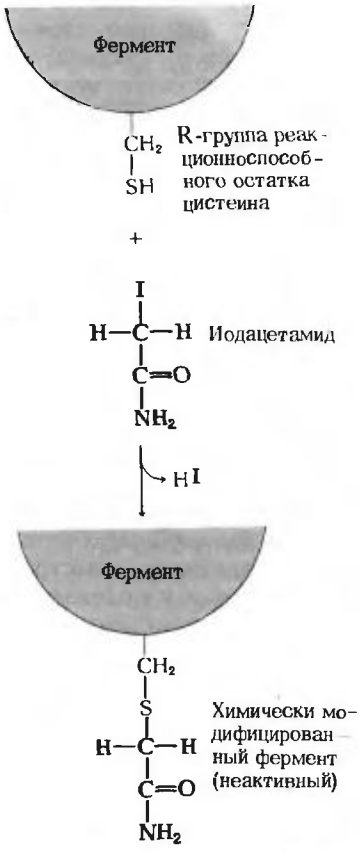


Рис. 9-11. Необратимое ингибирование SH-фермента иодацетамидом.

Конкурентный ингибитор конкурирует с субстратом за связывание с активным центром, но в отличие от субстрата связанный с ферментом конкурентный ингибитор не подвергается ферментативному превращению. Отличительная особенность конкурентного ингибирования состоит в том, что его можно устранить или ослабить, просто повысив концентрацию субстрата. Например, если при заданных концентрациях субстрата и конкурентного ингибитора активность фермента подавлена на 50%, то мы можем уменьшить степень ингибирования, повысив концентрацию субстрата.

По своей трехмерной структуре конкурентные ингибиторы обычно напоминают субстрат данного фермента. Благодаря такому сходству конкурентному ингибитору удается «обмануть» фермент и связаться с ним. Конкурентное ингибирование можно количественно изучать на основе теории Михаэлиса – Ментен. Конкурентный ингибитор I просто обратимо присоединяется к ферменту E, образуя с ним комплекс

$$E + I \rightleftarrows EI.$$

Однако в отличие от субстрата ингибитор не подвергается действию фермента и новые продукты реакции не образуются.

Классическим примером конкурентного ингибирования служит ингибирование сукцинатдегидрогеназы анионом малоновой кислоты (рис. 9-12). Сукцинатдегидрогеназа входит в состав группы ферментов, катализирующих реакции цикла трикарбоновых кислот – конечный метаболический путь окислительного разрушения углеводов и жиров в митохондриях. Этот фермент катализирует отщепление двух атомов водорода от сукцината – по одному от каждой из двух метиленовых ($—CH_2—$) групп. Сукцинатдегидрогеназа ингибируется малонатом, который напоминает сукцинат тем, что он также содержит две карбоксильные группы, принимающие при pH 7,0 ионизированную (депротонированную) форму. Однако он отличается от сукцината тем, что в его молекуле имеется только три атома углерода. Сукцинатдегидрогеназа не способна отщеплять водород от малоната, но малонат занимает активный центр фермента, не давая ему возможности взаимодействовать с нормальным субстратом. Малонат является обратимым ингибитором, так как повышение концентрации сукцината при заданной концентрации малоната снижает степень ингибирования фермента.

В качестве конкурентных ингибиторов сукцинатдегидрогеназы могут выступать и другие соединения, содержащие две отрицательно заряженные группы, расположенные на соответствующем расстоянии друг от друга. К ним относится, например, оксалоацетат – промежуточный продукт в цикле трикарбоновых кислот (рис. 9-12). Изучение структурных



Рис. 9-12. Реакция, катализируемая сукцинатдегидрогеназой, и ее конкурентное ингибирование. Обратите внимание, что конкурентные ингибиторы напоминают в структурном отношении сукцинат: они содержат две определенным образом расположенные в пространстве отрицательно заряженные группы, которые соответствуют конформации активного центра.

особенностей всех этих ингибиторов позволило сделать вывод, что в каталитическом центре сукцинатдегидрогеназы находятся две определенным образом расположенные в пространстве положительно заряженные группы, способные притягивать две отрицательно заряженные карбоксильные группы сукцинат-аниона. Таким образом, каталитический центр сукцинатдегидрогеназы оказывается комплементарным структуре своего субстрата (рис. 9-12).

Конкурентное ингибирование проще всего можно распознать экспериментальным путем, определив влияние концентрации ингибитора на зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата. Для выяснения вопроса о том, по какому типу – конкурентному или неконкурентному – происходит обратимое ингибирование фермента (дополнение 9-3), весьма удобно преобразовать уравнение Михаэлиса – Ментен в линейную форму. Чаще всего для этой цели используют метод двойных обратных величин. Из графиков, построенных в двойных обратных координатах, можно определить также значение константы диссоциации комплекса фермент – ингибитор. Для реакции диссоциации

$$EI \rightleftarrows E + I$$

константа диссоциации равна

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}.$$

9.14. Неконкурентное ингибирование тоже обратимо, но не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата

В случае неконкурентного ингибирования ингибитор присоединяется к ферменту не в активном центре, где связывается субстрат, а совсем в другом месте. При этом конформация молекулы фермента изменяется таким образом, что происходит обратимая инактивация его каталитического центра. Неконкурентные ингибиторы связываются обратимо как со свободным ферментом, так и с комплексом ES, образуя неактивные комплексы EI и ESI.

$$E + I \rightleftarrows EI,$$

$$ES + I \rightleftarrows ESI.$$

Дополнение 9-3. Кинетические тесты, позволяющие отличать конкурентное ингибирование от неконкурентного

Использование графиков, построенных в двойных обратных координатах для анализа данных, полученных при исследовании ингибирования ферментативных реакций, позволяет легко отличать конкурентные ингибиторы от неконкурентных. Проводятся две серии опытов по определению скорости реакции при одной и той же концентрации фермента. В одной серии концентрация субстрата тоже остается постоянной и соответствующими экспериментальными методами определяется влияние повышения концентрации ингибитора на начальную скорость реакции v_0. В другой серии, наоборот, концентрация ингибитора поддерживается постоянной, но используются разные концентрации субстрата. На основе данных, полученных в опытах той и другой серии, строят графики в координатах $\{1/[S];\ 1/v_0\}$.

На рис. 1 представлены такие графики, полученные в отсутствие ингибитора и при двух разных концентрациях конкурентного ингибитора. В случае конкурентных ингибиторов получается семейство прямых с разными углами наклона, пересекающихся в одной точке на оси $1/v_0$. Поскольку отрезок, отсекаемый на оси $1/v_0$, численно равен величине $1/V_{max}$, ясно, что V_{max} не изменяется в присутствии конкурентных ингибиторов. Это означает, что независимо от концентрации конкурентного ингибитора всегда можно подобрать достаточно высокую концентрацию субстрата, при которой субстрат вытеснит конкурентный ингибитор из активного центра.

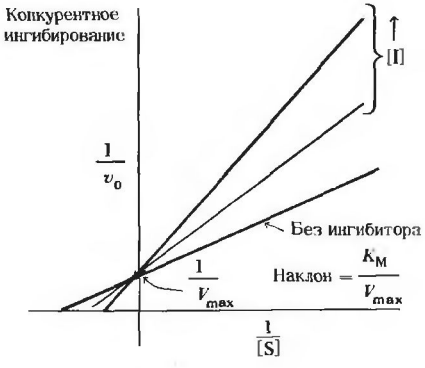


Рис. 1.

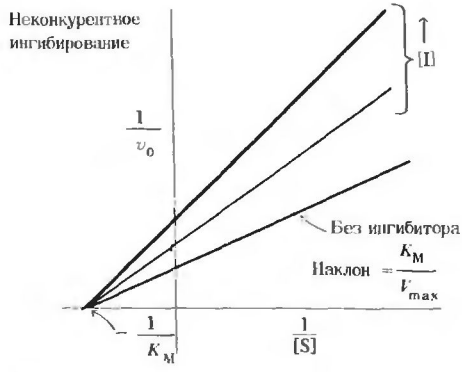


Рис. 2.

При неконкурентном ингибировании аналогичные графики представляют собой семейство прямых (рис. 2), пересекающихся с осью $1/[S]$ в одной точке и отсекающих на ней отрезок, численно равный $-1/K_M$. Это свидетельствует о том, что величина K_M не изменяется при изменении концентрации неконкурентного ингибитора, тогда как величина V_{max} при этом уменьшается.

Неконкурентное ингибирование фермента можно отличить от конкурентного путем анализа кинетических данных, выраженных графически в двойных обратных координатах, как показано в дополнении 9-3.

Наиболее важные неконкурентные ингибиторы представляют собой образующиеся в живых организмах промежуточные продукты метаболизма, способные *обратимо* связываться со специфическими участками на поверхности некоторых регуляторных ферментов и изменять при этом активность их каталитических центров. Примером может служить ингибирование L-треониндегидратазы L-изолейцином, обсуждаемое в разд. 9.18.

9.15. Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

Ферменты повышают скорости катализируемых ими реакций в $10^8 - 10^{20}$ раз. Например, уреаза ускоряет гидролиз мочевины в 10^{14} раз при pH 8 и 20°C. Как же удается ферментам проявлять такую необычайно высокую каталитическую активность в столь мягких условиях?

Существуют четыре основных фактора (табл. 9-7), определяющих способность ферментов ускорять химические реакции.

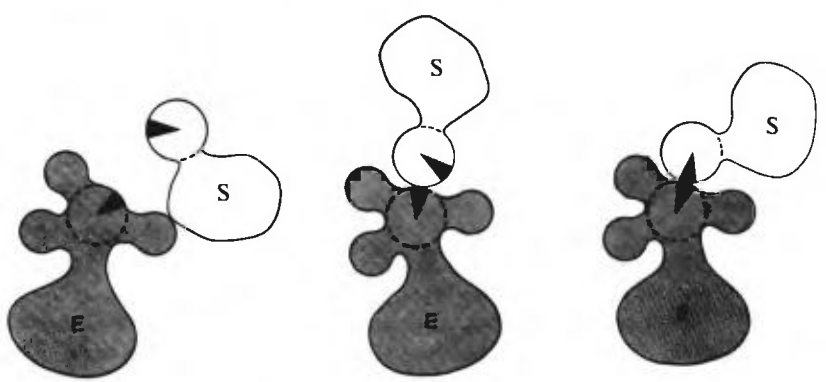
Сближение и ориентация. Фермент способен связывать молекулу субстрата таким образом, что атакуемая ферментом связь оказывается не только расположенной в непосредственной близости от каталитической группы, но и правильно ориентированной по отношению к ней. В результате вероятность того, что комплекс ES достигнет переходного состояния, сильно увеличивается (рис. 9-13).

Таблица 9-7. Факторы, влияющие на каталитическую эффективность ферментов

1. Сближение и ориентация субстрата по отношению к каталитической группе
2. Напряжение и деформация чувствительной к действию фермента связи, возникающие вследствие индуцированного соответствия между молекулами субстрата и фермента
3. Общий кислотно-основный катализ
4. Ковалентный катализ

Напряжение и деформация: индуцированное соответствие. Присоединение субстрата может вызывать конформационные изменения в молекуле фермента, которые приводят к напряжению структуры активного центра, а также несколько деформируют связанный субстрат, облегчая тем самым достижение комплексом ES переходного состояния.

Рис. 9-13. Схематическое изображение процессов сближения и ориентации при взаимодействии молекулы субстрата S с каталитической группой в активном центре фермента E.



Неправильная ориентация, неправильное сближение

Правильное сближение, неправильная ориентация

Правильное сближение, правильная ориентация



Рис. 9-14. Индуцированное соответствие между активным центром фермента и напряженной формой молекулы субстрата.

При этом возникает так называемое *индуцированное соответствие* фермента субстрату (рис. 9-14). Таким образом, небольшие изменения третичной или четвертичной структуры относительно крупной молекулы фермента могут играть роль механического рычага для молекулы субстрата. Возможно, что именно по этой причине ферменты представляют собой белки и, следовательно, по своим размерам значительно превосходят молекулы большинства субстратов.

Общий кислотно-основный катализ. В активном центре фермента могут находиться группы специфических аминокислотных остатков, которые являются хорошими донорами или акцепторами протонов (рис. 9-15). Такие кислотные или основные группы общего типа представляют собой мощные катализаторы многих органических реакций, протекающих в водных системах.

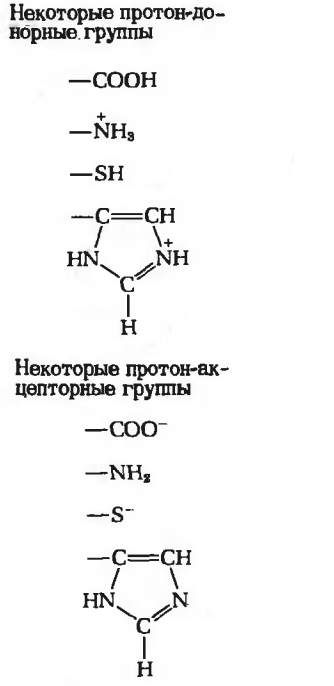


Рис. 9-15. Миогие оргаиические реакции ускоряются донорами или акцепторами протонов, т.е. обобщенными кислотами или основаниями. Активные центры ряда ферментов содержат функциоиальные группы аминокислотных остатков, прииимающие участие в каталитических процессах в качестве доноров или акцепторов протонов. Здесь показаны некоторые из этих групп. —SH-группа принадлежит цистеину, имидазольная группа – гистидину.

Некатализируемая реакция

$$RX + H_2O \longrightarrow ROH + HX$$

Катализируемая реакция

$$RX + E{-}OH \longrightarrow ROH + EX$$
$$EX + H_2O \longrightarrow E{-}OH + HX$$

Суммарная реакция $RX + H_2O \longrightarrow ROH + HX$

Рис. 9-16. Одиа из моделей ковалентиого катализа. В некоторых ферментативных реакциях фермент замещает функциональную группу R в субстрате RX, в результате чего образуется ковалентный комплекс EX. Он нестабилен и гидролизуется значительно быстрее, чем RX. К фермеитам, осуществляющим ковалентный катализ, относится химотрипсин (дополнение 9-4, Б).

Ковалентный катализ. Некоторые ферменты реагируют со своими субстратами, образуя очень нестабильные, ковалентно связанные фермент-субстратные комплексы, из которых в ходе последующей реакции образуются продукты реакции, причем значительно быстрее, чем в случае некатализируемых реакций (рис. 9-16).

Перечисленные выше четыре фактора, по-видимому, вносят различный вклад в ускорение химических реакций ферментами разных типов, однако ни для одного фермента пока не известно точного механизма, обеспечивающего ускорение той или иной специфической для него реакции.

9.16. Рентгеноструктурный анализ выявил важные структурные особенности ферментов

Метод рентгеноструктурного анализа позволил получить много важных сведений о структуре и каталитических механизмах ферментов (разд. 8-2–8-4). Он был использован для изучения целого ряда кристаллических ферментов. Результаты этих исследований дополнили информацию, полученную при химическом изучении ферментов. О некоторых наиболее важных успехах в этой области, достигнутых благодаря рентгеноструктурному анализу, речь пойдет в дополнении 9-4, в котором представлена целая «галерея» структур ферментов.

Дополнение 9-4. Структура некоторых ферментов, определенная с помощью дифракции рентгеновских лучей.

Методом рентгеноструктурного анализа было исследовано большое число кристаллических ферментов. Результаты таких исследований часто сопоставляются с данными, полученными химическими методами при 1) определении аминокислотной последовательности ферментов, 2) изучении их субстратной специфичности, 3) исследовании действия специфических ингибиторов и 4) идентификации специфических функциональных групп в активном центре. С целью выявления возможной связи между каталитическим действием ферментов и их третичной структурой были изучены представители большинства основных классов ферментов (см. табл. 9-3). Здесь показаны изображения (в масштабе) молекул трех ферментов, иллюстрирующие некоторые их структурные и функциональные особенности, выявленные при рентгеноструктурном анализе кристаллов этих ферментов.

А. Комплекс лизоцим–субстрат

Хотя фермент-субстратные комплексы обычно неустойчивы и быстро распадаются, иногда удается синтезировать аналог субстрата (или получить химически модифицированный субстрат), который присоединяется к активному центру фермента и остается связанным с ним, но не подвергается его действию.

Такой субстрат был найден для лизоцима, гидролизующего определенные связи в цепях бактериальных полисахаридов. На рис. 1 показана (в масштабе) предполагаемая структура нормального фермент-субстратного комплекса для лизоцима. Это изображение было получено на основе данных рентгеноструктурного анализа кристаллического комплекса лизоцима и «ложного», т.е. негидролизуемого, субстрата, представляющего собой аналог обычного субстрата лизоцима. Эти исследования были проведены Дэвидом К. Филлипсом и его сотрудника-

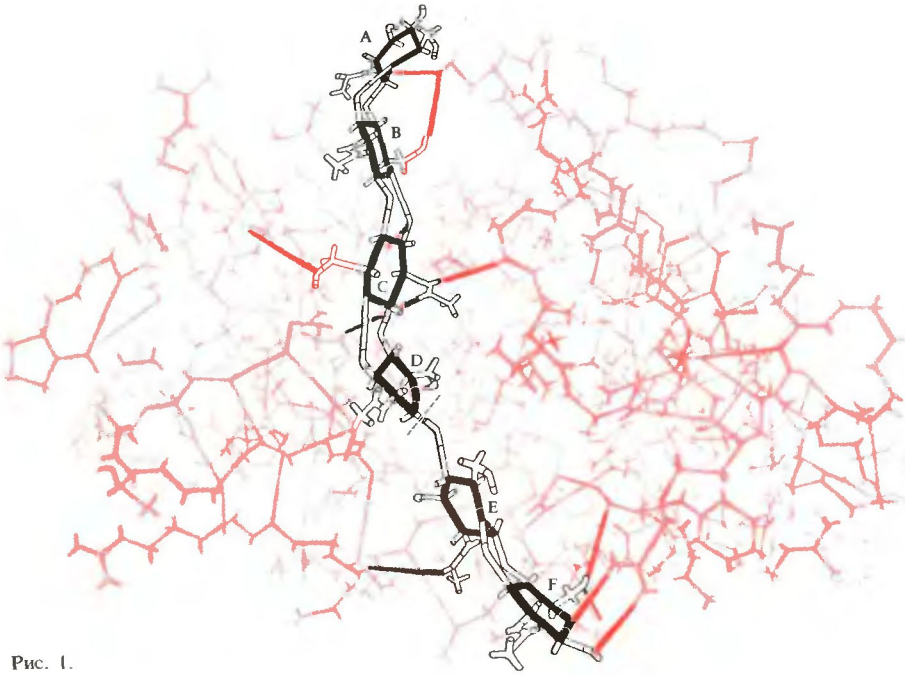


Рис. 1.

ми в Оксфордском университете. Полипептидная цепь, включая R-группы и атомы H, показана красным цветом. Участок молекулы субстрата, обозначенный черными линиями, лежит в канале (или щели) молекулы лизоцима и удерживается в этом положении специфическими водородными связями (изображены ярко-красными линиями) между ферментом и субстратом. Молекула субстрата представляет собой полимер с чередующимися звеньями N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, имеющих циклическую форму и связанных друг с другом гликозидными связями, обозначенными A–F (гл. 11). Место, в котором молекула субстрата разрывается, показано пунктирной линией.

Б. Активный центр химотрипсина

Химотрипсин – это протеолитический фермент, секретируемый из поджелудочной железы в тонкий кишечник в виде неактивного предшественника, или зимогена, называемого химотрипсиногеном. Химотрипсиноген, представляющий собой полипептидную цепь из 245 аминокислотных остатков и содержащий пять дисульфидных связей, образованных пятью остатками цистина, активируется в тонком кишечнике под действием другого протеолитического фермента – трипсина. Трипсин гидролизует четыре пептидные связи и удаляет из молекулы химотрипсиногена два дипептида в положениях 14–15 и 147–148. В результате образуется активный химотрипсин, состоящий из трех полипептидных цепей, ковалентно связанных двумя дисульфидными мостиками, один из которых соединяет A- и B-цепи, а второй – B- и C-цепи, как показано на рис. 2. Для проявления активности химотрипсина необходимы остаток гистидина 57 и остаток аспа-

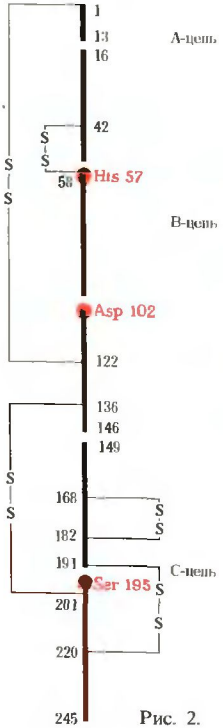


Рис. 2.

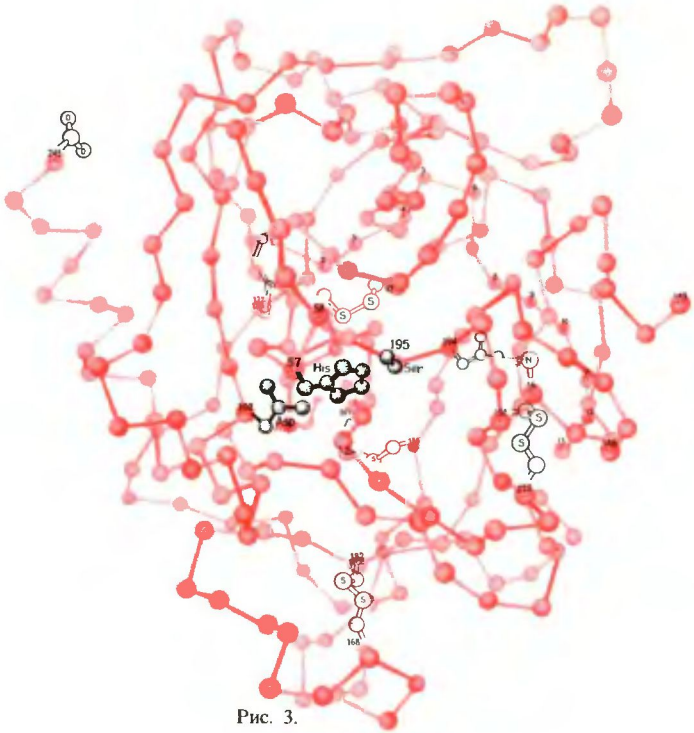


Рис. 3.

Рис. 4. Субстрат диффундирует к ферменту.

Рис. 5. Субстрат связывается с ферментом.

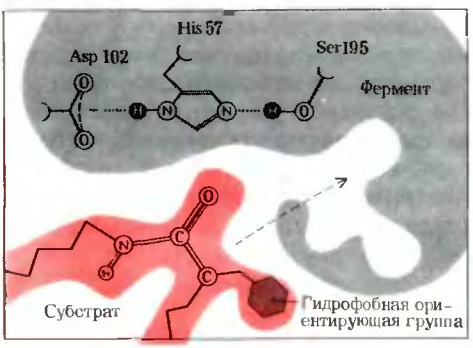


Рис. 8. Молекула воды приближается к активному центру.

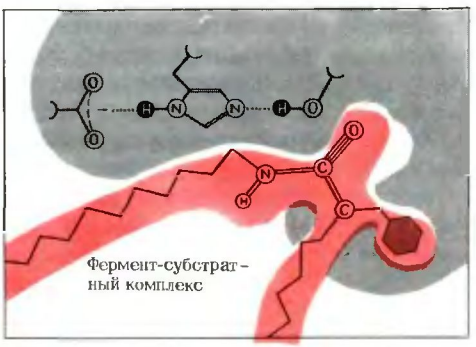
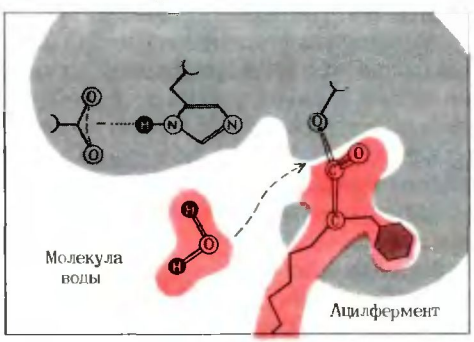
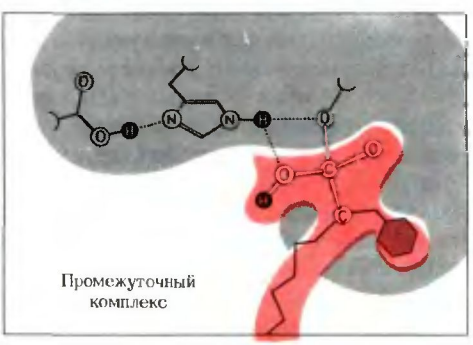


Рис. 9. Вода взаимодействует с ацилферментом.





рагиновой кислоты 102 в B-цепи, а также остаток серина 195 в C-цепи. Хотя по положению в аминокислотной последовательности эти остатки находятся далеко один от другого (и даже не в одной цепи), в третичной структуре молекулы фермента они оказываются очень близко друг к другу. Это показано на масштабном изображении остова молекулы химотрипсина (рис. 3), полученном по данным рентгеноструктурного анализа кристаллического химотрипсина Дэвидом М. Блоу и его сотрудниками в Кембриджском университете. На этом рисунке изображены R-группы только трех специфических аминокислотных остатков, входящих в состав активного центра.

B. Возможный механизм гидролиза специфических пептидов химотрипсином

Исходя из того, что по данным рентгеноструктурного анализа, аминокислотные остатки His-57, Asp-102 и Ser-195 расположены в молекуле химотрипсина близко друг к другу, был предложен возможный механизм участия этих остатков в каталитическом цикле химотрипсина. Было высказано предположение о том, что молекула связывается с активным центром так, что ее гидрофобная ориентирующая группа плотно прилегает к внутренней поверхности гидрофобного «кармана» активного центра (рис. 4; разд. 9.11). При этом расщепляемая пептидная связь оказывается рядом с гидроксильной группой Ser-195 (рис. 5).

Рис. 6. Одна из связей в субстрате разрывается.

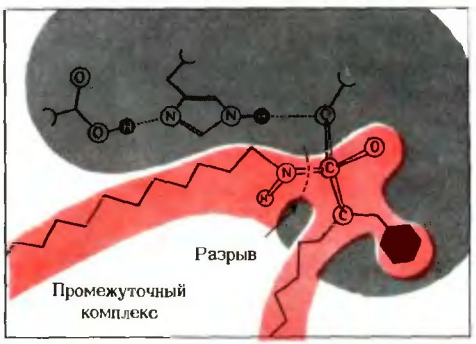


Рис. 7. Первый продукт уходит из активного центра.

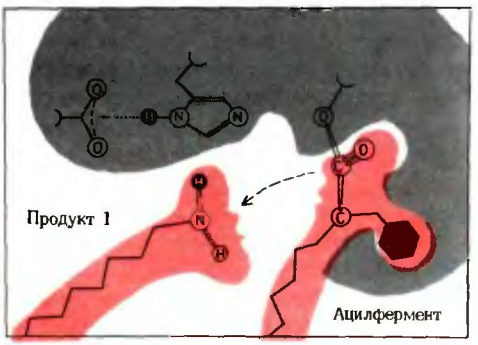


Рис. 10. Ацильная связь между субстратом и ферментом разрывается.

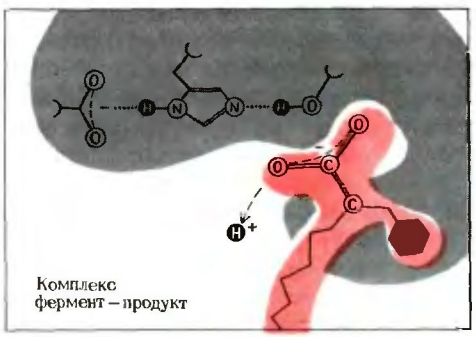
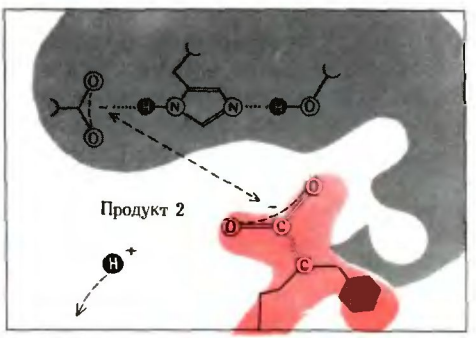


Рис. 11. Второй продукт уходит из активного центра.



Кислород этой гидроксильной группы соединяется ковалентной сложно-эфирной связью с углеродом ацильной группы субстрата, что приводит к образованию промежуточного фермент-субстратного комплекса (рис. 6; разд. 9.15). Гидроксильная группа серина легко теряет свой атом водорода, так как он сильно притягивается водородной связью к электроотрицательному атому азота в имидазольной R-группе His-57. Одновременно происходит разрыв пептидной связи, в результате чего образуется первый продукт реакции. После его выхода из активного центра ацильная группа субстрата остается ковалентно связанной с остатком серина 195 в молекуле фермента; это производное называется *ацилферментом* (рис. 7). Его сложно-эфирная связь очень неустойчива по сравнению с пептидной связью субстрата и гидролизуется с образованием второго продукта, представляющего собой карбоксильную часть субстрата. При этом протон вновь присоединяется к серину (рис. 8 и 9) и образуется комплекс фермент–продукт (рис. 10). Второй продукт уходит затем из активного центра, и каталитический цикл завершается (рис. 11). Ацилфермент представляет собой ключевой промежуточный комплекс в этом варианте ковалентного катализа. Имидазольная группа гистидина 57 участвует в перемещении протона по механизму общего кислотно-основного катализа.

Было высказано предположение, что роль остатка аспарагиновой кислоты 102, несущего большой отрицательный заряд, заключается в том, что он усиливает подвижность имидазольной группы гистидина 57, в результате чего последний становится способным притягивать атом водорода серина 195. Однако возникают сомнения относительно того, существует ли на самом деле такая «эстафета» электрических зарядов, поскольку аспарагиновая кислота 102 и гистидин 57 находятся слишком далеко друг от друга. Но какова бы ни была функция остатка аспарагиновой кислоты 102, ясно, что он необходим для каталитического действия фермента.

Г. Индуцированное соответствие между молекулой гексокиназы и одним из ее субстратов – D-глюкозой

Гексокиназа, катализирующая фосфорилирование D-глюкозы и других гексоз в реакции с ATP

ATP + D-глюкоза → ADP + D-глюкозо-6-фосфат,

состоит из двух полипептидных субъединиц, как показано на масштабном изображении пространственной модели ее молекулы (рис. 12). Рядом с «пустой» молекулой гексокиназы изображена также свободная молекула D-глюкозы (темно-красный цвет). Когда молекула D-глюкозы связывается с активным центром фермента в отсутствие второго субстрата, т.е. ATP, обе субъединицы гексокиназы сближаются, так что молекула глюкозы оказывается в «кармане» активного центра (рис. 13). При этом в четвертичной структуре фермента происходят довольно существенные изменения, так как при образовании комплекса гексокиназа–глюкоза в отсутствие ATP гексокиназа подвергается «вынужденной подгонке» к молекуле субстрата. Этот комплекс достаточно стабилен, и его удалось получить в кристаллическом виде. Рентгеноструктурный анализ этого комплекса был проведен Томасом А. Стейцем из Йельского университета. Если одновременно присутствуют и ATP и глюкоза, они связываются со

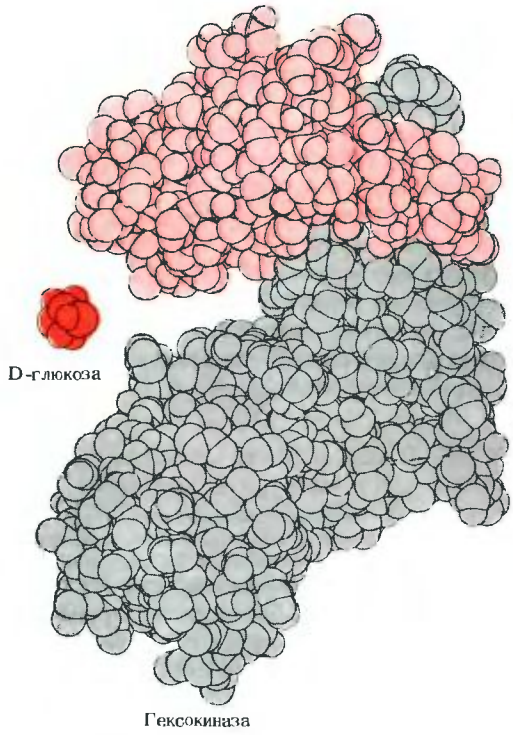


Рис. 12.

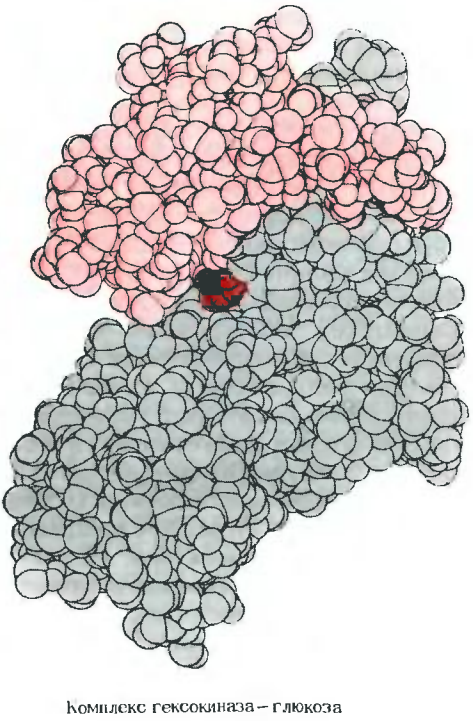


Рис. 13.

своими специфическими центрами, после чего происходит каталитическая реакция с образованием и последующим освобождением ADP и глюкозо-6-фосфата. Фермент при этом вновь принимает первоначальную конформацию, чтобы начать новый каталитический цикл.

Прежде всего рентгеноструктурный анализ позволяет определить вторичную, третичную и четвертичную структуры молекул различных ферментов, что дает возможность сравнивать их с соответствующими структурами некаталитических глобулярных белков. Такие сравнения не выявили никаких специфических особенностей в трехмерной структуре ферментов, по которым они отличались бы от некаталитических белков. Однако ферменты, принадлежащие к одному классу (например, ферменты, катализирующие перенос фосфатных групп от ATP на молекулы, играющие роль акцепторов фосфата) могут обладать какими-то общими для всех них структурными особенностями.

Кроме того, благодаря рентгеноструктурному анализу были идентифицированы активные центры многих ферментов. Активный центр часто представляет собой щель (или углубление) на поверхности молекулы фермента; по своей форме эта щель оказывается комплементарной входящей в нее молекуле субстрата. У одних ферментов активные центры выстланы петлями полипептидных цепей, находящихся в β-конформации, а у других они имеют форму «кармана», внутреннюю поверхность которого образуют аминокислотные остатки с заряженными полярными группами. В некоторых случаях рентгеноструктурный метод позволил определить структуру фермент-субстратного комплекса. Приме-

ром может служить фермент *лизоцим* (дополнение 9-4, *А*), разрывающий определенные связи в остове бактериальных полисахаридов.

Благодаря сочетанию рентгеноструктурных и химических исследований была выяснена детальная топография активного центра химотрипсина, состоящего из трех полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями остатков цистина (дополнение 9-4, *Б*). Химические исследования показали, что при инактивации химотрипсина диизопропилфторфосфатом образуется ковалентное производное остатка серина в положении 195 полипептидной цепи; отсюда следует, что этот остаток входит в состав активного центра. По данным других химических исследований, остаток гистидина в положении 57 и остаток аспарагиновой кислоты в положении 102 также участвуют в каталитическом процессе. Хотя эти остатки занимают в полипептидном остове положения, находящиеся далеко друг от друга, и даже в разных полипептидных цепях, данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют о том, что в трехмерной структуре свернутой нативной молекулы химотрипсина (дополнение 9-4, *Б*) они расположены в пространстве очень близко друг к другу. Эти точные данные о структуре химотрипсина в сочетании с результатами химических исследований фермента позволили предложить ряд механизмов каталитического действия химотрипсина (дополнение 9-4, *В*), а также исключить некоторые другие механизмы, не соответствующие данным о структуре активного центра. Хотя до сих пор точно не известно во всех деталях, как функционирует химотрипсин, механизм его действия мы понимаем лучше, чем механизм действия любого другого фермента.

Рентгеноструктурные исследования выявили еще одну важную особенность механизма действия ферментов, а именно возникновение конформационных изменений в молекуле фермента в процессе присоединения к ней субстрата и последующего их взаимодействия. Яркий пример этого – гексокиназа (разд. 9-3), катализирующая фосфорилирование D-глюкозы в реакции с ATP. Как описано в дополнении 9-4, *Г*, присоединение относительно небольшой молекулы глюкозы к активному центру гексокиназы приводит к сближению полипептидных цепей двух субъединиц, которые, как клещи, захватывают молекулу глюкозы и подготавливают ее для атаки со стороны молекулы ATP. По-видимому, при такой индуцированной «подгонке» конформации фермента к структуре субстрата молекула глюкозы деформируется и ее структура приближается к структуре переходного состояния.

9.17. В ферментных системах есть «дирижер», роль которого выполняет регуляторный фермент

Ферменты, осуществляющие в клетке различные метаболические процессы, например превращение глюкозы в молочную кислоту в скелетных мышцах или синтез аминокислот из более простых предшественников, организованы в виде последовательных цепей или систем, в которых они действуют согласованно. В таких ферментных системах продукт реакции, катализируемой первым ферментом, становится субстратом для следующего фермента и т.д. (рис. 9-17). Мультиферментные системы могут включать 15 и более ферментов, действующих в определенной последовательности.

В каждой ферментной системе есть хотя бы один фермент, выполняющий роль «дирижера», который задает скорость всей последовательности реакций, так как он катализирует лимитирующую стадию, т.е. самую медленную реакцию, определяющую скорость всего процесса в целом. Такие ферменты-«дирижеры» не только выполняют каталитическую функцию, но и обладают способностью повышать или понижать свою каталитическую активность в ответ на определенные сигналы. Благодаря действию подобных ферментов скорость каждой последовательности метаболических реакций постоянно изме-

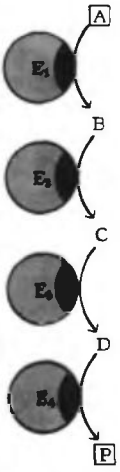


Рис. 9-17. Схематическое изображение мультиферментной системы, осуществляющей превращение A в P в ходе четырех последовательных ферментативных реакций.

няется, почти мгновенно приспосабливаясь к изменяющимся потребностям клетки в энергии и играющих роль строительных блоков молекулах, необходимых для роста и обновления клеток. В большинстве мультиферментных систем фермент-«дирижер» катализирует первую реакцию такой последовательности. Остальные же ферменты, присутствующие, как правило, в количествах, которые могут обеспечить очень высокую каталитическую активность, просто подчиняются указаниям «дирижера»; катализируемые ими реакции ускоряются лишь при поступлении достаточного количества субстратов, образующихся в качестве продуктов предшествующих реакций.

Такие ферменты-«дирижеры», активность которых изменяется под воздействием молекулярных сигналов разных типов, называются *регуляторными*. Существуют два основных класса регуляторных ферментов: аллостерические, т.е. ферменты, регулируемые нековалентно связанными с ними модуляторами, и ферменты, регулируемые путем их ковалентной модификации.

9.18. Аллостерические ферменты регулируются путем нековалентного присоединения к ним молекул модуляторов

В некоторых мультиферментных системах первый (регуляторный) фермент отличается характерной особенностью: он ингибируется конечным продуктом мультиферментной системы. Как только концентрация конечного продукта такой последовательности метаболических реакций превысит его обычную стационарную концентрацию, т.е. он будет произведен в большем количестве, чем нужно клетке, конечный продукт начинает действовать как специфический ингибитор первого, или регуляторного, фермента. В результате функционирование всей ферментной системы в целом замедляется, для того чтобы вновь привести скорость выработки конечного продукта в соответствие с потребностями клетки. Регуляция такого типа называется *ингибированием по принципу обратной связи* или *ретроингибированием*. Классическим примером подобного аллостерического ингибирования может служить бактериальная ферментная система, катализирующая превращение L-треонина в L-изолейцин – процесс, включающий пять ферментативных реакций (рис. 9-18). Эта система относится к числу тех ферментных систем, в которых впервые было обнаружено ингибирование по принципу обратной связи. Фермент, катализирующий первую реакцию указанного процесса, *треониндегидратаза*, ингибируется продуктом последней реакции – изолейцином, выступающим в качестве высокоспецифического ингибитора. Ни один из промежуточных продуктов этой цепи реакций не ингибирует треониндегидратазу, и ни один другой фермент цепи не ингибируется изолейцином. Ингибирование по принципу обратной связи – это один из нескольких известных типов аллостерической регуляции.

Ингибирование треониндегидратазы изолейцином обратимо; при повышении концентрации изолейцина активность фермента возрастает. Таким образом,

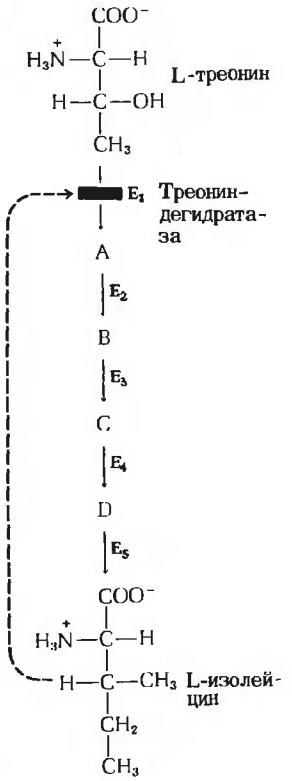


Рис. 9-18. Ингибирование по принципу обратной связи процесса превращения L-треонина в L-изолейцин, происходящего в ходе пяти последовательных реакций, катализируемых пятью ферментами ($E_1 - E_5$), через образование четырех промежуточных продуктов A, B, C и D. Первый фермент, треониидегидратаза (E_1), специфически ингибируется L-изолейцином – конечным продуктом всей последовательности реакций, но не ингибируется ни одним из промежуточных соединений (A, B, C и D). Такое ингибирование обозначено пунктирной линией и красной полоской, пересекающей стрелку, указывающую направление реакции, катализируемой треониндегидратазой.

треониндегидратазная активность очень быстро и обратимо изменяется в зависимости от концентрации изолейцина в клетке. Хотя изолейцин представляет собой весьма специфический ингибитор треониндегидратазы, он не связывается с субстратным центром фермента. Вместо этого молекула изолейцина присоединяется к другому специфическому участку на поверхности молекулы фермента, который называется *регуляторным* центром. Взаимодействие изолейцина с регуляторным центром треониндегидратазы не сопровождается образованием ковалентных связей и потому легко обратимо. *Треониндегидратаза – типичный представитель класса аллостерических, или регуляторных, ферментов, которые осуществляют свои функции путем обратимого нековалентного связывания с молекулой модулятора.* Термин «аллостерический» происходит от греческих слов *allo* и *stereos*, означающих соответственно «другой» и «место» (или «участок»). Аллостерические ферменты – это ферменты, имеющие «другие центры».

По своим свойствам аллостерические ферменты значительно отличаются от простых нерегуляторных ферментов,

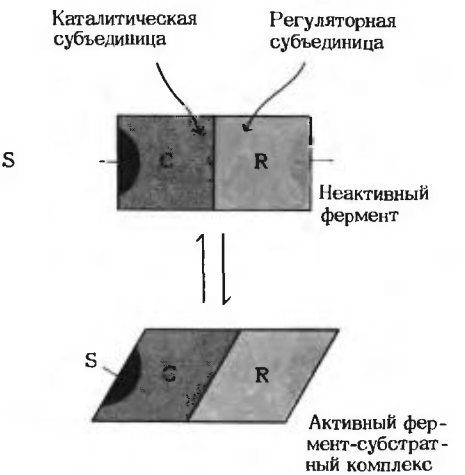


Рис. 9-19. Схематическая модель взаимодействия между субъединицами аллостерического фермента. У многих аллостерических ферментов центр связывания субстрата и центр связывания модулятора расположены в разных субъединицах – соответственно каталитической (C) и регуляторной (R). «Сообщение» о присоединении положительного модулятора M к его специфическому центру в регуляторной субъединице передается посредством конформационных изменений каталитической субъединицы, которая становится активной и ее сродство к связывающемуся с ней субстрату S повышается. После отделения модулятора M от регуляторной субъединицы фермент вновь переходит в неактивную или менее активную форму.

описанных выше в этой главе. Во-первых, как и все ферменты, аллостерические ферменты имеют *каталитический* центр, в котором происходит связывание субстрата и превращение его в продукт, но у аллостерических ферментов есть по меньшей мере еще один регуляторный, или аллостерический, центр для связывания регулирующего метаболита, называемого *эффектором* или *модулятором* (рис. 9-19). Аллостерический центр специфичен по отношению к своему модулятору аналогично тому, как каталитический центр специфичен по отношению к своему субстрату. Во-вторых, молекулы аллостерических ферментов обычно намного крупнее и более сложно устроены по сравнению с молекулами простых ферментов. Большинство из них состоит из двух или более полипептидных цепей, или субъединиц. И наконец, в-третьих, кинетика реакций, катализируемых аллостерическими ферментами, обычно значительно отклоняется от классического уравнения Михаэлиса–Ментен; это один из признаков, по которому они были впервые обнаружены.

9.19. Аллостерические ферменты ингибируются или активируются их модуляторами

Когда специфический *ингибирующий*, или *отрицательный*, модулятор связывается с аллостерическим центром, что происходит при повышении концентрации модулятора в клетке, фермент переходит в менее активную или совсем неактивную форму, т.е. «выключается» Когда же концентрация модулятора в клетке снижается, ингибитор покидает аллостерический центр и фермент вновь «включается», т.е. переходит в активную форму.

Существуют, однако, и такие аллостерические ферменты, которые *активируются* молекулами модулятора. В этом случае функцию *активирующего*, или *положительного*, модулятора выполняет не конечный продукт данной цепи ферментативных реакций, а какой-то другой метаболит, который служит

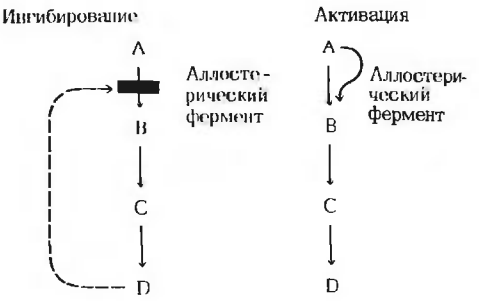


Рис. 9-20. Схема действия ингибирующих и активирующих аллостерических регуляторов.

молекулярным сигналом, означающим, что фермент должен «поспешить» (рис. 9-20). Часто в роли активирующего модулятора такого типа выступает сама молекула субстрата. Аллостерические ферменты этого класса, называемые *гомотропными* (так как модулятором и субстратом служит одно и то же соединение), имеют два или большее число центров связывания для субстрата. Эти центры связывания нередко выполняют двойную функцию, действуя и как каталитические, и как регуляторные центры. Аллостерические ферменты этого типа реагируют на ситуации, при которых субстрат накапливается в избыточных количествах и должен быть удален в ходе последующих реакций.

Таким образом, имеются аллостерические ферменты двух типов. Ферменты первого типа ингибируются своими модуляторами, которые обычно по своему химическому строению отличаются от субстрата (поэтому эти ферменты называются *гетеротропными*). Ферменты второго типа активируются своими модуляторами, часто самими субстратами. «Включение» и «выключение» аллостерических ферментов во многом напоминает «включение» и «выключение» гемоглобина дифосфоглицератом (гл. 8).

Некоторые аллостерические ферменты подвержены влиянию двух и более модуляторов, которые могут оказывать на фермент противоположное действие, т.е. один модулятор (или большее их число) активирует фермент, а другой (или другие)–ингибирует его.

У таких более сложных ферментов каждый модулятор имеет свой специфический аллостерический центр, связываясь с которым модулятор посылает ферменту сигналы о повышении или снижении его каталитической активности.

9.20. Поведение аллостерических ферментов не описывается уравнением Михаэлиса–Ментен

Для аллостерических ферментов соотношения между концентрацией субстрата и скоростью реакции отличаются от соотношений, отвечающих классическому уравнению Михаэлиса–Ментен, причем характер этих различий зависит от того, подчиняется ли фермент действию ингибирующего или активирующего модулятора. У аллостерических ферментов так же, как и у нерегуляторных ферментов, наблюдается «насыщение» субстратом, когда последний присутствует в достаточно больших концентрациях, однако график зависимости начальной скорости реакции от концентрации субстрата для некоторых аллостерических ферментов представляет собой *сигмоидную* кривую, а не классическую *гиперболу*, характерную для нерегуляторных ферментов (рис. 9-21). Хотя на сигмоидной кривой насыщения субстратом для аллостерических ферментов мы можем найти точку, в которой скорость реакции равна половине ее максимальной скорости, эта точка не соответствует величине K_M, поскольку поведение аллостерических ферментов не описывается гиперболической зависимостью, вытекающей из уравнения Михаэлиса–Ментен. В данном случае вместо символа K_M используют символы $[S]_{0,5}$ и $K_{0,5}$, обозначающие концентрацию субстрата, при которой скорость реакции, катализируемой аллостерическим ферментом, равна половине ее максимальной скорости.

Гиперболическая кривая насыщения субстратом для нерегуляторного фермента, приведенная выше на рис. 9-4, очень напоминает кривую связывания кислорода миоглобином (разд. 8-13). Что же касается сигмоидной кривой для аллостерического фермента, показанной на рис. 9-21, *A*, то она похожа на кривую связывания кислорода гемоглобином (разд. 8-13). Действительно, миоглобин и гемоглобин можно рассматривать как удобные модели для сравнительной интерпретации поведения обычных и аллостерических ферментов. Миоглобин имеет только один центр связывания для своего лиганда (кислорода) и одну полипептидную цепь; для него характерна гиперболическая кривая насыщения кислородом. Подобно миоглобину, многие нерегуляторные ферменты также имеют только один центр связывания для своих субстратов и одну полипептидную цепь; их поведение описывается гиперболической кривой насыщения субстратом.

Гемоглобин же содержит четыре центра связывания, по одному в каждой из четырех субъединиц, причем все эти центры действуют кооперативно. Вспомним, что когда один центр связывания гемоглобина занят молекулой кислорода, у других центров связывания сродство к кислороду возрастает. Это проявляется в том, что после связывания первой молекулы кислорода кривая насыщения гемоглобина кислородом резко идет вверх и принимает сигмоидную форму. Аналогичным образом *гомотропный* аллостерический фермент (рис. 9-21, *A*) имеет несколько центров связывания для своего субстрата, действующих кооперативно, так что связывание одной молекулы субстрата значительно облегчает присоединение к ферменту последующих молекул субстрата. Поэтому зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата описывается сигмоидной, а не гиперболической кривой.

В случае *гетеротропных* ферментов, для которых модулятором служит не субстрат, а какой-либо другой метаболит, трудно говорить о какой-то общей для них форме кривой насыщения субстратом, так как она зависит от того, является ли модулятор положительным (активирующим) или отрицательным (ингибирующим). Если модулятор

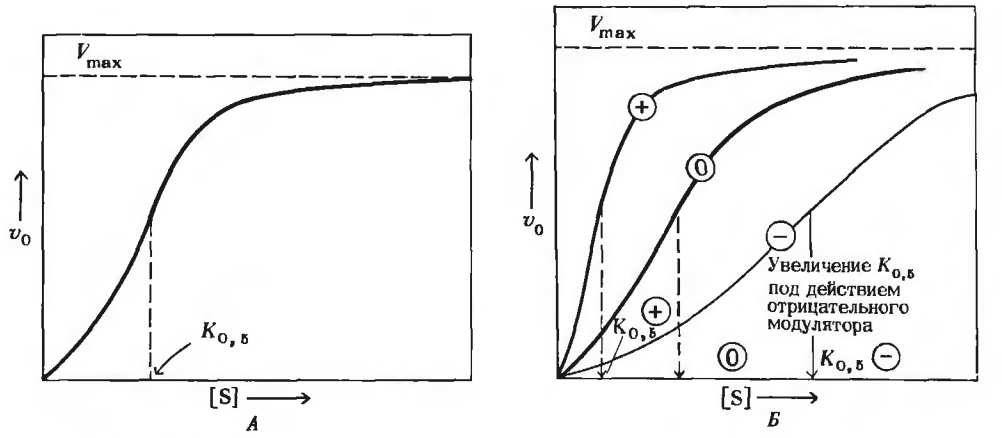


Рис. 9-21. Кривые зависимости активности фермента от концентрации субстрата, характерные для аллостерических ферментов.
А. Сигмоидная кривая, полученная для гомотропного фермента, субстрат которого служит также положительным (активирующим) модулятором. Величина $K_{0,5}$ – это концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной. Обратите внимание, что относительно небольшое повышение концентрации субстрата в крутой части кривой может вызвать весьма значительное увеличение скорости реакции. Обратите внимание также на то, что эта кривая напоминает кривую насыщения гемоглобина кислородом.
Б. Влияние положительного (активирующего) модулятора (+), отрицательного (ингибирующего) модулятора (−) и отсутствия модулятора (0) на аллостерический фермент, для которого характерно изменение величины $K_{0,5}$ при постоянной величине V_{max}. *В.* Кривые, характеризующие свойства аллостерического фермента менее часто встречающегося типа. Величина V_{max} изменяется, а величина $K_{0,5}$ остается почти постоянной.
Эти примеры иллюстрируют разнообразные, иногда очень сложные ответы аллостерических ферментов на действие их модуляторов.

оказывает на фермент активирующее действие, то кривая насыщения субстратом становится ближе по форме к гиперболе; при этом величина $K_{0,5}$ уменьшается, а величина V_{max} остается неизменной. В результате в присутствии положительного модулятора скорость реакции при данной концентрации субстрата повышается (рис. 9-21, *Б*). Некоторые аллостерические ферменты отвечают на воздействие активирующего модулятора повышением V_{max} и небольшим изменением величины $K_{0,5}$ (рис. 9-21, *В*). В случае отрицательного, или ингибирующего, модулятора сигмоидная форма кривой насыщения субстратом становится более выраженной, а величина $K_{0,5}$ повышается (рис. 9-21, *Б*). Следовательно, поведение аллостерических ферментов описывается различными кривыми зависимости субстрат—активность, так как одни из этих ферментов взаимодействуют с ингибирующими модуляторами, другие–с активирующими, а третьи–и с теми и с другими одновременно.

9.21. Субъединицы аллостерических ферментов сообщаются между собой

У аллостерических ферментов имеются и другие сходные черты с гемоглоби-

ном. Во-первых, молекулы аллостерических ферментов, как и молекула гемоглобина, состоят обычно из нескольких полипептидных субъединиц; некоторые аллостерические ферменты содержат по шесть, восемь или даже по двенадцать и более субъединиц. Во-вторых, у аллостерических ферментов связывающий центр для модулятора и каталитический центр для субстрата, по-видимому, сообщаются между собой подобно тому, как сообщаются друг с другом субъединицы гемоглобина: связывание первой молекулы кислорода с одной из субъединиц

Дополнение 9-5. Трехмерная структура регуляторного фермента аспартат–карбамоилтрансферазы

Этот аллостерический регуляторный фермент (рис. 1) имеет два каталитических кластера, в каждом из которых находится по три свернутые в третичную структуру полипептидные цепи и три регуляторных кластера (показаны красным цветом), содержащие по две полипептидные цепи. Один каталитический кластер с тремя полипептидными цепями в свернутой конформации обведен более жирной линией. За ним виден другой каталитический кластер. Структуру этого фермента установили по данным рентгеноструктурного анализа Уильям Липском и его сотрудники в Гарвардском университете[1]. Вопросы, связанные с ролью этого фермента в синтезе нуклеотидов и с его регуляцией, будут рассмотрены в гл. 22.

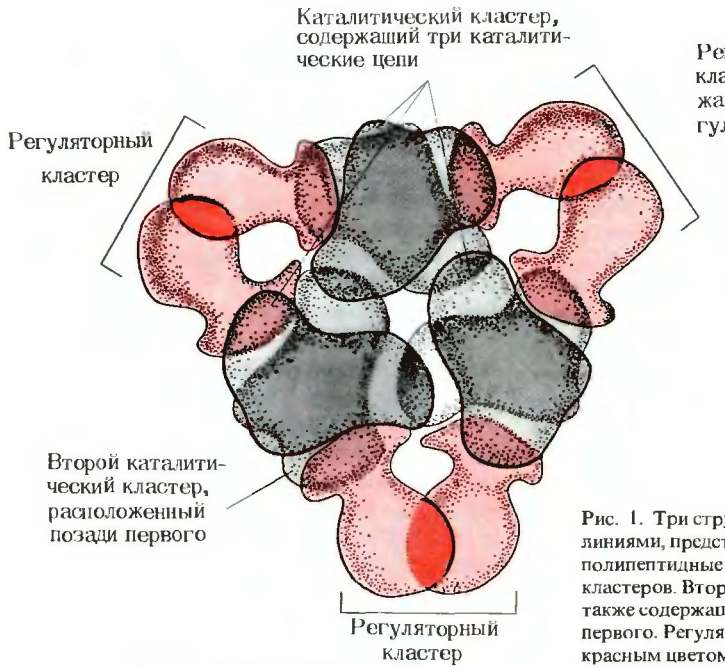


Рис. 1. Три структуры, обведенные жирными линиями, представляют собой три полипептидные цепи одного из каталитических кластеров. Второй каталитический кластер, также содержащий три цепи, находится позади первого. Регуляторные кластеры выделены красным цветом.

[1] Прекрасное описание этого фермента дано в книге: Cantor C.R. and Schimmel P.R. Biophysical Chemistry, pt. I, pp. 139–144, Freeman, San Francisco, 1980.

гемоглобина служит «сигналом» для других субъединиц повысить их сродство к кислороду. В-третьих, аллостерические ферменты претерпевают конформационные изменения при связывании с молекулой модулятора, что дает им возможность переходить из относительно активного состояния в относительно неактивное, и наоборот (рис. 9-19). Здесь опять мы обнаруживаем сходство с гемоглобином, в котором конформационные изменения позволяют «включать» и «выключать» механизм его действия.

Некоторые аллостерические ферменты имеют чрезвычайно сложную структуру и содержат много полипептидных цепей. К ним относится, например, такой важный фермент, как *аспартат–карбамоилтрансфераза*, которая состоит из 12 полипептидных цепей, образующих *каталитические* и *регуляторные* субъединицы. В дополнении 9-5 показана очень сложная четвертичная структура этого фермента, установленная по данным рентгеноструктурного анализа. Аспартат–карбамоилтрансфераза катализирует важную реакцию в биосинтезе нуклеотидов. Более подробно мы рассмотрим его действие и регуляторные свойства в гл. 22.

9.22. Некоторые ферменты регулируются путем обратной ковалентной модификации

Еще один важный класс регуляторных ферментов – это ферменты, у которых переход активной формы в неактивную происходит путем *ковалентной модификации* молекулы фермента. К этому классу относится, например, такой важный фермент, как *гликогенфосфорилаза* из мышц и печени, катализирующая реакцию:

$$(\text{Глюкоза})_n + \text{Фосфат} \rightarrow \underset{\text{Гликоген}}{} \rightarrow (\text{Глюкоза})_{n-1} + \text{Глюкозо-1-фосфат}$$

(Укороченная цепь гликогена)

Образовавшийся в этой реакции глюкозо-1-фосфат может затем расщепиться и превратиться либо в молочную кислоту (в мышце), либо в свободную глюкозу (в печени). Гликогенфосфорилаза существует в двух формах: в виде *фосфорилазы a* (активная форма) и фосфорилазы *b* (относительно неактивная форма; рис. 9-22). Фосфорилаза *a* представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, в каждой из которых имеется один специфический остаток серина, фосфорилированный по гидроксильной группе. Эти остатки фосфосерина необходимы для максимальной активности фермента. Фосфатные группы, соединенные с остатками серина, можно удалить из фосфорилазы *a* с помощью фермента, называемого *фосфатазой фосфорилазы*, который катализирует гидролитический разрыв связи между фосфатом и остатком серина.

$$\underset{\text{(Более активная форма)}}{\text{Фосфорилаза } a} + 2H_2O \xrightarrow{\text{Фосфатаза фосфорилазы}} \underset{\text{(Менее активная форма)}}{\rightarrow \text{Фосфорилаза } b} + 2P_i$$

В этой реакции фосфорилаза *a* превращается в фосфорилазу *b*, гораздо менее активно катализирующую распад гликогена. Таким образом, активная форма гликогенфосфорилазы превращается в относительно неактивную форму в результате расщепления двух ковалентных связей между остатками фосфорной кислоты и двумя специфическими остатками серина в молекуле фермента.

Фосфорилаза *b* может снова реактивироваться, т.е. превратиться в активную фосфорилазу *a*. Эта реакция осуществляется с помощью другого фермента, называемого *киназой фосфорилазы*, который катализирует перенос фосфатных групп от АТР к гидроксильным группам специфических остатков серина в фосфорилазе *b* (рис. 9-22):

$$2ATP + \text{Фосфорилаза } b \xrightarrow{\text{Киназа фосфорилазы}} \text{(Менее активная форма)}$$

$$\rightarrow 2ADP + \text{Фосфорилаза } a \text{ (Более активная форма)}$$

Итак, распад гликогена в скелетных мышцах и печени регулируется путем изменения количественных соотношений активной и неактивной форм фермента. Переход из одной формы в другую сопровождается изменениями четвертичной структуры фермента, затрагивающими и его каталитический центр. Естественно, что при этом каталитическая активность фермента изменяется.

Хотя в большинстве известных случаев регуляция действия ферментов путем их ковалентной модификации осуществляется через фосфорилирование и дефосфорилирование специфических остатков серина, как только что описано на примере гликогенфосфорилазы, существуют и другие способы ковалентной модификации ферментов, такие, как метилирование определенных аминокислотных остатков или присоединение к ним аденилатных групп. Другие примеры ковалентной модификации регуляторных ферментов будут рассмотрены в последующих главах.

Некоторые более сложные регуляторные ферменты модулируются посредством ковалентных и нековалентных механизмов. Такие ферменты катализируют реакции, представляющие собой наиболее важные этапы метаболизма; поэтому они взаимодействуют со множеством регуляторных метаболитов, осуществляющих как аллостерическую, так и ковалентную модификацию этих ферментов. К подобным ферментам относится только что рассмотренная гликогенфосфорилаза. Хотя регуляция этого фермента осуществляется в основном через ковалентную модификацию, как описано выше, возможно также и нековалентное (аллостерическое) взаимодействие его с аденилатом, который является активирующим модулятором фосфорилазы *b* (гл. 20).

Другой пример – *глутаминсинтетаза E. coli*, один из наиболее сложных регуляторных ферментов, известных в настоящее время. Она взаимодействует со многими аллостерическими модуляторами и регулируется также путем обратимой ковалентной модификации (гл. 23). Оба этих фермента будут обсуждаться дальше в связи с их ролью в метаболизме.

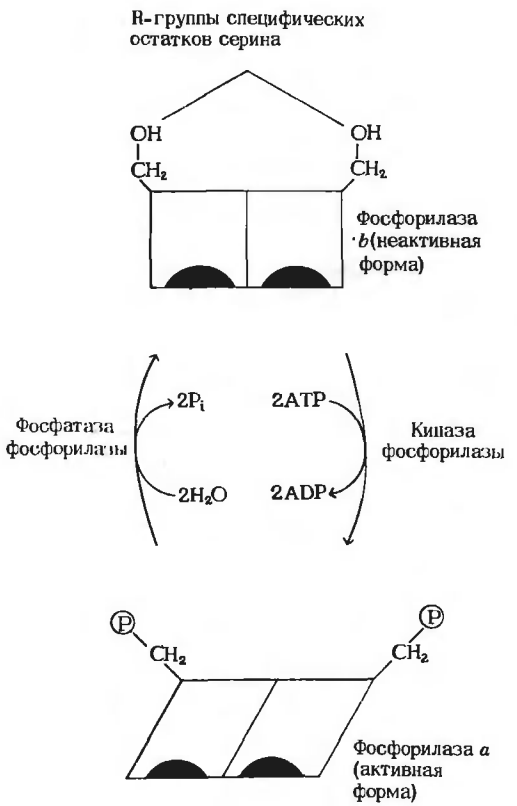


Рис. 9-22. Регуляция активности гликогенфосфорилазы путем ее ковалентной модификации. В активной форме фермента (фосфорилаза *a*) специфические остатки серина (по одному в каждой субъединице) фосфорилированы. В результате ферментативного отщепления фосфатных групп, катализируемого фосфатазой фосфорилазы, фосфорилаза *a* переходит в относительно неактивную фосфорилазу *b*. Фосфорилаза *b* может реактивироваться и превратиться в фосфорилазу *a* под действием киназы фосфорилазы, катализирующей фосфорилирование гидроксильных групп серина за счет ATP.

9.23. Многие ферменты существуют в нескольких формах

Известно много ферментов, которые существуют не менее чем в двух молекулярных формах, встречающихся у одного и того же вида, в одной и той же ткани, и даже в одной и той же клетке. В таких случаях все эти формы фермента катализируют одну и ту же реакцию, но, так как они различаются по своим кинетическим свойствам, а также по аминокислотному составу или последовательности аминокислотных остатков, их можно выделить и охарактеризовать с помощью соответствующих методов. Такие множественные формы ферментов называются *изоферментами* или *изозимами*. Одним из первых ферментов, у которого были обнаружены такие формы, была лактатдегидрогеназа, катализирующая обратимую окислительно-восстановительную реакцию:

$$\text{Лактат} + \text{NAD}^+ \rightleftarrows \text{Пируват} + \text{NADH} + \text{H}^+.$$

В ходе этой реакции лактат теряет два атома водорода и в результате окисляется в пируват (NAD^+ и NADH – это окисленная и восстановленная формы кофермента *никотинамидадениндинуклетида*, о котором речь пойдет в следующей главе). Лактатдегидрогеназа присутствует в тканях животных в виде пяти разных изоферментов, которые можно разделить методом электрофореза (рис. 9-23). Каждая из форм лактатдегидрогеназы состоит из четырех полипептидных цепей с молекулярной массой 33 500. Все пять изоферментов содержат в разных соотношениях полипептидные цепи двух видов, различающиеся по аминокислотному составу и последовательности аминокислот. А-цепи, называемые также М-цепями (от англ. «muscle» – мышца), кодируются двумя разными генами. Изоформа лактатдегидрогеназы, преобладающая в скелетной мышце, содержит четыре А-цепи, а изоформа, преобладающая в мышечной ткани сердца, состоит из четырех В-цепей. Лактатдегидрогеназы из других тканей представляют собой смеси пяти возможных форм, которые можно обозначить как A_4, A_3B, A_2B_2, AB_3, B_4. Эти изоферменты значительно различаются по максимальной скорости V_{max} и константе Михаэлиса–Ментен (K_M) для своих субстратов, в частности для пирувата. Изофермент A_4 предпочтительно катализирует быстрое восстановление пирувата в лактат в скелетной мышце при очень низких

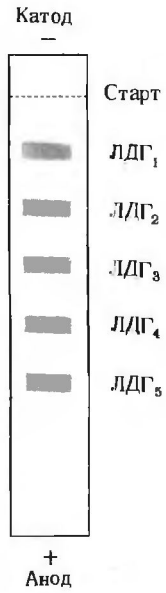


Рис. 9-23. Электрофоретическое разделение разных молекулярных форм лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Изоферменты обычно обозначаются цифровыми индексами, указывающими относительную скорость их перемещения при электрофорезе в полиакриламидном или крахмальном геле в стандартных условиях.
Разные формы лактатдегидрогеназы обозначаются также и буквами, как указано в тексте.
Анализ изоферментов часто используется для медицинской диагностики. В мышечной ткани сердца преобладает изофермент $ЛДГ_1$ (обозначаемый также H_4 или B_4). При сердечном приступе, приводящем к ограничению или прекращению циркуляции крови в каком-то участке сердца, концентрация этого изофермента в плазме крови сильно возрастает. Это обусловлено тем, что мембраны поврежденных клеток сердца не могут нормально функционировать и пропускают в кровоток некоторые цитозольные ферменты, в том числе ЛДГ. При некоторых болезнях печени (таких, как инфекционный гепатит) в крови возрастает содержание $ЛДГ_4$ и $ЛДГ_5$ – изоферментов, характерных для печени.

концентрациях пирувата, тогда как изофермент B_4 предпочтительно катализирует быстрое окисление лактата в пируват в мышечной ткани сердца. Другие формы лактатдегидрогеназы имеют промежуточные кинетические свойства.

Было показано, что многие ферменты, участвующие в клеточном метаболизме, существуют в нескольких молекулярных формах. Все эти формы данного фермента катализируют одну и ту же реакцию, но различаются по активности, а иногда и по чувствительности к аллостерическим модуляторам. Распространение изомерных форм того или иного фермента в различных тканях и органах определяется по меньшей мере четырьмя факторами. К ним относятся:

1. *Различия в каких-либо особенностях метаболизма в разных органах.* Например, наличие разных форм лактатдегидрогеназы в сердечной и скелетной мышцах отражает именно такие различия.
2. *Различия в локализации и метаболической роли данного фермента в клетках одного и того же типа.* Например, фермент малатдегидрогеназа существует в разных формах в митохондриях и цитозоле, где эти изоферменты выполняют несколько различные функции (гл. 17).
3. *Дифференцировка и развитие тканей взрослого организма из эмбриональных форм этих тканей.* Например, для печени эмбрионов характерно определенное соотношение различных форм лактатдегидрогеназы, изменяющееся в процессе дальнейшего развития этого органа. Интересно, что некоторые ферменты, катализирующие расщепление глюкозы, присутствуют в опухолевых клетках в тех формах, которые встречаются у эмбрионов.
4. *Тонкая регулировка скоростей метаболических реакций, осуществляемая благодаря различной чувствительности изоферментов к аллостерическим модуляторам.* Некоторые регуляторные ферменты существуют в нескольких молекулярных формах, различающихся по своей чувствительности к модуляторам (гл. 22).

9.24. Нарушение каталитической активности ферментов может быть обусловлено мутациями

Известно много генетических болезней человека, при которых тот или иной фермент либо совсем неактивен, либо имеет какой-то дефект, затрагивающий его каталитическую или регуляторную функцию. При таких заболеваниях в полипептидных цепях «дефектного» фермента содержится одна или большее число «неправильных» аминокислот, появившихся в результате мутации участков ДНК, кодирующей этот фермент. Каталитическая активность фермента зависит не только от наличия определенных аминокислотных остатков в каталитическом и регуляторном центрах, но и от общей трехмерной структуры фермента. Поэтому замена одного аминокислотного остатка в каком-либо важном месте цепи может привести к изменению или даже к полной утрате каталитической активности фермента, подобно тому как замена всего лишь одного аминокислотного остатка в молекуле гемоглобина вызывает появление серповидноклеточного гемоглобина с нарушенной функцией (разд. 8.18). Если генетически измененный фермент входит в состав ферментной системы, катализирующей какой-нибудь центральный метаболический путь, то последствия такого изменения могут быть очень тяжелыми, вплоть до летальных нарушений метаболизма.

Некоторые из наиболее серьезных генетических заболеваний человека, вызванных нарушениями структуры того или иного фермента, приведены в табл. 9-8. Эти заболевания будут обсуждаться в последующих главах. Прилагается много усилий, чтобы предотвратить нежелательные последствия подобных генетических дефектов в ферментах. Один из испробованных подходов – это введение в организм нормальной, активной формы дефектного фермента, иммобилизованного в фильтрующей капсуле, вставленной в кровеносный сосуд. Использование такого метода позволяет надеяться, что метаболиты, нака-

Таблица 9-8. Некоторые генетические заболевания, обусловленные дефектами определенных ферментов

Болезнь	Дефектный фермент
Альбинизм	Тирозин-3-монооксигеназа
Алкаптонурия	Гомогентизат-1, 2-диоксигеназа
Галактоземия	Галактозо-1-фосфат–уридилтрансфераза
Гомоцистинурия	Цистатионин-β-синтаза
Фенилкетонурия	Фенилаланин-4-монооксигеназа
Болезнь Тея–Сакса	Гексозаминидаза А

пливающиеся в организме вследствие какого-либо генетического дефекта, будут превращаться в нормальные продукты при прохождении крови через капсулу, содержащую активный фермент.

Генетические изменения в ферментах не всегда приводят к вредным последствиям. Часто они проявляются в изменении второстепенных признаков организма, таких, как цвет глаз или волос (рис. 9-24). Иногда в результате какого-либо генетического нарушения фермент начинает функционировать более эффективно, что дает организму некоторое преимущество в борьбе за существование.

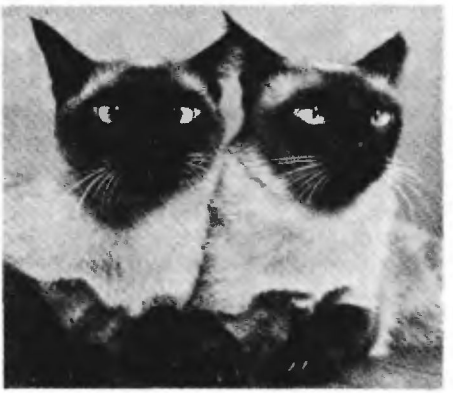


Рис. 9-24. Характерная окраска сиамских кошек – это результат генетических изменений фермента, ответственного за синтез темного пигмента шерсти; вследствие этого дефекта фермент активен только в более холодных частях тела.

Краткое содержание главы

Ферменты – это белки, катализирующие строго определенные химические реакции. Они связываются с молекулой субстрата, в результате чего образуется промежуточный фермент-субстратный комплекс, который затем распадается на свободный фермент и продукт реакции. При повышении концентрации субстрата S и постоянной концентрации фермента E каталитическая активность последнего будет повышаться до тех пор, пока не достигнет характерной для данного фермента максимальной скорости V_{max}, при которой практически весь фермент находится в форме комплекса ES и, следовательно, насыщен субстратом. Такая зависимость между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции описывается гиперболической кривой. Концентрация субстрата, при которой скорость реакции составляет половину величины V_{max}, получила название константы Михаэлиса–Ментен (K_M). Эта константа является характеристикой каталитического действия фермента применительно к какому-то определенному субстрату. Уравнение Михаэлиса–Ментен

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

связывает скорость ферментативной реакции с концентрацией субстрата и величиной V_{max} через константу K_M. Это уравнение приложимо также к двухсубстратным реакциям, протекающим по механизму единичного или двойного замещения (механизм типа «пинг-понг»). Каждый фермент имеет оптимум pH, т. е. определенное значение pH, при котором его активность достигает максимального уровня. Все ферменты обладают строгой специфичностью по отношению к субстратам, на которые они действуют. Ферменты можно инактивировать путем необратимой модификации некоторых функциональных групп, имеющих важное значение для каталитической активности ферментов. Их можно также подвергнуть обратимому ингибированию по

конкурентному или неконкурентному механизму. Конкурентные ингибиторы, по своей структуре напоминающие обычно субстрат, обратимо конкурируют с ним за связывание с активным центром, но в отличие от субстрата не претерпевают никаких превращений под действием фермента. Неконкурентные ингибиторы связываются не с активным центром, а с каким-то другим участком молекулы фермента. Они могут присоединяться как к свободному ферменту, так и к фермент-субстратному комплексу; их действие нельзя устранить путем добавления субстрата. Ферменты ускоряют химические реакции благодаря тому, что обеспечивают правильную ориентацию молекулы субстрата в непосредственной близости от каталитического центра, предоставляют для катализа протон-донорные и протон-акцепторные группы, образуют при помощи ковалентных связей нестабильные промежуточные соединения с субстратом и вызывают напряжение в молекуле субстрата или ее деформацию.

Кроме каталитической активности некоторые ферменты обладают также и регуляторной активностью. Они служат как бы «дирижерами», задающими темп метаболическим процессам. Некоторые регуляторные ферменты, называемые аллостерическими, регулируют скорость реакций путем обратимого нековалентного присоединения специфических модуляторов, или эффекторов, к регуляторному, или аллостерическому, центру фермента. Такими модуляторами могут быть либо сами субстраты, либо какие-то промежуточные продукты метаболизма. К другому классу относятся регуляторные ферменты, способные изменять свою активность путем ковалентной модификации содержащихся в них специфических функциональных групп, необходимых для активности фермента. Некоторые ферменты существуют в нескольких формах, называемых изоферментами, которые различаются по своим кинетическим характеристикам. Многие генетические заболевания человека обусловлены нарушением в результате мутаций функционирования одного или нескольких ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Barman T. Enzyme Handbook, vol. 1, Springer-Verlag, New York, 1969. Полезная сводка данных об основных свойствах известных в то время ферментов, классифицированных в соответствии с международными правилами.

Enzyme Nomenclature, Academic, New York, 1979. Рекомендации Международной комиссии по ферментам.

Fersht A. Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, San Francisco, 1977. Ясно ваписанное краткое введение в эту область науки. [Имеется перевод: Фёршт Э. Структура и механизм действия ферментов.– М.: Мир, 1982.]

Friedmann H., Herbert (ed.). Benchmark Papers in Biochemistry, vol. 1, Enzymes, Hutchinson Ross, Stroudsburg, Pa., 1981. Сборник классических статей по химии ферментов с комментариями редактора. Чрезвычайно интересная книга.

Newsholme E. A., *Start C.* Regulation in Metabolism, Wiley, New York, 1973. В главах 1 и 2 рассматриваются свойства регуляторных ферментов.

Segel L. H. Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems, Wiley, New York, 1975. Для более подготовленных читателей.

Статьи

Anderson C. M., *Zucker F. H.*, *Steitz T. A.* Space-Filling Models of Kinase Clefts and Conformational Changes, Science, **204**, 375–380 (1979). Структура гексокиназы и других ферментов, использующих ATP.

Dische Z. The Discovery of Feedback Inhibition, Trends Biochem. Sci., **1**, 269 (1976).

Enzymes: One Hundred Years, FEBS Lett. Suppl., vol. 62 (1976).

Koshland D. E., Jr., *Neet K. E.* The Catalytic and Regulatory Properties of Enzymes, Annu. Rev. Biochem., **37**, 359–410 (1968). Серия интересных статей, представленных по случаю 100-й годовщины изобретения слова «энзим».

Monod J., *Changeux J.-P.*, *Jacob F.* Allosteric Proteins and Cellular Control Systems, J. Mol. Biol., **6**, 306–329 (1963). Классическая статья, в которой впервые была выдвинута концепция аллостерической регуляции.

Mosbach K. Enzymes Bound to Artifical Matrixes, Sci. Am., **224**, 26–33, March (1971). Ферменты, связанные с носителями, не только имитируют действие некоторых ферментов в клетках, но и используются как

биокатализаторы в промышленности и медицине.

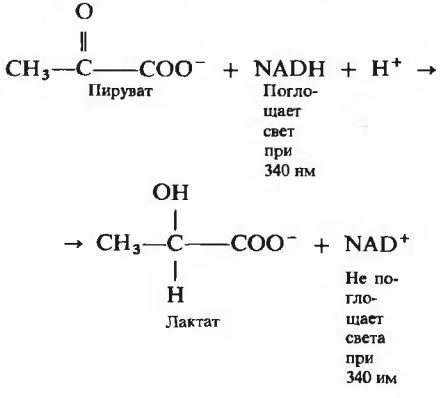
Phillips D. C. The Three-Dimensional Structure of an Enzyme Molecule, Sci. Am., **215**, 78–90, November (1966) (offprint 1055). Превосходная статья, посвященная трехмерной структуре и механизму каталитического действия лизоцима.

Schmidt E., Schmidt F. W. Clinical Enzymology, FEBS Lett. Suppl., vol. 62 (1976). Использование ферментов для диагностики болезней.

Segal H. L. Enzymatic Interconversion of Active and Inactive Forms of Enzymes, Science, **180**, 25–31 (1973).

Вопросы и задачи

1. *Сохранение сладкого вкуса кукурузы.* Сладкий вкус зерен в свежесобранных початках кукурузы обусловлен высоким содержанием в них сахара. Кукуруза, которую продают через несколько дней после сбора, имеет более низкую сахаристость, так как около 50% свободного сахара в зернах превращаются в крахмал в течение одного дня хранения. Чтобы сохранить сладкий вкус свежесобранной кукурузы, очищенные початки помещают на несколько минут в кипящую воду («бланшируют»), а затем охлаждают в холодной воде. Кукуруза, обработанная таким образом и хранящаяся в замороженном виде, сохраняет свой сладкий вкус. В чем биологическая основа этой обработки?
2. *Внутриклеточная концентрация ферментов.* Чтобы оценить в первом приближении фактическую концентрацию ферментов в бактериальной клетке, предположим, что она содержит 1000 разных ферментов, растворенных в цитозоле. Мы можем сильно упростить задачу, предположив далее, что молекулярная масса каждого из них составляет 100 000, и что все 1000 ферментов присутствуют в одинаковой концентрации. Рассчитайте *среднюю* молярную концентрацию ферментов в такой гипотетической клетке, исходя из следующих условий: в бактериальной клетке (которая представляет собой цилиндр диаметром 1 мкм и высотой 2 мкм) цитозоль (удельный вес 1,20) содержит 20% (по весу) растворимого белка и весь этот растворимый белок полностью состоит из различных ферментов.
3. *Катализ уреазой.* Фермент уреаза повышает скорость гидролиза мочевины при pH 8,0 и 20°C в 10^{14} раз. Если данное количество уреазы может полностью гидролизовать данное количество мочевины за 5 мин при pH 8,0 и 20°C, сколько времени потребовалось бы для полного гидролиза мочевины в тех же условиях без уреазы? Предполагается, что обе реакции проходят в стерильных условиях без доступа бактерий.
4. *Требования, которым удовлетворяют активные центры ферментов.* Активный центр фермента обычно представляет собой «карман» на поверхности фермента, выстланный боковыми цепями аминокислот, необходимыми для связывания субстрата и катализа его химического превращения. Молекула карбоксипептидазы, последовательно отщепляющей С-концевые аминокислотные остатки от субстратов (пептидов), состоит из одной полипептидной цепи (307 аминокислотных остатков). Три главные каталитические группы в активном центре – это аргинин 145, тирозин 248 и глутаминовая кислота 270 (номер указывает положение аминокислоты в аминокислотной последовательности фермента).
   а) Если бы карбоксипептидаза представляла собой идеальную α-спираль, то на каком расстоянии (в нм) друг от друга находились бы аргинин 145 и тирозин 248; аргинин 145 и глутаминовая кислота 270? (Подсказка: см. рис. 7-6).
   б) Объясните, каким образом эти три аминокислоты, расположенные так далеко друг от друга в полипептидной цепи, могут катализировать реакцию, участники которой занимают пространство размером в несколько десятых долей нанометра.
   в) Если в процессе гидролиза участвуют только эти три каталитические группы, для чего ферменту необходимо иметь так много аминокислотных остатков?
5. *Количественное определение лактатдегидрогеназы.* Мышечный фермент лактатдегидрогеназа катализирует реакцию:



В отличие от NAD^+ раствор NADH поглощает свет при 340 нм (ближняя ультрафиолетовая область спектра). Это свойство используется для определения концентрации NADH в растворе путем измерения поглощения раствора при 340 нм с помощью спектрофотометра. Объясните, как эти свойства NADH можно использовать для количественного определения лактатдегидрогеназы.

6. *Оценка V_{max} и K_M непосредственно по данным о скорости реакции.* Хотя для точного определения величин V_{max} и K_M, характеризующих ферментативную реакцию, используют обычно графические методы (см., например, дополнение 9-2), эти величины можно определить, измерив скорости реакции при возрастающих концентрациях субстрата. Исходя из определения V_{max} и K_M, оцените приблизительные значения этих величин для ферментативной реакции по следующим данным:

[S], М	V, мкмоль/л·мин
$2{,}5 \cdot 10^{-6}$	28
$4{,}0 \cdot 10^{-6}$	40
$1 \cdot 10^{-5}$	70
$2 \cdot 10^{-5}$	95
$4 \cdot 10^{-5}$	112
$1 \cdot 10^{-4}$	128
$2 \cdot 10^{-3}$	139
$1 \cdot 10^{-2}$	140

7. *Физический смысл V_{max}.* В лаборатории два студента независимо друг от друга выделили фермент лактатдегидрогеназу (из сердца цыпленка), катализирующую восстановление пирувата до лактата. Фермент был получен в виде концентрированного раствора. Затем оба студента измерили ферментативную активность полученных ими растворов в одних и тех же условиях при разных концентрациях субстрата и таким образом определили V_{max} и K_M своих препаратов. При сравнении результатов они обратили внимание на то, что значения K_M у них совпадали, а значения V_{max} существенно различались. Один из студентов утверждал, что разные значения V_{max} свидетельствуют о том, что они получили различные формы одного и того же фермента. Другой же утверждал, что, несмотря на разные значения V_{max}, они выделили одну и ту же форму фермента. Кто из них прав? Объясните, как можно разрешить это противоречие?

8. *Связь между скоростью реакции и концентрацией субстрата: уравнение Михаэлиса–Ментен.*
   а) При какой концентрации субстрата фермент, для которого максимальная скорость превращения субстрата составляет 30 мкмолей/мин·мг, а величина K_M равна 0,005 М, будет работать со скоростью, равной 1/4 максимальной?
   б) Определите, какую долю V_{max} будет составлять скорость реакции при концентрациях субстрата, равных $1/2\ K_M$, $2K_M$ и $10K_M$.

9. *Графическое определение величин V_{max} и K_M.* При определении каталитической активности пептидазы из тонкого кишечника, гидролизующей дипептид глицилглицин:

   Глицилглицин + H_2O → 2 Глицин,

   были получены следующие экспериментальные данные:

[S], мМ	1,5	2,0	3,0	4,0	8,00	16,0
Продукт, мг/мин	0,21	0,24	0,28	0,33	0,40	0,45

   По этим данным определите графическим путем (см. дополнение 9-2) величины K_M и V_{max} для этого препарата фермента.

10. *Число оборотов карбоангидразы.* Карбоангидраза эритроцитов, имеющая молекулярную массу 30 000,– один из самых активных ферментов, известных в настоящее время. Она катализирует обратимую реакцию гидратации CO_2

$$H_2O + CO_2 \rightleftarrows H_2CO_3,$$

   которая играет важную роль в транспорте CO_2 из тканей в легкие. Рассчитайте число оборотов карбоангидразы, если при оптимальных условиях 10 мкг чистой карбоангидразы катализируют гидратацию 0,30 г CO_2 в 1 мин при 37°С.

11. *Необратимое ингибирование фермента.* Многие ферменты необратимо ингибируются ионами тяжелых металлов, такими, как Mg^{2+}, Cu^{2+} или Ag^+, которые могут взаимодействовать с важными для активности фермента сульфгидрильными группами с образованием меркаптидов:

$$E\text{—}SH + Ag^+ \rightarrow E\text{—}S\text{—}Ag + H^+.$$

   Сродство ионов Ag^+ к сульфгидрильным группам столь велико, что эти ионы можно использовать для количественного титрования —SH-групп. К 10 мл раствора,

содержащего 1 мг/мл чистого фермента, добавили такое количество $AgNO_3$, которое достаточно для полной инактивации фермента. Для этого потребовалось 0,342 мкмоля $AgNO_3$. Рассчитайте минимальную молекулярную массу фермента. Почему значение молекулярной массы, полученное таким путем, будет минимальным?

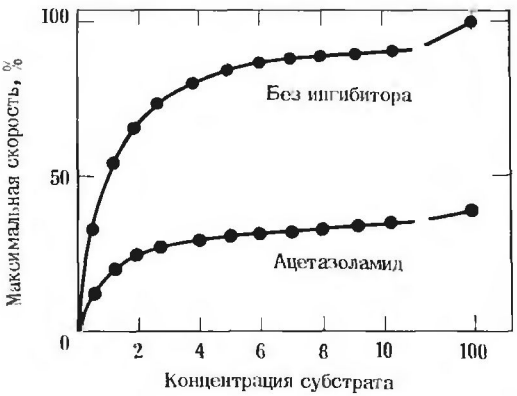
12. *Защита фермента от тепловой денатурации.* При нагревании раствора фермента со временем он постепенно утрачивает каталитическую активность. Это обусловлено разворачиванием молекулы нативного фермента, которая по мере возрастания ее тепловой энергии принимает конформацию беспорядочного клубка. При инкубации раствора гексокиназы в течение 12 мин при 45°С фермент теряет 50% активности, но если гексокиназа инкубируется при 45°С в присутствии очень большой концентрации одного из ее субстратов — глюкозы, то она утрачивает только 3% активности. Объясните, почему тепловая денатурация гексокиназы замедляется в присутствии одного из ее субстратов.

13. *Клиническое применение дифференцированного ингибирования ферментов.* В сыворотке крови человека содержатся ферменты, известные под названием кислых фосфатаз, которые гидролизуют биологические фосфоэфиры в слабо кислой среде (pH 5,0):

$$R{-}O{-}PO_3^{2-} + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow R{-}OH + HO{-}PO_3^{2-}$$

Кислые фосфатазы синтезируются в эритроцитах, печени, почках, селезенке и предстательной железе (простате). С медицинской точки зрения фермент из предстательной железы имеет весьма важное значение, так как повышение его концентрации в крови часто служит указанием на рак простаты. Фосфатаза из простаты сильно ингибируется тартрат-ионами, тогда как кислые фосфатазы из других тканей не ингибируются этими ионами. Как можно использовать эти данные для разработки метода специфического определения активности кислой фосфатазы из предстательной железы в сыворотке крови человека?

14. *Ингибирование карбоангидразы ацетазоламидом.* Карбоангидраза сильно ингибируется ацетазоламидом, применяемым как мочегонное средство и как препарат для лечения глаукомы, характеризующейся чрезмерным повышением внутриглазного давления. В этих и других секреторных процессах карбоангидраза играет важную роль, поскольку она участвует в регуляции pH и содержания бикарбоната во многих жидкостях организма человека. На рисунке показана экспериментальная кривая, выражающая зависимость скорости реакции, катализируемой карбоангидразой от концентрации субстрата. При проведении опыта в присутствии ацетазоламида получается нижняя кривая. Исходя из анализа кривых и ваших знаний о кинетических свойствах конкурентных и неконкурентных ингибиторов ферментов, определите природу ингибирования ацетазоламидом. Объясните, на чем основано ваше утверждение.



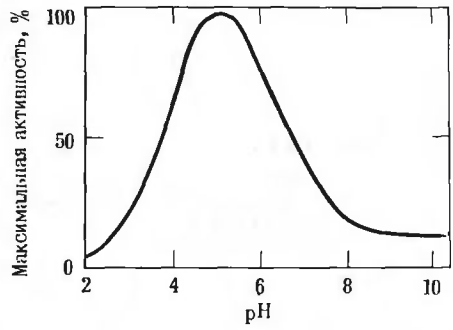
15. *Помощь при отравлении метанолом.* Метанол (древесный спирт), который когда-то использовался как антифриз для автомобилей, очень токсичен; прием внутрь всего лишь 30 мл метанола может привести к смерти. Такая необычайно высокая токсичность метанола обусловлена действием не столько самого метанола, сколько продукта его метаболизма — формальдегида. Метанол быстро окисляется до формальдегида под действием фермента печени алкогольдегидрогеназы:

$$NAD^+ + \underset{\text{метанол}}{CH_3{-}OH} \rightarrow$$
$$\rightarrow NADH + H^+ + \underset{\text{формальдегид}}{H_2C{=}O}$$

Один из методов лечения при отравлении метанолом состоит в том, что больному назначают этанол (этиловый спирт) либо внутрь, либо внутривенно в количествах, которые у здорового человека вызывают интоксикацию. Объясните, почему такое лечение оказывается эффективным?

16. *Оптимум pH лизоцима.* Ферментативная активность лизоцима максимальна при pH 5,2 и уменьшается как при снижении, так и при повышении этого значения pH (см. рисунок). Лизоцим содержит в активном центре два аминокислотных остатка, необходимых для катализа: глутаминовую кислоту в положении 35 и аспарагиновую кислоту в положении 52. Величины pK' карбоксильных групп боковых цепей этих двух остатков равны соответственно 5,9 и 4,5. В каком ионизированном состоянии (протонированном или депротонированном) находится каждый из этих аминокислотных остатков в оптимуме pH лизоцима? Как можно объяснить форму

Задача 16



приведенной на рисунке кривой, характеризующей зависимость активности лизоцима от pH, исходя из того, что нам известно, в каком состоянии ионизации находятся эти два аминокислотных остатка?

ГЛАВА 10

ВИТАМИНЫ И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ: ИХ РОЛЬ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ ФЕРМЕНТОВ

Для каталитической активности многих ферментов требуются те или иные кофакторы небелковой природы. Такими кофакторами могут быть органические соединения (в этом случае их называют коферментами) или какие-либо неорганические вещества, например металлы (в форме ионов). У одних ферментов кофакторы непосредственно участвуют в каталитическом процессе, у других же они выполняют функцию промежуточных переносчиков определенных функциональных групп от молекулы субстрата к ферменту. Хотя такие кофакторы присутствуют в клетках в крайне незначительных количествах, они необходимы для действия многих ферментов и потому играют жизненно важную роль в метаболизме клетки.

В этой главе мы рассмотрим химическую природу и функции подобных веществ. Мы увидим, что предшественниками многих коферментов служат витамины – органические соединения, которые в малых количествах должны обязательно присутствовать в пище людей и большинства животных для поддержания нормального развития и жизнедеятельности организма. Открытие витаминов и их важнейшего значения для профилактики и лечения болезней, связанных с нарушением питания, явилось одним из наиболее ценных вкладов биохимии в медицину и подъем общего благосостояния. Подробнее этот вопрос будет рассмотрен в гл. 26. Не менее важным достижением экспериментальной науки можно считать выявление роли витаминов и незаменимых неорганических веществ в каталитическом действии ферментов, поскольку это позволило понять, что сохранение здоровья людей зависит от их правильного питания.

В этой главе собрана информация о строении витаминов, коферментов и некоторых необходимых для организма минеральных веществ, а также об их функционировании в качестве кофакторов различных ферментов; в связи с этим ее можно рассматривать как введение к последующим главам, в которых речь пойдет о клеточном метаболизме. В них мы вновь вернемся к коферментам и неорганическим веществам и подробно расскажем, каким образом недостаток витаминов и минеральных солей может привести к серьезным нарушениям определенных последовательностей метаболических реакций. Далее, в гл. 26 мы рассмотрим витамины и микроэлементы в другом аспекте, а именно их роль в питании человека.

10.1. Витамины – незаменимые органические микрокомпоненты пищи

Поскольку суточная потребность человека в витаминах составляет лишь незначительные их количества (порядка миллиграммов или даже микрограммов), витамины можно назвать *микрокомпонентами* пищи. В отличие от них *макрокомпоненты* – углеводы, белки и жиры – должны входить в пищевой рацион человека в больших количествах, так как суточная потребность в них исчисляется сотнями или по меньшей мере десятками граммов. Это объясняется тем, что основные пищевые вещества используются

в организме в качестве источников энергии и сырья для получения органических предшественников многих клеточных компонентов, а также для того, чтобы обеспечить аминокислотами биосинтез белков. Витамины же, напротив, нужны лишь в малых количествах, потому что они играют роль катализаторов в различных химических превращениях макрокомпонентов пищи – превращениях, которые в совокупности называются обменом веществ, или метаболизмом. Подобно ферментам, витамины присутствуют в тканях в очень низких концентрациях.

В настоящее время известно 13 различных витаминов, которые вместе с основными питательными веществами – углеводами, жирами и белками – должны содержаться в пищевом рационе людей и животных многих видов, чтобы обеспечить нормальный рост и жизнедеятельность организма. Термин «витамин» впервые был использован для обозначения специфического микрокомпонента пищи органической природы, предотвращающего обусловленную неполноценным питанием болезнь *бери-бери*, распространенную когда-то в странах, население которых употребляло в пищу много риса. Поскольку этот микрокомпонент обладал свойствами амина, Казимир Функ, польский биохимик, первым получивший это вещество в чистом виде, назвал его «витамин», что в переводе означает «необходимый для жизни амин». В дальнейшем, когда были открыты многие другие незаменимые органические микрокомпоненты, оказалось, что далеко не все они представляют собой амины.

Почти все известные витамины присутствуют в клетках всех животных и большинства растений и микроорганизмов, выполняя в них одни и те же важные биохимические функции. Однако не все эти витамины должны обязательно содержаться в пищевом рационе всех видов животных. Например, хотя витамин С должен присутствовать в пище людей, обезьян, морских свинок и индийских крыланов, большинство остальных животных не нуждается в том, чтобы получать его с пищей, так как у них есть ферменты, которые обеспечивают синтез витамина С из такого простого предшественника, как глюкоза. Таким образом, в настоящее время термин витамин применяется в общем смысле для обозначения группы органических веществ, присутствующих в клетках в очень небольших количествах и участвующих в их нормальной жизнедеятельности. При этом некоторые организмы не способны синтезировать те или иные витамины, и потому должны получать их из внешних источников.

10.2. Витамины являются важными компонентами коферментов и простетических групп ферментов

О биохимической функции некоторых витаминов впервые стало известно в 30-е годы благодаря слиянию двух направлений исследований, одно из которых имело целью изучение химической структуры коферментов, а другое – изучение строения витаминов. В 1935 г. немецкому биохимику Отто Варбургу удалось выделить и установить структуру кофермента (сейчас его называют *никотинамидадениндинуклеотидфосфатом*), необходимого для катализа определенных окислительно-восстановительных реакций в клетке. Варбург показал, что один из компонентов этого кофермента представляет собой простое органическое соединение – никотинамид (рис. 10-1), которое задолго до того было впервые выделено из табака. Несколько позже американские биохимики Д. Уайн Улли и Конрад Элведжем попытались установить химическое строение выделенного ими из мяса и других пищевых продуктов вещества, которое предотвращало или

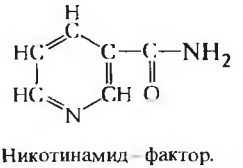


Рис. 10-1. Никотинамид – фактор, предотвращающий пеллагру. Он входит в состав кофермента никотинамидадениндинуклеотида (см. рис. 10-6).

излечивало обусловленное неполноценным питанием заболевание собак «черный язык», аналогичное *пеллагре* человека. Улли и Элведжем были поражены тем, что по некоторым химическим свойствам выделенное ими вещество напоминало никотинамид. Поэтому они попробовали лечить собак чистым никотинамидом, и такое лечение оказалось успешным. В скором времени было установлено, что никотинамидом можно излечивать также и пеллагру у людей. Теперь мы знаем, что никотинамид – это компонент кофермента, необходимого для ферментативного катализа ряда жизненно важных окислительных реакций. Несмотря на очень простое строение молекулы никотинамида, большинство животных не может синтезировать его в достаточных количествах и поэтому должно получать его с пищей.

Вскоре после этого выяснилось, что другие витамины также функционируют в качестве компонентов коферментов и простетических групп ферментов. Содержание витаминов в пище может быть крайне незначительным, поскольку коферменты, выполняющие функции катализаторов, необходимы клеткам в очень низких концентрациях. Например, минимальное количество витамина B_6, которое должно содержаться в суточном рационе человека, составляет около 2 мг, а витамина B_{12} – менее 3 мкг.

Примерно в то же время было обнаружено, что в пище животных, кроме витаминов, должен присутствовать целый ряд неорганических элементов, которые так же, как и коферменты, необходимы для активности определенных ферментов. В качестве примера можно привести цинк – незаменимый элемент питания человека и животных, являющийся важным компонентом множества различных ферментов.

В этой главе мы в общих чертах рассмотрим функции различных витаминов как коферментов. В последующих главах мы узнаем, почему недостаток витаминов, а следовательно, и нарушение действия ферментов могут приводить к серьезным изменениям ключевых путей метаболизма углеводов, жиров и белков.

10.3. Витамины можно разделить на два класса

Витамины делятся на два класса: *водорастворимые* и *жирорастворимые* витамины (табл. 10-1). К водорастворимым витаминам относятся: тиамин (витамин B_1), рибофлавин (витамин B_2), никотиновая кислота, пантотеновая кислота, пиродоксин (витамин B_6), биотин, фолиевая кислота, витамин B_{12} и аскорбиновая кислота (витамин С). Почти для всех этих витаминов установлено, какую функцию они выполняют в качестве коферментов. Биохимические функции жирорастворимых витаминов A, D, E и K, представляющих собой маслянистые, плохо растворимые в воде вещества, пока еще не совсем понятны. Кроме этих, хорошо известных витаминов, существуют и другие вещества, которые необходимы определенным видам, но обычно не считаются витаминами. К ним относятся *карнитин* (разд. 18.2), *инозитол* и *липоевая кислота* (гл. 26).

Сначала мы рассмотрим природу и свойства водорастворимых витаминов, их функционирование в качестве компонентов тех или иных коферментов, а также приведем примеры ферментативных реакций, в которых участвуют эти коферменты (табл. 10-1).

10.4. Тиамин (витамин B_1) функционирует в форме тиаминпирофосфата

Витамин B_1, или тиамин, обязательно должен присутствовать в пище большинства позвоночных и некоторых видов микроорганизмов. Недостаток этого витамина в пищевом рационе человека вызывает болезнь бери-бери, для которой характерны быстрая потеря веса и различные неврологические расстройства. В Азии в XIX в. и начале XX в. болезнь бери-бери была причиной смерти сотен тысяч людей, употребляющих в пищу в основном полированный или очищенный белый рис. В отрубях, которые удаляются в процессе очистки, содержится почти весь присутствующий в рисе тиамин. Впервые в чистом виде тиамин

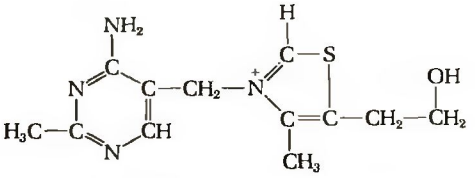
Таблица 10-1. Витамины и их роль в ферментативных реакциях

Витамин	Коферментная (или активная) форма	Тип катализируемой реакции или функция
Водорастворимые		
Тиамин	Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование α-кетокислот
Рибофлавин	Флавинмононуклеотид, флавинадениндинуклеотид	Окислительно-восстановительные реакции
Никотиновая кислота	Никотинамидадениндинуклеотид, никотинамидадениндинуклеотидфосфат	Окислительно-восстановительные реакции
Пантотеновая кислота	Кофермент А	Перенос ацильных групп
Пиридоксин	Пиридоксальфосфат	Перенос аминогрупп
Биотин	Биоцитин	Перенос CO_2
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолиевая кислота	Перенос одноуглеродных групп
Витамин B_{12}	Дезоксиаденозилкобаламин	Перенос связанного с углеродом атома водорода на соседний атом углерода
Аскорбиновая кислота	Не известна	Кофактор реакций гидроксилирования
Жирорастворимые		
Витамин A	Ретиналь	Зрительный процесс
Витамин D	1,25-дигидроксихолекальциферол	Регуляция обмена Ca^{2+}
Витамин E	Не известна	Защита мембранных липидов
Витамин K	Не известна	Кофактор реакций карбоксилирования

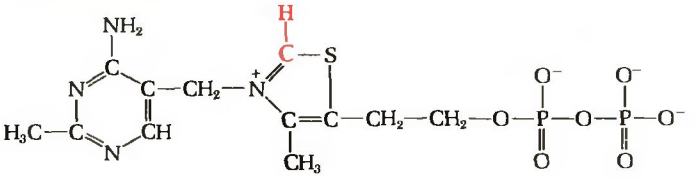
был получен в 1926 г. Его химическое строение определил в начале 30-х годов американский ученый Роберт Р. Уильямс. Вскоре после этого был осуществлен химический синтез тиамина.

Молекула тиамина содержит бициклическую систему из пиримидинового и тиазольного колец (рис. 10-2). В тканях животных тиамин присутствует главным образом в форме кофактора – *тиаминпирофосфата* (рис. 10-2). Тиаминпирофосфат служит кофактором в ряде ферментативных реакций, в которых осуществляется перенос альдегидных групп с молекулы-донора на молекулу-акцептор. В этих реакциях тиаминпирофосфат выполняет функцию промежуточного переносчика альдегидной группы, которая ковалентно связывается с тиазольным кольцом. В качестве примера можно привести реакцию, катализируемую *пируватдекарбоксилазой* (рис. 10-3), представляющую собой важную стадию сбраживания глюкозы в спирт под действием дрожжей. В ходе пируватдекарбоксилазной реакции карбоксильная группа пирувата отщепляется в виде CO_2; одновременно остальная часть молекулы, называемая иногда *активным ацетальдегидом*, переносится во второе положение тиазольного кольца тиаминпирофосфата, прочно связанного с ферментом, в результате чего образуется гидроксиэтильное производное. Это промежуточное соединение существует лишь очень короткое время, поскольку гидроксиэтильная группа быстро отщепляется от кофермента в виде свободного ацетальдегида. Тиаминпирофосфат служит также кофактором и в более сложных реакциях основного пути окисления углеводов в клетках – реакциях, катализируемых ферментами *пируватдегидрогеназой* и *α-кетоглутаратдегидрогеназой*.

Тиамин (витамин B_1)



Тиаминпирофосфат (кофермент). Реакционноспособная группа выделена красным цветом



α-Гидроксиэтилтиаминпирофосфат – промежуточная форма, переносящая "активную" ацетальдегидную группу (выделена красным цветом)

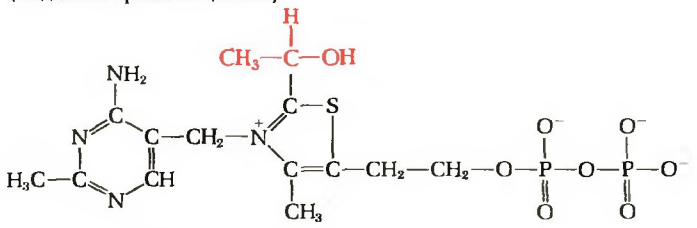
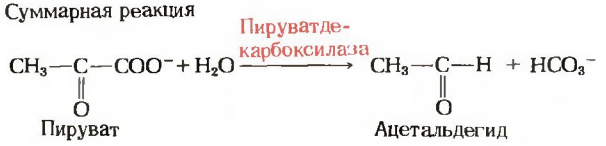


Рис. 10-2. Тиамин и его активные формы.

Суммарная реакция



Отдельные стадии

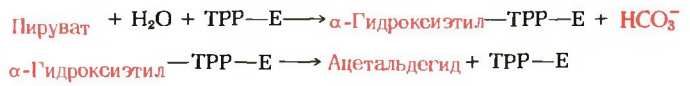
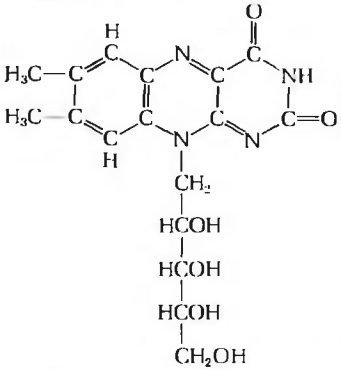


Рис. 10-3. Ферментативное декарбоксилирование пирувата, осуществляемое пируватдекарбоксилазой (обозначена буквой Е). Этот процесс протекает с участием тиаминпирофосфата (TPP), представляющего собой прочно связанную с ферментом простетическую группу. В верхней части рисунка представлено уравнение суммарной реакции. Внизу эта реакция разделена на отдельные стадии, иллюстрирующие роль тиаминпирофосфата как промежуточного переносчика ацетальдегида.

10.5. Рибофлавин (витамин B_2) – компонент флавиновых нуклеотидов

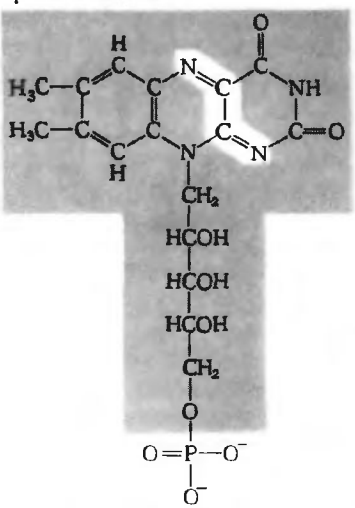
Витамин B_2, или *рибофлавин*, впервые был выделен из молока. В 1935 г. было установлено строение этого соединения и осуществлен его химический синтез. Из-за присутствия в молекуле рибофлавина сложной изоаллоксазиновой поли-

Рибофлавин



Циклическая изоаллоксазиновая система

Флавинмононуклеотид (FMN). Реакционноспособная группа выделена красным цветом



Флавинадениндинуклеотид (FAD). Реакционноспособная группа выделена красным цветом

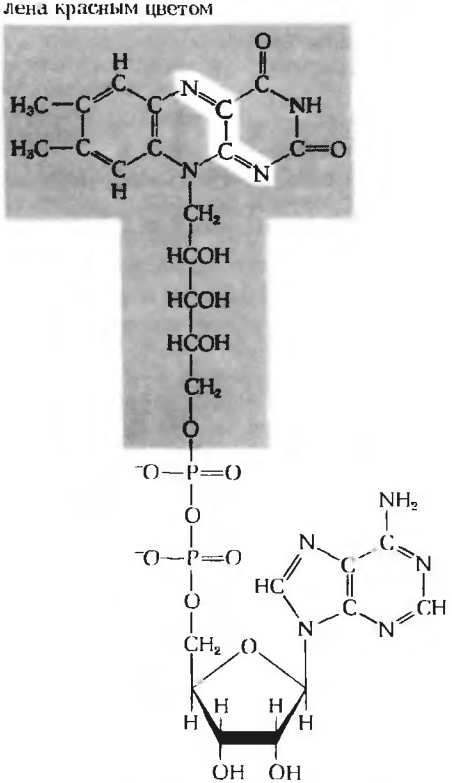


Рис. 10-4. Рибофлавин (витамин B_{12}) и его коферментные формы.

циклической системы (рис. 10-4) он имеет ярко-желтую окраску. В дальнейшем было показано, что рибофлавин входит в состав двух родственных коферментов – *флавинмононуклеотида* (FMN) и флавинадениндинуклеотида (FAD), структура которых изображена на рис. 10-4. Эти коферменты функционируют в качестве прочно связанных с ферментами простетических групп дегидрогеназ, относящихся к классу *флавопротеинов*, или *флавиндегидрогеназ*. В катализируемых этими ферментами реакциях изоаллоксазиновое кольцо флавиновых нуклеотидов служит промежуточным переносчиком атомов водорода, отщепляющихся в ходе реакции от молекулы субстрата (рис. 10-5). *Сукцинатдегидрогеназа*, о которой говорилось ранее (разд. 9.13), является одним из представителей флавиндегидрогеназ. Этот фермент, содержащий в качестве простетической группы ковалентно связанную с ним молекулу FAD, катализирует реакцию:

$$\text{Сукцинат} + \text{E—FAD} \rightarrow \text{Фумарат} + \text{E—FADH}_2,$$

где символ E—FAD обозначает молекулу фермента, связанную с FAD. У большинства других флавиндегидрогеназ

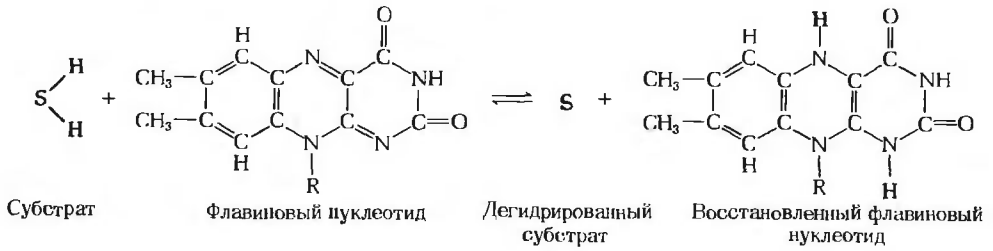


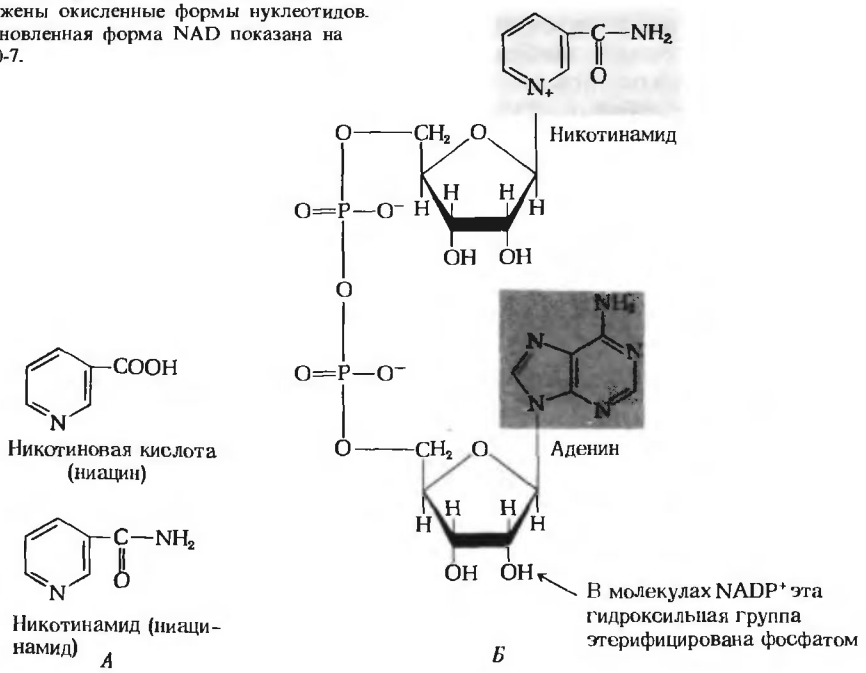
Рис. 10-5. Обратимый перенос двух атомов водорода от молекулы субстрата на изоаллоксазиновое кольцо FMN или FAD, катализируемый флавиндегидрогеназой. Символ R обозначает остальную часть флавинового нуклеотида.

FMN и FAD соединены с молекулами ферментов не ковалентно. В состав активного центра некоторых флавиндегидрогеназ входят также ионы железа или других металлов.

10.6. Никотинамид – это активная группа коферментов NAD и NADP

Недостаточное содержание в пище *никотиновой кислоты* (рис. 10-6) вызывает у людей заболевание, которое называется *пеллагрой* (от итальянского слова, означающего «шершавая кожа»). Пеллагра распространена во многих районах мира, где люди питаются в основном кукурузой и едят мало мяса, молока и яиц. В целях профилактики и лечения пеллагры можно использовать как никотиновую кислоту, так и ее амид – *никотинамид*. Чтобы кому-нибудь не пришла в голову мысль о возможности употребления в пищу табака как источника этого ви-

Рис. 10-6. *А*. Две формы витамина, предотвращающего пеллагру. *Б*. Строение активных коферментных форм этого витамина – никотинамидадениндинуклеотида (NAD^+) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата ($NADP^+$). Оба этих соединения содержат по два нуклеотидных остатка, каждый из которых состоит из основания (никотинамида или аденина), пятиуглеродного сахара (D-рибозы) и фосфатной группы. На рисунке изображены окисленные формы нуклеотидов. Восстановленная форма NAD показана на рис. 10-7.



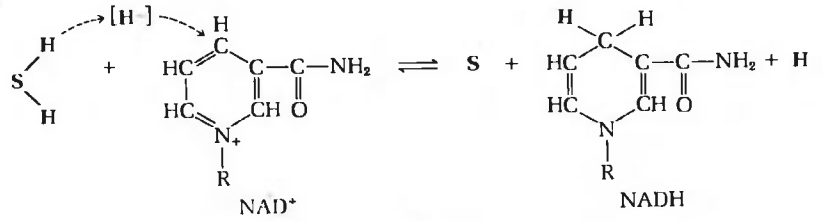


Рис. 10-7. Общее уравнение, показывающее, как NAD^+ действует в качестве кофермента в реакциях ферментативного дегидрирования. Молекула субстрата и продукты реакции выделены красным цветом. Изображена только никотинамидная часть молекулы NAD^+, остальная же ее часть обозначена буквой R.

тамина, никотиновой кислоте было дано другое (условное) название – *ниацин*.

Никотинамид – компонент двух близких по структуре коферментов – *никотинамидадениндинуклеотида* (NAD) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADP). Строение этих коферментов показано на рис. 10-6. NADP отличается от NAD наличием в молекуле фосфатной группы. Эти коферменты могут находиться как в окисленной (NAD^+ и $NADP^+$), так и в восстановленной (NADH и NADPH) формах. Никотинамидный компонент этих коферментов играет роль промежуточного переносчика *гидрид-иона*, который ферментативно отщепляется от молекулы субстрата под действием специфических дегидрогеназ (рис. 10-7). В качестве примера можно привести реакцию, катализируемую *малатдегидрогеназой*, которая дегидрирует малат, превращая его в оксалоацетат; эта реакция представляет собой один из этапов окисления углеводов и жирных кислот. Малатдегидрогеназа катализирует также обратимый перенос гидрид-иона от малата к NAD^+, в результате чего образуется NADH; второй атом водорода отщепляется от гидроксильной группы молекулы малата в виде свободного иона H^+:

$$\text{L-малат} + NAD^+ \xrightleftharpoons{\text{Малатдегидрогеназа}} \text{Оксалоацетат} + NADH + H^+.$$

Известно большое число дегидрогеназ такого типа, из которых каждая обладает специфичностью по отношению к какому-нибудь определенному субстрату. Одни из этих ферментов используют в качестве кофермента NAD^+, другие – $NADP^+$, а третьи могут функционировать с любым из этих двух коферментов. У большинства дегидрогеназ NAD (или NADP) связывается с белковой частью фермента только во время каталитического цикла, однако известны и такие ферменты, с которыми эти коферменты связаны очень прочно и постоянно присутствуют в активном центре.

10.7. Пантотеновая кислота – компонент кофермента А

Пантотеновую кислоту (рис. 10-8) впервые выделил из дрожжей и экстрактов печени в 1938 г. Роджер Уильямс (брат Роберта Уильямса, установившего структуру тиамина). Пантотеновая кислота (приставка *пан-* означает «повсеместно») обнаружена во всех исследованных тканях растений и животных, а также у микроорганизмов. Однако лишь через двенадцать лет после того, как пантотеновая кислота была получена в чистом виде, Фритц Липманн и Натан Каплан показали, что она является коферментом. Сначала они обнаружили термостабильный фактор, необходимый для ускорения АТР-зависимого ферментативного ацетилирования спиртов и аминов. Затем, очистив и изучив свойства этого фактора, получившего название *кофермент А* (кофермент ацетилирования), они установили, что в нем содержится прочно связанная пантотено-

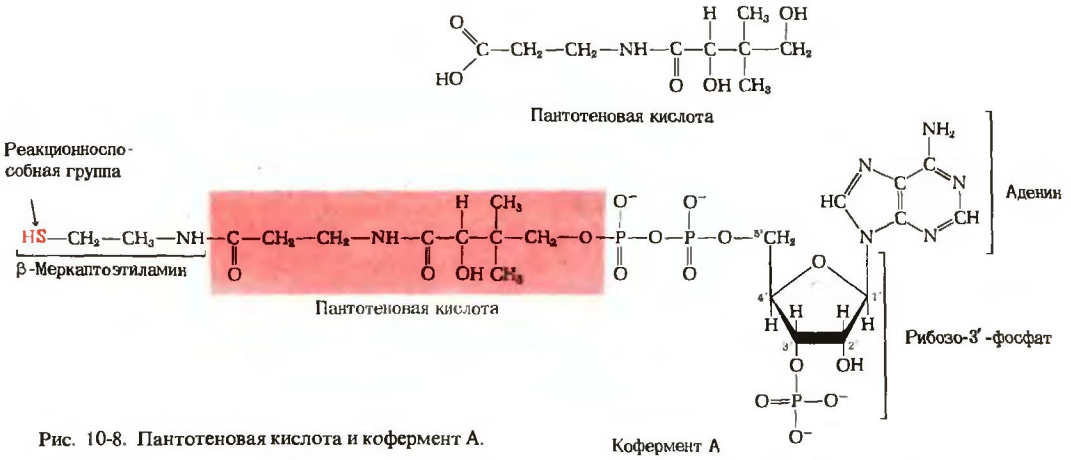
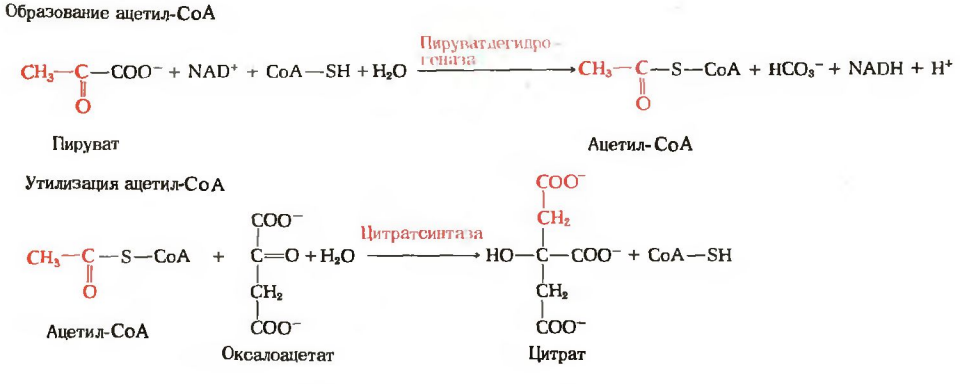


Рис. 10-8. Пантотеновая кислота и кофермент А.

вая кислота. Сейчас мы знаем, что кофермент А выполняет значительно более широкие функции: он участвует во многих ферментативных реакциях, в которые вовлечены не только ацетильные, но и любые другие ацильные группы. Кофермент А (–CoA или CoA-SH) выполняет функции промежуточного переносчика ацильных групп.

Молекула кофермента А (рис. 10-8) содержит реакционноспособную тиоловую (—SH) группу, с которой ковалентно связываются переносимые коферментом ацильные группы, в результате чего образуются *тиоэфиры*. Тиоэфиры представляют собой сложные эфиры тиолов, или тиоспиртов (общая формула R—SH). На рис. 10-9 показано, как тиоловая группа кофермента А функционирует в качестве переносчика ацильной группы. В ходе первой реакции, изображенной на рис. 10-9, окислительное декарбоксилирование пирувата под действием *пируватдегидрогеназного комплекса* приводит к образованию ацетил-CoA. В ходе второй реакции ацильная группа ацетил-CoA под действием *цитратсинтазы* переносится на оксалоацетат, который превращается при этом в цитрат. Этой реакцией начинается *лимонный цикл* – центральный путь окислительного расщепления углеводов и жирных кислот в аэробных условиях (гл. 16).

Рис. 10-9. Роль кофермента А в реакциях, катализируемых пируватдегидрогеназой и цитратсинтазой. Переносимая ацетильная группа выделена красным цветом.

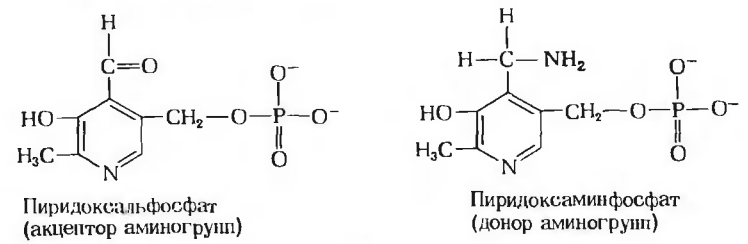


10.8. Пиридоксин (витамин B_6) играет важную роль в метаболизме аминокислот

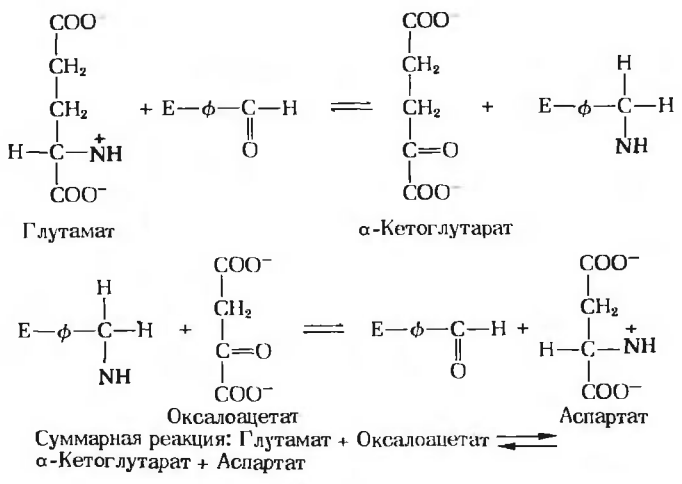
Группа витамина B_6 включает три родственных соединения: *пиридоксин, пири-*



А



Б



В

доксаль и *пиридоксамин* (рис. 10-10), которые в биологических системах легко превращаются друг в друга. Активной формой витамина B_6 является *пиридоксальфосфат* или его аминоформа – *пиридоксаминфосфат*. Пиридоксальфосфат представляет собой прочно связанную простетическую группу целого ряда ферментов, катализирующих реакции с участием аминокислот. К наиболее распространенным и хорошо изученным реакциям такого типа относятся реакции *переаминирования*, в которых аминогруппа α-аминокислоты обратимо переносит-

Рис. 10-10. Активные формы витамина B_6 (*А*), коферментные формы этого витамина (*Б*) и реакция переаминирования (*В*). В ходе этой реакции пиродоксальфосфат переносит аминогруппу в активный центр фермента. Показаны две стадии реакции. Трансаминаза с ее простетической группой изображена в двух формах: E—ф—CO—H и E—ф—C(NH$_2$)—H$_2$.

ся на α-углеродный атом α-кетокислоты (рис. 10-10). В реакциях переаминирования, катализируемых *трансаминазами*, или *аминотрансферазами*, прочно связанный пиридоксальфосфат служит промежуточным переносчиком аминогруппы от ее донора – α-аминокислоты – к акцептору – α-кетокислоте. В процессе каталитического цикла трансаминаз аминогруппа вступающей в реакцию аминокислоты сначала переносится на связанный с ферментом пиридоксальфосфат. Образовавшееся при этом аминопроизводное кофермента – пиридоксаминфосфат – передает затем аминогруппу второму субстрату – α-кетокислоте и возвращается в исходную пиридоксальфосфатную форму. В подобных реакциях переаминирования могут участвовать самые разнообразные аминокислоты и *α-кетоглутарат*, который играет роль универсального акцептора аминогрупп и в ходе реакции превращается в *глутаминовую кислоту* – ключевой продукт метаболизма аминогрупп.

Трансаминазы обычно катализируют реакции *двойного замещения* (реакции типа «пинг-понг»; разд. 9.8). В таких реакциях аминогруппа переносится сначала с первого субстрата - аминокислоты - на кофермент, а затем происходит отделение образовавшейся α-кетокислоты от фермента; после этого с ферментом связывается второй субстрат – вступающая в реакцию α-кетокислота. При этом аминогруппа переносится с пиридоксаминфосфата на второй субстрат.

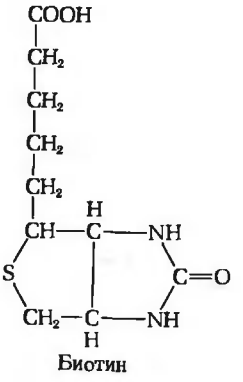
10.9. Биотин является активным компонентом биоцитина – простетической группы некоторых ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования

В 1935 г. голландский биохимик Фритц Кёгль получил в кристаллическом виде около 1 мг фактора роста дрожжевых клеток; для этого ему потребовалось 250 кг сухих яичных желтков. Впоследствии оказалось, что это вещество необходимо также и для роста крыс, получавших с пищей большие количества сырого яичного белка. Новый фактор роста был назван *биотином*. Хотя куриные яйца представляют собой полезный во всех отношениях пищевой продукт и содержат биотин, при скармливании животным сырых яичных белков в больших количествах у них развивается недостаточность биотина. Этот парадоксальный факт объясняется тем, что в яичном белке содержится *авидин* – белок, который очень прочно связывает биотин, что препятствует всасыванию этого витамина в кишечнике.

В биотин-зависимых ферментах молекула биотина ковалентно присоединена к ферментному белку при помощи амидной связи, в образовании которой участвует ε-аминогруппа реакционноспособного остатка лизина, находящегося в активном центре фермента. Этот *биотинил-лизиновый* остаток, называемый *биоцитином*, может быть выделен из биотинсодержащих ферментов после их кислотного или ферментативного гидролиза (рис. 10.11). Биотин играет роль переносчика карбоксильных ($-COO^-$) групп во многих реакциях ферментативного карбоксилирования, протекающих с участием АТР. Карбоксильная группа кислоты обратимо связывается с атомом азота бициклической системы биотина. В качестве примера биотин-зависимой реакции карбоксилирования можно привести реакцию, катализируемую *пируваткарбоксилазой*, в ходе которой из пирувата образуется оксалоацетат (рис. 10-11).

10.10. Фолиевая кислота служит предшественником кофермента тетрагидрофолиевой кислоты

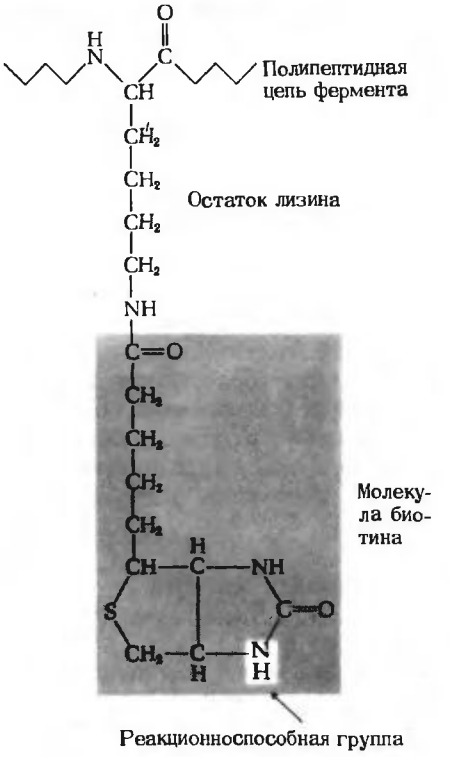
Фолиевая кислота (от лат. «folium» – лист) впервые была выделена из листьев шпината. Она широко распространена в биологических системах. Молекула фолиевой кислоты состоит из трех основных компонентов: *глутаминовой кислоты*, *п-аминобензойной кислоты* и гетероциклического конденсированного соединения *птеридина* (рис. 10-12). Недостаток фолиевой кислоты, известной



Биотин

А

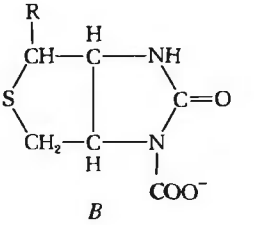
Биоцитин (остаток биотиниллизина). Реакционноспособная группа выделена красным цветом



Молекула биотина

Реакционноспособная группа

Б



В

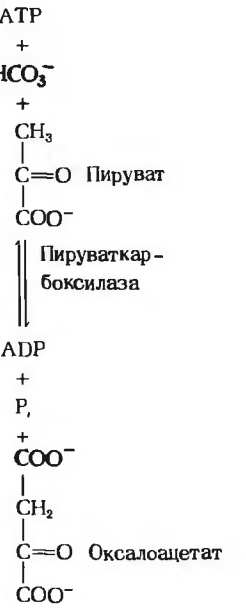
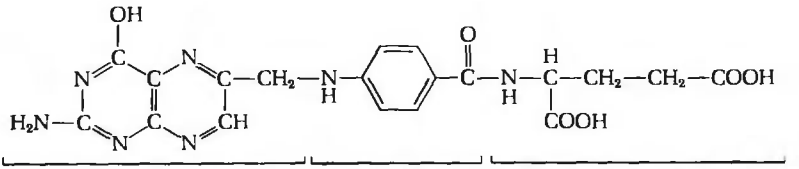


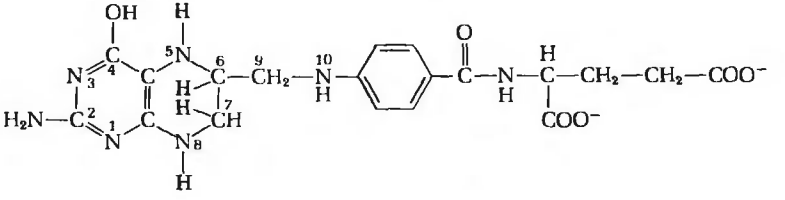
Рис. 10-11. Биотин (*А*) и его активная форма – биоцитин (*Б*), играющий роль простетической группы некоторых ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования. *В*. В биотин-зависимых реакциях карбоксилирования в качестве промежуточного соединения образуется N-карбоксипроизводное биоцитина. Показана только циклическая система биоцитина. *Г*. Карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата – важная стадия биосинтеза глюкозы из пирувата. Реакцию катализирует биотин-зависимый фермент пируваткарбоксилаза.

также под названием *птероилглутаминовой* кислоты, приводит к развитию анемии. Сама по себе фолиевая кислота не обладает коферментной активностью; однако она ферментативно восстанавливается в тканях в *тетрагидрофолиевую кислоту* (FH_4), которая и является активным коферментом. Тетрагидрофолат играет роль промежуточного переносчика одноуглеродных групп во многих сложных ферментативных реакциях. К таким группам, переносимым от одной

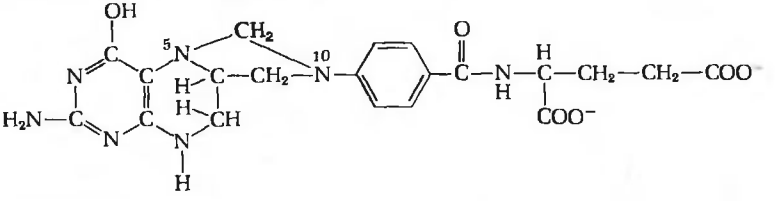
Фолиевая кислота



Тетрагидрофолат. Коферментная форма фолиевой кислоты. Четыре дополнительных атома водорода выделены красным цветом



N^5, N^{10}- метилентетрагидрофолат. Присоединенная метиленовая группа выделена красным цветом



Одноуглеродные группы, переносимые ферментами, для функционирования которых необходим тетрагидрофолат

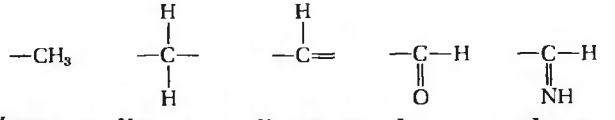


Рис. 10-12. Фолиевая кислота, ее коферментная форма тетрагидрофолат и метилентетрагидрофолат. Метиленовая группа – одна из пяти различных одноуглеродных групп, которые могут переноситься посредством тетрагидрофолата.

молекулы к другой, относятся *метильная* ($—CH_3$), *метиленовая* ($—CH_2—$), *метенильная* (—CH=), *формильная* (—CHO) и *формиминогруппа* (—CH=NH) (рис. 10-12). Характерный пример такой реакции приведен на рис. 10-13.

Восстановление фолиевой кислоты до ее активной формы – тетрагидрофолата – происходит в два этапа путем последовательного присоединения к молекуле двух пар водородных атомов. Второй этап – реакция, катализируемая *дигидрофолатредуктазой*, – эффективно ингибируется лекарственными препаратами, используемыми при терапии некоторых

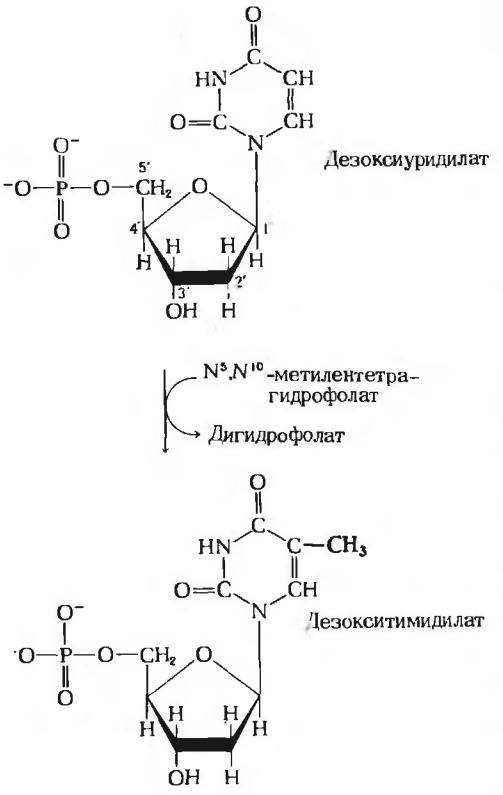


Рис. 10-13. Роль N^5, N^{10}-метилентетрагидрофолата (рис. 10-12) как донора метильной группы в ферментативном синтезе тимидиловой кислоты – строительного блока ДНК. Вновь встроенная метильная группа выделена красным цветом.



Рис. 10-14. Сходство в строении *n*-аминобензойной кислоты и сульфаниламида – конкурентного ингибитора ферментной системы, включающей *n*-аминобензоат в фолиевую кислоту.

форм рака. Поскольку гидрофолат необходим при биосинтезе *тимидиловой кислоты* (одного из строительных блоков ДНК), эти лекарственные препараты ингибируют процесс репликации ДНК в быстро растущих раковых клетках.

Некоторые бактерии не нуждаются в экзогенной фолиевой кислоте как факторе роста, так как они сами могут ее синтезировать из *n-аминобензойной кислоты* – одного из компонентов фолиевой кислоты. Следовательно, *n*-аминобензойная кислота играет роль витамина для таких бактерий. Это открытие оказалось очень ценным, потому что оно позволило понять механизм действия *сульфаниламида* – важного лекарственного препарата, ингибирующего рост патогенных бактерий, нуждающихся в *n*-аминобензойной кислоте. На рис. 10-14 показано, что *n*-аминобензойная кислота и сульфаниламид очень сходны по своей структуре. Благодаря такому сходству сульфаниламид может конкурировать с *n*-аминобензоатом в процессе ферментативного синтеза фолиевой кислоты.

10.11. Витамин B_{12} – предшественник кофермента B_{12}

Витамин B_{12} – самый сложный из витаминов – имеет не совсем обычную историю. В 1926 г. два американских врача Джордж Мино и Уильям Мэрфи обнаружили, что включение в пищевой рацион больших количеств полусырой печени оказывает лечебное действие при злокачественной анемии – тяжелом заболевании, которое часто приводит к летальному исходу. У животных не наблюдается аналогичного заболевания. Ощутимых успехов в выделении из печени антианемического фактора удалось достичь лишь в конце 40-х годов, когда Мэри Шорб обнаружила один вид бактерий, рост которых зависел от этого фактора. Таким образом, скорость роста бактерий можно было использовать в качестве простого и быстрого теста для оценки содержания активного фактора. В 1948 г. Э. Лестер Смит (Англия), а также Эдвард Рикес и Карл Фолкерс (США) получили витамин B_{12} в кристаллическом виде.

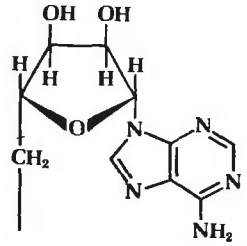
Однако потребовалось еще 10 лет для того, чтобы методом рентгеноструктурного анализа установить его структуру, которая оказалась очень сложной (рис. 10-15).

Витамин B_{12} отличается от всех остальных витаминов не только сложностью своего строения, но и тем, что он содержит важный для организма микроэлемент *кобальт*. Производное витамина B_{12}, которое обычно получают при его выделении, называется *цианкобаламином*, так как в нем содержится цианогруппа, связанная с атомом кобальта. Сложная *корриновая циклическая* система витамина B_{12} (рис. 10-15), с которой координационно связан атом кобальта, по химическому строению сходна с порфириновой циклической системой гема и гемопротеинов (разд. 8.2). В коферментной форме витамина B_{12}, которая называется *5′-дезоксиаденозилкобаламином*, цианогруппа замещена на 5′-дезоксиаденозильную группу (рис. 10-15).

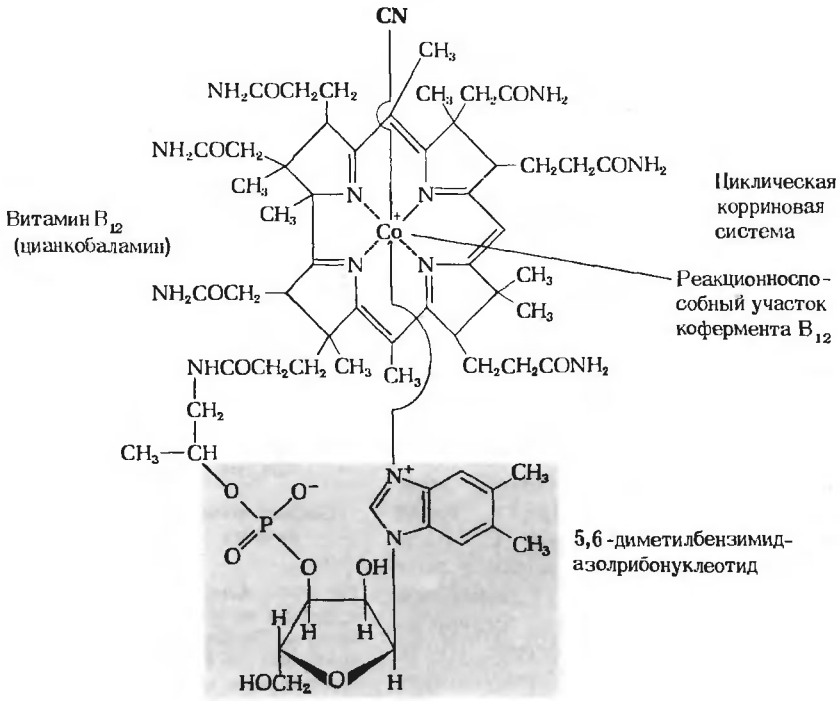
Витамин B_{12} не вырабатывается ни растениями, ни животными; его синтезируют только некоторые виды микроорганизмов. Суточная потребность здорового человека в этом витамине ничтожна – она составляет около 3 мкг. Роль витамина B_{12} в лечении злокачественной анемии будет рассмотрена в гл. 26.

Все ферменты, нуждающиеся в коферменте B_{12}, обладают способностью осуществлять обмен между связанным с углеродом атомом водорода и какой-

Рис. 10-15. Витамин B_{12} и его коферментная форма, называемая аденозилкобаламином (или коферментом B_{12}). Цианогруппа (выделена красным цветом) заменена в коферменте B_{12} на 5′-дезоксиаденозильную группу (изображена в верхней части рисунка).



5′-дезоксиаденозильная группа кофермента B_{12}

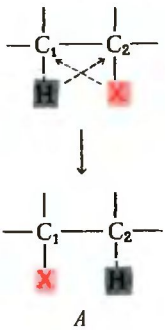


Витамин B_{12} (цианкобаламин)

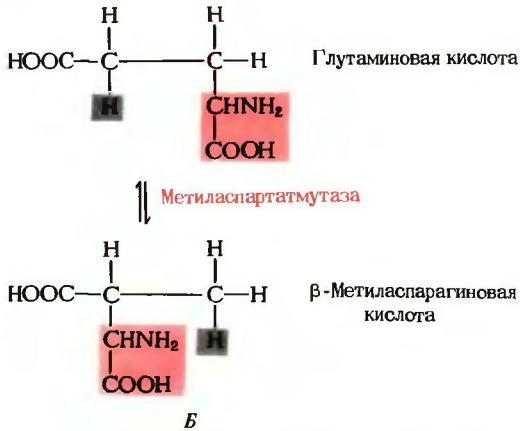
Циклическая корриновая система

Реакционноспособный участок кофермента B_{12}

5,6-диметилбензимидазолрибонуклеотид



А



Б

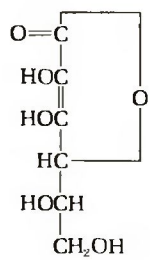
Рис. 10-16. Реакции, происходящие с участием коферментных форм витамина B_{12}. *А.* Кофермент B_{12}-зависимые ферменты катализируют перенос атома водорода от атома C_1 к атому C_2 в обмен на группу X. *Б.* Кофермент B_{12}-зависимая реакция, катализируемая метиласпартатмутазой. Обратите внимание на то, что группы H и X, присоединенные к соседним атомам углерода, обмениваются местами.

нибудь группой (алкильной, карбоксильной, гидроксильной или аминогруппой), связанной с соседним атомом углерода (рис. 10-16). На рис. 10-16 показана типичная реакция, для осуществления которой необходим кофермент B_{12} (кобамид). Другая коферментная форма витамина B_{12}, *метилкобаламин*, участвует в некоторых реакциях, протекающих с переносом метильных групп.

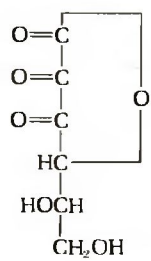
10.12. Биохимическая функция витамина С (аскорбиновой кислоты) не известна

Хотя уже в 90-х годах XVIII в. знали о том, что в плодах цитрусовых содержится какой-то фактор, предотвращающий возникновение у людей цинги, его не удавалось получить в чистом виде и идентифицировать до 1933 г., когда американские исследователи С. Глен Кинг и У. А. Во наконец выделили этот противоцинготный фактор из лимонного сока. Вскоре после этого было установлено его химическое строение (рис. 10-17). Аскорбиновая кислота присутствует в тканях всех животных и высших растений. Только люди и некоторые другие позвоночные должны получать ее с пищей; большинство же животных и, вероятно, все растения могут синтезировать это соединение из глюкозы. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней.

Аскорбиновая кислота, по-видимому, играет роль кофактора в реакции ферментативного гидроксилирования, при котором остатки пролина в коллагене соединительной ткани позвоночных превращаются в остатки *4-гидроксипролина* (рис. 5-7). Гидроксипролиновые остатки обнаружены только в коллагене (разд. 7.15) и не встречаются ни в одном другом белке животных. Таким образом, хотя аскорбиновая кислота, видимо, участвует



L-аскорбиновая кислота



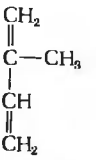
L-дегидроаскорбиновая кислота

Рис. 10-17. Аскорбиновая кислота (витамин С) и продукт ее окисления – дегидроаскорбиновая кислота. Последняя, хотя и обладает биологической активностью, очень неустойчива и легко распадается.

в образовании основного компонента соединительной ткани высших животных, пока не ясно, является ли это ее единственной или даже главной функцией.

10.13. Жирорастворимые витамины представляют собой производные изопрена

Четыре жирорастворимых витамина (A, D, E и K) в биологических системах образуются путем соединения остатков пятиуглеродного углеводорода *изопрена*, называемого также *2-метилбутадиеном* (рис. 10-18), который играет роль строительного блока при образовании различных жиро- и каучукоподобных веществ растительного происхождения. Натуральный каучук и гуттаперча, используемые, например, при изготовлении мячей для игры в гольф, представляют собой полимеры изопрена. Чтобы показать изопреноидное происхождение жирорастворимых витаминов, в их структурных формулах изопреновые единицы отделяют черточками друг от друга, как



Изопрен

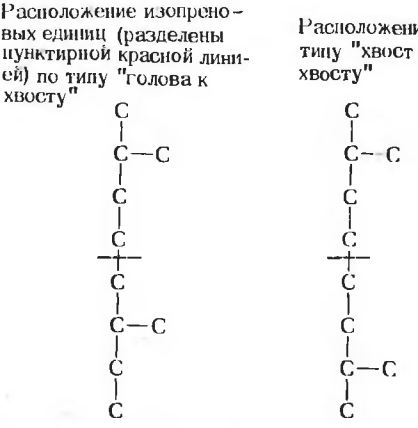


Рис. 10-18. Изопрен — структурная единица изопреноидных соединений.

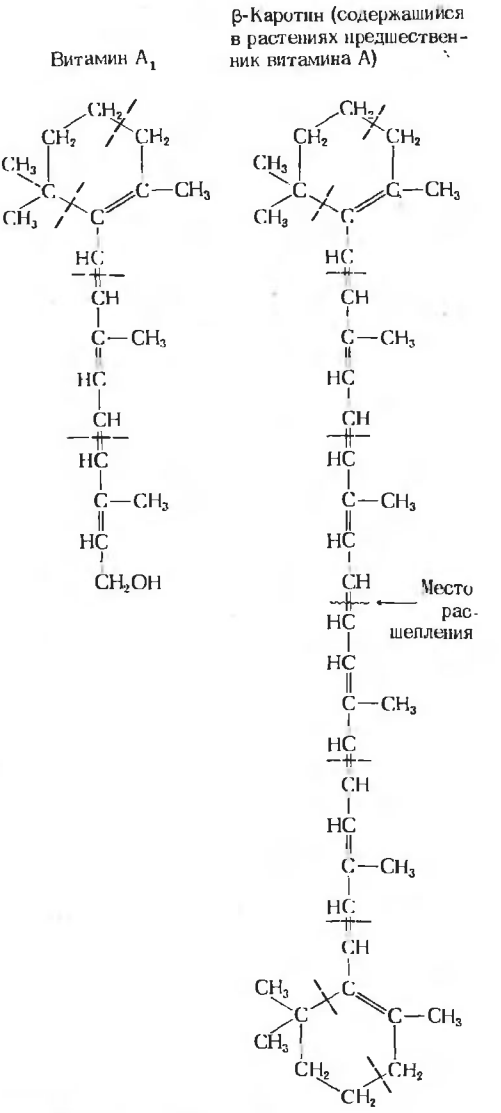


Рис. 10-19. Витамин A_1 и его предшественник — β-каротин. Изопреновые структурные единицы отделены друг от друга красными пунктирными линиями. При расщеплении β-каротина образуются две молекулы витамина A_1. Эта реакция протекает в тонком кишечнике.

это сделано на рис. 10-19 в структурной формуле витамина A.

Пока еще не совсем понятно, в чем заключаются биохимические или коферментные функции жирорастворимых витаминов. Однако в их изучении уже

достигнут значительный прогресс. Одно из важных свойств жирорастворимых витаминов состоит в том, что они могут запасаться в организме в больших количествах. Поэтому их отсутствие в пищевом рационе может не проявляться на физиологическом уровне в течение многих месяцев.

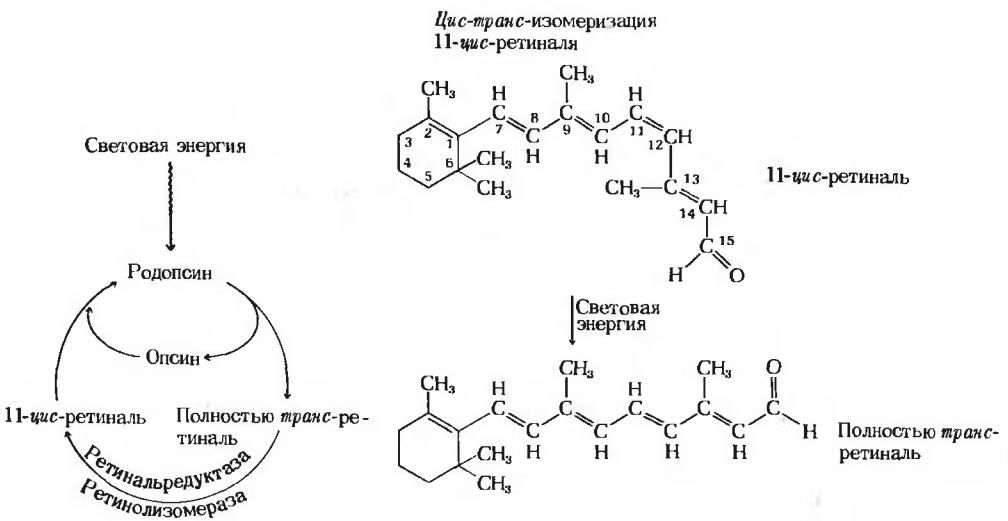
10.14. Витамин А, вероятно, выполняет несколько функций

Роль витамина А как необходимого фактора питания впервые установил в 1915 г. Элмер Мак-Коллум. Позднее он выделил этот витамин из жира, содержащегося в печени рыб. Известны две природные формы витамина А – витамин A_1, или *ретинол*, который получают из печени морских рыб, и витамин A_2, выделяемый из печени пресноводных рыб. Оба этих витамина – 20-атомные спирты, состоящие из изопреновых единиц. В растениях витамин А, как таковой, не встречается, но многие растения содержат вещества изопреноидной природы, называемые *каротиноидами*, которые в организме большинства животных могут превращаться ферментативным путем в витамин А. На рис. 10-19 показано, как в результате расщепления β-*керотина* из него образуется витамин А. β-Каротин придает моркови, батату и другим овощам характерный для них цвет.

У людей и экспериментальных животных недостаточность витамина А приводит к целому ряду симптомов, между которыми на первый взгляд трудно найти что-либо общее. К числу таких симптомов относятся сухость кожи, ксерофтальмия («сухие глаза»), сухость слизистых оболочек, задержка развития и роста, стерильность самцов, ночная (куриная) слепота. Последний симптом обычно используют для ранней диагностики недостаточности витамина А (разд. 26.16).

Интенсивные биохимические и биофизические исследования витамина А, начало которым положил Джордж Уолд в Гарвардском университете, позволили получить всестороннюю информацию

Рис. 10-20. Циклический процесс синтеза и распада зрительного пигмента родопсина. При возбуждении молекулы родопсина видимым светом его простетическая группа 11-*цис*-ретиналь поглощает световую энергию и в результате изомеризации, состоящей из нескольких стадий, превращается в полностью *транс*-ретиналь. Этот процесс возбуждает нервный импульс. Поскольку структура полностью *транс*-ретиналя не соответствует конформации активного центра белка опсина, ретиналь отщепляется от него. В ходе двух последовательных ферментативных реакций полностью *транс*-ретиналь вновь превращается в исходный 11-*цис*-ретиналь, который связывается с опсином, вновь образуя родопсин.



о функции витамина А в процессе зрения. На рис. 10-20 показан цикл химических изменений зрительного пигмента родопсина в палочках сетчатки. Эти клетки воспринимают световые сигналы низкой интенсивности, но не чувствительны к цвету. Роль активного компонента в зрительном процессе играет окисленная форма ретинола – *ретиналь*, или *альдегид витамина А*, связанный с белком *опсином*. Комплекс ретиналя с опсином, называемый *родопсином*, расположен в уложенных стопками внутриклеточных мембранах палочек. При возбуждении родопсина видимым светом ретиналь, у которого одна двойная связь в 11-м положении находится в *цис*-конфигурации (остальные двойные связи имеют *транс*-конфигурацию), в результате очень сложных, но быстро протекающих внутримолекулярных перестроек изомеризуется в полностью *транс*-ретиналь. Считают, что эти изменения, влияющие на геометрическую конфигурацию ретиналя (рис. 10-20), вызывают изменение формы всей молекулы родопсина. Такое конформационное изменение служит молекулярным пусковым механизмом, возбуждающим в окончаниях зрительного нерва импульс, который затем передается в мозг. В ходе «темновых» ферментативных реакций образовавшийся при освещении полностью *транс*-ретиналь вновь превращается в исходный 11-цис-ретиналь.

Ретиналь содержится также в *бактериородопсине* – светочувствительном пигменте, представляющем собой ретиналь-белковый комплекс, который присутствует в клеточной мембране *галобактерий* – «солелюбивых» прокариот, получающих основное количество энергии за счет света, поглощенного этим пигментом (гл. 17).

10.15. Витамин D – предшественник гормона

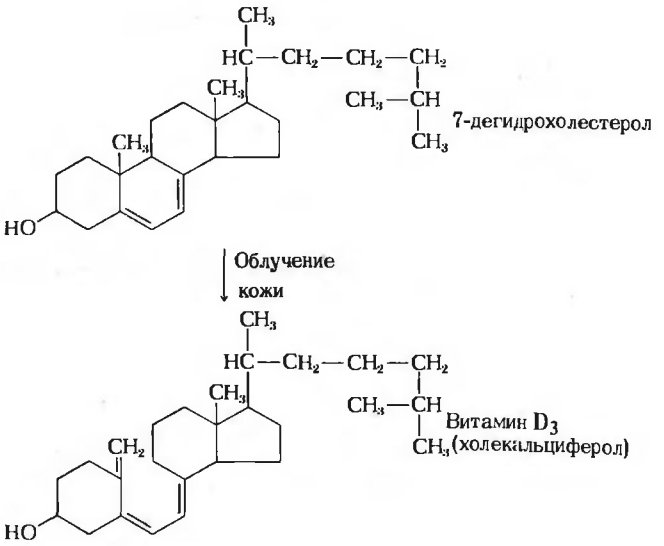
Недостаток витамина D приводит к нарушению фосфорно-кальциевого обмена и процесса образования костей. В результате у детей развивается *рахит*, к числу характерных симптомов которого относятся искривление костей нижних конечностей и деформация грудной клетки («куриная грудь»). *Витамин* D_3, или *холекальциферол* (рис. 10-21), обычно образуется в коже человека и животных из неактивного предшественника – *7-дегидрохолестерола* – в ходе реакций, начинающихся под действием ультрафиолетового компонента солнечного излучения. В больших количествах витамин D_3 содержится также в жире из печени рыб. Другую распространенную форму витамина D – *витамин* D_2, или *эргокальциферол*, – получают в промышленных масштабах путем ультрафиолетового облучения *эргостерола* дрожжей. До тех пор, пока человек получает достаточную дозу солнечных лучей, ему не нужны дополнительные количества витамина D.

В последние годы активно изучается биохимическая роль витамина D. Сам по себе витамин D_3 не обладает биологической активностью, но он служит предшественником 1, 25-дигидроксихолекальциферола (рис. 10-22). Витамин D_3 гидроксилируется в два этапа – сначала в печени, а затем в почках. 1,25-дигидроксихолекальциферол образуется в почках, а оттуда переносится в другие органы и ткани, главным образом в тонкий кишечник и кости, где он регулирует обмен Ca^{2+} и фосфора. Благодаря такой особенности 1,25-дигидроксихолекальциферола его можно считать гормоном, так как по определению гормон – это «посредник», синтезируемый в одном органе и регулирующий биологическую активность какой-то другой ткани.

10.16. Витамин Е защищает клеточные мембраны от кислорода

Витамин Е представляет собой группу, состоящую по меньшей мере из трех соединений – α-, β- и γ-токоферола; из них наиболее важное значение имеет α-токоферол (рис. 10-23). Токоферолы содержатся в растительных маслах, особенно богаты ими семена пшеницы. При недостатке витамина Е у крыс и других животных наблюдается шелушение кожи, мышечная слабость и стерильность. Тер-

Образование витамина D_3 у животных



Витамин D_2 (эргокальциферол), продажный препарат, получаемый путем облучения эргостерола дрожжей и других грибов

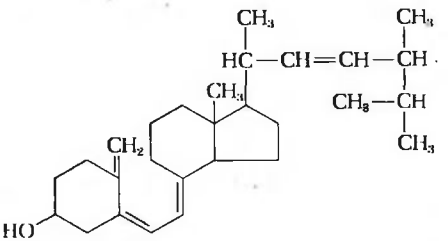
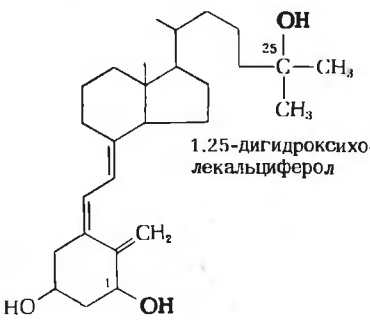


Рис. 10-21. Разные формы витамина D.

Рис. 10-22. Образование и функция активной формы витамина D_3 — 1, 25-дигидроксихолекальциферола.



Сводные данные о предшественниках, метаболизме и функциях витамина D_3

7-дегидрохолестерол

↓ Кожа (облучение ультрафиолетом)

Холекальциферол (D_3)

↓ Печень

25-гидроксихолекальциферол

↓ Почки (реакция ускоряется под действием паратиреоидного гормона и при низком содержании фосфата в крови)

1,25-дигидроксихолекальциферол

↙ Усиливает всасывание Ca^{2+} (первичный эффект) в кишечнике

↘ Ускоряет удаление Ca^{2+} из костей

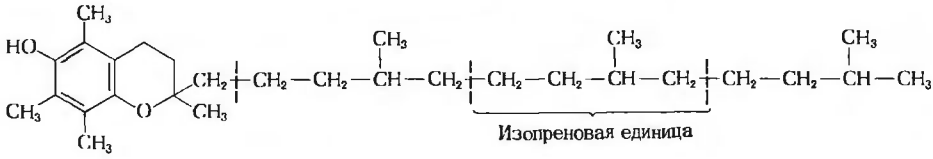


Рис. 10-23. Витамин Е (α-токоферол). Изопреновые единицы в боковой цепи разделены красными пунктирными линиями.

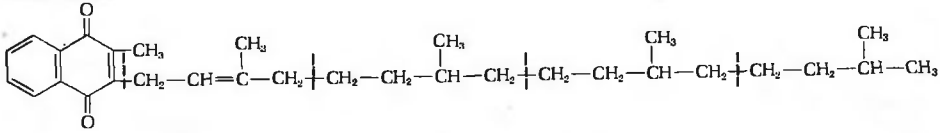
мин «токоферол» происходит от греческого слова «tokos», что в переводе означает «рождение ребенка». Однако не известно, влияет ли витамин Е на способность к оплодотворению у людей. Недостаточность токоферола вызывает у человека такие симптомы, как дегенерация печени и нарушение функции мембран. Молекулы токоферолов состоят из ароматического кольца и длинной изопреноидной боковой цепи. Точная биологическая функция витамина Е пока не установлена; предполагают, что он участвует в защите липидов клеточных мембран от разрушающего воздействия кислорода (разд. 12.2).

10.17. Витамин К – компонент карбоксилирующего фермента

Две основные формы витамина К – витамины K_1 и K_2 – в значительных количествах содержатся в большинстве высших растений. Обе формы представляют собой нафтохиноны с изопреноидными боковыми цепями разной длины (рис. 10-24). Недостаток витамина К у цыплят и других животных вызывает у них нарушение свертываемости крови.

Сравнительно недавно удалось установить биохимическую функцию витамина К в механизме свертывания крови. Витамин К необходим для нормального образования белка плазмы крови *протромбина*, который является неактивным предшественником *тромбина* – фермента, превращающего белок плазмы крови *фибриноген* в *фибрин* – нерастворимый, волокнистый белок, способствующий формированию кровяного сгустка. Чтобы протромбин мог активироваться и превратиться в тромбин, он должен связать ионы Ca^{2+}. При недостатке витамина К в организме животных синтезируются дефектные молекулы протромбина, неспособные правильно связывать ионы Ca^{2+}. В нормальной молекуле протромбина содержится несколько остатков особой аминокислоты – *γ-карбоксиглутаминовой кислоты*, которая и связывает ионы Ca^{2+}. При недостаточности витамина К вместо остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты в молекуле протромбина содержатся остатки глутаминовой кислоты. Джон Сатти из Висконсинского университета обнаружил ферментативную систему, способную превращать остатки глутаминовой кислоты в протромбине, выделенном из крови животных с недостаточностью витамина К, в остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты. Для

Витамин K_1 (филлохинон). Эта форма, обнаруженная в растениях, имеет боковую цепь из четырех изопреновых единиц



Витамин K_2 (менахинон). Эта форма, обнаруженная у животных, содержит в боковой цепи шесть изопреновых единиц, в каждой из которых имеется двойная связь



Рис. 10-24. Разные формы витамина К.

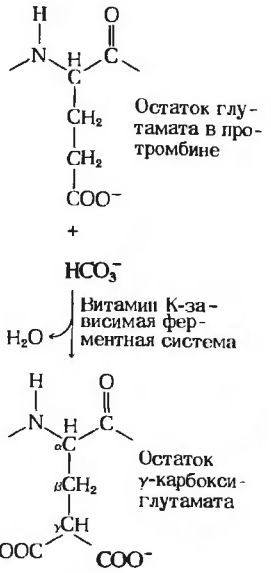


Рис. 10-25. Функция витамина К как кофактора при образовании остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты в протромбине и других белках.

действия этого фермента необходим витамин К (рис. 10-25). Некоторые другие Ca^{2+}-связывающие белки в организме также содержат остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты.

10.18. В пище животных должны содержаться многочисленные неорганические вещества

Для нормального роста и выполнения биологических функций человеку и животным кроме витаминов необходим также целый ряд неорганических элементов. Эти элементы можно разделить на два класса: *макроэлементы* и *микроэлементы*. Макроэлементы, к которым относятся кальций, магний, натрий, калий, фосфор, сера и хлор, требуются организму в относительно больших количествах (порядка нескольких граммов в сутки). Часто они выполняют более чем одну функцию. Например, кальций служит структурным компонентом неорганического вещества костей гидроксиапатита, состав которого можно приблизительно описать формулой $[Ca_3(PO_4)_2]_3$. Вместе с тем ионы Ca^{2+} играют роль очень важных регуляторов в цитозоле клетки, где их концентрация составляет менее 10^{-6} М. Фосфор в форме фосфата представляет собой необходимый компонент внутриклеточной АТР-зависимой системы переноса энергии.

Более непосредственное отношение к действию ферментов имеют *незаменимые микроэлементы* (табл. 10-2 и 10-3), суточная потребность в которых не превышает нескольких миллиграммов или микрограммов, т. е. сопоставима с потребностью в витаминах. Известно, что в пище животных обязательно должно содержаться около 15 микроэлементов.

Большинство незаменимых микроэлементов служит в качестве кофакторов или простетических групп ферментов. При этом они выполняют какую-нибудь одну из трех (по меньшей мере) возможных функций. Во-первых, незаменимый микроэлемент сам по себе может обладать каталитической активностью по отношению к той или иной химической реакции, скорость которой в значительной степени возрастает в присутствии ферментного белка. Это особенно характерно для ионов железа и меди. Во-вторых, ион металла может образовать

Таблица 10-2. Микроэлементы и их биологические функции

Элемент	Примеры биохимических функций
Железо	Простетическая группа гемсодержащих ферментов (каталазы, цитохромоксидазы)
Иод	Необходим для синтеза гормонов щитовидной железы
Медь	Простетическая группа цитохромоксидазы
Марганец	Кофактор аргиназы и других ферментов
Цинк	Кофактор дегидрогеназы, ДНК-полимеразы, карбоангидразы
Кобальт	Компонент витамина B_{12}
Молибден	Кофактор ксантиноксидазы
Селен	Кофактор глутатионпероксидазы и других ферментов
Ванадий	Кофактор нитратредуктазы
Никель	Кофактор уреазы

Таблица 10-3. Необходимые микроэлементы, биохимические функции которых точно еще не установлены

Элемент	Предположительная функция
Хром	Нормальная утилизация содержащейся в крови глюкозы
Олово	Образование костей
Фтор	Образование костей
Кремний	Образование соединительной ткани и костей
Мышьяк	Не известна

комплекс одновременно и с субстратом и с активным центром фермента, в результате оба они сближаются друг с другом и переходят в активную форму. Наконец, в-третьих, ион металла может играть роль мощного акцептора электронов на определенной стадии каталитического цикла. Ферменты, для активности которых необходимы ионы металлов, часто называются *металлоферментами.*

10.19. Для действия многих ферментов требуется железо

Железо относится к тем микроэлементам, биологические функции которых изучены наиболее полно. Железо входит в состав гемогрупп кислород-переносящих белков гемоглобина и миоглобина, а также переносчика электронов митохондриального белка цитрохрома *c* (гл. 8). Гемовые простетические группы содержатся также в целом ряде важных ферментов (рис. 10-26). Примером может служить *цитохромоксидаза,* катализирующая восстановление молекулярного кислорода до воды за счет электронов, поступающих из молекул питательных веществ. В молекуле цитохромоксидазы вследствие изменения валентности железо обратимо переходит из ферриформы [Fe(III)] в ферроформу [Fe(II)], в результате чего происходит перенос электронов с цитрохрома *c* на молекулярный кислород. *Цитохром P450,* участвующий в реакциях ферментативного гидроксилирования, также способен переносить электроны на кислород.

К числу других гемсодержащих ферментов относятся *каталаза,* осуществляющая расщепление перекиси водорода, и *пероксидаза,* катализирующая окисление различных органических веществ перекисями. Ион железа в молекуле каталазы активно участвует в каталитическом цикле. Даже простые соли железа, такие, как $FeSO_4$, способны проявлять некоторую каталитическую активность, ускоряя разложение перекиси водорода на H_2O и O_2. Возможно, что роль порфириновой группы и белковой части каталазы сводится к тому, что они лишь резко повышают эту исходную каталитическую активность железа.

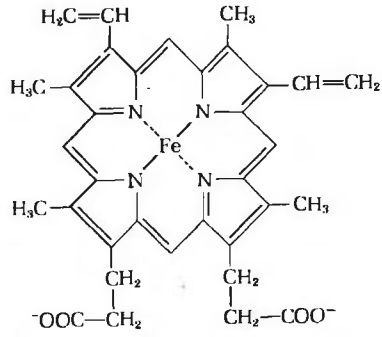


Рис. 10-26. Железопорфириновая группировка, или гем. Гем служит простетической группой гемсодержащих ферментов, таких, как хромоксидаза, каталаза и пероксидаза. (См. также рис. 8-5.)

Железо-серные ферменты — это еще один важный класс железосодержащих ферментов, участвующих в переносе электронов в клетках животных, растений и бактерий. Железо-серные ферменты не содержат гемогрупп; они характеризуются тем, что в их молекулах присутствует равное число атомов железа и серы, которые находятся в особой лабильной форме, расщепляющейся под действием кислот. К железо-серным ферментам относится, например, *ферредоксин* хлоропластов, осуществляющий перенос электронов от возбужденного светом хлорофилла на разнообразные акцепторы электронов (гл. 23). Дальше (разд. 17.8) мы увидим, что в реакциях переноса электронов в митохондриях участвуют другие железо-серные ферменты.

Некоторые флавопротеины имеют в своем составе кроме флавинового нуклеотида еще и железо.

10.20. В некоторых окислительных ферментах содержится также медь

Электрон-переносящие простетические группы *цитохромоксидазы* наряду с железом содержат также медь, которая играет важную роль в каталитической активности этого фермента. Атомы меди в цитохромоксидазе подвергаются циклическим изменениям валентности Cu (II) – Cu (I) и таким образом участвуют в переносе электронов, акцептором которых служит кислород. Медь присутствует также в активном центре *лизилоксидазы* – фермента, осуществляющего формирование поперечных сшивок между полипептидными цепями коллагена и эластина (разд. 7.16 и 7.17). Недостаток меди в организме животных приводит к образованию дефектного коллагена, в котором отсутствуют поперечные сшивки. В результате коллаген и эластин в стенках артерий становятся менее прочными, что увеличивает вероятность их разрыва. Медь необходима также для нормального усвоения железа в организме человека.

10.21. Для действия многих ферментов необходим цинк

Ионы Zn^{2+} являются необходимыми компонентами почти ста различных ферментов. Они присутствуют во многих *NAD- и NADP-зависимых дегидрогеназах* – ферментах, катализирующих перенос гидрид-ионов от молекул субстрата на коферменты NAD^+ и $NADP^+$. Например, NAD-зависимый фермент – *алкогольдегидрогеназа* печени, осуществляющий дегидрирование этанола с образованием ацетальдегида, содержит два иона Zn^{2+}, которые, по-видимому, связывают кофермент NAD^+ с активным центром фермента. Ионы Zn^{2+} входят также в состав *ДНК- и РНК-полимераз* и таким образом участвуют в важных ферментативных реакциях, протекающих в ходе репликации и транскрипции генетической информации. Ионы Zn^{2+} присутствуют также в молекулах *карбоангидразы*, катализирующей гидратацию CO_2 до H_2CO_3 и протеолитического фермента *карбоксипептидазы*, секретируемого в тонкий кишечник. Гормон инсулин накапливается в виде комплекса с цинком. К числу наиболее интересных функций цинка можно отнести его участие в восприятии вкуса и запаха рецепторами языка и полости носа.

10.22. Некоторым ферментам требуются ионы марганца

Фермент *аргиназа*, гидролизующий аргинин с образованием мочевины – конечного продукта метаболизма аминогрупп в организме человека, содержит прочно связанные с ним ионы Mn^{2+}, необходимые для его ферментативной активности. Ион Mn^{2+} служит кофактором и некоторых фосфат-переносящих ферментов, а также ферментов, обеспечивающих образование кислорода в хлоропластах растений в процессе фотосинтеза.

10.23. В состав витамина B_{12} входит кобальт

Уникальная особенность витамина B_{12} заключается в том, что кроме органического компонента его молекулы содержат также и неорганический компонент – *кобальт*. Поэтому кобальт необходимо включать в питательную среду микроорганизмов, синтезирующих витамин B_{12}. Поскольку витамин B_{12} присутствует в клетках животных и некоторых микроорганизмов в следовых количествах, для его биосинтеза нужны ничтожные количества этого элемента.

10.24. Селен является и незаменимым микроэлементом, и ядом

Уже давно было известно, что селен в виде селенита и селената оказывает сильное токсическое действие на сельскохозяйственных животных, пасущихся в определенных местностях штатов Мон-

тана и Дакота, а также в других местах, где в почве в больших количествах присутствуют соли селена. Поэтому совершенно неожиданными оказались результаты опытов, в которых было обнаружено, что селен, правда в значительно меньших количествах, должен обязательно содержаться в пище крыс и цыплят. Проведенные в последние годы исследования показали, что селен в комплексе с какой-либо аминокислотой входит в состав простетических групп нескольких ферментов, в частности *глутатионпероксидазы*, которая вместе с пептидом *глутатионом* (рис. 10-27) защищает клетки от разрушающего действия перекиси водорода. В эритроцитах железо, присутствующее в молекуле гемоглобина, обычно находится в ферроформе [Fe(II)]. Однако под воздействием перекиси водорода оно легко окисляется до ферриформы (Fe(III)]; образующийся при этом *метгемоглобин* не способен

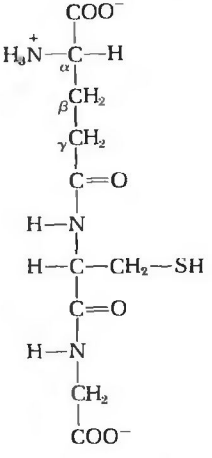


Рис. 10-27. Глутатион (GSH) – трипептид, содержащий L-глутаминовую кислоту, L-цистеин и глицин. Следует обратить внимание на то, что остаток цистеина присоединен к γ-, а не к α-карбоксильной группе глутаминовой кислоты. Глутатион присутствует в высоких концентрациях во всех животных клетках. Одна из его функций состоит в восстановлении токсичных перекисей при помощи глутатионпероксидазы (см. текст). В нескольких ферментативных реакциях он действует как кофактор, но его нельзя считать коферментом. Предполагается также, что глутатион участвует в транспорте аминокислот через клеточные мембраны.

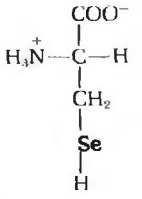


Рис. 10-28. Селеноцистеин – аналог цистеина, у которого сера заменена на селен. Остаток селеноцистеина присутствует в активном центре глутатионпероксидазы и других селен-зависимых ферментов.

переносить кислород. Глутатионпероксидаза предотвращает образование метгемоглобина путем разложения перекиси водорода в следующей реакции:

$$\underset{\text{Восстановленный глутатион}}{2GSH} + H_2O_2 \rightarrow \underset{\text{Окисленный глутатион}}{GSSG} + 2H_2O$$

Активный центр глутатионпероксидазы содержит остаток необычной аминокислоты – *селеноцистеина* (рис. 10-28), в которой атом серы цистеина заменен на атом селена. Возможно, что —SeH-группа этого остатка обладает какими-то преимуществами по сравнению с —SH-группой в механизме действия этого и других селенсодержащих ферментов.

10.25. Для некоторых ферментов требуются другие микроэлементы

Было обнаружено, что для нормального функционирования активных центров некоторых флавиндегидрогеназ необходимы *молибден* и *ванадий*. Например, фермент *ксантиноксидаза*, катализирующий окисление определенных пуринов с образованием мочевой кислоты как конечного продукта, содержит в качестве простетической группы FAD, а также молибден и железо.

Оказалось, что *кремний*, встречающийся повсеместно в виде *кварца* (SiO_2) – главного компонента песка – и *кальций-алюмосиликата* – основного минерального компонента глины – необходимо включать в пищевой рацион крыс, цыплят и других животных, содержащихся на синтетической пище, тщательно

очищенной от кремния. Функция кремния в организме пока не установлена, известно, однако, что в максимальных количествах он встречается в костях и соединительной ткани животных в виде кремнийорганических соединений.

Недавно было показано, что в состав *уреазы* – первого фермента, который был получен в кристаллическом виде в 1926 г. (разд. 9.1), входит *никель*. *Хром*, расположенный в периодической системе элементов рядом с никелем, участвует в регуляции усвоения глюкозы тканями животных. *Олово*, без которого невозможно правильное развитие скелета, требуется, вероятно, для процессов кальцификации.

Для некоторых растений оказались необходимыми еще два элемента – *бор* и *алюминий*.

Краткое содержание главы

Витамины – это органические вещества, которые в следовых количествах присутствуют в большинстве живых организмов и необходимы для их нормальной жизнедеятельности. Однако некоторые организмы не способны синтезировать эти вещества и должны получать их из внешних источников. Бóльшая часть водорастворимых витаминов представляет собой компоненты различных коферментов или простетических групп ферментов, играющих важную роль в клеточном метаболизме. Тиамин (витамин B_1) – активный компонент тиаминпирофосфата, кофермента, выполняющего функцию промежуточного переносчика ацетальдегида в ходе ферментативного декарбоксилирования пирувата – основного продукта распада глюкозы в клетках. Рибофлавин (витамин B_2) входит в состав коферментов флавинмононуклеотида (FMN) и флавинадениндинуклеотида (FAD), выполняющих роль водородпереносящих простетических групп в определенных ферментах, катализирующих реакции окисления. Никотиновая кислота является компонентом никотинамидадениндинуклеотидов (NAD и NADP), которые служат переносчиками гидрид-ионов при функционировании ряда дегидрогеназ. Пантотеновая кислота представляет собой незаменимый компонент кофермента А, играющего роль переносчика ацильных групп в процессе ферментативного окисления пирувата и жирных кислот. Витамин B_6 (пиридоксин) служит предшественником пиридоксальфосфата – простетической группы трансаминаз и других ферментов метаболизма аминокислот. Биотин функционирует как простетическая группа некоторых карбоксилаз, действуя в качестве переносчика карбоксильных групп. Фолиевая кислота служит предшественником тетрагидрофолиевой кислоты – кофермента, участвующего в ферментативном переносе одноуглеродных фрагментов. Витамин B_{12} в форме его 5′-дезоксиаденозильного производного участвует в ферментативном обмене между связанным с углеродом атомом водорода и какой-либо группой, соединенной с соседним атомом углерода.

Жирорастворимые витамины выполняют другие важные функции. Витамин А служит предшественником светочувствительного пигмента, претерпевающего цикл химических превращений в палочках сетчатки у позвоночных. Витамин D_3, или холекальциферол, образующийся из 7-дегидрохолестерола под действием солнечного излучения, – это основной предшественник 1,25-дигидроксихолекальциферола, который, подобно гормону, регулирует обмен ионов Ca^{2+} в тонком кишечнике и костях. Витамин К является кофактором при ферментативном образовании остатков γ-карбоксиглутаминовой кислоты в протромбине – Ca^{2+}-связывающем белке плазмы крови, играющем важную роль в свертывании крови. Железо, медь, цинк, марганец, кобальт, молибден, селен и никель – все эти элементы необходимы для действия многих ферментов. Кроме того, в пище животных должны содержаться и некоторые другие элементы, в том числе ванадий, олово, хром и кремний; однако их функции точно еще не установлены.

ЛИТЕРАТУРА

Роль витаминов и неорганических веществ в питании обсуждается в гл. 26.

Книги

Boyer P. D., Lardy H., Myrback K. (eds.). The Enzymes, 3d ed., 14 vols., Academic, New York, 1970–1981. Содержательные обзоры функциональной роли коферментов.

Florkin M., Stotz E. H. (eds.). Comprehensive Biochemistry, vol. 21, Metabolism of Vitamins and Trace Elements, American Elsevier, New York, 1971. Подробно рассмотрены химические, метаболические и биохимические аспекты роли витаминов и микроэлементов.

Hutchinson D. W. Nucleotides and Coenzymes, Wiley, New York, 1973.

Статьи

Harris L. J. The Discovery of Vitamins. In: Joseph Needham (ed.), The Chemistry of Life, Cambridge University Press, New York, 1970, pp. 156–170.

Hubbard R. 100 Years of Rhodopsin, Trends Biochem. Sci., **1**, 154–158 (1976).

Simkiss K. Metal Ions in Cells, Endeavour, **3**, 2–6 (1979).

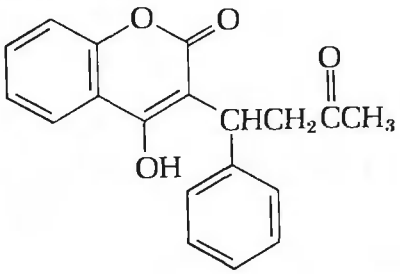
Staudinger H. A. Ascorbic Acid, Trends Biochem. Sci., **3**, 211–212 (1978).

Вопросы и задачи

1. *Потребность в никотиновой кислоте.* Недостаток никотиновой кислоты в пище приводит к заболеванию – пеллагре.
   а) Суточная потребность взрослого человека в никотиновой кислоте, составляющая 7,5 мг, уменьшается, если в пище содержится большое количество аминокислоты триптофана. Что можно сказать о взаимосвязи между никотиновой кислотой и триптофаном на основе этого наблюдения?
   б) В конце прошлого и в начале нашего столетия пеллагра была довольно распространенным заболеванием, особенно в сельских местностях на юге США, где люди употребляли в пищу мало мяса, а питались в основном кукурузой. Объясните, почему такое питание приводило к недостаточности никотиновой кислоты?
2. *Полиневрит у голубей.* В ставших классическими экспериментах голуби, содержавшиеся на экспериментальной диете, утрачивали координацию движений и способность удерживать свое тело в равновесии. Уровень пирувата в крови и мозгу этих птиц значительно превышал нормальный. Такое состояние проходило, если голубям давали мясо. Объясните эти наблюдения.
3. *Бактериальный тест на рибофлавин.* *Lactobacillus casei* – представители семейства бактерий, используемых для получения таких продуктов брожения, как йогурт, квашеная капуста и соленья, не способны синтезировать рибофлавин. Характерное свойство этих бактерий заключается в том, что они получают энергию за счет расщепления глюкозы до молочной кислоты (pK' 3,5). Какой метод количественного определения рибофлавина вы предложили бы исходя из этой информации?
4. *Пиридоксин и потребность бактерий в аминокислотах.* Бактерии *Lactobacillus casei* растут на простой культуральной среде, содержащей витамины рибофлавин и пиридоксин и четыре аминокислоты. Если в культуральную среду добавить полный набор аминокислот и рибофлавин, то количество пиридоксина, необходимого для оптимального роста бактерий, сократится на 90%. Объясните, почему это происходит.
5. *Яичные белки предохраняют желтки от порчи.* Яйца можно держать в холодильнике от четырех до шести недель, не опасаясь, что они испортятся. Если же отделить яичные желтки от белков, то они быстро испортятся даже при низкой температуре.
   а) Почему портятся желтки?
   б) Как вы объясните тот факт, что наличие яичных белков предотвращает порчу желтков?
   в) Какую пользу с биологической точки зрения приносит птицам такой способ защиты яиц?
6. *Потребность бактерий Streptococcus faecalis в фолиевой кислоте.* Бактерии *Steptococcus faecalis*, обитающие в толстом кишечнике, нуждаются в витамине фолиевой кислоте. Если в питательной среде содержатся аденин и тимидин, то бактерии могут хорошо расти и при отсутствии фолиевой кислоты. Исследование бактерий, выращенных в таких условиях, показало, что они не содержат фолиевой кислоты. Почему бактерии нуждаются в фолиевой кислоте? Почему потребность в фолиевой кислоте исчезает у бактерий при добавлении в культуральную среду аденина и тимидина?
7. *Потребность в кобальте у жвачных.* Значительную часть веса наземных растений составляют нерастворимые полисахариды, главный из которых – целлюлоза. Хотя большинство животных не имеет ферментов, необходимых для переваривания целлюлозы, жвачные (например коровы, лошади, овцы и козы) используют микроорганизмы для предварительного переварива-

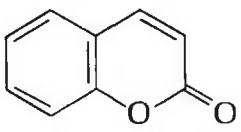
ния травянистых растений и листьев деревьев. В отличие от других животных жвачным необходим в больших количествах кобальт. В тех местах, где содержание кобальта в почве невелико (например, в Австралии), недостаточность кобальта у крупного рогатого скота и овец представляет серьезную проблему. Объясните, почему жвачным необходим кобальт?

8. *Периодичность применения витаминов.* Витамины A и D можно применять сразу за один прием в таком количестве, которого достаточно для поддержания их нормального уровня в течение нескольких недель; витамины же группы B необходимо принимать значительно чаще. Почему?
9. *Недостаточность витамина A.* Недостаточность витамина A вызывает ксерофтальмию – заболевание, сопровождающееся потерей зрения; для более ранних стадий характерны сухость и тусклость роговицы глаза. Дети в значительно большей степени подвержены этому заболеванию, чем взрослые. В тропических странах от ксерофтальмии слепнут десятки тысяч детей в возрасте от 18 до 36 месяцев. В то же время у взрослых, добровольно находившихся в течение двух лет на диете без витамина A, отмечалось лишь ослабление зрения в условиях пониженной освещенности. После введения витамина A этот дефект зрения быстро исчезал. Объясните, чем обусловлены различия в проявлении недостаточности витамина A у взрослых и детей.
10. *Почечная остеодистрофия.* У больных с поврежденными почками, несмотря на нормально сбалансированную диету, часто развивается почечная остеодистрофия – рахитоподобное заболевание, сопровождающееся интенсивной деминерализацией костей. Какой витамин участвует в минерализации костей? Почему повреждение почек приводит к деминерализации?
11. *Действие варфарина и дикумарола.* Варфарин – продажный препарат, применяемый для борьбы с грызунами, является мощным антагонистом витамина K; его введение в организм блокирует действие витамина K.

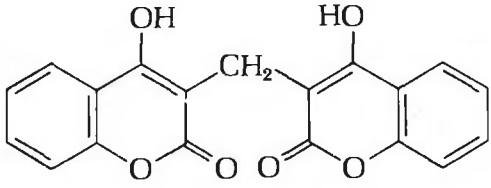


Варфарин

а) Предложите молекулярный механизм действия варфарина в качестве антагониста витамина K.
б) Почему скармливание грызунам варфарина приводит к их гибели?
в) Если коров или лошадей кормить неправильно приготовленным клевером, то у них развивается заболевание, сопровождающееся сильными внутренними кровотечениями. Было установлено, что причиной этого служит дикумарол – вещество, образующееся в результате действия микроорганизмов на кумарин – обычный компонент клевера. В клинической практике дикумарол используют для лечения больных с острым тромбофлебитом (образование кровяных сгустков, закупоривающих просвет сосуда). Объясните принцип этого лечения.

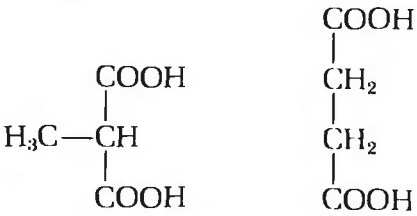


Кумарин



Дикумарол

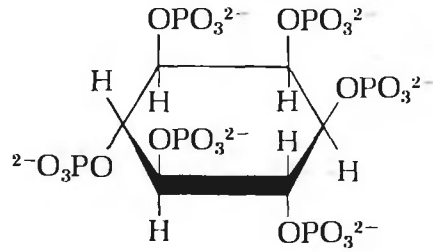
12. *Метилмалоновая кислота в моче.* У больного с клиническими проявлениями ацидоза (снижение pH крови и мочи) в моче были обнаружены значительные количества метилмалоновой кислоты. Известно, что при скармливании здоровым животным метилмалоновой кислоты она превращается в янтарную кислоту. Как вы объясните эти наблюдения?



13. *Недостаточность цинка в организме человека.* В некоторых странах Ближнего Востока, главным образом в Иране и Египте, у людей встречаются случаи недостаточности цинка. Это объясняется тем, что население в этих странах употребляет в пищу очень большое количество хлебных злаков, для которых характерно высокое содержание фитиновой кислоты (миоинозитолгексафосфата), очень прочно связывающей катионы двухвалентных металлов, особенно ионы Zn^{2+}.

а) Почему употребление хлебных злаков приводит к недостаточности цинка?

б) Недостаточность цинка особенно часто наблюдается в отдаленных деревнях,



Фитиновая кислота

где люди пекут хлеб из пресного недрожжевого теста. В городах, где в пищу употребляют хлеб из дрожжевого теста, недостаточность цинка встречается значительно реже. Объясните эти наблюдения.

ГЛАВА 11

УГЛЕВОДЫ: СТРОЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

Прежде чем приступить к изучению метаболизма клеток, следует рассмотреть углеводы, поскольку их можно считать основой существования большинства организмов. В таких углеводах, как сахара и крахмал, заключено основное количество калорий, получаемых с пищей человеком, почти всеми животными и многими бактериями. Центральное место углеводы занимают и в метаболизме зеленых растений и других фотосинтезирующих организмов, утилизирующих солнечную энергию для синтеза углеводов из CO_2 и H_2O. Образующиеся в результате фотосинтеза огромные количества крахмала и других углеводов играют роль главных источников энергии и углерода для неспособных к фотосинтезу клеток животных, растений и микроорганизмов.

Углеводам присущи также и другие важные биологические функции. Крахмал и гликоген используются как временные депо глюкозы. Нерастворимые полимеры углеводов выполняют функции структурных и опорных элементов в клеточных стенках бактерий и растений, а также в соединительной ткани и оболочках клеток животных. Углеводы других типов служат в качестве смазки в суставах, обеспечивают слипание клеток и придают биологическую специфичность поверхности животных клеток.

В этой главе мы рассмотрим строение, свойства и функции наиболее важных углеводов. Кроме того, мы остановимся на свойствах сложных соединений, образованных из углеводов и белков, а именно *гликопротеинов* и *протеогликанов*; у животных эти соединения служат необходимыми компонентами клеточных поверхностей и внеклеточных опорных систем.

11.1. Углеводы делятся на три класса в зависимости от числа остатков сахаров

Углеводы являются полигидроксиальдегидами или полигидроксикетонами либо образуют эти вещества в результате гидролиза. Происхождение названия «углеводы» связано с тем, что, судя по эмпирическим формулам, большинство веществ этого класса представляют собой соединения углерода с водой, поскольку соотношение между числом атомов углерода, водорода и кислорода в молекулах углеводов составляет 1 : 2 : 1. Так, эмпирическая формула D-глюкозы – $C_6H_{12}O_6$; по-другому ее можно записать как $(CH_2O)_6$ или $C_6(H_2O)_6$. Большинство распространенных углеводов имеют эмпирическую формулу $(CH_2O)_n$, однако существуют и углеводы, не удовлетворяющие этому соотношению, а некоторые из них содержат также атомы азота, фосфора или серы.

Различают три основных класса углеводов: *моносахариды*, *олигосахариды* и *полисахариды*. *Моносахариды*, или *простые сахара*, содержат только одну структурную единицу полигидроксиальдегида или полигидроксикетона. Среди природных моносахаридов наиболее распространена D-глюкоза, содержащая шесть атомов углерода.

Олигосахариды (греческое слово «олиго» значит «немного») состоят из коротких цепей, образованных моносаха-

ридными единицами, соединенными ковалентными связями. Наиболее часто встречаются *дисахариды*, состоящие из двух моносахаридных единиц. Типичный представитель дисахаридов – *сахароза*, или *тростниковый сахар*, молекулы которой содержат остатки двух шестиуглеродных сахаров – D-глюкозы и D-фруктозы, – соединенные ковалентной связью. Большинство олигосахаридов, содержащих три и более остатков, встречаются не в свободной форме, а в виде боковых цепей, присоединенных к полипептидам, входящим в состав *гликопротеинов* и *протеогликанов*, что будет рассмотрено несколько ниже.

Полисахариды представляют собой длинные цепи, образованные сотнями или тысячами моносахаридных единиц. Некоторые полисахариды, например *целлюлоза*, имеют линейные цепи, тогда как другие, например *гликоген*, – разветвленные. Наиболее распространенные в растительном мире углеводы – *крахмал* и *целлюлоза* – образованы из повторяющихся остатков D-глюкозы; различие между ними состоит лишь в способах связи остатков D-глюкозы между собой.

Названия всех обычных моносахаридов и дисахаридов имеют окончание *-оза*.

11.2. Существует два семейства моносахаридов: альдозы и кетозы

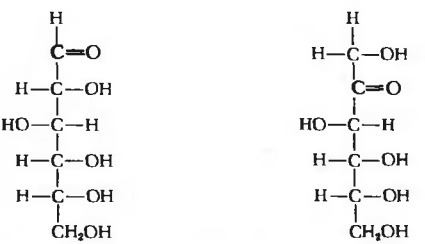
Моносахариды – бесцветные, твердые кристаллические вещества, которые легко растворяются в воде, но нерастворимы в неполярных растворителях. Как правило, они сладкого вкуса.

Как уже упоминалось выше, большинство моносахаридов имеет эмпирическую формулу $(CH_2O)_n$, где n равно или больше трех. Основу моносахаридов составляет неразветвленная цепочка углеродных атомов, соединенных между собой одинарными связями. Один из атомов углерода связан двойной связью с атомом кислорода, образуя карбонильную группу; ко всем остальным атомам углерода присоединены гидроксильные группы. Если карбонильная группа расположена в конце углеродной цепи, то моносахарид является *альдегидом* (разд. 3.4) и носит название *альдозы*; если карбонильная группа находится в любом другом положении, то моносахарид является *кетоном* (разд. 3.4) и носит название *кетозы*. К простейшим моносахаридам относятся две *триозы* (трехуглеродные сахара): альдоза *глицеральдегид* и кетоза *дигидроксиацетон* (рис. 11-1).

Моносахариды, углеродный скелет которых образуется из 4, 5, 6 или 7 атомов, называют соответственно *тетрозами*, *пентозами*, *гексозами* и *гептозами*. Каждый из таких моносахаридов может существовать в двух формах, образуя



Рис. 11-1. Две триозы. Карбонильные группы выделены красным цветом.



11-2. Две обычные гексозы (D-глюкоза и D-фруктоза).

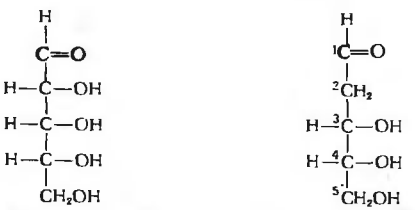


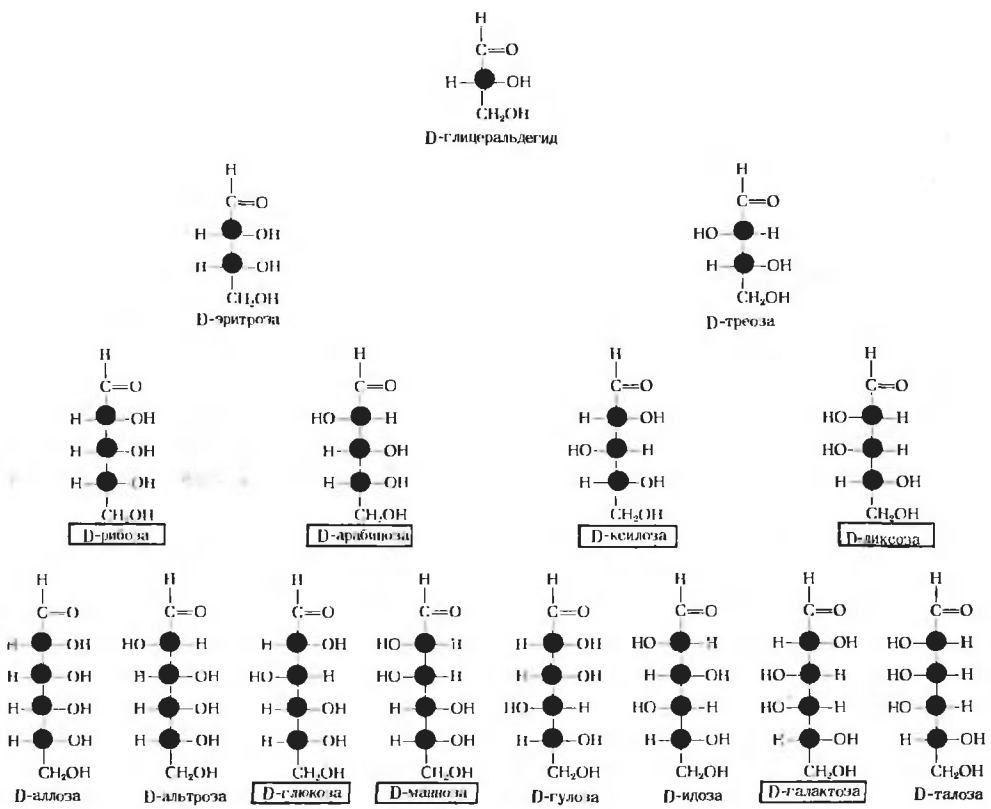
Рис. 11-3. Пентозные компоненты нуклеиновых кислот.

альдотетрозы и кетотетрозы, альдопентозы и кетопентозы, альдогексозы и кетогексозы и так далее. Наиболее широко распространены в природе гексозы, а именно альдогексоза D-глюкоза и кетогексоза D-фруктоза (рис. 11-2). Альдопентозы D-рибоза и 2-дезокси-D-рибоза (рис. 11-3) входят в состав нуклеиновых кислот.

11.3. Моносахариды обычно содержат несколько асимметрических центров

Все моносахариды, за исключением дигидроксиацетона, имеют один или несколько асимметрических, или хиральных (разд. 3.5), атомов углерода и, следовательно, могут встречаться в виде оптически активных изомеров. Простейшая альдоза глицеральдегид содержит только один асимметрический центр и, таким образом, может существовать в виде двух стереоизомеров, которые выглядят как несовместимые зеркальные отражения друг друга (разд. 5.3). Альдогексозы имеют четыре асимметрических центра и могут существовать в виде $2^n = 2^4$, т.е. 16 различных стереоизомеров. Среди них наиболее распространена глюкоза, а именно D-глюкоза. На рис. 11-4 показано строение всех стереоизомеров альдотриоз, альдотетроз, альдопентоз и альдогексоз D-ряда. Они изображены при помощи *проекционных формул* (см. рис. 5.4), на которых связи, выступающие вперед из плоскости листа, показаны горизонтальными линиями, а связи, направленные за плоскость листа, показаны

Рис. 11-4. Семейство D-альдоз, содержащих от трех до шести атомов углерода. Приведены обычные структурные формулы, где ковалентные связи показаны черточками. Названия наиболее распространенных альдоз обведены рамкой. Красным цветом выделены асимметрические атомы углерода.



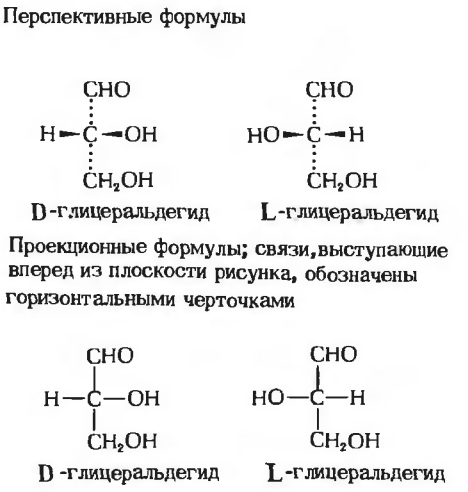


Рис. 11-5. Стереоизомеры глицеральдегида.

вертикальными линиями (рис. 11-5). В дальнейшем мы рассмотрим два других способа изображения пространственной структуры сахаров, а именно *проекции Хеуорса* и *конформационные формулы*.

Практически все природные моносахариды (за исключением дигидроксиацетона) обладают оптической активностью. Так, D-глюкоза в природе встречается в виде правовращающего изомера с удельной величиной вращения $[\alpha]_D^{20} = +52{,}7°$, а D-фруктоза – в виде левовращающего соединения ($[\alpha]_D^{20} = -92{,}4°$). Так же как и стереоизомерные формы аминокислот (гл. 5), все стереоизомеры моносахаридов определяют по отношению к выбранному в качестве стандарта веществу – глицеральдегиду, который имеет одну D-форму и одну L-форму (рис. 11-5). *Однако, поскольку многие альдозы имеют два или больше асимметрических центров, принято, что обозначения D и L указывают на конфигурацию асимметрического атома углерода, максимально удаленного от атома углерода карбонильной группы.* Если гидроксильная группа при наиболее удаленном асимметрическом атоме углерода располагается в проекционной формуле *справа*, то сахар относят к D-ряду, а если *слева*, то к L-ряду. В природе обнаружены практически все возможные D-альдозы (рис. 11-4), но из них наиболее важно запомнить пентозу *D-рибозу* и три *гексозы – D-глюкозу, D-маннозу* и *D-галактозу*.

Сходным образом можно изобразить строение всех D-кетоз, содержащих до 6 углеродных атомов; все они имеют одинаковую конфигурацию при наиболее удаленном от карбонильной группы асимметрическом атоме углерода. Название кетоз образуется путем введения суффикса -ул- в название соответствующей альдозы; так, например, альдопентозе D-рибозе соответствует кетопентоза D-рибулоза. Некоторые кетозы, например фруктоза, имеют тривиальные названия. Самые важные в биологическом отношении сахара – это кетопентоза *D-рибулоза*, кетогексоза *D-фруктоза* и кетогептоза *D-седогептулоза* (рис. 11-6). В природе иногда встречаются L-альдозы и L-кетозы, однако они мало распространены.

Два сахара, различающиеся по конфигурации вокруг только одного атома углерода, представляют собой эпимеры

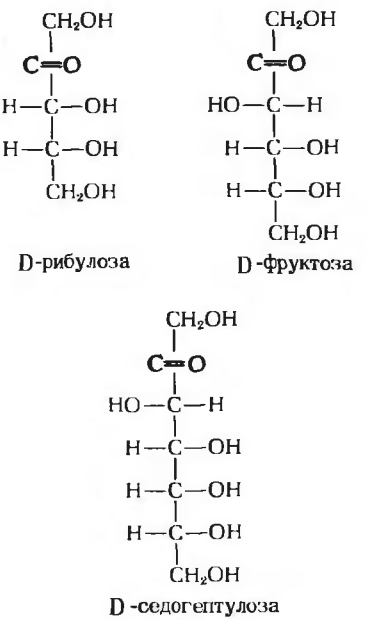


Рис. 11-6. Три наиболее важные кетозы.

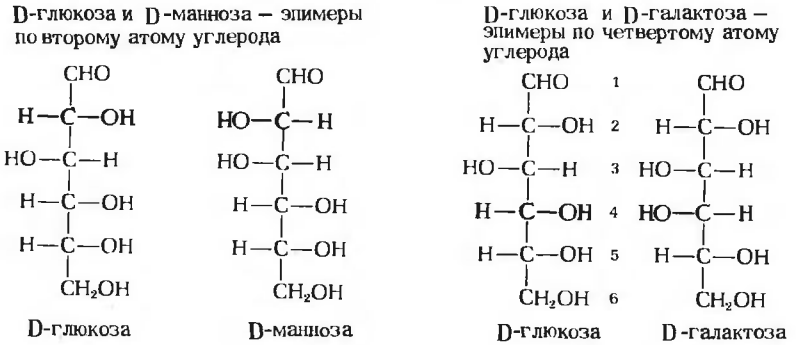


Рис. 11-7. Эпимеры D-глюкозы.

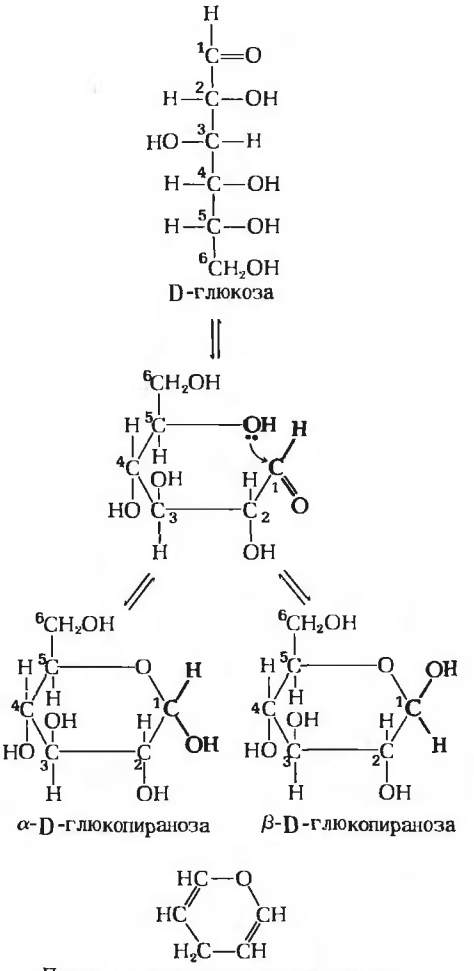
по отношению друг к другу. Так, D-глюкоза и D-манноза – эпимеры относительно 2-го углеродного атома, а D-глюкоза и D-галактоза – эпимеры относительно 4-го атома (рис. 11-7).

11.4. Типичные моносахариды имеют циклическую структуру

На рис. 11-1 – 11-4 и 11-6 строение различных альдоз и кетоз представлено в виде прямолинейных цепочек. Такая форма соответствует структуре лишь триоз и тетроз; что касается моносахаридов, скелет которых состоит из 5 и более атомов углерода, то в растворах они существуют в виде замкнутых циклических структур, причем карбонильная группа находится не в свободном состоянии, как это изображено на рисунках, а образует ковалентную связь с одной из гидроксильных групп, связанных с атомом углерода основной цепи. Одним из доказательств того, что D-глюкоза имеет замкнутую циклическую структуру, служит тот факт, что в кристаллическом виде это вещество существует в двух формах, несколько различающихся по свойствам. Если производят кристаллизацию D-глюкозы из воды, то образуется α-D-глюкоза с величиной удельного вращения (разд. 5.2) $[\alpha]_D^{20} = +112{,}2°$. Если же D-глюкозу кристаллизуют из пиридина, то образуется β-D-глюкоза, для которой $[\alpha]_D^{20} = +18{,}7°$. По химическому составу обе формы идентичны. На основе ряда химических данных был сделан вывод, что углеродные скелеты α- и β-изомеров D-глюкозы образуют два разных шестичленных кольца (рис. 11-8), а не прямолинейные цепочки. Такие циклические формы сахаров из-за их сходства с шестичленным циклическим соединением *пираном* получили название *пираноз*. Две циклические формы D-глюкозы называются α-*D-глюкопиранозой* и β-*D-глюкопиранозой* (рис. 11-8).

При растворении α-D-глюкозы в воде ее удельное вращение постепенно меняется во времени, достигая в конце концов стабильного значения 52,7°; в аналогичных условиях удельное вращение и β-D-глюкозы достигает того же значения. Это изменение оптической активности, получившее название *мутаротации*, обусловлено тем, что как α-, так и β-D-глюкоза образуют при 25°C равновесную смесь, состоящую примерно на $^1/_3$ из α-D-глюкозы и на $^2/_3$ из β-D-глюкозы и содержащую лишь очень небольшое количество незамкнутой формы. Из этих экспериментов следует, что α- и β-изомеры D-глюкозы в водном растворе могут превращаться друг в друга.

Формирование пиранозного кольца в молекуле D-глюкозы обусловлено протеканием обычной реакции между альдегидной и гидроксильной группами, приводящей к образованию *полуацеталя* (рис. 11-9). Полуацетали содержат асимметрический атом углерода и потому могут существовать в двух стереоизомерных формах. D-глюкопираноза – это *внутримолекулярный* полуацеталь: он образуется в результате взаимодействия свободной гидроксильной группы при пятом атоме углерода с альдегидобразующим первым углеродным атомом,



Пиран – родоначальник ряда пираноз

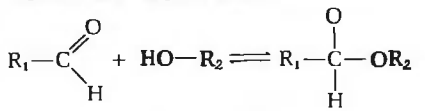
Рис. 11-8. Образование двух форм D-глюкопиранозы. Когда между альдегидной группой при C1 и гидроксильной группой при C5 формируется полуацетальная связь, из-за асимметрии атома C1 могут образовываться два стереоизомера, обозначаемые буквами α и β.

который в результате становится асимметричным. D-глюкопираноза может существовать, таким образом, в виде двух стереоизомеров, для обозначения которых используют буквы α и β (рис. 11-8). В итоге при циклизации число асимметрических центров в молекуле D-глюкозы оказывается на один больше по сравнению с тем числом, которое предусматривает формула в виде прямой цепочки. *Изомерные формы моносахаридов, отличающиеся друг от друга только конфигурацией полуацетального углеродного атома, такие, как α-D-глюкоза и β-D-глюкоза, называются аномерами.* Полуацетальный, или карбонильный, атом углерода называется *аномерным углеродом*. Устойчивые пиранозные кольца могут образовывать только альдозы, содержащие пять или более атомов углерода. Альдогексозы также существуют в виде циклических соединений с пятичленными кольцами. Из-за сходства таких колец с пятичленным циклическим соединением *фураном* их называют *фуранозами* (рис. 11-10). Однако шестичленное альдопиранозное кольцо намного более устойчиво, чем альдофуранозное, и потому в растворах альдогексоз преобладает альдопиранозная форма.

Кетогексозы также существуют в виде α- и β-аномеров. В этих соединениях гидроксильная группа пятого атома углерода взаимодействует с карбонильной группой второго атома углерода, образуя пятичленное фуранозное кольцо с *полукетальной* связью (рис. 11-9). D-фруктоза образует две фуранозы (рис. 11-10), из которых чаще встречается β-*D-фруктофураноза.*

Для изображения циклических форм моносахаридов обычно пользуются *проекционными формулами Хеуорса.* В таких формулах часть кольца, расположенную

Образование полуацеталя



Образование полукеталя

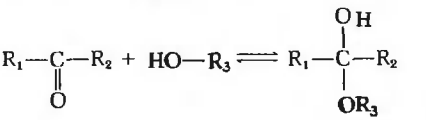


Рис. 11-9. Альдегиды и кетоны могут взаимодействовать со спиртами, образуя полуацетали и полукетали. В этих реакциях атом углерода карбонильной группы становится асимметричным.

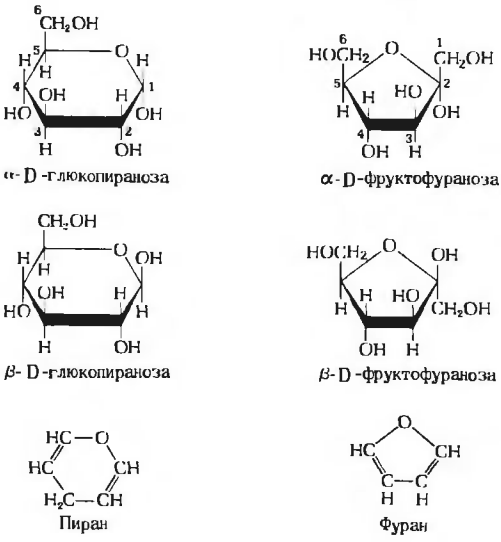


Рис. 11-10. Пиранозные формы D-глюкозы и фуранозные формы D-фруктозы, изображенные с помощью проекционных формул Хеуорса.

тельной мере особенностями конформации образующих их простых шестиатомных сахаров.

11.5. Простые моносахариды могут служить восстановителями

Моносахариды легко восстанавливают такие окислители, как феррицианид, перекись водорода или ионы двухвалентной меди (Cu^{2+}). В этих реакциях окисляется карбонильная группа сахаров и восстанавливается окислитель. (Напомним, что восстановителями называют доноры электронов, а окислителями – акцепторы электронов.) Глюкозу и другие сахара, способные восстанавливать окислители, называют *восстанавливающими (редуцирующими) сахарами*. Это свойство используют при анализе сахаров. Измеряя количество окислителя, восстановленное раствором сахара , можно вы-

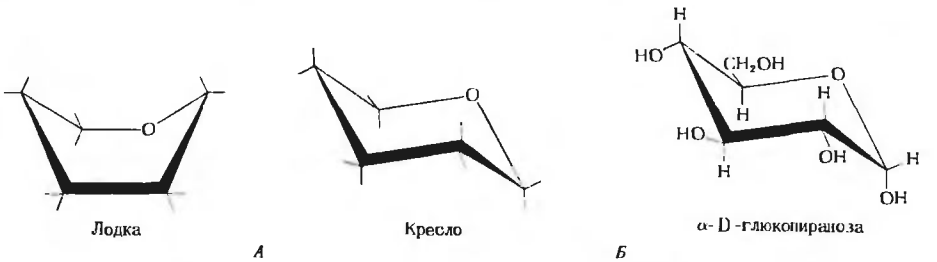


Рис. 11-11. *А*. Две изомерные формы пиранозного кольца (лодка и кресло), изображенные при помощи конформационных формул. *Б*. Конформационная формула α-D-глюкопиранозы, имеющей конформацию кресла.

ближе к читателю, изображают жирными линиями (рис. 11-10). Следует иметь в виду, что в действительности шестичленное пиранозное кольцо не лежит в одной плоскости, как это кажется при использовании проекции Хеуорса. У большинства сахаров оно имеет форму *кресла*, а у некоторых – форму *лодки*; эти конформации изображаются при помощи *конформационных формул* (рис. 11-11). Как мы увидим дальше, биологические свойства и функции многих полисахаридов определяются в значительной мере числить концентрацию сахара. Этим способом определяют содержание глюкозы в крови и моче при диагностике *сахарного диабета*, характеризующегося значительным увеличением уровня глюкозы в крови и выведением избытка ее с мочой.

11.6. Дисахариды содержат две моносахаридные единицы

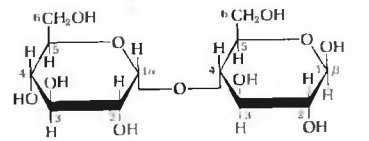
Дисахариды состоят из двух ковалентно связанных друг с другом моносахаридов. У большинства дисахаридов химическая связь между моносахаридными единицами называется *гликозидной связью*; она образуется в результате взаимодействия гидроксильной группы одного из сахаров с аномерным атомом угле-

рода второго сахара. Гликозидные связи легко гидролизуются кислотами, но устойчивы к действию оснований. Поэтому дисахариды можно гидролизовать и получить в свободном виде их моносахаридные компоненты путем кипячения в разбавленной кислоте.

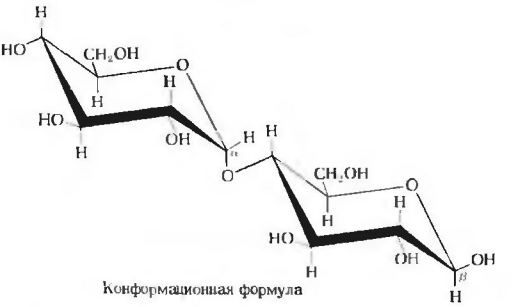
Дисахариды, так же как и моносахариды, широко распространены в природе; наиболее часто встречаются *сахароза*, *лактоза* и *мальтоза* (рис. 11-12). Простейший дисахарид – *мальтоза* – содержит два остатка D-глюкозы, соединенных гликозидной связью между первым атомом углерода (аномерным углеродом) одного остатка глюкозы и четвертым атомом углерода второго остатка (рис. 11-12). Аномерный атом углерода в гликозидной связи между двумя остатками D-глюкозы имеет α-конфигурацию, соответственно эта связь обозначается как α(1 → 4). В этом обозначении первая цифра, или локант, указывает на моносахаридный остаток с аномерным углеродом. Оба остатка глюкозы в молекуле мальтозы находятся в пиранозной форме. Мальтоза относится к восстанавливающим сахарам, поскольку она содержит одну потенциально свободную карбонильную группу, которая может быть окислена. Второй остаток глюкозы в молекуле мальтозы может существовать как в α-, так и в β-форме; α-форма образуется при действии на крахмал (разд. 24.1, а) содержащегося в слюне фермента – *амилазы*. Под действием секретируемого слизистой кишечника фермента мальтазы, специфически гидролизующего α(1 → 4)-связь, мальтоза подвергается гидролизу с образованием двух молекул D-глюкозы. Дисахарид *целлобиоза* также содержит два остатка D-глюкозы, но они соединены друг с другом β(1 → 4)-связью.

Дисахарид *лактоза* (рис. 11-12), при гидролизе которой образуется D-галактоза и D-глюкоза, присутствует только в молоке. Наличие в молекуле лактозы потенциально свободной карбонильной группы (в остатке глюкозы) делает ее восстанавливающим дисахаридом. В процессе переваривания пищи лактоза подвергается ферментативному гидролизу в результате воздействия *лактазы*, секретируемой мукозными клетками кишечника. У грудных младенцев активность этого фермента очень высока, однако в кишечнике взрослых людей лактазная активность наблюдается лишь у жителей севера Европы и некоторых африканских племен. У большинства взрослых людей, в том числе у жителей Востока, арабов, евреев, многих африканцев, индийцев и жителей Средиземноморья, лактазная активность в кишечнике очень низка, что часто приводит к *непереносимости (интолерантности)*

Мальтоза (β-форма) [O-α-D-глюкопиранозил-(1 → 4)-β-D-глюкопираноза]

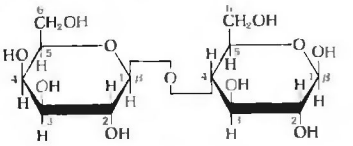


Проекционная формула Хеуорса



Конформационная формула

Лактоза (β-форма) [O-β-D-галактопиранозил-(1 → 4)-β-D-глюкопираноза]



Сахароза [O-β-D-фруктофуранозил-(2 → 1)-α-D-глюкопиранозид]

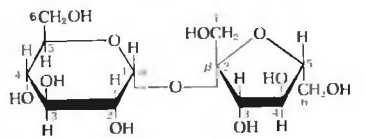


Рис. 11-12. Важнейшие дисахариды. Структура мальтозы показана как при помощи проекции Хеуорса, так и в виде конформационной формулы.

лактозы. Описанная особенность обусловлена генетически. Причина непереносимости лактозы связана с тем, что этот дисахарид может всасываться в кишечнике только после гидролиза на моносахаридные компоненты: при низкой лактазной активности неусвоенная лактоза накапливается в кишечнике; в результате после потребления молока у человека с непереносимостью лактозы возникает тяжелый понос и боли в животе. Непереносимость лактозы не следует путать с генетическим заболеванием – *галактоземией* (разд. 15.9).

Сахароза, или тростниковый сахар,— дисахарид, состоящий из глюкозы и фруктозы. Сахарозу синтезируют многие растения, у высших же животных она отсутствует. В отличие от мальтозы и лактозы у сахарозы нет свободного аномерного атома углерода, поскольку оба аномерных атома моносахаридных остатков связаны друг с другом (рис. 11-12); поэтому сахароза не является восстанавливающим сахаром. В биохимии растений этот дисахарид – своего рода загадка. Дело в том, что если D-глюкоза служит основным строительным блоком как крахмала, так и целлюлозы, то сахароза – основной промежуточный продукт фотосинтеза. У многих растений именно в форме сахарозы транспортируются по сосудистой системе сахара из листьев к другим частям растения. Преимущество сахарозы перед глюкозой как транспортной формы сахаров заключается, вероятно, в том, что ее аномерные атомы углерода связаны друг с другом: это предохраняет сахарозу от атаки окислительных или гидролитических ферментов в процессе ее переноса из одной части растений в другую.

Животные не могут усваивать сахарозу как таковую, однако она становится доступной для усвоения после воздействия фермента *сахаразы* (другое его название – *инвертаза*), локализованного в клетках, выстилающих тонкий кишечник (см. рис. 24-2). Этот фермент катализирует расщепление сахарозы на D-глюкозу и D-фруктозу, которые легко проникают в кровоток.

Таблица 11-1. Сладость некоторых сахаров и сахарина

Сахар	Относительная сладость	Сахар	Относительная сладость
Сахароза	100	Мальтоза	30
Глюкоза	70	Лактоза	16
Фруктоза	170	Сахарин	40 000

Сахароза обладает наибольшей сладостью по сравнению с другими дисахаридами и глюкозой (табл. 11-1). Из-за постоянно возрастающей стоимости ввозимого в США тростникового сахара, сырьем для которого служит сахарный тростник и сахарная свекла, а также благодаря доступности в США больших количеств D-глюкозы, получаемой путем гидролиза кукурузного крахмала, в последнее время была предложена новая промышленная технология, позволяющая получать продукт, обладающий более сладким вкусом, чем глюкоза. По этой технологии крахмал сначала гидролизуют с образованием кукурузного сиропа – концентрированного нейтрального раствора D-глюкозы; далее полученный раствор пропускают через большую колонку, заполненную инертным носителем, к которому ковалентно пришит выделенный из растений фермент *глюкозоизомераза*. Этот иммобилизованный на инертном носителе фермент катализирует обратимую реакцию:

$$\text{D-глюкоза} \rightleftharpoons \text{D-фруктоза}.$$

В результате этой реакции кукурузный сироп превращается в эквимолярную смесь D-глюкозы и D-фруктозы. Поскольку D-фруктоза примерно в 2,5 раза слаще D-глюкозы (табл. 11-1), степень сладости сиропа после такой обработки существенно возрастает. Этот продукт оказывается значительно дешевле сахарозы, обладая при этом такой же питательной ценностью. Сейчас он все шире используется в пищевой промышленности, при производстве безалкогольных напитков и мороженого. Недавно в продажу поступил новый продукт, содержащий 90% фруктозы и получаемый также путем изомеразной реакции; его можно

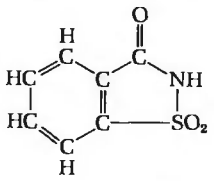


Рис. 11-13. Сахарин – неусваиваемое сладкое на вкус искусственное вещество.

использовать для замены обычного пищевого сахара, однако стóит он в два раза дороже сахарозы. Поскольку фруктоза значительно слаще сахарозы, этот продукт можно потреблять в значительно меньших количествах, чем сахарозу; следовательно, его использование уменьшает количество усваиваемых калорий. С другой стороны, по питательной ценности фруктоза не отличается от сахарозы, и поэтому более высокую стоимость нового продукта нельзя считать оправданной.

Главным образом для людей, страдающих ожирением и диабетом, которым вредно избыточное употребление сахара, были получены искусственные сладкие вещества, не обладающие питательной ценностью. Эти искусственные сладости стимулируют те же вкусовые рецепторы на языке, что и природные сахара, но не усваиваются организмом (см. гл. 26). Наиболее широкое распространение из таких веществ получил *сахарин* (рис. 11-13), который в 400 раз слаще сахарозы.

11.7. Полисахариды содержат большое число моносахаридных остатков

В природе большинство углеводов представлено в виде полисахаридов с высокой молекулярной массой. Биологическое значение ряда полисахаридов состоит в том, что они обеспечивают накопление моносахаридов, другие же служат структурными элементами клеточных стенок и соединительной ткани. При полном гидролизе под действием кислоты или специфических ферментов полисахариды расщепляются с образованием моносахаридов или их производных.

Полисахариды, называемые также *гликанами*, отличаются друг от друга как природой составляющих их моносахаридных остатков, так и длиной и степенью разветвленности цепей. Их можно разделить на два типа: *гомополисахариды*, состоящие из остатков одного и того же моносахарида, и *гетерополисахариды*, содержащие остатки двух или большего числа моносахаридов. Пример гомополисахарида – резервный углевод *крахмал*, состоящий из остатков только D-глюкозы. Примером гетерополисахарида может служить содержащаяся в соединительной ткани *гиалуроновая кислота*, которая состоит из чередующихся остатков двух разных моносахаридов. В отличие от белков полисахариды нельзя характеризовать строго определенной молекулярной массой: как правило, они представлены смесями высокомолекулярных соединений; в зависимости от метаболических потребностей клеток моносахаридные остатки могут ферментативно присоединяться к полисахаридам или же отщепляться от них.

11.8. Некоторые полисахариды представляют собой форму запасания «клеточного топлива»

Наиболее важный резервный полисахарид в клетках растений – *крахмал*, а в клетках животных – *гликоген*. И крахмал, и гликоген содержатся внутри клеток в виде крупных кластеров, или гранул (рис. 11-14). Молекулы крахмала и гликогена имеют много экспонированных гидроксильных групп и поэтому сильно гидратированы. При экстрагировании крахмала и гликогена из гранул горячей водой образуются мутные коллоидные растворы или взвеси.

Наиболее богаты *крахмалом* клубни (например, картофеля) и семена (особенно кукурузы), однако способностью синтезировать крахмал обладают почти все клетки растений (рис. 11-14). Крахмал представляет собой смесь двух полимеров глюкозы: *α-амилозы* и *амилопектина*. Первый из них состоит из длинных, неразветвленных цепей остатков D-глюкозы, соединенных друг с другом α(1 →

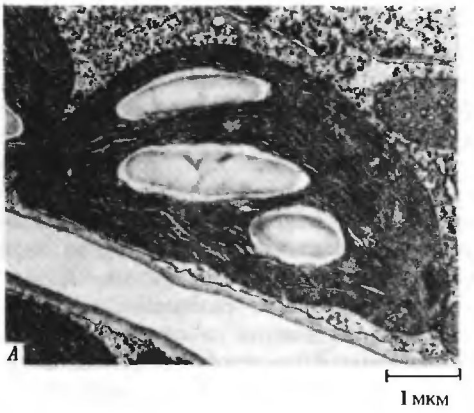
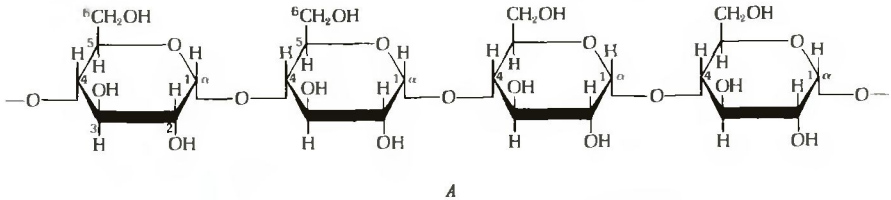


Рис. 11-14. Крахмал и гликоген запасаются в виде гранул в клетках соответственно растений и животных. А. Крупные гранулы крахмала в единичном хлоропласте. В клетках листьев большинства растений крахмал образуется из D-глюкозы, синтезированной в процессе фотосинтеза. *Б.* Электронная микрофотография гранул гликогена в клетке печени хомяка. Эти гранулы намного мельче, чем гранулы крахмала, изображенные на соседнем рисунке.

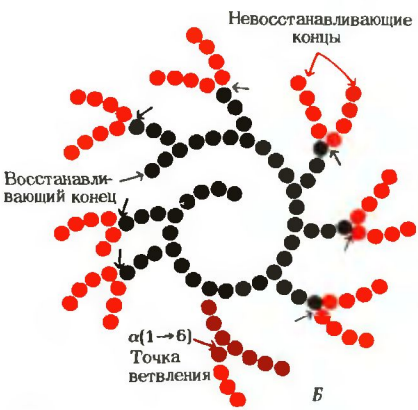
→4)-связями. Молекулярная масса таких цепей колеблется от нескольких тысяч до 500 000. Амилопектин также имеет высокую молекулярную массу, но в отличие от α-амилозы его цепи сильно разветвлены (рис. 11-15). В неразветвленных участках амилопектина остатки глюкозы соединены друг с другом связями α(1→4), а в участках ветвления цепи – связями (1→6). При варке картофеля происходит экстракция амилозы горячей водой, в результате чего вода начинает опалесцировать и приобретает молочный оттенок. В вареном картофеле основную часть крахмала составляет оставшийся амилопектин.

Гликоген – основной резервный полисахарид в клетках животных, т.е. его роль аналогична роли крахмала в клетках растений. Подобно амилопектину, гликоген – разветвленный полисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных друг с другом α(1→4)-связями, но по сравнению с амилопектином он значительно более разветвлен и компактен. В местах ветвления образуются α(1→→6)-связи. В наибольшем количестве гликоген содержится в печени, где на его долю приходится до 7% общего веса органа; гликоген имеется также в скелетных мышцах. В клетках печени гликоген присутствует в виде крупных гранул, состоящих в свою очередь из меньших гранул; последние образованы единичными сильно разветвленными молекулами гликогена со средней молекулярной массой в несколько миллионов (рис. 11-14). С этими же гранулами прочно связаны ферменты, ответственные за синтез и распад гликогена.

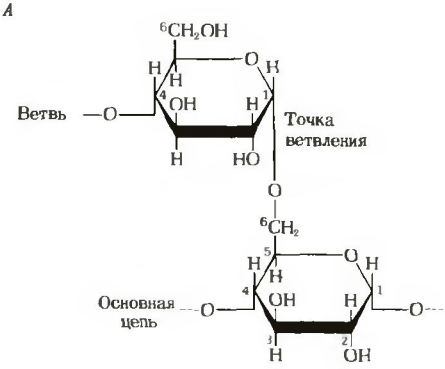
В желудочно-кишечном тракте гликоген и крахмал расщепляются *амилазами*. Слюна и секрет поджелудочной железы содержат α-амилазы, гидролизующие α(1→4)-связи в расположенных снаружи ветвях гликогена и амилопектина; при этом высвобождается D-глюкоза, небольшое количество мальтозы и остается устойчивое по отношению к амилазам «ядро», которое называют *остаточным декстрином* (рис. 11-15). Декстрины – липкие вещества: они составляют основу для приготовления различных клеев. α-Амилаза не способна атаковать α(1→6)-связи в точках ветвления и потому не гидролизует остаточный декстрин; это делает специальный фермент – *α(1→6)-глюкозидаза*. После гидролиза α(1→6)-связей этим ферментом для действия α-амилазы становится доступной еще одна группа α(1→4)-связей. После их расщепления обнажается следующий набор точек ветвления, которые подвергаются новой атаке α(1→6)-глюкозидазы. Так, в результате совместного действия α-амилазы и α(1→6)-глюкозидазы



А



Б



В

Рис. 11-15. Полисахариды крахмала амилоза и амилопектин. *А*. Амилоза – линейный полимер, состоящий из остатков D-глюкозы, связанных друг с другом α(1→4)-связью. *Б*. Амилопектин. Каждый кружок соответствует остатку глюкозы. Красными кружками обозначены остатки глюкозы внешних цепей, отщепляемые под действием α-амилазы. Черными кружками показано строение остаточного декстрина, образующегося после отщепления α-амилазой всех внешних остатков глюкозы. Связи α(1→6) в местах ветвления цепей (показаны маленькими стрелками) расщепляются α(1→6)-глюкозидазой, после чего для амилазы становится доступным новый набор α(1→4)-связей. Гликоген имеет сходное строение, но его молекула более компактна и сильнее разветвлена. *В*. Строение точки ветвления цепи.

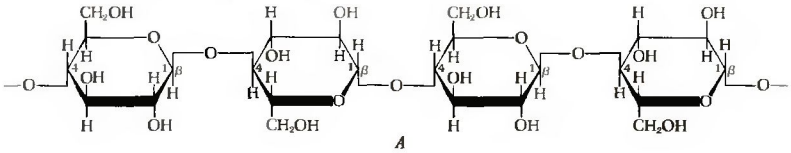
гликоген и амилопектин полностью расщепляются с образованием глюкозы и небольших количеств мальтозы. В клетках животных, однако, гликоген расщепляется под действием другого фермента, а именно *гликогенфосфорилазы*, которая расщепляет гликоген с образованием не глюкозы, а глюкозо-1-фосфата (разд. 15.8 и 20.14).

Содержащийся в солоде фермент β-амилаза отличается от α-амилазы тем, что гидролизует α(1→4)-связи не подряд, а через одну, с образованием главным образом мальтозы и лишь небольших количеств глюкозы. Следует иметь в виду, что индексы α и β в названиях амилаз не имеют никакого отношения к индексам α и β в обозначениях гликозидных связей, а используются просто для различения двух типов амилаз.

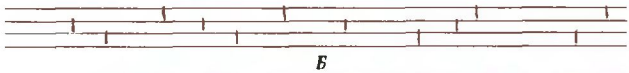
11.9. Целлюлоза – наиболее распространенный структурный полисахарид

Многие полисахариды служат внеклеточными опорными элементами в стенках клеток одноклеточных микроорганизмов и высших растений, а также на внешней поверхности клеток животных. Другие полисахариды входят в состав соединительной ткани позвоночных и экзоскелета членистоногих. Структурные полисахариды защищают клетки, ткани и органы, придают им форму и поддерживают ее.

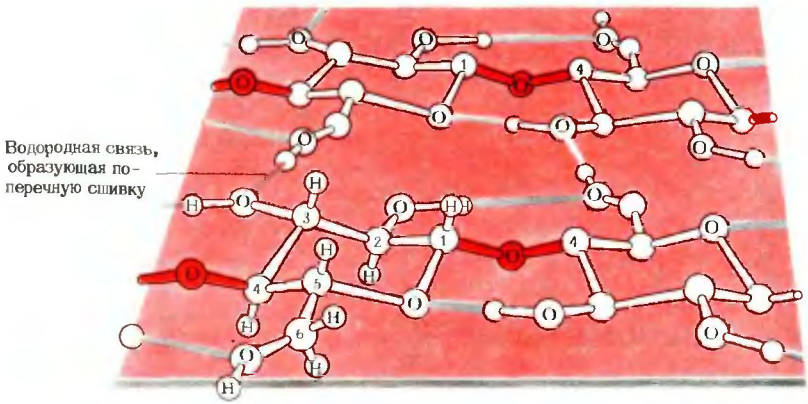
Существует большое число различных структурных полисахаридов. На примере одного из них, а именно *целлюлозы*, мы увидим, как специфическая молекулярная организация вещества может быть приспособлена для выполнения определенной биологической функции. Целлюлоза – прочное, волокнистое, водонераство-



А



Б



В



Рис. 11-16. Строение целлюлозы и различные конформации β(1 → 4)-связей в цепях целлюлозы, а также α(1 → 4)-связей в цепях крахмала и гликогена. *А*. Цепь целлюлозы: остатки D-глюкозы соединены друг с другом β(1 → 4)-связью. *Б*. Схематическое изображение параллельно расположенных полимерных цепей целлюлозы, соединенных водородными связями (выделены цветом). *В*. Изображение (с соблюдением масштаба) двух участков параллельных цепей, показывающее истинное расположение остатков D-глюкозы и поперечных сшивок, образованных водородными связями. *Г*. Изображение (с соблюдением масштаба) участка молекулы амилозы. Благодаря α(1 → 4)-связям полимерные цепи в молекулах амилозы, амилопектина и гликогена приобретают сильно спирализованную компактную структуру, в которой многие гидроксильные группы обращены наружу.

римое вещество – содержится в стенках клеток растений, главным образом в ветвях, стеблях, а также в стволах и других деревянистых частях растений. Древесина состоит в основном из целлюлозы и других полимерных веществ, хлопок – почти целиком из целлюлозы. Если наиболее распространенные *внутриклеточные* биополимеры – это белки (разд. 3.6), то целлюлоза, бесспорно, это не только самый распространенный внеклеточный структурный полисахарид в растительном мире, но и вообще самый распространенный в природе биополимер.

Целлюлоза является линейным, неразветвленным гомополисахаридом, состоящим из 10 000 и более остатков D-глюкозы, связанных друг с другом (1 → → 4)-гликозидными связями; в этом отношении она сходна с амилозой и линейными участками цепей гликогена. Но между этими полисахаридами существует одно очень важное различие: в целлюлозе (1 → 4)-связи имеют β-конфигурацию, а в амилозе, амилопектине и гликогене – α-конфигурацию. Это, казалось бы, незначительное различие в строении целлюлозы и амилозы приводит к весьма существенным различиям в их свойствах (рис. 11-16). Благодаря геометрическим особенностям α(1 → → 4)-связей линейные участки полимерных цепей в молекулах гликогена и крахмала стремятся принять скрученную, спиральную конформацию, что способствует образованию плотных гранул, которые и обнаруживаются в большинстве животных и растительных клеток. α(1 → 4)-связи гликогена и крахмала легко гидролизуются α-амилазой желудочно-кишечного тракта позвоночных, а образующаяся при этом D-глюкоза попадает в кровь и далее используется в энергетическом обмене. Что касается целлюлозы, то из-за β-конфигурации связей ее полимерные цепи сильно вытянуты и соединяются друг с другом бок о бок, образуя длинные нерастворимые фибриллы (рис. 11-16). Связи β(1 → 4) в молекуле целлюлозы не гидролизуются α-амилазами. Поскольку в кишечнике позвоночных нет фермента, способного гидролизовать целлюлозу, она не переваривается и ее D-глюкозные остатки не могут служить пищей для большинства высших организмов. Целлюлозу хорошо переваривают термиты, но лишь потому, что в их кишечнике живут паразитические микроорганизмы *Trichonympha* (рис. 11-17), секретирующие целлюлазу, – гидролизующий целлюлозу фермент, с помощью которого и происходит переваривание древесины у термитов. Целлюлазу синтезируют также некоторые бактерии и грибы, вызывающие гниение древесины.

Среди позвоночных только крупный рогатый скот и другие жвачные (овцы, козы, верблюды, жирафы и т. д.) могут использовать целлюлозу в качестве пищи. Однако делают они это весьма необычным способом. Большая часть кишечника, составляющая 15% общего веса коровы, приходится на долю четырех последовательно соединенных друг с другом желудков. Первые два из них составляют так называемый *рубец*. Содержа-



Рис. 11-17. Две клетки *Trichonympha*. Эти простейшие живут в кишечнике термитов и секретируют целлюлазу. Не будь этих паразитов, термиты не смогли бы переваривать целлюлозу.

щиеся в нем микроорганизмы секретируют целлюлазу и расщепляют целлюлозу до D-глюкозы, которую далее сбраживают до короткоцепочечных жирных кислот (см. гл. 12), двуокиси углерода и газообразного метана (CH_4). Образовавшиеся жирные кислоты всасываются в кровоток коровы, проникают в ткани и используются как топливо. Метан и CO_2, которые вырабатываются со скоростью 2 л/мин, постоянно выводятся посредством непроизвольного процесса, напоминающего едва уловимую на слух отрыжку. В остальных двух желудках жвачных микроорганизмы, сделавшие свое дело, перевариваются ферментами, секретируемыми слизистой желудка; при этом образуются аминокислоты, сахара и другие продукты, которые всасываются и используются в организме коровы в качестве питательных веществ. Таким образом, между коровой и населяющими ее рубец микроорганизмами устанавливаются отношения симбиоза, при котором микроорганизмы получают возможность насладиться короткой, но счастливой жизнью в удобной и теплой среде; при этом целлюлоза из клевера и другой травы служит основным источником топлива и для «жильцов», и для организма-хозяина. Ежегодно огромные количества целлюлозы синтезируются растениями, причем не только растущими в лесах деревьями, но и культурными растениями. Расчеты показывают, что на долю каждого живущего на Земле человека растения ежедневно нарабатывают приблизительно 50 кг целлюлозы. Целлюлоза находит широкое применение в промышленности. Древесина, хлопок, бумага и картон почти полностью состоят из целлюлозы. Целлюлоза используется также для получения искусственного шелка, изоляционных, строительных и упаковочных материалов.

Прочные нерастворимые панцири, или экзоскелеты, омаров, крабов, а также многих насекомых построены в основном из полисахарида *хитина* – линейного полимера, образованного остатками *N-ацетил-D-глюкозамина*, которые соединяются друг с другом β-связями

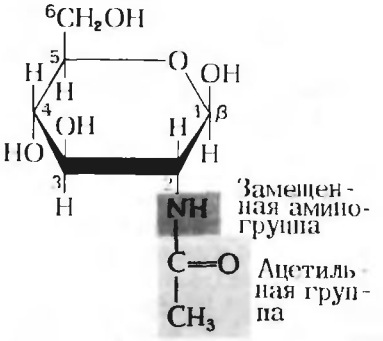


Рис. 11-18. N-ацетил-D-глюкозамин – важный строительный блок хитина и многих других структурных полисахаридов. В молекуле аминосахара D-глюкозамина ко второму атому углерода вместо гидроксильной группы присоединена аминогруппа (выделена красным цветом).

(рис. 11-18). Хитиновый каркас у омаров и крабов усилен за счет включений карбоната кальция.

11.10. Клеточные стенки содержат в больших количествах структурные и защитные полисахариды

Большинство клеток растений окружены жесткой и очень прочной полисахаридной оболочкой, которую можно сравнить с пластиком, армированным стекловолокном. Каркас клеточных стенок растений состоит из перекрещивающихся слоев длинных, вытянутых целлюлозных волокон, прочность которых превышает прочность стальной проволоки того же диаметра (рис. 11-19). Волокнистый каркас усилен похожим на цемент матриксом, образованным из структурных полисахаридов другого типа и из полимерного вещества *лигнина*. Очень толстые клеточные стенки древесины в стволах деревьев позволяют им выдерживать чрезвычайно большие нагрузки (рис. 11-19). Клеточная стенка бактерий (рис. 11-20) располагается снаружи по отношению к клеточной мембране, образуя вокруг клетки жесткую пористую оболочку. Она физически защищает нежную клеточную мембрану и цитоплазму клетки. Структурной основой клеточных сте-



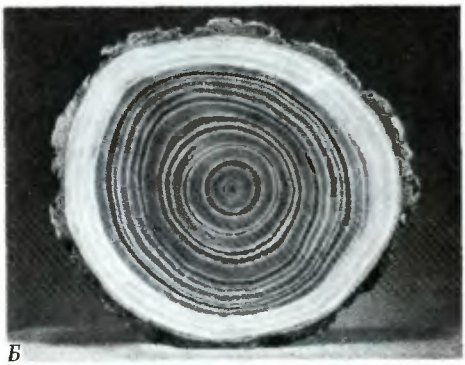
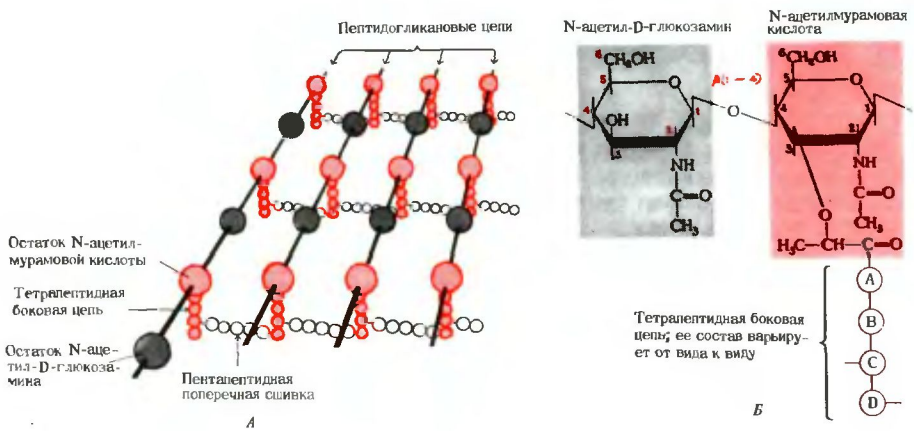


Рис. 11-19. Целлюлоза – главный компонент клеточных стенок растений. *А*. Электронная микрофотография клеточной стенки водоросли (*Chaetomorpha*). Клеточная стенка состоит из перекрещивающихся слоев волокон целлюлозы, импрегнированных цементирующими полимерными веществами. *Б*. Поперечный срез ствола дерева (псевдоакации), на котором отчетливо видны годичные кольца роста. Древесина, образовавшаяся весной, содержит крупные клетки с тонкими стенками; в древесине, образовавшейся позднее, клетки мельче, зато содержится больше слоев целлюлозных волокон. Светлая древесина вокруг стволового канала – заболонь.

нок большинства бактерий служит пронизанный поперечными ковалентными связями каркас, который почти целиком окружает клетку. Он состоит из длинных, параллельно расположенных полисахаридных цепей, связанных между собой через определенные интервалы поперечными сшивками из коротких полипептидных цепочек. Полисахаридные цепи состоят из чередующихся моносахаридных остатков *N-ацетил-D-глюкозамина* (рис. 11-18) и *N-ацетилмурамовой кислоты* (сложного девятиатомного сахара), соединенных друг с другом β(1→4)-связями (рис. 11-20). К каждому остатку N-ацетилмурамовой кислоты присоединена боковая тетрапептидная цепочка. Параллельные полисахаридные цепи сшиваются короткими поперечными полипептидными цепочками, структура которых различна у разных видов бактерий. У гноеродных бактерий

Рис. 11-20. *А*. Схематическое изображение пептидогликана клеточной стенки грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*. *Б*. Строение повторяющейся дисахаридной единицы в скелете пептидогликана.



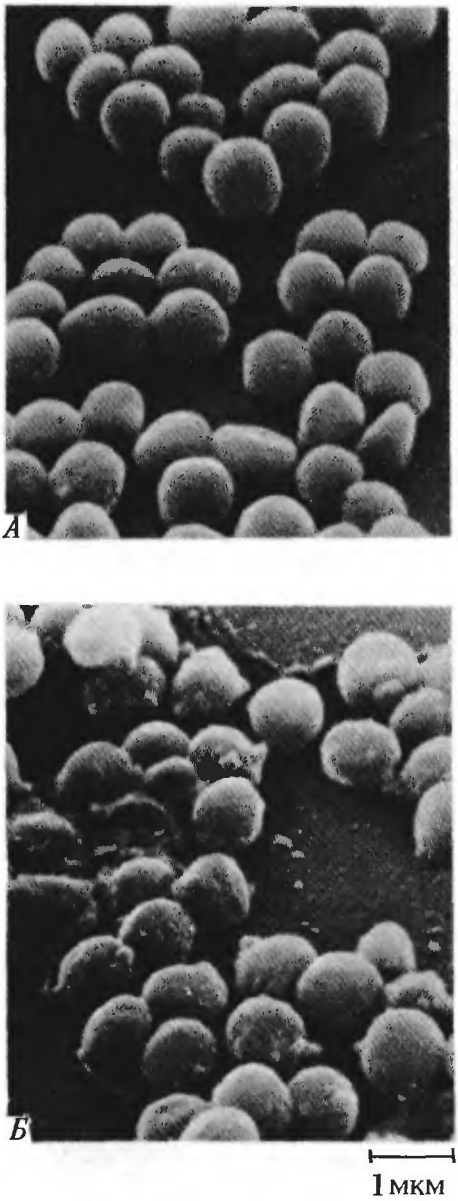


Рис. 11-21. Действие пенициллина на клетки *Staphylococcus aureus*. *А*. Клетки до обработки пенициллином. *Б*. В результате воздействия пенициллина нарушается целостность клеточных стенок, и они лопаются.

Staphylococcus aureus, вызывающих развитие фурункулов и нагноение ран, остатки ацетилмурамовой кислоты в соседних полисахаридных цепях связаны друг с другом пептидными цепочками, состоящими из пяти остатков глицина. Вся эта скрепленная поперечными связями структура, окружающая клетку, называется *муреином* (от латинского слова murus – стенка) или *пептидогликаном*; второе название подчеркивает гибридную природу данной структуры, представляющей собой сочетание пептидных и полисахаридных элементов. Тянущийся непрерывно вдоль всей поверхности бактериальной клетки пептидогликан можно рассматривать как одну гигантскую мешковидную молекулу. У грамположительных бактерий (дающих окраску по Граму, т.е. при обработке красителем кристаллическим фиолетовым) пептидогликан образует вокруг клетки несколько концентрических слоев, пронизываемых другими макромолекулярными компонентами. У грамотрицательных бактерий, например у *E. coli*, пептидогликановый каркас покрыт богатой липидами внешней оболочкой, содержащей гидрофобные белки (см. гл. 12). Целостность клеточных стенок имеет жизненно важное значение для защиты, роста и деления бактерий. Действие *пенициллина* – одного из наиболее ценных антибиотиков, используемых для борьбы с бактериальными инфекциями, основано на том, что он подавляет последний этап ферментативного синтеза пептидогликанов у чувствительных к нему микроорганизмов; это приводит к формированию неполноценных клеточных стенок и подавлению роста бактерий (рис. 11-21).

11.11. Гликопротеины – гибридные молекулы

Гликопротеины – это белки, которые содержат ковалентно присоединенные углеводы – отдельные моносахариды или сравнительно короткие олигосахариды. Углеводная часть в молекуле гликопротеина может составлять менее 1%, а может достигать и 30% и более. Некоторые гликопротеины содержат одну или несколько углеводных групп, другие – большое число линейных или разветвленных олигосахаридных цепей (рис. 11-22). Почти все белки на внешней поверхности животных клеток – гликопротеины. К

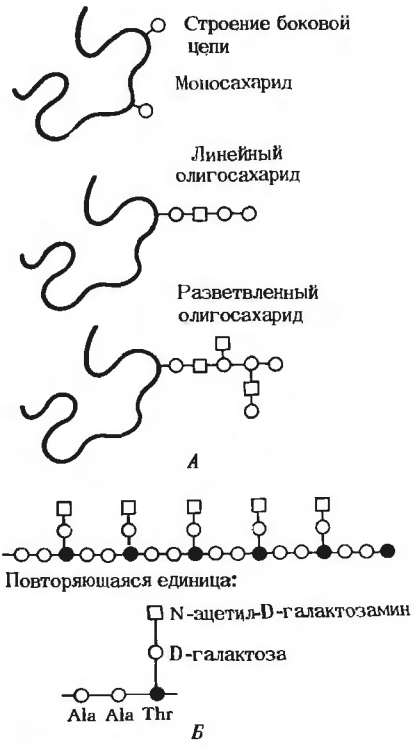


Рис. 11-22. Строение некоторых гликопротеинов и протеогликана. *А*. Три типа гликопротеинов, различающиеся размером и составом боковых углеводных цепей. *Б*. Повторяющаяся структурная единица антифризного гликопротеина, встречающегося у некоторых видов полярных рыб. Этот фрагмент повторяется много раз. Красные квадратики – N-ацетил-D-галактозамин, красные кружки – D-галактоза.

гликопротеинам относится бóльшая часть секретируемых клеткой белков, а также белков плазмы крови. В общем, можно сказать, что большинство белков, расположенных или функционирующих вне клетки, являются гликопротеинами.

Наиболее интересным внеклеточным гликопротеином оказался так называемый *антифризный белок*, обнаруженный в крови некоторых арктических и антарктических рыб, а также у камбаловых и тресковых рыб восточного побережья Северной Америки. Строение антифризных белков варьирует у различных видов; наиболее хорошо изученный антифризный белок имеет полипептидный скелет, образованный повторяющимся до 50 раз трипептидом Ala-Ala-Thr (рис. 11-22). К каждому остатку треонина присоединен дисахарид *D-галактозил-N-ацетил-D-галактозамин*. Антифризные белки способны снижать температуру замерзания воды, по-видимому подавляя образование кристаллов льда. Наличие в крови рыб антифризных белков в сочетании с очень высокой концентрацией NaCl [которая также понижает температуру замерзания воды (разд. 4.4)] позволяет им переносить столь низкие температуры полярных морей, при которых кровь наземных позвоночных неизбежно бы замерзла.

11.12. На поверхности клеток животных присутствуют гликопротеины

Клетки тканей животных окружены не жесткой клеточной стенкой, а мягкой, гибкой структурой, называемой иногда *клеточной оболочкой*. В клеточной оболочке содержатся олигосахаридные цепи различных типов. Клетки, выстилающие кишечник, окружены очень толстой, богатой углеводами оболочкой, получившей название гликокаликса, или пушистой оболочки (fuzzy coat; рис. 11-23). Олигосахариды таких клеточных оболочек относятся в основном к специфическим гликопротеинам клеточных мембран. Помимо гликопротеинов в этих мембранах имеются и другие гибридные молекулы с углеводными группами, а именно *гликолипиды*.

К числу наиболее полно изученных мембранных гликопротеинов относится *гликофорин*, присутствующий в мембране эритроцитов (разд. 12.13). Гликофорин содержит около 50% углеводов в форме длинной полисахаридной цепи, ковалентно присоединенной к одному из концов полипептидной цепи. Полисахаридная цепь выступает наружу с внешней стороны клеточной мембраны, тогда как полипептидная цепь погружена внутрь мембраны. К мембранным гликопротеинам относится также *фибронектин* (от латинских слов «fibra» – волокно и «necter» – связывать, присоединять).

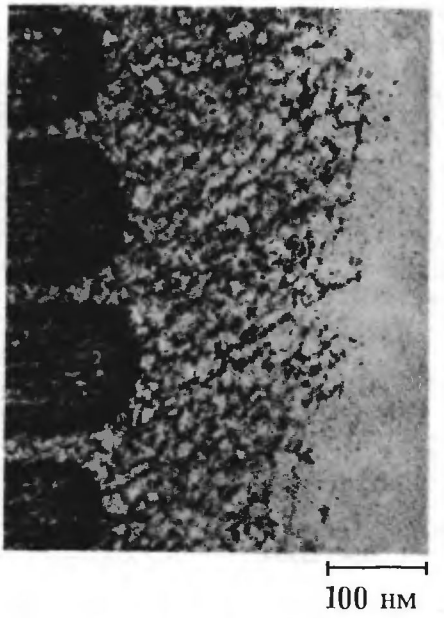


Рис. 11-23. Гликокаликс на микроворсинках (слева) эпителиальной клетки кишечника – это состоящая из нитей сетевидная структура, образованная олигосахаридами.

Считают, что фибронектин способствует связыванию клеток друг с другом (разд. 2.20). Эти и другие гликопротеины мы рассмотрим подробнее в следующей главе в разделе, посвященном строению мембран.

11.13. Гликозаминогликаны и протеогликаны – важные компоненты соединительной ткани

Еще одну группу структурных и защитных полисахаридов составляют *гликозаминогликаны*, или *кислые мукополисахариды*. Обычно они присоединяются к белкам, образуя *протеогликаны* (рис. 11-24), т.е. такие состоящие из полисахаридов и белков соединения, в которых на долю полисахарида приходится основная часть молекулы – обычно более 95%. В отличие от протеогликанов в гликопротеинах, также состоящих из полисахаридов и белков, бóльшую часть молекулы составляет белковая часть.

Гликозаминогликаны образуются из повторяющихся дисахаридных остатков, каждый из которых представляет собой производное аминогексозы – обычно D-глюкозамина или D-галактозамина. По меньшей мере один из двух сахаров в повторяющемся дисахаридном остатке гликозаминогликана содержит кислотную группу, несущую при pH 7 отрицательный заряд; как правило, это карбоксильная или сульфатная группа. Примером кислой гексозы может служить D-глюкуронат, образующийся из D-глюкозы путем ее окисления по шестому атому углерода (рис. 11-25). Гликозаминогликаны относятся таким образом к гетерополисахаридам, поскольку они состоят из чередующихся остатков моносахаридов двух разных типов (табл. 11-2). В названии «мукополисахариды» приставка *муко-*указывает на то, что эти полисахариды были получены впервые из *муцина* – скользкого смазывающего протеогликана, содержащегося в выделяемой слизи. Впоследствии термин «кислые мукополисахариды» стал использоваться применительно к кислым полисахаридам различных тканей позвоночных. Протеогликаны присутствуют в гелеобразном *основном веществе* («*межклеточном цементе*»), заполняющем в большинстве тканей пространство между клетками. Кроме того, они содержатся в хрящах, сухожилиях и коже, а также в *синовиальной жидкости*, выполняющей функцию смазки в суставах.

Гиалуроновая кислота – это гликозаминогликан межклеточного основного вещества тканей животных, состоящий из многократно чередующихся остатков

Таблица 11-2. Моносахаридные компоненты кислых полисахаридов, характерных для соединительной ткани

Полисахарид	Компоненты
Гиалуроновая кислота	D-глюкуронат + + N-ацетил-D-глюкозамин
Хондроитин	D-глюкуронат + + N-ацетил-D-галактозамин
Дерматансульфат	D-идуронат + N-ацетил-D-галактозамин-4-сульфат

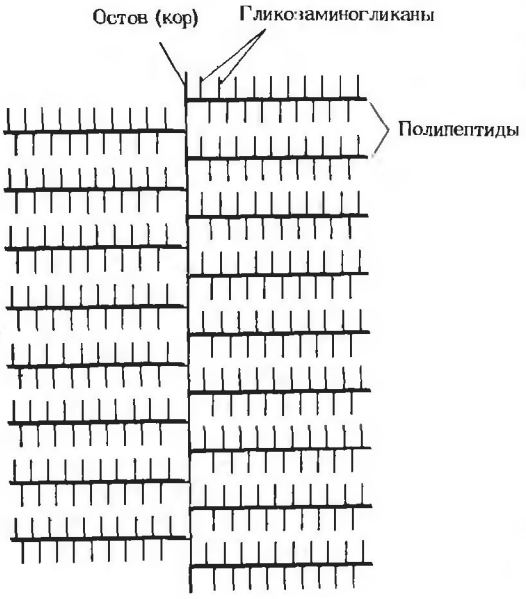


Рис. 11-24. Схематическое изображение протеогликана, состоящего из разветвленного белкового каркаса, к которому присоединены многочисленные боковые цепи гликозаминогликанов. Вся структура сильно гидратирована.

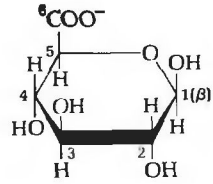


Рис. 11-25. D-глюкуронат. Красным выделена карбоксильная группа в положении 6, диссоциирующая при pH, близких к 7.

D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина (рис. 11-26). Гиалуроновая кислота образует очень вязкие, гелеобразные растворы. Она часто встречается в сочетании с другими гликозаминогликанами. Секретируемый некоторыми патогенными бактериями фермент *гиалуронидаза* способен гидролизовать гликозидные связи гиалуроновой кислоты и тем самым облегчать проникновение бактерий в ткани. Гиалуронидаза позвоночных в процессе оплодотворения гидролизует состоящую из гликозаминогликанов внешнюю оболочку яйцеклетки, делая ее проницаемой для сперматозоида. *Хондроитин*, основной полисахарид протеогликанов хряща, содержит чередующиеся остатки *D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-галактозамина*. *Дерматансульфат* кожи также содержит чередующиеся остатки двух разных сахаров (табл. 11-2).

Еще один важный гликозаминогликан – *гепарин*; он образуется лишь в определенных клетках, присутствующих главным образом в выстилающем слое стенок артерий. В состав гепарина входят повторяющиеся единицы из остатков шести сахаров, каждая из которых представляет собой последовательность чередующихся остатков сульфопроизводных N-ацетил-D-глюкозамина и D-идуроната. Гепарин – мощный ингибитор свертывания крови; он предотвращает образование тромбов в циркулирующей крови. Выделенный из легочной ткани гепарин используется в медицине для предотвращения свертывания донорской крови, а также для предупреждения свертывания крови в сосудах при различных патологических состояниях, например после приступов стенокардии.

В протеогликанах хрящей молекулы гликозаминогликанов ковалентно свя-

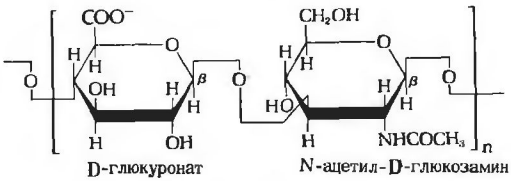


Рис. 11-26. Повторяющаяся единица гиалуроната – линейного полимера, содержащего тысячи таких дисахаридных единиц. При pH 7 карбоксильная группа остатка D-глюкуроната полностью ионизирована.

заны с белком. Типичный протеогликан хрящевой ткани содержит около 150 полисахаридных цепей с молекулярной массой 20 000 каждая; они (в виде боковых цепей) ковалентно присоединены к «сердцевинным» полипептидам. Такие протеогликаны представляют собой сильно гидратированные структуры (рис. 11-24).

Краткое содержание главы

Углеводы – полигидроксиальдегиды или кетоны с эмпирической формулой $(CH_2O)_n$. Они делятся на моносахариды, или сахара (один альдегидный или кетонный остаток); олигосахариды (несколько моносахаридных остатков) и полисахариды – крупные линейные или разветвленные молекулы, содержащие большое число моносахаридных остатков. Моносахариды, или простые сахара, имеют одну альдегидную или кетонную группу. Они содержат по крайней мере один асимметрический атом углерода и потому могут существовать в виде разных стереоизомеров. Наиболее распространенные в природе сахара, такие, как рибоза, глюкоза, фруктоза и манноза, относятся к D-ряду. Простые сахара, содержащие пять или более атомов углерода, могут существовать в виде замкнутых циклических полуацеталей – фураноз (пятичленные кольца) или пираноз (шестичленные кольца). Фуранозы и пиранозы встречаются в виде аномерных α- и β-форм, которые в процессе мутаротации могут превращаться друг в друга. Сахара, способные восстанавливать окислители, называются восстанавливающими (редуцирующими) сахарами.

Дисахариды состоят из двух моносахаридов, связанных друг с другом ковалентной связью. Мальтоза содержит два остатка D-глюкозы, связанных друг с другом α(1 → 4)-гликозидной связью. Лактоза образована из D-галактозы и D-глюкозы. Сахароза, которая не относится к категории восстанавливающих сахаров, состоит из остатков D-глюкозы и D-фруктозы, соединенных друг с другом через аномерные атомы углерода.

Полисахариды (гликаны) содержат большое число моносахаридных остатков, связанных друг с другом гликозидными связями. Некоторые из них играют роль резервных углеводов. Наиболее важными резервными полисахаридами являются крахмал и гликоген – высокомолекулярные разветвленные полимеры, в которых остатки глюкозы в линейных участках цепи соединены друг с другом α(1 → 4)-связями, а в местах разветвления – α(1 → 6)-связями. Гидролиз α(1 → 4)-связей происходит под действием α-амилазы, а α(1 → 6)-связей – под действием α(1 → 6)-глюкозидазы. Ряд полисахаридов функционирует в качестве структурных элементов клеточных стенок. В структурном полисахариде растений целлюлозе остатки D-глюкозы связаны друг с другом β(1 → 4)-связями. Целлюлоза устойчива к воздействию α- и β-амилаз, и потому позвоночные не могут переваривать клетчатку. Исключение составляют жвачные животные, в желудке которых имеются бактерии, секретирующие целлюлазу, под действием которой целлюлоза расщепляется на остатки D-глюкозы. В жестких пористых стенках бактерий содержатся пептидогликаны, в которых линейные полисахариды, состоящие из чередующихся остатков N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина, связаны друг с другом короткими поперечными пептидными цепями. Клеточные стенки растений имеют прочный жесткий каркас, образованный из волокон целлюлозы и других полимерных веществ. Клетки животных окружены нежной гибкой внешней оболочкой (гликокаликсом), в состав которой входят олигосахаридные цепи, связанные с липидами и белками. Гликопротеины содержат один или большее число остатков сахаров; большинство внеклеточных белков и белков клеточной поверхности относятся к гликопротеинам. В соединительной ткани животных содержатся различные гликозаминогликаны, состоящие из чередующихся остатков сахаров, один из которых имеет кислотную группу. Образованные гликозаминогликанами структуры, в которых количественно преобладает полисахаридная часть, называют протеогликанами.

ЛИТЕРАТУРА

Lehninger A.L. Biochemistry, 2d ed., Worth, New York, 1975.

Davidson E.A. Carbohydrate Chemistry, Holt, New York, 1967. Превосходный обзор.

Florkin M., Stotz E.H. (eds.). Comprehensive Biochemistry, sec. II, vol. 5, Carbohydrates, Elsevier, New York, 1963.

Lennarz W.J. (ed.). The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, Plenum, New York, 1980. Современный обзор этой очень сложной области.

Статьи

Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.-J. How Bacteria Stick, Sci. Am., **238**, 86–95, January (1978).

Jaques L.B. Heparin: An Old Drug with a New Paradigm, Science, **206**, 528–533 (1979).

Kretchmer N. Lactose and Lactase, Sci. Am., **227**, 70–78, October (1972); (offprint 1259).

Points H.G. On the Scent of the Riddle of Sucrose, Trends Biochem. Sci., **3**, 137–139 (1978).

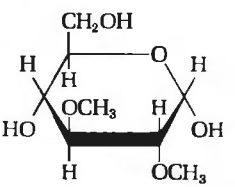
Yamada K.M., Olden K. Fibronectins, Abhesive Glycoproteins of Cell Surface and Blood, Nature, **275**, 179–184 (1978).

Вопросы и задачи

1. *Взаимопревращение различных форм D-галактозы.* Свежеприготовленный раствор α-формы галактозы (1 г/мл в 10-сантиметровой кювете) имеет величину оптического вращения $+150{,}7°$. При длительном стоянии оптическое вращение постепенно уменьшается, достигая равновесного значения $+80{,}2°$. Свежеприготовленный раствор β-формы (1 г/мл) имеет величину оптического вращения всего лишь $+52{,}8°$. Более того, если этот раствор оставить постоять несколько часов, то оптическое вращение увеличивается, достигая равновесного значения $+80{,}2°$, т.е. того же значения, что и в случае α-D-галактозы.
   а) Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса для α- и β-форм галактозы. В чем состоит основное различие между этими формами?
   б) Объясните, почему при стоянии свежеприготовленного раствора α-формы оптическое вращение постепенно снижается? Объясните, почему растворы α- и β-форм в одинаковых концентрациях после стояния показывают одну и ту же величину оптического вращения?
   в) Рассчитайте процентное содержание α- и β-форм галактозы при равновесии.
2. *Инвертаза «инвертирует» сахарозу.* При гидролизе сахарозы ($[\alpha]_D^{20} = +66{,}5°$) образуется эквимолярная смесь D-глюкозы ($[\alpha_D^{20} = +52{,}5°$) и D-фруктозы ($[\alpha]_D^{20} = -92°$).
   а) Как определить скорость гидролиза сахарозы, используя фермент, экстрагированный из клеток, выстилающих просвет тонкого кишечника.
   б) Объясните, почему эквимолярную смесь D-глюкозы и D-фруктозы, образующуюся при гидролизе сахарозы, в пищевой промышленности называют инвертированным сахаром.
   в) Раствор сахарозы обрабатывают инвертазой до тех пор, пока оптическое вращение в системе не станет равным нулю. Какая часть сахарозы при этом оказывается гидролизованной? (В настоящее время инвертазу чаще называют сахаразой.)
3. *Производство шоколада с жидкой начинкой.* Производство шоколада с жидкой начинкой можно считать интересным примером использования ферментов в технике. Ароматная жидкая начинка представляет собой в основном водный раствор сахаров, обогащенный фруктозой, которая и придает ей сладкий вкус. Техническая проблема заключается в следующем: для приготовления шоколадной оболочки твердую центральную часть нужно окружить горячим расплавленным шоколадом и в то же время конечный продукт должен содержать под застывшим шоколадом жидкую, богатую фруктозой начинку. Предложите решение этой задачи. (Подсказка: сахароза растворяется значительно хуже, чем глюкоза и фруктоза.)
4. *Аномеры лактозы.* Дисахарид лактоза, состоящий из галактозы и глюкозы, может существовать в двух аномерных формах, для обозначения которых используют буквы α и β. Эти аномеры значительно различаются по свойствам. Так, например, β-аномер слаще на вкус, чем α-аномер. Кроме того, β-аномер обладает лучшей растворимостью, чем α-аномер; из-за этого при длительном хранении мороженого в морозильнике может произойти кристаллизация α-аномера, и тогда мороженое становится рассыпчатым.
   а) Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса двух аномерных форм лактозы.
   б) Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса для всех веществ, образующихся в результате гидролиза α-аномера до галактозы и глюкозы. Сделайте то же для β-аномера.

5. *Аномеры сахарозы?* Дисахарид лактоза может существовать в двух аномерных формах, а аномерных форм другого дисахарида – сахарозы – обнаружено не было. Почему?
6. *Скорость роста бамбука.* Стебли тропической травы бамбука при оптимальных условиях могут расти феноменально быстро (примерно 30 см в день). Рассчитайте, сколько сахарных остатков в секунду должно ферментативно присоединяться к растущим целлюлозным цепям при такой скорости роста, если принять, что стебли бамбука почти целиком состоят из целлюлозных волокон, ориентированных по направлению роста. Длина каждого остатка D-глюкозы в молекуле целлюлозы составляет приблизительно 0,45 нм.
7. *Сравнение целлюлозы и гликогена.* Практически чистая целлюлоза, полученная из волокон, окружающих семена растений вида *Gossypium* (хлопчатник), представляет собой прочное, волокнистое, совершенно нерастворимое в воде вещество. Гликоген же, выделенный из мышц или печени, напротив, легко диспергируется в горячей воде, образуя мутный раствор. Несмотря на различие в физических свойствах, оба этих вещества – полимеры, обладающие близкими молекулярными массами и состоящие из остатков D-глюкозы, соединенных 1,4-связями. Какими особенностями строения обусловлены различия в свойствах этих двух полисахаридов? Какое биологическое значение имеют особенности физических свойств этих соединений?
8. *Гликоген как депо энергии. Как долго могут летать промысловые птицы?* Еще с древних времен было известно, что такие промысловые птицы, как куропатки, перепела и фазаны очень быстро устают. Греческий историк Ксенофон (434-355 до н.э.) писал: «Дрофу можно легко поймать, если ее внезапно вспугнуть, поскольку, подобно куропатке, она улететь далеко не может и быстро устает; мясо ее изумительно вкусно». Летательные мышцы промысловых птиц почти полностью обеспечиваются энергией за счет распада глюкозо-1-фосфата (см. гликолиз, гл. 15), который образуется при расщеплении накопленного в мышцах гликогена под действием гликогенфосфорилазы. Скорость выработки энергии во время полета (в форме АТР) лимитируется скоростью распада гликогена. Во время «панического полета» скорость распада гликогена у промысловых птиц очень высока и составляет около 120 мкмоль/мин глюкозо-1-фосфата в расчете на 1 г сырой ткани. Рассчитайте, как долго могут лететь промысловые птицы, если известно, что в их летательных мышцах содержится около 0,35% гликогена (по весу).
9. *Определение степени разветвленности амилопектина.* Степень разветвленности [число гликозидных $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связей] в молекуле амилопектина можно определить следующим способом. Навеску амилопектина сначала подвергают исчерпывающему метилированию, в результате которого все атомы водорода в гидроксильных группах замещаются на метильные группы ($—O—H \rightarrow —O—CH_3$). Далее все гликозидные связи подвергают кислотному гидролизу, после чего определяют количество остатков 2,3-диметилглюкозы.

Задача 9



2,3-диметилглюкоза

   а) Объясните, на чем основан этот способ количественного определения точек ветвления в молекуле амилопектина. Что происходит с остатками глюкозы в неразветвленных участках амилопектина во время этой процедуры?
   б) В результате обработки 258 мг амилопектина описанным выше способом образовалось 12,4 мг 2,3-диметилглюкозы. Определите, сколько глюкозы (в процентах) в амилопектине находится в местах $\alpha(1 \rightarrow 6)$-связей.
10. *Определение структуры трегалозы.* Почти 30% веса кокона жука-паразита *Larinus maculatus* приходится на долю углевода трегалозы. При кислотном гидролизе трегалозы образуется только D-глюкоза. Если трегалозу подвергнуть исчерпывающему метилированию (т.е. все ОН-группы превратить в $—OCH_3$), а затем провести кислотный гидролиз, то образуется только один продукт – 2,3,4,6-тетраметилглюкоза. Каково строение трегалозы? Докажите, что предложенная вами структура соответствует описанным выше экспериментальным данным.

ГЛАВА 12

ЛИПИДЫ И МЕМБРАНЫ

В предыдущих главах мы уже рассмотрели такие важные компоненты клетки, как вода, белки, ферменты, коферменты и углеводы. Перед тем как перейти к изучению метаболических процессов в клетках, следует рассмотреть еще одну группу биомолекул – *липиды*. Липиды представляют собой нерастворимые в воде маслянистые или жирные вещества, которые могут быть экстрагированы из клеток неполярными растворителями, такими, как эфир или хлороформ. Наиболее распространенные липиды – жиры или *триацилглицеролы*, играют роль топлива для большинства организмов. Именно в них запасается бóльшая часть энергии, выделяющейся в результате химических реакций.

Рассмотрение липидов в этой главе уместно и еще по одной причине. Дело в том, что наряду с неполярными липидами существуют также *полярные липиды*. Они составляют главные компоненты клеточных мембран, т.е. тех «контейнеров», в которых протекают основные метаболические процессы. Мембраны не только отделяют содержимое клеток от окружающей среды, но и обеспечивают пространственное разделение метаболических процессов внутри клеток. Вместе с тем мембраны – это не просто клеточный «покров»: в них локализованы многочисленные ферменты и транспортные системы. Более того, на внешней поверхности клеточной мембраны располагаются разнообразные распознающие, или рецепторные, участки, которые способствуют узнаванию других клеток, связывают определенные гормоны и воспринимают иные сигналы из внешнего окружения. Многие свойства клеточных мембран обусловлены наличием в них полярных липидов.

12.1. Жирные кислоты – структурные компоненты большинства липидов

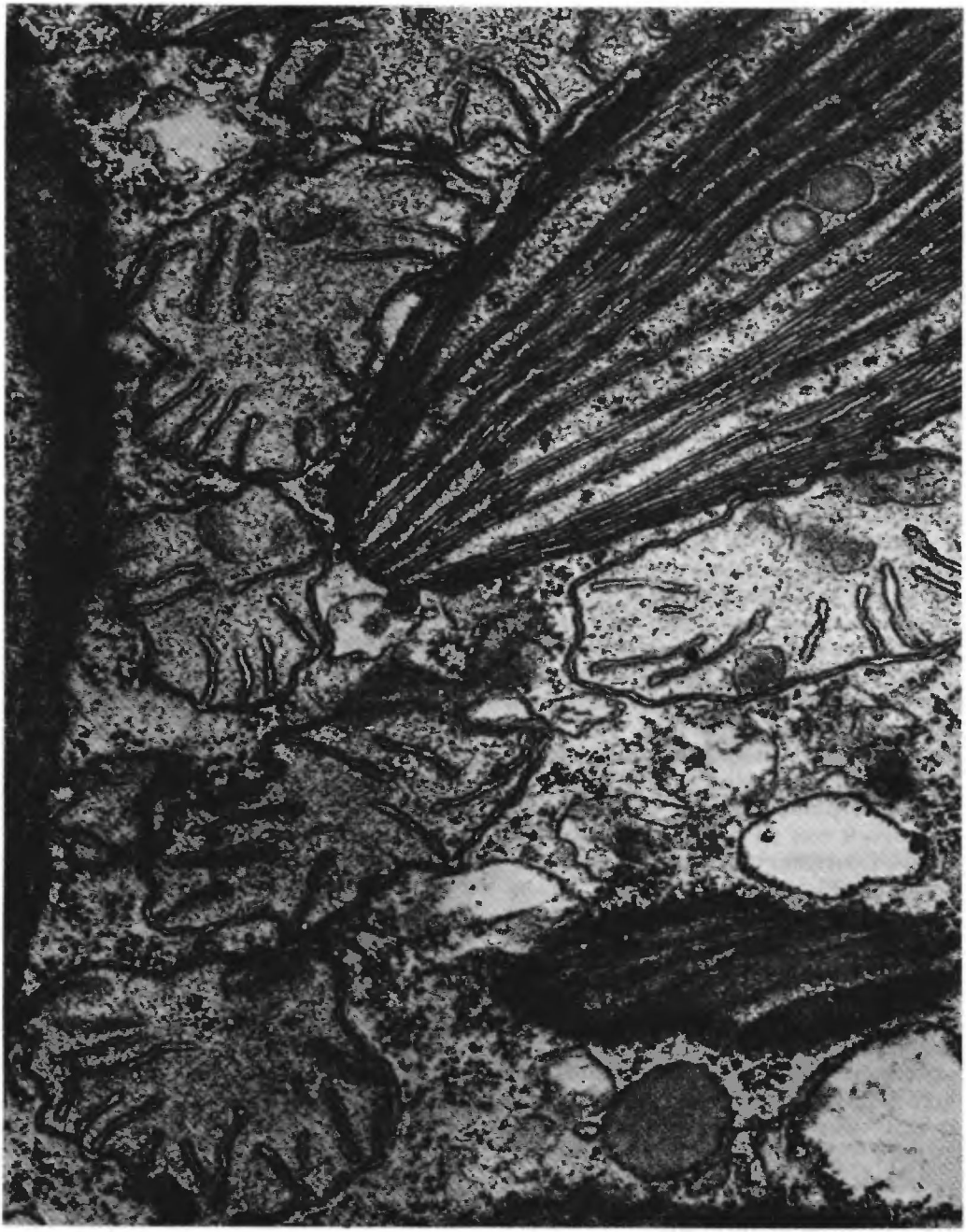
Существует несколько классов липидов, каждый из которых выполняет специфические биологические функции (табл. 12-1). Мы начнем рассмотрение с *жирных кислот* – характерных структурных компонентов большинства липидов. Жирные кислоты – это длинноцепочечные органические кислоты, содержащие от 4 до 24 углеродных атомов; они содержат одну карбоксильную группу и длинный неполярный углеводородный

Таблица 12-1. Липиды основных типов, сгруппированные в соответствии с их химическим строением

Известны липиды и некоторых других типов, но они менее распространены в животных тканях

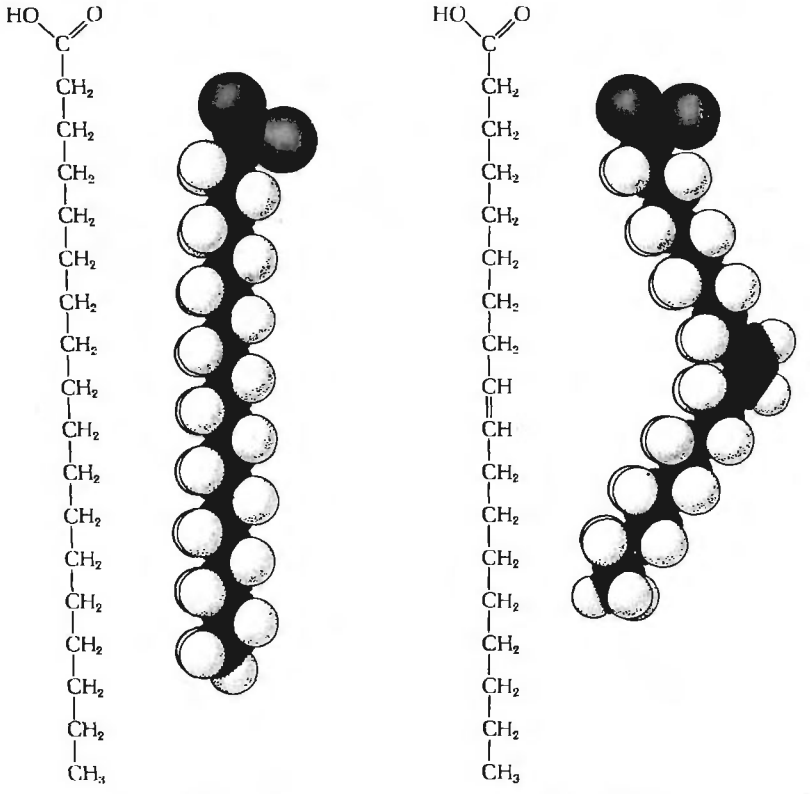
Триацилглицеролы
Воска
Фосфоглицериды
Фосфатидилэтаноламин
Фосфатидилхолин
Фосфатидилсерин
Фосфатидилинозитол
Кардиолипин
Сфинголипиды
Сфингомиелин
Цереброзиды
Ганглиозиды
Стеролы и их эфиры с жирными кислотами

«хвост» (рис. 12-1), из- за которого большинство липидов нерастворимы в воде и проявляют свойства масел или жиров. В клетках и тканях жирные кислоты встречаются не в свободном состоянии, а в ковалентно связанной форме в составе липидов различных классов; в свободном виде жирные кислоты можно полу-



Липиды играют важную роль в построении и функционировании клеток. На этой электронной микрофотографии показана цитоплазма фотосинтезирующей водоросли *Euglena*. Отчетливо видны липидсодержащие мембраны хлоропласта (наверху справа) и нескольких митохондрий (вокруг хлоропласта и внизу слева). В хлоропласте видны также две липидные капли, которые служат энергетическим резервом. Серая овальная структура внизу справа – липидное включение в цитоплазме.

$$—CH=CH—CH_2—CH=CH—$$



А *Б*

Рис. 12-1. Структурные формулы и пространственные модели двух типичных жирных кислот. *А*. Стеариновая кислота изображена в виде вытянутой цепочки, однако в действительности ее молекула не имеет жесткой линейной структуры. Поскольку вокруг любой одинарной связи возможно свободное вращение, углеводородная цепь стеариновой кислоты (как и всех других насыщенных жирных кислот) обладает большой гибкостью и может принимать разнообразные конформации. *Б*. В молекуле олеиновой кислоты *цис*-двойная связь фиксирует определенный изгиб углеводородной цепи. Все остальные связи в цепи одинарные, и потому относительно них возможно свободное вращение.

чить только путем химического или ферментативного гидролиза. Из природных липидов выделены разнообразные жирные кислоты, различающиеся длиной цепи, наличием, числом и положением двойных связей; некоторые жирные кислоты содержат также боковые метильные группы. На рис. 12-1 и в табл. 12-2 приведено строение основных жирных кислот, обнаруженных в природных липидах.

Практически все встречающиеся в естественных условиях жирные кислоты содержат четное число атомов углерода, причем чаще всего — 16 или 18 углеродных атомов. Длинная углеводородная цепь, составляющая хвост молекулы, может быть полностью насыщена, т. е. содержать только одинарные связи, или ненасыщена, т. е. содержать одну или несколько двойных связей. Как правило, ненасыщенные жирные кислоты встречаются и у животных, и у растений в два

Таблица 12-2. Некоторые природные жирные кислоты

Число атомов углерода	Структура	Систематическое название	Тривиальное название	Температура плавления, °С
	Насыщенные жирные кислоты			
12	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	*н*-Додекановая	Лауриновая кислота	44,2
14	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	*н*-Тетрадекановая	Миристиновая	53,9
16	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	*н*-Гексадекановая	Пальмитиновая	63,1
18	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	*н*-Октадекановая	Стеариновая	69,6
20	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	*н*-Эйкозановая	Арахиновая	76,5
24	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	*н*-Тетракозановая	Лигноцериновая	86,0
	Ненасыщенные жирные кислоты			
16	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Пальмитолеиновая	– 0,5
18	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Олеиновая	13,4
18	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Линолевая	– 5
18	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Линоленовая	– 11
20	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}(CH_2)_3COOH$		Арахидоновая	– 49,5

раза чаще, чем насыщенные. В большинстве жирных кислот имеющаяся двойная связь расположена между 9-м и 10-м атомами углерода (она обозначается Δ^9). Дополнительные двойные связи обычно расположены между Δ^9-двойной связью и метильным концом цепи. Две двойные связи в жирных кислотах не бывают *сопряженными* (—CH=CH—CH=CH—), а всегда между ними находится метиленовая группа:

$$—CH{=}CH—CH_2—CH{=}CH—$$

Двойные связи практически во всех природных жирных кислотах находятся в *цис*-конформации, что приводит к сильному изгибу алифатической цепи (рис. 12-1). Жирные кислоты с несколькими двойными связями (такие, как, например, *арахидоновая кислота*, содержащая четыре двойные связи) имеют несколько изгибов цепи, и их молекулы обладают большей жесткостью, чем молекулы насыщенных жирных кислот; последние благодаря свободному вращению вокруг одинарных связей характеризуются большей гибкостью и большей длиной. При температуре тела насыщенные жирные кислоты ряда от C_{12} до C_{24} находятся в твердом воскоподобном состоянии, а ненасыщенные жирные кислоты представляют собой жидкости.

Обычные жирные кислоты нерастворимы в воде, но в разбавленных растворах NaOH или KOH они могут образовывать мицеллы (разд. 4.3), превращаясь в так называемые мыла – соли жирных кислот. Употребляемое для мытья мыло состоит в основном из калиевых солей жирных кислот. Na^+-или K^+-мыла – это *амфипатические* соединения (разд. 4.3): их ионизированная карбоксильная группа образует полярную голову, а углеводородная цепь – неполярный хвост. Na^+- или K^+-мыла способны эмульгировать нерастворимые в воде масла и жиры. Углеводородные хвосты мыла при этом встраиваются в капли жира, а полярные головы взаимодействуют с водой. Таким образом, мыла формируют гидрофильную оболочку вокруг капель жира, образуя мелкодисперсную смесь или эмульсию (рис. 12-2).

Ca^{2+}- и Mg^{2+}-мыла жирных кислот растворяются очень плохо и потому не

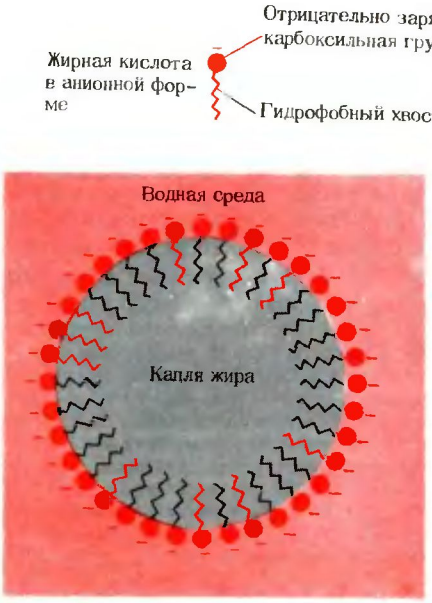


Рис. 12-2. Эмульгирующее действие мыла на жир. Мыло разбивает жир на капли, окруженные оболочкой из гидрофильных, высокополярных карбоксильных групп и таким путем образует стабильную эмульсию. Отрицательный заряд карбоксильных групп компенсируется равным числом положительно заряженных ионов, например Na^+.

эмульгируют жиров. Именно этим объясняется появление белых хлопьев осадка при растворении банного мыла (состоящего главным образом из K^+-мыла) в жесткой воде, которая содержит соли Ca^{2+} и Mg^{2+}.

12.2. Триацилглицеролы — это глицероловые эфиры жирных кислот

Триацилглицеролы – наиболее простые и широко распространенные липиды, содержащие жирные кислоты. Другие часто употребляемые названия этих липидов – жиры, нейтральные жиры или *триглицеролы*. Триацилглицеролы представляют собой эфиры спирта *глицерола* и трех молекул жирных кислот (рис. 12-3). Триацилглицеролы – основной компонент жировых депо растительных и животных клеток. В мембранах они обычно не содержатся. Важно отметить, что триацилглицеролы – это неполярные, гидрофобные вещества, поскольку они не содержат заряженных или сильно полярных функциональных групп.

Триацилглицеролы бывают различных типов в зависимости от природы и положения трех остатков жирных кислот, этерифицирующих гидроксильные группы глицерина. Триацилглицеролы, содержащие остатки одинаковых жирных кислот во всех трех положениях, называют *простыми триацилглицеролами*; их название определяется названием жирной кислоты. Так, например, тристеароилглицерол, трипальмитоилглицерол и триолеилглицерол содержат соответственно остатки стеариновой, пальмитиновой и олеиновой кислот. Чаще пользуются тривиальными названиями этих соединений, а именно: *тристеарин, трипальмитин, триолеин*. Триацилглицеролы, содержащие два разных либо все три разных остатка жирных кислот, называют *смешанными триацилглицеролами*. Большинство природных жиров, таких, как оливковое или сливочное масло и другие пищевые жиры, содержат сложные смеси простых и смешанных триацилглицеролов, в состав которых входят жирные кислоты, различающиеся как по длине цепи, так и по степени насыщенности (табл. 12-3).

Триацилглицеролы, содержащие остатки только насыщенных жирных кислот, при комнатной температуре имеют консистенцию твердого вещества. Примером может служить тристеарин – основной компонент говяжьего сала. Триацилглицеролы, содержащие три ненасыщенные жирные кислоты (например, триолеин – основной компонент оливкового масла), при комнатной температуре находятся в жидком состоянии. Сливочное масло представляет собой смесь триацилглицеролов, причем в состав некоторых из них входят жирные кислоты с относительно короткими цепями; поскольку с укорочением цепи жирной кислоты температура ее плавления снижается, сливочное масло при комнатной температуре имеет мягкую консистенцию (табл. 12-3).

Природные триацилглицеролы не

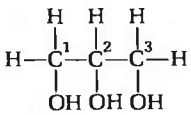
растворяются в воде. По удельному весу они легче воды, и именно поэтому во всех подливках масло плавает сверху.

Триацилглицеролы хорошо растворяются в неполярных растворителях, таких, как хлороформ, бензол или эфир, и этими растворителями обычно пользуются для экстракции жиров из тканей. Триацилглицеролы гидролизуются при кипячении с кислотами или основаниями либо под действием *липазы* – фермента, поступающего в тонкий кишечник из поджелудочной железы. Гидролиз триацилглицеролов в присутствии KOH или NaOH (этот процесс называют *омылением*) приводит к образованию смеси K^+- или Na^+-мыл и глицерола (рис.

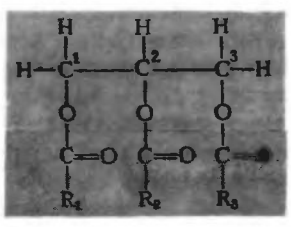
Таблица 12-3. Жирнокислотный состав трех натуральных пищевых жиров[1)]

	Процент от общего количества жирных кислот				
	насыщенные				ненасыщенные
	C_4—C_{12}	C_{14}	C_{16}	C_{18}	$C_{16}+C_{18}$
Оливковое масло	< 2	< 2	13	3	80
Сливочное масло	11	10	26	11	40
Говяжий жир	< 2	< 2	29	21	46

[1)] Эти жиры состоят из смеси триацилглицеролов с разным жирнокислотным составом и, следовательно, с разными температурами плавления. Оливковое масло, жидкое при комнатной температуре, содержит в основном ненасыщенные (жидкие) жирные кислоты. Говяжий жир, в котором много длинноцепочечных насыщенных жирных кислот, при комнатной температуре имеет твердую консистенцию. Сливочное масло, содержащее значительное количество жирных кислот с короткой цепью, при комнатной температуре имеет мягкую консистенцию.

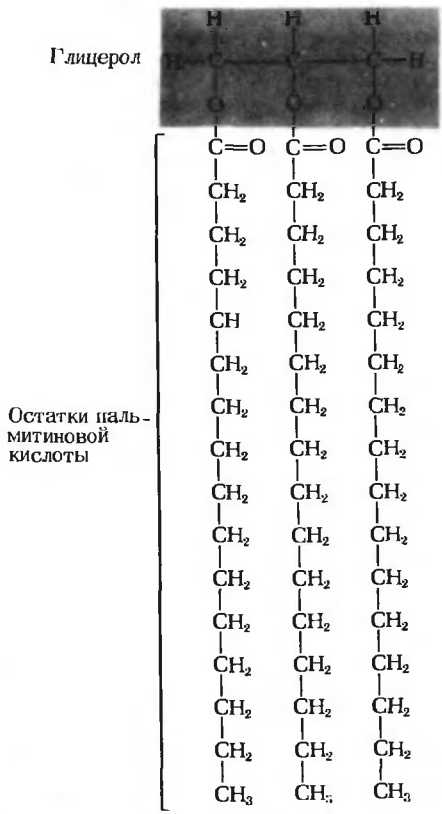


Глицерол



Общая схема строения триацилглицеролов; R_1 R_2 и R_3 – углеводородные хвосты трех жирных кислот

Рис. 12-3. Глицерол и общая схема строения триацилглицеролов. Обратите внимание, что если в молекуле глицерола в положениях 1 и 3 находятся две *разные* жирные кислоты, то углеродный атом 2 становится асимметричным. В живой материи такие триацилглицеролы имеют L-конфигурацию. Изображенный справа трипальмитин, как и все триацилглицеролы с *одинаковыми* жирными кислотами в положениях 1 и 3, оптически не активен.



Трипальмитин

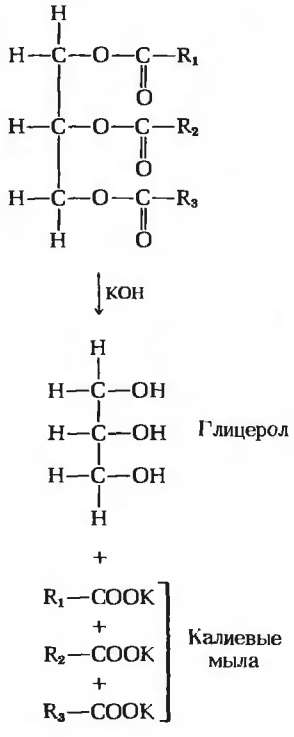


Рис. 12-4. Омыление (щелочной гидролиз) триацилглицерола. Употребляемое в быту мыло получают путем гидролиза смеси триацилглицеролов елким калием. Образующиеся K^+-мыла жирных кислот отмывают от KOH и прессуют в брикеты.

12-4). Именно эта химическая реакция лежит в основе промышленного получения хозяйственного мыла из триацилглицеролов.

Триацилглицеролы с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, жидкие при комнатной температуре, можно превратить в твердые жиры путем частичного восстановления двойных связей. Большие количества жидких растительных масел, например кукурузного масла, перерабатывают в твердые пищевые жиры (маргарин) путем каталитического гидрирования, в процессе которого часть двойных связей восстанавливается до одинарных.

На воздухе триацилглицеролы, содержащие ненасыщенные жирные кислоты с большим числом двойных связей, легко подвергаются *самоокислению*. Суть этого сложного процесса состоит в том, что молекулярный кислород взаимодействует с остатками жирных кислот по месту двойных связей, что приводит к образованию соединений, придающих жирам неприятный прогорклый вкус. Льняное масло, на котором готовят масляные краски, употребляемые в живописи, очень богато жирными кислотами с большим числом двойных связей. На воздухе это масло «сохнет», т. е. подвергается самоокислению с последующей полимеризацией, что приводит к образованию прочного смолистого покрытия. В клетках в обычных условиях самоокисление ненасыщенных жиров полностью заторможено благодаря наличию витамина Е (разд. 10.16), различных ферментов, а также, по-видимому, аскорбиновой кислоты (разд. 10.12). Однако при некоторых заболеваниях оно может иметь место, вызывая в ряде тканей образование аномальных липидных включений.

12.3. Триацилглицеролы — форма запасания липидов

Основная функция триацилглицеролов — запасание липидов. В большинстве растительных и животных клеток триацилглицеролы находятся в цитозоле в виде мелкодисперсных эмульгированных маслянистых капелек (рис. 12-5). В специализированных клетках соединительной ткани животных, а именно в *адипоцитах*, или *жировых клетках*, огромное количество триацилглицеролов может запасаться в виде жировых капелек, заполняющих почти весь объем клетки (рис. 12-5, *А*). В большом числе жировые клетки обнаруживаются под кожей, в брюшной полости и в молочных железах. У тучных людей в жировых клетках накапливаются килограммы триацилглицеролов, энергии которых могло бы хватить на обеспечение основного обмена организма в течение нескольких месяцев. В отличие от этого в форме гликогена организм может запасти энергию не более чем на сутки (гл. 21). Триацилглицеролы значительно лучше, чем гликоген, приспособлены для запа-

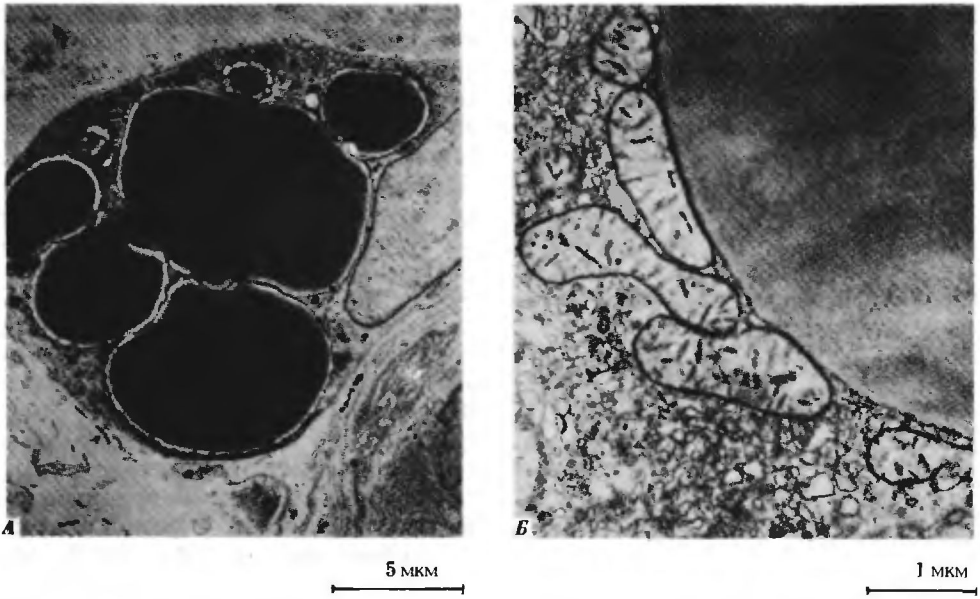


Рис. 12-5. Запасы жира в клетках. *А*. Жировая клетка (адипоцит) из жировой ткани свиньи. Огромные капли жира заполняют практически весь объем клетки. Светлая продолговатая структура с правого края – ядро клетки. *Б*. Часть крупной капли жира в цитоплазме клетки печени голодающего хомячка. При хорошем кормлении животных в их печени содержится лишь малое количество мелких жировых капель. При голодании, когда жир становится основным энергетическим ресурсом и транспортируется из жировой ткани в печень, количество и размеры жировых капель значительно возрастают. К поверхности капли примыкают несколько митохондрий, внутри которых происходит окисление жирных кислот.

сания энергии: во-первых, они могут накапливаться в очень больших количествах в практически чистом, негидратированном виде, а во-вторых, в расчете на единицу веса в них запасается в два раза больше энергии, чем в углеводах (гл. 18 и 26).

У некоторых животных запасы триацилглицеролов под кожей выполняют сразу две функции: они служат в качестве энергетического депо и образуют теплоизоляционный слой, защищающий организм от действия очень низких температур. Тюлени, моржи, пингвины и другие теплокровные животные Арктики



Рис. 12-6. Тюлень Уэделла – обитатель Антарктики. Очень толстый слой подкожного жира служит не только жировым депо, но и надежно защищающим от холода «гидрокостюмом».

и Антарктики снабжены мощными прослойками из триацилглицеролов (рис. 12-6).

12.4. Воска – эфиры жирных кислот и длинноцепочечных спиртов

Воска – это сложные эфиры, образуемые длинноцепочечными насыщенными или ненасыщенными жирными кислотами (с числом углеродных атомов от 14 до 36) и длинноцепочечными спиртами (с числом углеродных атомов от 16 до 22) (рис. 12-7). У позвоночных секретируемые кожными железами воска выполняют функцию защитного покрытия, смазывающего и смягчающего кожу и предохраняющего ее от воды. Восковым секретом покрыты также волосы, шерсть и мех. У птиц, особенно водоплавающих, выделяемые копчиковой железой воска придают перьевому покрову водоотталкивающие свойства. Листья многих растений покрыты защитным слоем воска. Блеск листьев многих тропических растений, а также падуба, рододендронов и сумаха обусловлен отражением света от воскового покрытия.

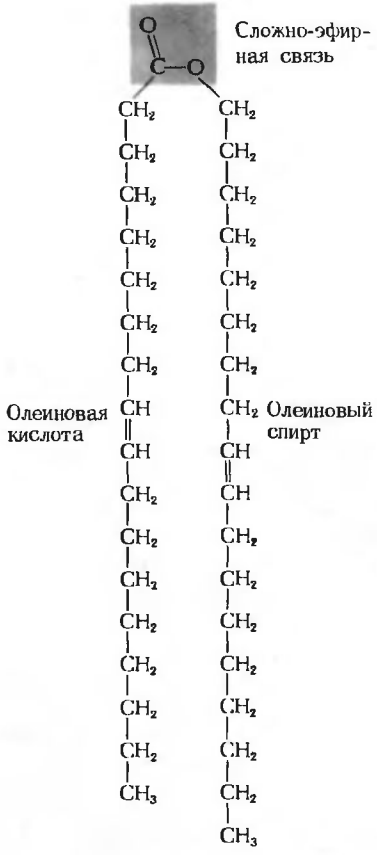


Рис. 12-7. Структура воска; показан воск, представляющий собой эфир олеиновой кислоты и олеинового спирта.

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

12.5. Фосфолипиды – основные липидные компоненты мембран

Существует несколько классов мембранных липидов. Они отличаются от триацилглицеролов тем, что наряду с углеводородными цепями содержат одну или несколько сильно полярных «голов». На этом основании мембранные липиды часто называют также *полярными липидами*. В наибольшем количестве в мембранах присутствуют *фосфолипиды*. Фосфолипиды служат структурными компонентами мембран и никогда не запасаются в больших количествах. Как видно уже из названия, липиды этой группы содержат фосфор (в виде остатков фосфорной кислоты). Роль основного фосфолипидного компонента мембран играют *фосфоглицериды* (рис. 12-8), в состав которых входят два остатка жирных кислот, этерифицирующих первую и вторую гидроксильные группы глицерола. Третья гидроксильная группа глицерола образует сложно-эфирную связь с фосфорной кислотой. Кроме того, фосфоглицериды содержат остаток еще одного спирта, связанного сложно-эфирной связью с фосфорной кислотой. Этот

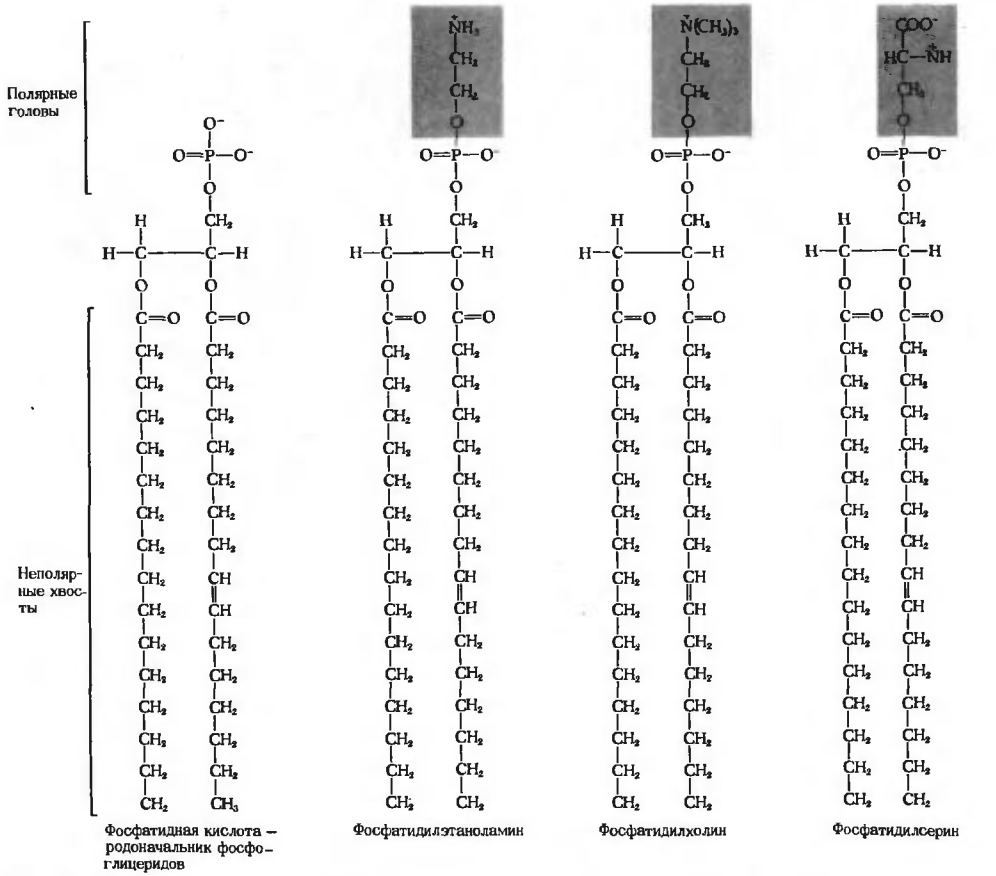
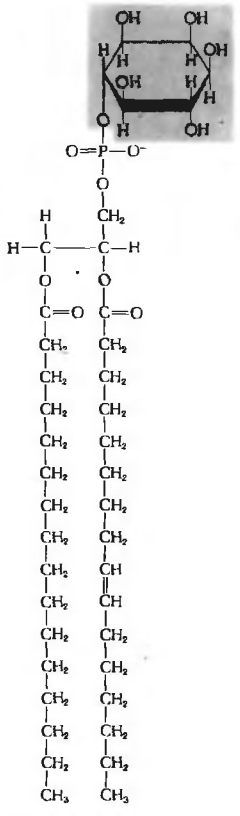


Рис. 12-8. Основные фосфоглицериды. Полярные головы фосфоглицеридов состоят из отрицательно заряженной (при pH 7,0) фосфатной группы, этерифицированной спиртом (выделен цветом). Остаток спирта также может нести электрический заряд.

второй остаток локализуется, таким образом, в полярной голове молекулы фосфоглицерида. В зависимости от того, какой спирт входит в состав полярной головы, различают несколько классов фосфоглицеридов. Все молекулы фосфоглицеридов имеют два неполярных хвоста из длинноцепочечных жирных кислот, чаще всего – из жирных кислот, содержащих 16 или 18 атомов углерода. Как правило, одна из жирных кислот насыщенная, а вторая – ненасыщенная; последняя при этом образует эфирную связь всегда со средней, т.е. при С2, гидроксильной группой глицерола. Отметим, что второй углеродный атом (С2) глицерола в молекуле фосфоглицерида асимметричен и имеет L-конфигурацию, поскольку глицерол происходит из L-глицеральдегида.

Названия различных типов фосфоглицеридов образуются в соответствии с названием спирта в их полярной группе (рис. 12-8). Исходным для всех фосфоглицеридов соединением служит *фосфатидная кислота*, в голове которой нет спирта. В свободном виде она встречается в очень незначительных количествах, играя роль промежуточного продукта в биосинтезе фосфоглицеридов. Самые распространенные фосфоглицериды – это сходные между собой *фосфатидилэтаноламин* и *фосфатидилхолин*, полярные головы которых содержат соответственно спирты *этаноламин* и *холин*. Комбинации жирных кислот в неполяр-



Фосфатидилинозитол

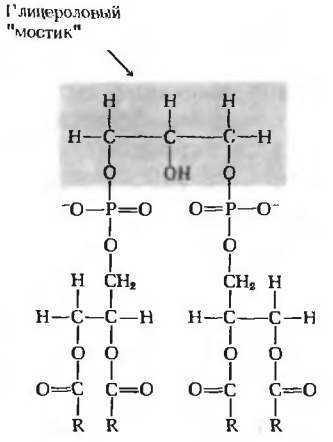


Рис. 12-9. Кардиолипин («двойной» фосфоглицерид) содержится в больших количествах в мембранах митохондрий и бактерий. Буквой R обозначены углеводородные цепи длинноцепочечных жирных кислот.

ной части этих соединений могут быть разнообразными. К фосфоглицеридам относится также *фосфатидилсерин*, полярная группа которого содержит остаток гидроксиаминокислоты *серина* (разд. 5.7) и *фосфатидилинозитол*, в состав которого входит циклический спирт – *инозитол*. Локализованный главным образом во внутренней мембране митохондрий *кардиолипин* в отличие от остальных фосфоглицеридов является «двойным» фосфоглицеридом (рис. 12-9).

При pH 7,0 остаток фосфорной кислоты во всех фосфоглицеридах заряжен отрицательно. Кроме того, при pH, близких к 7,0, спиртовые группы голов также могут нести один или несколько электрических зарядов (рис. 12-8). Таким образом, фосфоглицериды содержат группировки двух разных типов, а именно полярные гидрофильные головы и неполярные гидрофобные хвосты. Вследствие этого фосфоглицериды обладают *амфипатическими* свойствами (разд. 4.3). Как правило, амфипатическими свойствами обладают мембранные липиды, тогда как откладываемые в запас липиды (триацилглицеролы и воска) таких свойств лишены.

При нагревании с кислотами или щелочами фосфоглицериды гидролизуются, распадаясь на основные структурные компоненты: жирные кислоты, глицерол, фосфорную кислоту и спирт полярной головы. Они могут гидролизоваться также ферментативным путем – под действием различных *фосфолипаз*, катализирующих процессы гидролитического расщепления специфических связей в молекуле фосфоглицерида.

12.6. Сфинголипиды – также важные компоненты мембран

Второй важный класс мембранных липидов – сфинголипиды – тоже имеют полярную голову и два неполярных хвоста, но не содержат глицерола. Сфинголипиды построены из одного остатка длинноцепочечной жирной кислоты, одного остатка длинноцепочечного аминоспирта *сфингозина* (или его производ-

ного) и одного остатка спирта полярной головы.

Сфингозин служит предшественником ряда длинноцепочечных аминоспиртов, присутствующих в различных сфинголипидах. У млекопитающих наиболее широко распространены сфингозин и *дигидросфингозин* (рис. 12-10). В сфинголипидах полярная голова присоединена к гидроксильной группе сфингозина, а жирная кислота образует амидную связь с аминогруппой. Существуют три подкласса *сфинголипидов*: *сфингомиелины*, *цереброзиды* и *ганглиозиды*. Сфингомиелины содержат фосфор, тогда как в цереброзидах и ганглиозидах его нет.

Сфингомиелины (рис. 12-11) – самые простые и самые распространенные сфинголипиды. Их характеризует наличие фосфохолина или фосфоэтаноламина в полярной голове. Тот факт, что сфингомиелины содержат фосфор, дает основание отнести их вместе с фосфоглицеридами к фосфолипидам. Действительно, по своим основным свойствам сфинголипиды и такие фосфоглицериды, как фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин, очень близки; электрический заряд их примерно одинаков. Сфингомиелины присутствуют в большинстве мембран животных клеток, особенно много их в *миелиновых оболочках* нервных клеток определенного типа.

Цереброзиды не содержат фосфора и не несут электрического заряда, поскольку их полярные головы образованы

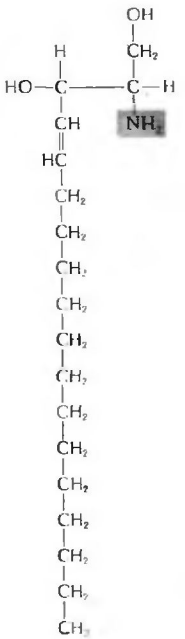


Рис. 12-10. Сфингозин. В отличие от сфингозина в дигидросфингозине нет двойной связи. В сфинголипидах жирная кислота присоединена к аминогруппе (выделена красным цветом) посредством амидной связи.

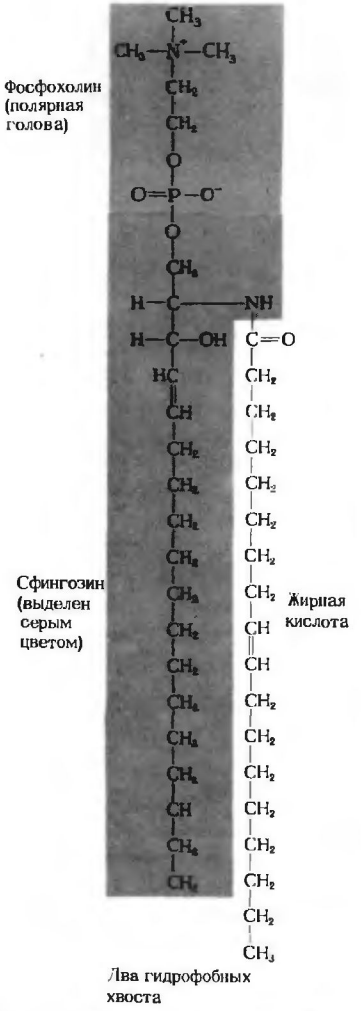


Рис. 12-11. Структура сфингомиелина. Впервые сфингомиелин был выделен из миелина – построенной из мембран оболочки определенных клеток мозга; в дальнейшем он был обнаружен в мембранах многих тканей животных.

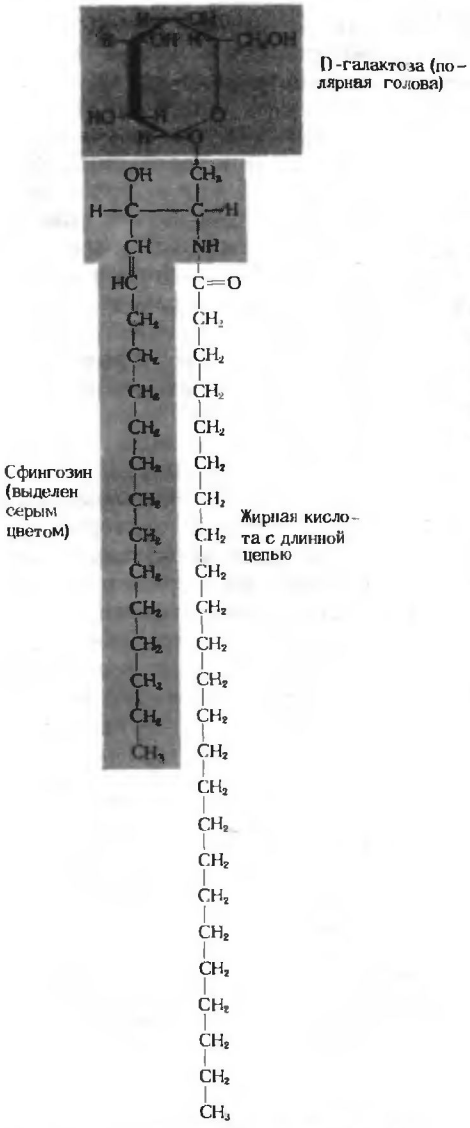


Рис. 12-12. Галактоцереброзид. Жирная кислота в составе галактоцереброзидов обычно содержит 24 атома углерода.

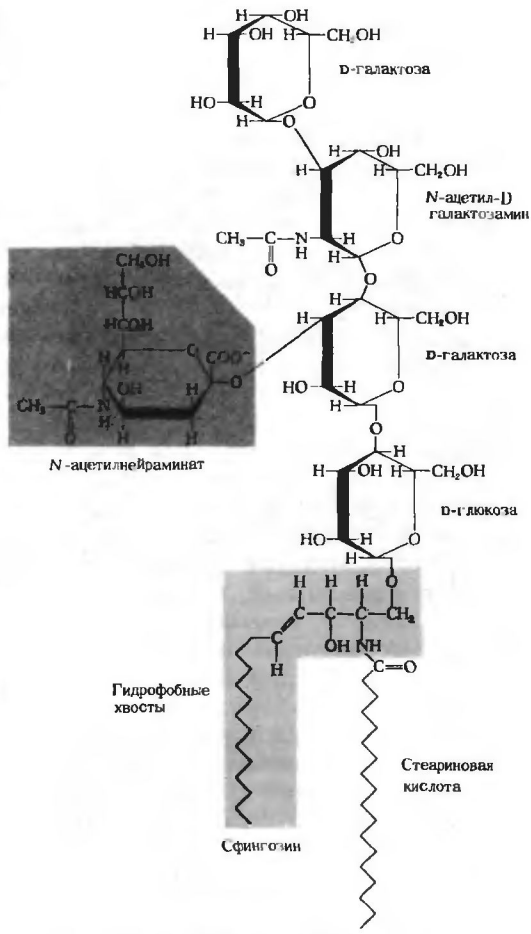


Рис. 12-13. Строение ганглиозида GM_1. В состав полярной головы ганглиозидов входят очень сложные олигосахариды, содержащие по крайней мере один остаток N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты, ионизированный при pH 7. Для обозначения различных ганглиозидов пользуются специальными символами, по которым можно определить строение полярной головы. В клеточных мембранах обнаружено более 15 различных классов ганглиозидов. Особенно много ганглиозидов в нервных окончаниях и в специальных гормон-рецепторных участках на поверхности клеток. Относительная длина гидрофобных хвостов на схеме сильно уменьшена.

электронейтральными группами. Из-за характерного признака цереброзидов – наличия двух или нескольких остатков сахаров в полярной голове – их называют также *гликосфинголипидами* (от греческого слова „glycos" – сладкий). Цереброзиды относятся к *гликолипидам* (общее название липидов, содержащих остатки сахаров). На рис. 12-12 показано строение *галактоцереброзида*, полярная голова которого образована сахаром D-галактозой (разд. 11.3). Галактоцереброзиды содержатся главным образом в мембранах клеток мозга, тогда как *глюкоцереброзиды*, полярная голова которых представлена D-глюкозой, при-

сутствуют в мембранах других (не нервных) клеток.

Известны также цереброзиды, содержащие два, три или четыре остатка сахаров: D-глюкозы, D-галактозы или N-ацетил-D-галактозамина. Эти более сложные цереброзиды локализуются в основном в наружном слое клеточных мембран и, как мы увидим далее, являются важными компонентами клеточной поверхности.

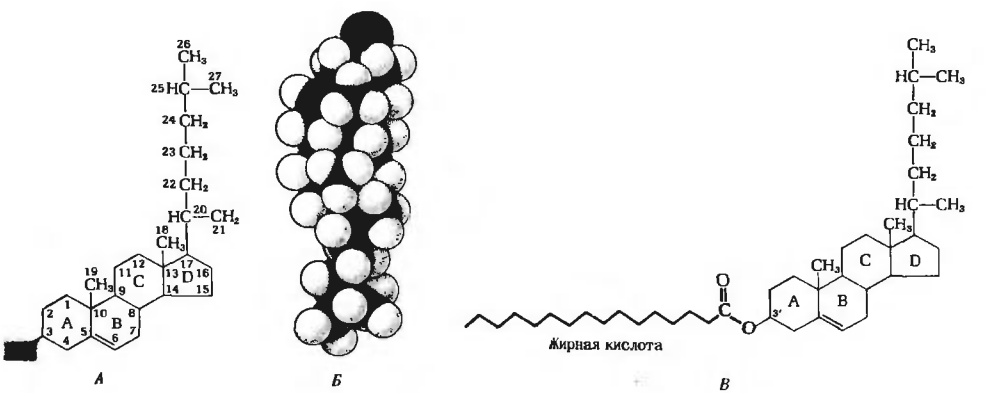
Наиболее сложные сфинголипиды – *ганглиозиды* (рис. 12-13). Их очень крупные полярные головы образованы несколькими остатками сахаров. Для ганглиозидов характерно наличие в крайнем положении одного или нескольких остатков *N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты* (рис. 12-13), несущей при pH 7,0 отрицательный заряд. Остатки N-ацетилнейраминовой кислоты встречаются также в олигосахаридных боковых цепях некоторых мембранных гликопротеинов. В сером веществе мозга ганглиозиды составляют около 6% мембранных липидов. Они обнаруживаются также, хотя и в меньших количествах, в мембранах клеток других (не нервных) тканей. Ганглиозиды – важные компоненты расположенных на поверхности клеточных мембран специфических *рецепторных участков*. Так, они находятся в тех специфических участках нервных окончаний, где происходит связывание молекул нейромедиатора в процессе химической передачи импульса от одной нервной клетки к другой.

12.7. Стероиды – неомыляемые липиды, обладающие специфическими функциями

Все рассмотренные выше липиды относятся к категории омыляемых, т.е. при нагревании с щелочами они подвергаются гидролизу и из остатков их жирных кислот образуются мыла. Однако в клетках обнаруживаются и *неомыляемые* липиды, не содержащие остатков жирных кислот и потому не способные образовывать мыла. Существуют два основных класса неомыляемых липидов: *стероиды* и *терпены*. Здесь мы рассмотрим только те стероиды, которые включаются в состав мембран.

Стероиды – сложные жирорастворимые вещества, молекулы которых содержат четыре конденсированных кольца (рис. 12-14). Наиболее широко распространенными стероидами являются *стеролы*, т.е. стероидные спирты. Основной стерол в тканях животных – *холестерол*. Холестерол и его эфиры с длинноце-

Рис. 12-14. Холестерол, стероидный спирт. *А*. Принятое обозначение колец и нумерация углеродных атомов стероидов. Из-за того что четыре конденсированных кольца создают жесткую структуру, присутствие холестерола в мембранах приводит к снижению их текучести. Гидроксильная группа (отмечена красным цветом) образует полярную голову холестерола, остальная часть молекулы гидрофобна. *Б*. Пространственная модель холестерола. Гидроксильная группа расположена вверху. *В*. Эфир холестерола. Подобно триацилглицеролам, эфиры холестерола способны омыляться.



почечными жирными кислотами – важные компоненты липопротеинов плазмы, а также наружной клеточной мембраны. В мембранах растительных клеток содержатся другие стеролы, в частности *стигмастерол*, который отличается от холестерола только наличием двойной связи между 22-м и 23-м углеродными атомами. В молекуле холестерола имеется полярная голова: это гидроксильная группа в положении С3. Остальная часть молекулы, как видно из пространственной модели на рис. 12-14, относительно жестка и гидрофобна.

12.8. Липопротеины сочетают свойства липидов и белков

Ряд липидов образует комплексы со специфическими белками; эти комплексы называют *липопротеинами*. В плазме крови имеются три основных класса *липопротеинов плазмы*, причем содержание липидов в них может составлять от 50 до 90%. Молекулы липидов и полипептидов в липопротеинах прочно связаны друг с другом, хотя и не образуют ковалентных связей. Липопротеины плазмы содержат полярные липиды и триацилглицеролы, а также холестерол и его эфиры. Неполярные триацилглицеролы и эфиры холестерола спрятаны внутри под оболочкой, образованной водорастворимыми, гидрофильными участками полипептидных цепей и полярными головами молекул фосфоглицеридов (рис. 12-15). Наличие внешней гидрофильной оболочки в липопротеинах делает эти богатые липидами структуры растворимыми в воде и хорошо приспособленными для транспорта липидов из тонкого кишечника в жировые депо и в различные ткани (гл. 24). Классификация липопротеинов плазмы крови основана на величине их плотности, которая в свою очередь зависит от содержания липидов (табл. 12-4). Чем выше содержание липидов, тем ниже плотность липопротеинов и тем больше скорость, с которой они движутся вверх, т. е. всплывают, во время центрифугирования плазмы крови при очень высоких скоростях вращения

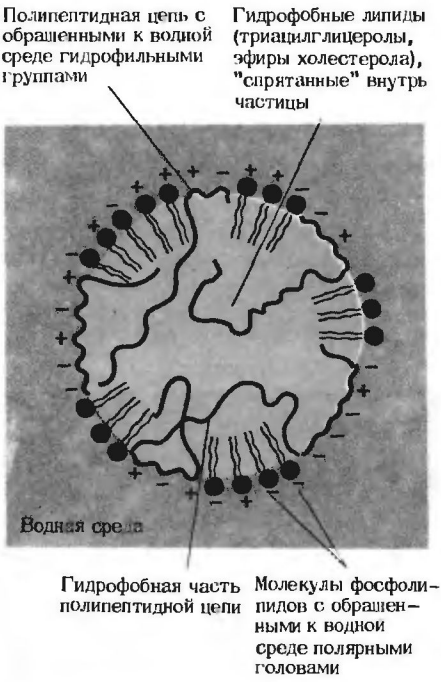


Рис. 12-15. Схематическая модель липопротеина плазмы. На внешней поверхности расположены фрагменты полипептидных цепей и полярные головы фосфолипидов, контактирующие с водной фазой. Нерастворимые в воде триацилглицеролы и холестерол спрятаны от воды внутри частицы.

ротора. Кроме липопротеинов трех классов, в плазме крови содержатся также *хиломикроны* (особенно после приема жирной пищи). Хиломикроны представляют собой капельки, состоящие практически из чистых триацилглицеролов, окруженных очень тонким слоем белков (табл. 12-4). По размеру они значительно больше липопротеинов. Хиломикроны переносят триацилглицеролы из тонкого кишечника, где они всасываются во время пищеварения, в жировые депо.

Многочисленные факты позволяют предположить, что высокое содержание в плазме *липопротеинов низкой плотности* (ЛПНП) при низком содержании *липопротеинов высокой плотности* (ЛПВП) является важным фактором возникновения *атеросклероза* – заболевания, протекающего с образованием обильных отложений холестерола и его эфиров

Таблица 12-4. Примерный состав липопротеинов плазмы крови[1)]

Тип	Плотность, г/мл	Белок, %	Триацилглицеролы, %	Фосфолипиды, %	Холестерол, %	Относительные количества триацилглицеролов и белков
Хиломикроны	0,92–0,96	1,7	96	0,8	1,7	
Липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП)	0,95–1,00	10	60	18	15	
Липопротеины низкой плотности (ЛПНП)	1,00–1,06	25	10	22	45	
Липопротеины высокой плотности (ЛПВП)	1,06–1,21	50	3	30	18	

[1)] Имеются три основных класса липопротеинов, различающихся по плотности (т.е. по содержанию липидов). Кроме них в плазме крови содержатся хиломикроны – значительно более крупные частицы с очень низкой плотностью (см. также гл. 24).

на внутренней поверхности кровеносных сосудов. Ограничение кровотока через суженные сосуды мозга или сердца при атеросклерозе может приводить к инсульту или к инфаркту миокарда (гл. 24 и 26).

12.9. Полярные липиды образуют мицеллы, монослои и бислои

Как и мыла (разд. 12.1), полярные липиды обладают амфипатическими свойствами (разд. 4.3). При взбалтывании в воде или водных растворах полярные липиды спонтанно формируют *мицеллы*, в которых углеводородные хвосты липидов спрятаны от воды, а электрически заряженные гидрофильные головы располагаются на поверхности частицы, взаимодействуя с водным окружением (рис. 12-16). Такие мицеллы могут состоять из тысяч липидных молекул. Полярные липиды способны также растекаться по поверхности водных растворов, образуя слой толщиной в одну молекулу – *монослой*. В таких системах углеводородные хвосты обращены к воздушной среде и избегают таким образом контакта с водой, а гидрофильные головы погружены в полярную водную фазу (рис. 12-16).

На поверхности раздела двух водных фаз полярные липиды легко и самопроизвольно формируют очень тонкие *бислои*. В таких структурах углеводородные хвосты липидных молекул направлены внутрь от обращенных к каждой из фаз поверхностей и образуют внутренний непрерывный углеводородный слой, а располагающиеся снаружи гидрофильные головы оказываются погруженными в водный раствор. В зависимости от природы содержащихся в них жирных кислот фосфолипидные бислои имеют толщину от 6 до 7 нм, они лишены жесткости, находятся в жидком состоянии и легко могут изгибаться. В лабораторных условиях такие бислои нетрудно получить путем сильного встряхивания водных суспензий фосфолипидов; при этом образуются *липосомы* – замкнутые пузырьки, окруженные непрерывным липидным бислоем (рис. 12-

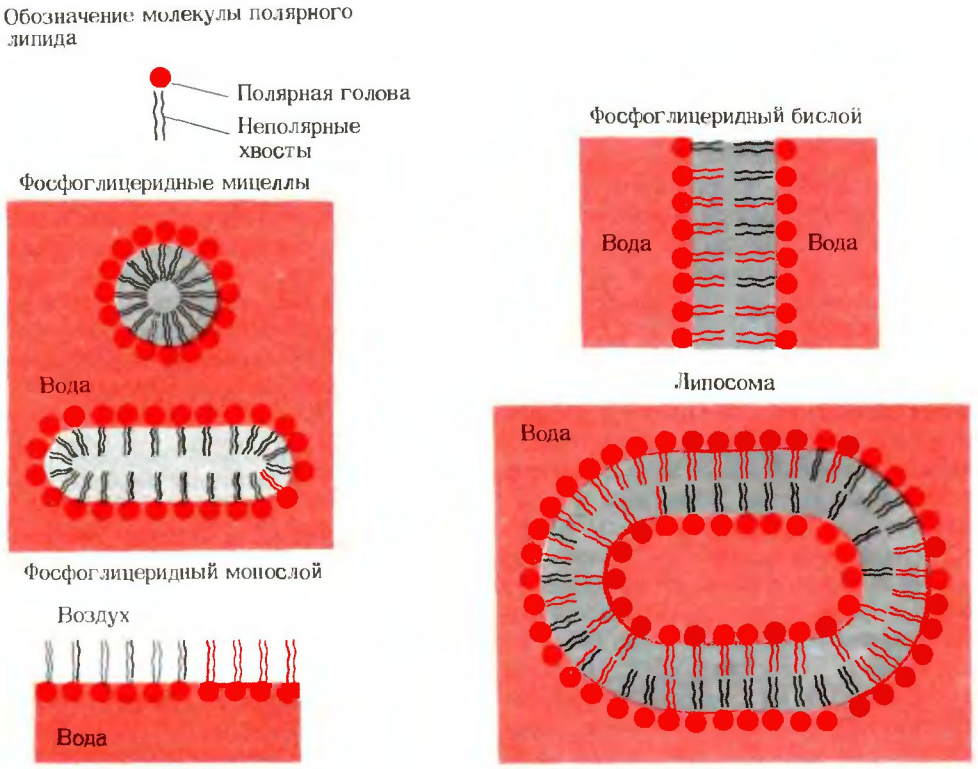


Рис. 12-16. Полярные липиды, особенно фосфоглицериды, способны спонтанно образовывать мицеллы, монослои и бислои. Они могут образовывать также замкнутые пузырьки, называемые липосомами, которые с успехом используются в качестве моделей для изучения свойств клеточных мембран и органелл.

16). Фосфолипидные бислои можно получить также на маленьких отверстиях перегородок, разделяющих два водных раствора. Липидные бислои и липосомы служат предметом интенсивных исследований, так как оказалось, что по своим свойствам они очень сходны с природными мембранами. Например, и полярные липидные бислои, и природные мембраны обладают высоким электрическим сопротивлением, вследствие чего и те и другие непроницаемы для катионов или анионов, но легко пропускают молекулы воды.

При введении в кровоток липосомы захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы, локализованными главным образом в костном мозгу и селезенке; в этих клетках липиды липосом подвергаются метаболическим превращениям. Указанное обстоятельство позволяет использовать липосомы для доставки специфических лекарств в ретикулоэндотелиальную систему и таким образом направленно воздействовать именно на эту ткань. С этой целью липосомы «нагружают» раствором лекарственного препарата и затем вводят в кровь. В экспериментах на животных было показано, что использование липосом в качестве переносчиков лекарств значительно уменьшает токсичность и увеличивает эффективность препаратов, действующих против простейших, вызывающих *лейшманиоз* – изнурительное заболевание, поражающее миллионы людей в тропических странах. При определенных условиях липосомы могут сливаться с плазматическими мембранами клеток. Это позволяет в экспериментальных условиях изменять липидный состав клеточных мембран и изучать значение таких изменений.

В результате воздействия тех же сил, которые стабилизируют структуру глобулярных белков, фосфолипиды в водных растворах самопроизвольно формируют бислои и липосомы. Вспомним, что в воде полипептидная цепь принимает такую конформацию, при которой гидрофобные R-группы аминокислотных остатков расположены внутри глобулы и тем самым защищены от контактов с водой, тогда как гидрофильные полярные R-группы торчат наружу, контактируя с водной средой. Совершенно то же самое происходит и с полярными липидами: они способны к самосборке в структуры, в которых неполярные углеводородные цепи спрятаны, а полярные группы обращены к воде. Сами по себе триацилглицеролы не могут формировать мицеллы, поскольку они не имеют полярных голов; однако в смеси с фосфоглицеридами они образуют мелкодисперсные эмульсии, в капельках которых молекулы фосфоглицеридов располагаются на поверхности, а триацилглицеролы – внутри. Подобное строение имеют жировые капельки в клетках (рис. 12-5), а также хиломикроны.

12.10. Полярные липиды и белки – основные компоненты мембран

Внешние, или плазматические, мембраны многих клеток, а также мембраны ряда внутриклеточных органелл, например митохондрий и хлоропластов, удалось выделить в свободном виде и изучить их молекулярный состав. Во всех мембранах имеются полярные липиды в количестве, составляющем в зависимости от типа мембраны от 20 до 80% ее массы, остальное приходится главным образом на долю белков. Так, в плазматических мембранах животных клеток количество белков и липидов, как правило, примерно одинаково; во внутренней митохондриальной мембране содержится около 80% белков и только 20% липидов, а в миелиновых мембранах мозга, наоборот, около 80% липидов и только 20% белков. Липидная часть мембран представляет собой смесь различного рода полярных или амфипатических липидов. В мембранах животных клеток присутствуют в основном фосфоглицериды и в меньших количествах – сфинголипиды. Триацилглицеролы обнаруживаются лишь в следовых количествах. Некоторые мембраны животных клеток, в особенности наружная плазматическая мембрана, содержат значительные количества холестерола и его эфиров. Для каждого типа мембран любой животной клетки характерен свой относительно постоянный липидный состав (табл. 12-5).

Таблица 12-5. Примерный липидный состав (в процентах) субклеточных мембран печени крысы

Обратите внимание на высокий уровень холестерола и его эфиров, а также гликолипидов (значительную часть которых составляют ганглиозиды) в плазматической мембране.

Мембрана	Фосфолипиды	Холестерол	Гликолипиды	Эфиры холестерола и минорные компоненты
Плазматическая	57	15	6	22
Аппарата Гольджи	57	9	0	34
Эндоплазматического ретикулума	85	5	0	10
Внутренняя митохондриальная	92	0	0	8
Ядерная	85	5	0	10

Природные мембраны характеризуются очень малой толщиной (от 6 до 9 нм), эластичностью, а также тем, что они находятся в жидком состоянии. Через мембраны легко проходит вода, но они практически полностью непроницаемы для заряженных ионов типа Na^+, Cl^- или H^+ и для полярных, но не заряженных молекул, например сахаров. Только те полярные молекулы проникают через природные мембраны, для которых существуют специфические транспортные системы, или переносчики. В то же время растворимые в липидах

молекулы легко проходят через природные мембраны благодаря своей способности растворяться в углеводородном слое мембран. Как природные мембраны, так и полярные липидные бислои обладают высоким электрическим сопротивлением и потому являются хорошими изоляторами. Такое сходство свойств позволяет считать, что природные мембраны представляют собой сплошной, пластиноподобный полярный липидный бислой, в который включены многочисленные белки.

В различных мембранах на долю белков приходится от 20 до 80% массы. В мембране эритроцита, например, содержится около 20 различных белков, а во внутренней митохондриальной мембране их значительно больше. Некоторые белки в мембранах обладают ферментативной активностью, другие обеспечивают связывание и перенос молекул полярных веществ через мембраны. Мембранные белки различаются по характеру связи с мембранными структурами. Одни белки, называемые *внешними*, или *периферическими*, непрочно связаны с поверхностью мембраны; другие, называемые *внутренними*, или *интегральными*,– погружены внутрь мембраны и даже могут пронизывать ее насквозь (рис. 12-17). Периферические белки обычно легко экстрагируются из мембран, тогда как интегральные белки могут быть выделены только при помощи детергентов или органических растворителей.

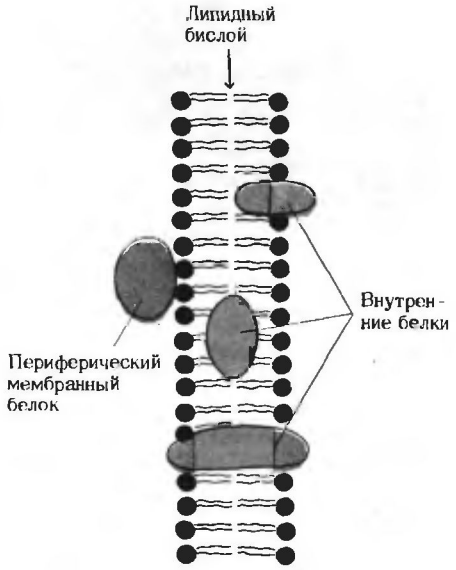


Рис. 12-17. Мембранные белки. Периферические (внешние) белки легко отделяются от мембраны, тогда как интегральные мембранные белки плохо экстрагируются водными растворами.

Важную роль в изучении строения мембран сыграли методы химического анализа, но наряду с этим обширная информация была получена и при использовании электронной микроскопии (дополнение 12-1).

Дополнение 12-1. Электронная микроскопия мембран

В сочетании с разнообразными методами приготовления и окрашивания тканей электронная микроскопия позволила выявить много важных деталей в строении мембран. На приведенных ниже фотографиях видны три разных изображения плазматической мембраны эритроцита, полученные при электронной микроскопии препаратов, приготовленных тремя различными методами.

На рис. 1 показан вид плазматической мембраны эритроцита сбоку. Эта фотография, на которой видны две темные линии («железнодорожные пути») получена после фиксации клеток четырехокисью осмия. Линии соответствуют наружному и внутреннему полярным слоям, состоящим из полярных голов мембранных липидов. Светлая зона между линиями соответствует гидрофобной части липидного бислоя, в которой находятся неполярные углеводород-

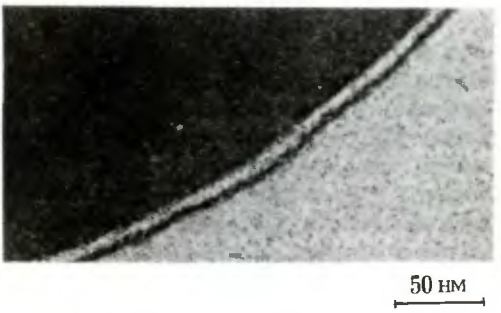


Рис. 1.

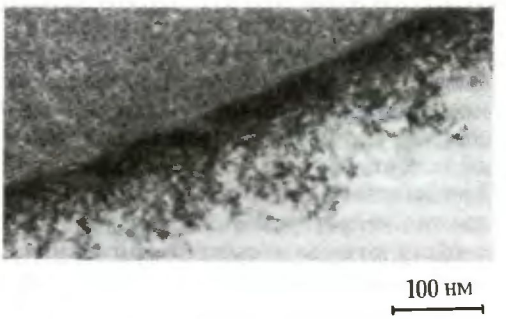


Рис. 2. Гликокаликс эритроцита. Эритроцит окружен наобычайно пышной оболочкой, толщина которой составляет около 140 нм. Она образована олигосахаридными нитями диаметром 1,5–2,5 нм.

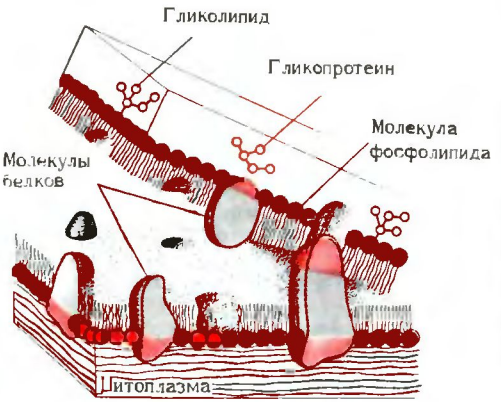


Рис. 3.



Рис. 4.

ные цепи жирных кислот. Эта микрофотография получена методом *трансмиссионной электронной микроскопии*.

На рис. 2 показан гликокаликс (разд. 11.12) на внешней поверхности эритроцита, выявленный специальным методом окрашивания. Эта «пушистая оболочка» состоит из гидрофильных олигосахаридных групп гликопротеинов и гликолипидов, ее толщина – около 100 нм, что приблизительно в 10 раз превышает толщину липидного бислоя.

На рис. 3 и 4 показана внутренняя сторона мембраны эритроцита; электронная микрофотография на рис. 4 получена с использованием *метода замораживания–скалывания*. При приготовлении препаратов этим методом клетки сначала замораживают, а затем замороженный блок раскалывают. Иногда линия раскола проходит в плоскости между двумя липидными слоями (рис. 3). С обеих образующихся при этом поверхностей делают отпечатки, которые затем исследуют в электронном микроскопе (рис. 4). Внутренняя часть каждого из липидных слоев имеет гладкую поверхность; расположенные на ней скопления – это молекулы интегральных белков. Стрелкой показан внешний край скола.

При исследовании других особенностей строения мембран применяются также методы *сканирующей электронной микроскопии* [на-

пример, для изучения микроворсинок, расположенных на поверхности клеток (рис. 2-20, разд. 2-19)] и *негативного контрастирования* [для выявления крупных периферических белков, например, F_1-АТРазы внутренней митохондриальной мембраны (гл. 17)].

12.11. Мембраны имеют жидкостно-мозаичную структуру

Исходя из результатов исследований, проведенных химическими и электронно-микроскопическими методами, а также учитывая сходство в свойствах синтетических фосфолипидных бислоев и природных мембран, С. Джонатан Сингер и Гарт Николсон сформулировали в 1972 г. теорию строения мембран, получившую название *жидкостно-мозаичной модели* (рис. 12-18). Согласно этой модели, основной непрерывной частью мембраны, т.е. ее матриксом, служит полярный липидный бислой. При обычной для клетки температуре матрикс находится в жидком состоянии, что обеспечивается определенным соотношением между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами в гидрофобных хвостах полярных липидов. Жидкостно-мозаичная модель предполагает также, что на поверхности расположенных в мембране интегральных белков имеются гидрофобные R-группы аминокислотных остатков, за счет которых белки как бы «растворяются» в центральной гидрофобной части бислоя. В то же время на поверхности периферических, или внешних, белков, имеются в основном гидрофильные R-группы, которые притягиваются к гидрофильным заряженным полярным головам липидов за счет электростатических сил. Интегральные белки, а к ним относятся ферменты и транспортные белки, обладают активностью только в том случае, если находятся внутри гидрофобной части бислоя, где они приобретают необходимую для проявления активности пространственную конфигурацию. Следует еще раз подчеркнуть, что ни между молекулами липидов в бислое, ни между белками и липидами бислоя не образуется ковалентных связей.

Далее, из жидкостно-мозаичной модели следует, что мембранные белки могут свободно перемещаться в латеральной плоскости. Периферические бел-

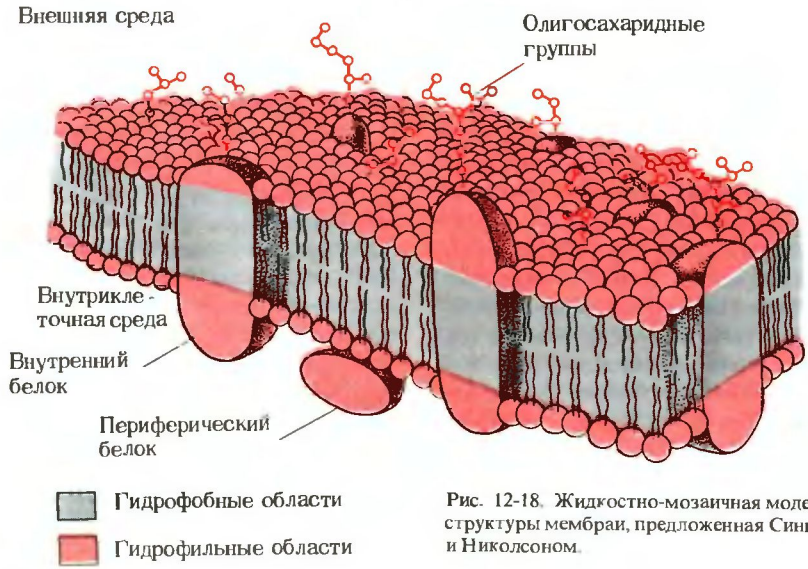


Рис. 12-18. Жидкостно-мозаичная модель структуры мембраи, предложенная Сингером и Николсоном.

ки буквально плавают на поверхности бислойного «моря», а интегральные белки, подобно айсбергам, почти полностью погружены в углеводородный срединный слой (рис. 12-18). Способность мембранных белков передвигаться в латеральной плоскости может быть, однако, ограничена вследствие притяжения между функционально связанными белками и образования ими кластеров, что в конечном итоге приводит к мозаичному распределению мембранных белков в жидком липидном бислое. Предполагают, что такие кластеры мембранных белков могут латерально перемещаться в бислое. Этот процесс лежит, по-видимому, в основе так называемого *кэпинга*, т.е. перемещения определенных мембранных белков в специфические участки или зоны мембраны, происходящего в клетках некоторых типов на протяжении их жизненного цикла. Модель Сингера–Николсона позволяет объяснить многие физические, химические и биологические свойства мембран; она получила широкое признание как наиболее вероятный способ молекулярной упаковки липидов и белков в мембранах. Однако, как мы увидим дальше, некоторые структурные особенности биологических мембран все же не укладываются в рамки жидкостно-мозаичной модели.

12.12. Мембраны асимметричны, т. е. имеют неравноценные стороны

В большинстве своем мембраны асимметричны, т.е. имеют неравноценные стороны, что хорошо согласуется с жидкостно-мозаичной моделью. Эта асимметричность проявляется, во-первых, в том, что внутренняя и внешняя стороны плазматических мембран бактериальных и животных клеток различаются по составу полярных липидов. Так, например, внутренний липидный слой мембраны эритроцитов человека содержит в основном фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, а внешний – фосфатидилхолин и сфингомиелин. Во-вторых, некоторые транспортные системы в мембранах действуют только в одном направлении. Например, в мембранах эритроцитов имеется транспортная система («насос»), перекачивающая ионы Na^+ из клетки в окружающую среду, а ионы K^+ – внутрь клетки за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТР. Этот насос, получивший название *Na^+, K^+-транспортной АТР-азы*, никогда не перекачивает ионы Na^+ и K^+ в обратных направлениях. В-третьих, на внешней поверхности плазматических мембран содержится очень большое число олигосахаридных группировок, представляющих собой головы гликолипидов и олигосахаридные боковые цепи гликопротеинов, тогда как на внутренней поверхности плазматической мембраны олигосахаридных группировок практически нет.

Асимметричность биологических мембран сохраняется главным образом за счет того, что перенос индивидуальных молекул фосфолипидов с одной стороны липидного бислоя на другую очень затруднен (рис. 12-19). Препятствием для такого переноса служит высокий уровень энергии, необходимой для проталкивания полярных, заряженных голов молекул фосфолипидов через срединный углеводородный слой мембраны. Следовательно, полярная молекула липида способна свободно перемещаться на своей стороне бислоя, но ограничена в возможности перескочить на другую поверхность (рис. 12-19).

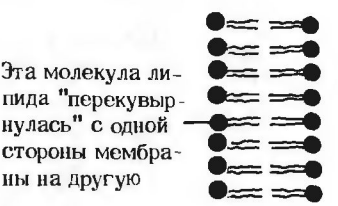


Рис. 12-19. Асимметричность распределения липидов на двух поверхностях липидного бислоя клеточной мембраны. Полярные липидные молекулы могут свободно перемещаться по поверхности каждой из сторон мембраны, однако тот «перескок» молекул липида с одной стороны мембраны на другую, который показан на схеме, происходит лишь в редких случаях.

12.13. Мембраны эритроцитов исследованы очень подробно

Изучение белков, содержащихся в плазматической мембране эритроцитов, позволило сформулировать новые представления о строении мембран. Возникло, в частности, предположение о том, что по крайней мере некоторые мембраны имеют «скелет». В мембране эритроцита человека содержится пять главных белков и большое число минорных. Большинство мембранных белков – гликопротеины. К интегральным белкам в мембране эритроцита относится *гликофорин* («переносчик сахара»). Его молекулярная масса составляет 30000; гликофорин содержит 130 аминокислотных остатков и множество остатков сахаров, на долю которых приходится около 60% всей молекулы. На одном из концов полипептидной цепи располагается гидрофильная голова сложного строения, включающая в себя до 15 олигосахаридных цепей, каждая из которых состоит приблизительно из 10 остатков сахаров. На другом конце полипептидной цепи гликофорина находится большое число остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот (рис. 12-20), которые при pH 7,0 несут отрицательный заряд. В середине молекулы, между двумя гидрофильными концами, располагается участок полипептидной цепи, содержащий около 30 гидрофобных аминокислотных остатков. Богатый сахарами конец молекулы гликофорина локализуется на внешней поверхности мембраны эритроцита, выступая из нее в виде кустика. Считают, что расположенный в середине молекулы гликофорина гидрофобный участок проходит сквозь липидный бислой, а полярный конец с отрицательно заряженными остатками аминокислот погружен в цитозоль. Богатая сахарами голова гликофорина содержит антигенные детерминанты, определяющие группу крови (A, B или O). Кроме того, на ней имеются участки, связывающие некоторые патогенные вирусы.

На долю другого важного белка мембраны эритроцитов – *спектрина* – приходится до 20% общего количества белков в мембране. Этот периферический белок расположен на внутренней поверхности мембраны; он легко поддается экстракции. Молекула спектрина состоит из четырех полипептидных цепей, суммарная молекулярная масса которых составляет около 1 млн.; эти цепи образуют длинные гибкие стержни длиной 100–200 нм. Связываясь с определенными белками и липидами на внутренней поверхности мембраны эритроцита, молекулы спектрина формируют гибкую решетку, которая, по-видимому, играет роль скелета мембраны. Со спектрином связываются также микрофиламенты актина, и весьма вероятно, что именно они соединяют стержни спектрина друг с другом. Таким образом, можно говорить о том, что мембрана эритроцита имеет скелет, или каркас, на котором крепятся специфические липиды и мембранные белки (рис. 12-21).

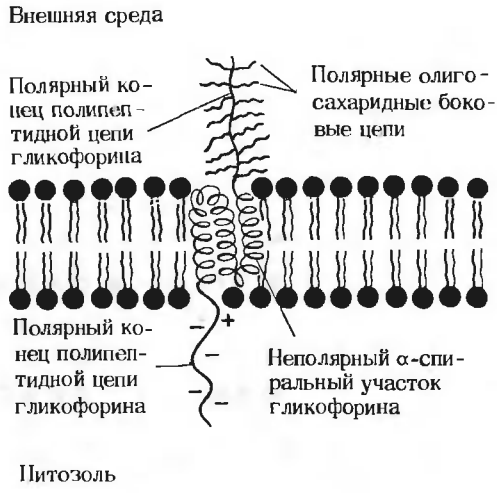


Рис. 12-20. Молекула гликофорина в мембране эритроцита. Выступающие из мембраны разветвленные углеводные цепи несут специфические участки, определяющие группу крови, а также участки, ответственные за связывание некоторых вирусов.

Плазматические мембраны других клеток имеют более сложное строение. На внешней поверхности клеток во многих плотных тканях присутствует еще один важный гликопротеин – *фибронектин* (разд. 11.12), обладающий высокой

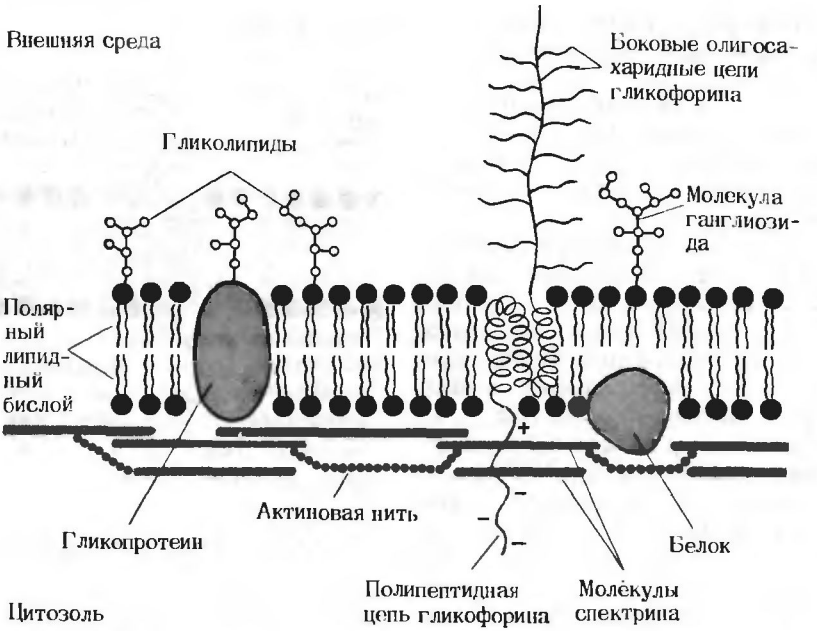


Рис. 12-21. Схематическое изображение участка эритроцитарной мембраны. На схеме показаны олигосахаридные «антенны», образованные мембранными гликопротеинами и гликолипидами, боковые олигосахаридные цепи гликофорина, а также присоединенная к внутренней поверхности мембраны скелетная основа из молекул спектрина, связанных между собой короткими нитями актина.

адгезивной способностью и, возможно, обеспечивающий слипание однотипных клеток друг с другом.

12.14. Лектины – специфические белки, способные связываться с определенными клетками и вызывать их агглютинацию

Много лет назад было установлено, что определенные растительные белки, часто называемые *фитогемагглютининами*, способны связываться с эритроцитами и вызывать их агглютинацию. В дальнейшем оказалось, что фитогемагглютинины могут присоединяться к поверхности многих других животных клеток. Хотя белки этого типа содержатся главным образом в растениях, особенно у представителей семейства бобовых, они встречаются также и в тканях беспозвоночных. В числе первых открытых фитогемагглютининов были *конканавалин А* из канавалии мечевидной и *рицин* из клещевины обыкновенной. Эти и многие другие белки растений и животных, способные связываться со специфическими углеводными группами на поверхности клеток, получили название *лектинов* (от лат. «legere» – подбирать или выбирать). Например, конканавалин А связывается с D-глюкозой и D-маннозой, а лектин из бобов сои – с D-галактозой и N-ацетил-D-галактозамином. Сейчас идентифицировано уже более 1000 лектинов. Очень важен и интересен тот факт, что некоторые лектины вызывают избирательную агглютинацию злокачественных опухолевых клеток. Это указывает на различия в структуре поверхностей опухолевых и нормальных клеток: по-видимому, специфические углеводные остатки на поверхности опухолевых клеток более доступны для связывающихся с ними лектинов.

Специфичность лектинов, а также их важное практическое значение проявляются в том, что они способны различать эритроциты трех типов – А, В и О – по структуре олигосахаридных групп гликофорина. Лектин из фасоли лима вызывает агглютинацию только эритроцитов

типа А, лектин из лотосовых – эритроцитов типа В, а третий лектин, также растительного происхождения, агглютинирует только эритроциты типа О. Лектин из фасоли лима связывается с гликопротеинами, содержащими в качестве главного сахарного компонента N-ацетил-D-галактозамин, а лектины, реагирующие с эритроцитами типа О – с поверхностными гликопротеинами, содержащими сахар *фукозу*. Специфические гликопротеины имеются на поверхности не только эритроцитов, но и других клеток животных тканей. Именно из-за этих гликопротеинов при пересадке кожи или какого-либо органа (например, почек или сердца) от одного человека другому необходима идентичность тканей донора и реципиента для успешного приживления трансплантируемой ткани.

У растений и беспозвоночных животных лектины, вероятно, функционируют как защитные белки, предохраняя эти лишенные иммунной системы, а следовательно, и антител организмы от вторжения паразитарных микроорганизмов. Считают, что лектины располагаются на поверхности клеток растений.

12.15. Мембраны имеют очень сложные функции

Сейчас уже ясно, что мембраны выполняют многочисленные сложные динамические функции и обладают рядом замечательных биологических свойств; следовательно, их нельзя рассматривать ни как простые инертные оболочки, ограничивающие содержимое клеток, ни как статичные, неизменяющиеся структуры. Большинство мембран содержит ферменты, одни из которых взаимодействуют с субстратами, находящимися с наружной стороны мембраны, а другие – с субстратами внутри ограниченного мембраной пространства. Во внутренней мембране митохондрий и в тилакоидной мембране хлоропластов локализована сложная система из многочисленных ферментов и других белков. Как правило, в мембраны включены также транспортные системы, которые обеспечивают перенос специфических молекул питательных органических веществ, например глюкозы, и позволяют определенным неорганическим ионам проникать внутрь клетки, а продуктам жизнедеятельности клетки – выходить из нее. Регулируя поток веществ внутрь клетки и из нее, такие транспортные системы способствуют поддержанию постоянства внутриклеточной среды. Поверхность мембран несет также электрически заряженные группы, которые помогают поддерживать разность электрических потенциалов на мембране. Это особенно важно в случае нервных клеток, способных передавать импульсы в форме очень быстрых волнообразных изменений электрических свойств мембраны вдоль вытянутого тела клетки или аксона. Мембраны клеток самопроизвольно восстанавливают свою целостность: если их проткнуть или механически разрушить, они автоматически в течение короткого времени вновь замыкаются («запечатываются»).

На внешней поверхности мембран имеются специфические *распознающие участки*, функции которых состоят в распознавании определенных молекулярных сигналов. Например, именно посредством мембраны некоторые бактерии воспринимают незначительные изменения концентрации питательного вещества, что стимулирует их движение к источнику пищи; это явление носит название *хемотаксиса*. На внешней поверхности мембран животных клеток есть также участки, узнающие другие клетки того же типа и тем самым способствующие связыванию клеток друг с другом в процессе формирования тканей. Распознающие участки еще одного типа служат специфическими рецепторами гормонов. Так, определенные участки на поверхности клеток печени и мышц распознают и связывают такие гормоны, как *инсулин*, *глюкагон* и *адреналин*. Связавшие гормон рецепторные участки передают через мембрану сигналы, которые поступают во внутриклеточные ферментативные системы и регулируют их активность. Кроме того, на поверхности клеток имеются особые участки, спе-

цифичные для данного индивидуума или вида, которые получили название *участков тканевой совместимости.*

Важными компонентами многих распознающих или рецепторных участков мембраны животных клеток служат, по-видимому, ганглиозиды. Содержание ганглиозидов по сравнению с другими мембранными липидами очень невелико, но, видимо, они могут концентрироваться в определенных участках. Большое разнообразие ганглиозидов, каждый из которых несет свою олигосахаридную голову, позволило предположить, что ганглиозиды наряду с гликопротеинами формируют на поверхности клеток специфические мозаичные структуры, выполняющие роль рецепторных участков. Отрицательно заряженные полярные группы (головы) ганглиозидов могут служить рецепторами, т.е. выступающими на поверхности клетки антеннами, распознающими молекулы определенных сигнальных веществ, в частности гормонов.

Таким образом, мембраны клеток представляют собой очень сложные структуры; составляющие их молекулярные комплексы образуют упорядоченную двумерную мозаику, и это придает поверхности мембран биологическую специфичность. Молекулярная организация клеточных мембран – один из наиболее актуальных предметов исследования в современной клеточной биологии и биохимии.

Краткое содержание главы

Липиды – это жироподобные, нерастворимые в воде компоненты клеток, экстрагируемые неполярными растворителями. Одни липиды служат структурными компонентами мембран, другие представляют собой форму запасания клеточного «топлива». Жирные кислоты – гидрофобные компоненты липидов – обычно содержат четное число атомов углерода, чаще всего 16 или 18. Жирные кислоты могут быть насыщенными или ненасыщенными, причем ненасыщенные имеют *цис*-конфигурацию. У большинства ненасыщенных жирных кислот одна двойная связь находится в Δ^9-положении. Натриевые или калиевые соли жирных кислот называются мылами. Молекулы триацилглицеролов содержат три молекулы жирных кислот, которые образуют сложно-эфирные связи с тремя гидроксильными группами глицерола. Простые триацилглицеролы содержат жирные кислоты только одного типа, а смешанные – по крайней мере двух разных типов. Триацилглицеролы служат главным образом формой накопления жиров в организме.

Полярные липиды, состоящие из полярных голов и неполярных углеводородных хвостов, являются основными компонентами мембран. Из всех полярных липидов наиболее широко распространены фосфоглицериды. Фосфоглицериды содержат две молекулы жирных кислот, образующие сложно-эфирные связи с двумя свободными гидроксильными группами глицерол-3-фосфата, и еще одну молекулу спирта, гидроксильная группа которого этерифицирована фосфорной кислотой. Этот остаток спирта представляет собой полярную голову всей молекулы фосфоглицерида. Фосфоглицериды отличаются друг от друга строением полярных голов. Наиболее распространенные фосфоглицериды – фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. При pH, близких к 7, полярные головы фосфоглицеридов несут отрицательный заряд. У других мембранных липидов, а именно у сфинголипидов, основой структуры служит не глицерол, а сфингозин. Такой сфинголипид, как сфингомиелин, содержит кроме фосфорной кислоты и холина две длинные углеводородные цепи, одна из которых образована жирной кислотой, а вторая – сфингозином, длинноцепочечным алифатическим аминоспиртом. Относящийся к стеролам холестерол играет роль предшественника в биосинтезе многих стероидов и служит важным компонентом плазматических мембран клеток.

Все полярные липиды содержат полярные или заряженные головы и неполярные углеводородные хвосты; они самопроизвольно образуют мицеллы, монослои и бислои, стабилизированные

за счет гидрофобных взаимодействий. Полярные липидные бислои составляют структурную основу клеточных мембран; в мембраны включены также многочисленные белки, одни из которых (внешние белки) находятся на поверхности, а другие (внутренние белки) — внутри мембран. Наружная и внутренняя поверхности мебран неидентичны, причем на наружной поверхности располагаются гидрофильные олигосахаридные группы гликопротеинов и гликолипидов. Некоторые из этих олигосахаридных групп играют важную роль в процессах узнавания клетками друг друга и адгезии, а также определяют тканевую специфичность и входят в состав рецепторных участков для гормонов.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C. Form and Function of the Phospholipids, 2d ed., Elsevier, New York, 1973. Всестороннее обсуждение предмета.

Gurr A. L., James A. T. Lipid Biochemistry: An Introduction, 3d ed., Methuen, New York, 1980.

Hanson J. R. Introduction to Steroid Chemistry, Pergamon, New York, 1968. Краткая сводка данных.

Harrison R., Lunt G. G. Biological Membranes, Their Structure and Function, 2d ed., Halsted, New York, 1980. Прекрасная книга, написанная на современном уровне. Множество превосходных иллюстраций.

Weissmann G., Claiborne R. (eds.). Cell Membranes: Biochemistry, Cell Biology, and Pathology, H. P. Publishing Co., New York, 1975. Интересный и хорошо иллюстрированный обзор.

Статьи

Benson A. A., Lee R. F. The Role of Wax in Oceanic Food Chains, Sci. Am., **232**, 77–86, March (1975).

Capaldi R. A. A Dynamic Model of Cell Membranes, Sci. Am., **230**, 26–33, March (1974). Уточнение модели Сингера – Николсона.

Fishman P. H., Brady R. O. Biosynthesis and Function of Gangliosides, Science, **194**, 906–915 (1976).

Lodish H. F., Rothman J. E. The Assembly of Cell Membranes, Sci. Am., **240**, 48–63, January (1979).

Lux S. E. Dissecting the Red Cell Membrane Skeleton, Nature, **281**, 426–429 (1979).

Marchesi V. T. Spectrin: Present Status of a Putative Cyto-Skeletal Protein of the Red Cell Membrane, J. Membrane Biol., **51**, 101–131 (1979).

Marx J. L. Liposomes: Research Applications Grow, Science, **199**, 1056–1128 (1978).

Sharon N. Lectins, Sci. Am., **236**, 108–119, June (1977).

Singer S. J., Nicolson G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Membranes, Science, **175**. 720–731 (1972).

Вопросы и задачи

1. *Температура плавления жирных кислот.* Жирные кислоты с 18 углеродными атомами имеют следующие точки плавления: стеариновая кислота +69,6°; олеиновая кислота +13,4°С; линолевая кислота −5° и линоленовая кислота −11°С. Какими структурными особенностями определяется та или иная температура плавления этих кислот? Объясните, какова молекулярная основа определенной направленности в изменении температуры плавления.
2. *Прогоркание кулинарных жиров.* Некоторые из применяемых в кулинарии жиров, например сливочное масло, быстро портятся при хранении на воздухе при комнатной температуре, тогда как свойства твердых жиров типа маргарина в аналогичных условиях меняются мало. Почему?
3. *Приготовление майонеза.* В процессе приготовления майонеза фосфатидилхолин (лецитин) из яичных желтков переходит в растительное масло, что стабилизирует соус и не позволяет ему расслаиваться. Объясните, почему это происходит.
4. *Гидролиз липидов.* Назовите продукты, образующиеся при мягком гидролизе разведенным раствором едкого натрия следующих соединений:
   а) 1-стеароил-2,3-дипальмитоилглицерол,
   б) 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолин.

   Какие продукты получатся при воздействии на вещество б) горячего концентрированного NaOH?
5. *Суммарный электрический заряд фосфолипидов.* Как будут заряжены при pH 7,0 а) фосфатидилхолин, б) фосфатидилэтаноламин и в) фосфатидилсерин?
6. *Защита растений-суккулентов.* Произрастающие в засушливых районах суккуленты обычно покрыты восковым налетом.

Как это способствует выживанию растений?

7. *Число молекул детергента в мицелле.* При растворении в воде небольших количеств додецилсульфата натрия

$$[CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-Na^+]$$

широко распространенного детергента – ионы детергента остаются в растворе в виде мономеров. При увеличении концентрации детергента наступает момент (критическая концентрация мицеллообразования), когда в результате ассоциации мономеров образуются мицеллы (рис. 12-16). Критическая концентрация мицеллообразования для додецилсульфата натрия составляет 8,2 мМ. При изучении свойств мицелл было установлено, что их молекулярная масса в среднем составляет 18 000. Рассчитайте, сколько молекул детергента содержится в одной мицелле.

8. *Гидрофобные и гидрофильные группы мембранных липидов.* Все мембранные липиды представляют собой амфипатические соединения, т.е. содержат как гидрофобные, так и гидрофильные группы. Например, в молекуле фосфатидилхолина гидрофобную часть образуют две цепочки жирных кислот, а гидрофильную – фосфохолиновая голова. Назовите структурные компоненты, играющие роль гидрофобных и гидрофильных групп в каждом из указанных ниже мембранных липидов:
   а) фосфатидилэтаноламин,
   б) сфингомиелин,
   в) галактоцереброзид,
   г) ганглиозид,
   д) холестерол.

9. *Свойства липидов и липидных бислоев.* Липидные бислои, сформированные на границе двух водных фаз, обладают следующими важными свойствами: они образуют двумерные пленки; края этих пленок замыкаются сами на себя; в результате самозапечатывания образуются замкнутые структуры – липосомы.
   а) Объясните, какими свойствами липидов обусловлены эти свойства бислоев?
   б) Каково биологическое значение этих свойств и как они связаны со структурой биологических мембран?

10. *Проникновение ионов через клеточные мембраны.* Липидный бислой клеточной мембраны предохраняет клетки от быстрой потери ионов K^+, Cl^- и Mg^{2+}. Почему?

11. *Экстракция интегральных мембранных белков.* В отличие от цитоплазматических белков многие включенные в мембрану белки практически не поддаются экстракции из мембраны в водный раствор (рис. 12-17). Тем не менее такие белки удается все же отделить от мембраны и получить в растворенном виде, если в раствор, используемый для экстракции, добавить додецилсульфат натрия (см. вопрос 7) или какой-либо другой детергент, например холат натрия. На чем основан этот прием?

12. *Роль остатков сахаров в ориентации мембранных гликопротеинов.* Изучение различных мембранных гликопротеинов показывает, что остатки сахаров всегда располагаются на наружной поверхности мембраны (см., например, рис. 12-18). Одно из возможных объяснений этого явления состоит в том, что именно остатки сахаров обеспечивают асимметричную ориентацию гликопротеина в мембране.
   а) Почему остатки сахаров локализуются на наружной поверхности мембраны, а не внутри нее?
   б) Объясните, каким образом остатки сахаров обеспечивают асимметричность распределения гликопротеинов в мембране?

13. *Текучесть мембран и значение этой характеристики.* Согласно основной гипотезе мембранологии (т.е. науки о мембранах), для нормального функционирования мембран составляющие их липиды должны быть в жидком (а не в «замороженном») состоянии. Подтверждением этой гипотезы служит тот факт, что соотношение жирных кислот в бактериальных мембранах зависит от условий роста бактерий. Так, если бактерии растут при пониженной температуре, у них увеличивается относительное содержание ненасыщенных жирных кислот (по отношению к насыщенным). И наоборот, если бактерии растут при повышенной температуре, уровень ненасыщенных жирных кислот (по отношению к насыщенным) оказывается ниже нормы.
   а) Подумайте, почему для нормального функционирования интактной бактериальной мембраны мембранные липиды должны находиться в жидком состоянии?
   б) Объясните, почему обнаруженные изменения в соотношении насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в зависимости от температуры роста подтверждают гипотезу о текучем состоянии мембран.

ПРИЛОЖЕНИЕ

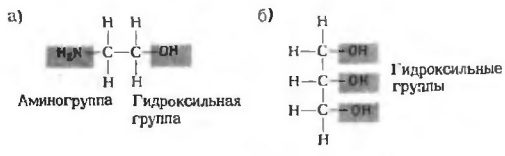
ОТВЕТЫ

Глава 2

1. а) 625 клеток; б) 1×10^5 митохондрий; в) 2×10^5 молекул.
2. а) $1{,}1 \times 10^4$ молекул; б) 1×10^{-4} М.
3. а) 1×10^{-12} г (1 пикограмм); б) 5,9%; в) 4,6%.
4. а) 1,3 мм; длина ДНК в 650 раз превышает размер клетки, поэтому ДНК должна быть плотно скручена, б) 3156 белков.
5. а) Скорость метаболизма лимитируется диффузией, которая в свою очередь зависит от площади поверхности. б) Для бактерии – 12×10^6 м$^{-1}$, или 12 мкм$^{-1}$, для амебы 4×10^4 м$^{-1}$, или 0,04 мкм$^{-1}$; отношение равно 300. в) Отношение площади поверхности к объему у человека равно 19 м$^{-1}$; соотношение между этими показателями у бактерии и человека равно $(1{,}2 \times 10^6)/1$. Ответ будет иным при других размерах тела.
6. а) 7850; б) $3{,}14 \times 10^{-10}$ м^2; в) $2{,}72 \times \times 10^{-9}$ м^2; г) 765%-ное улучшение отношения площади поверхности к объему.

Глава 3

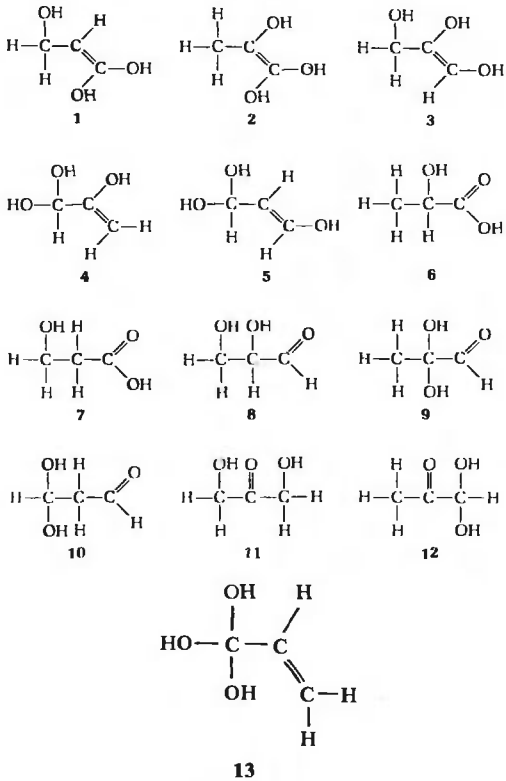
1. Витамины, полученные из этих двух источников, идентичны, и организм не в состоянии различить их.
2.





Эти два энантиомера по-разному взаимодействуют с хиральным биологическим «рецептором» (т.е. с белком).

4. Декседрин представляет собой лишь один из энантиомеров, в то время как бензедрин – это рацемическая смесь.
5. а) 3 молекулы фосфорной кислоты, α-D-рибоза, аденин.
   б) Холин, фосфорная кислота, глицерол, олеиновая кислота, пальмитиновая кислота. в) Тирозин, 2 молекулы глицина, фенилаланин, метионин.
6. а) CH_2O; $C_3H_6O_3$.
   б)



в) Это означает, что X содержит хиральный центр; все, кроме 6, 7, 8 и 12, нестабильны и как таковые не встречаются.

г) Это означает, что X содержит функциональную группу с кислотными свойствами; можно исключить 8; структура 6 согласуется со всеми полученными данными. д) Структура 6; мы не можем различить два возможных энантиомера.

Глава 4

1. 9,6 моляльный, или примерно 9,6 М.
2. 3,35 мл.
3. 1,1.
4. $7{,}5 \times 10^{-6}$ молей.
5. Для равновесной реакции $HA \rightleftarrows H^+ + A^-$ соответствующее уравнение Хендерсона–Хассельбаха выглядит так: $pK' = pH + \log [A^-]/[HA]$. Если кислота (HA) наполовину диссоциирована, то $[HA] = [A^-]$. Тогда $[A^-]/[HA] = 1$, $\log 1 = 0$ и $pK' = pH$.
6. а) В области pH около 9,3; б) $\frac{2}{3}$; в) 10^{-2} л; г) $pH - pK' = -2$.
7. а) 0,1 М HCl; б) 0,1 М NaCl; в) 0,1 М NaOH.
8. Правильный ответ – г).
9. В желудке.
10. 5,80 г $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ и 8,23 г Na_2HPO_4.
11. а) pH крови регулируется CO_2 – бикарбонатной буферной системой согласно следующей суммарной реакции:

$$CO_2 + H_2O \rightleftarrows H^+ + HCO_3^-.$$

При слабом снабжении легких воздухом концентрация CO_2 в них и в артериальной крови возрастает, сдвигая равновесие вправо и повышая концентрацию водородных ионов, т.е. pH крови при этом снижается. б) При усиленном дыхании (гипервентиляции) концентрация CO_2 в легких и в артериальной крови снижается. Это сдвигает равновесие влево, в результате чего расходуются водородные ионы. Таким образом, их концентрация уменьшается, и pH возрастает по сравнению с нормальным значением, которое равно 7,4. в) Молочная кислота – это средняя по силе кислота (pK' 3,86), которая полностью диссоциирует при физиологических условиях

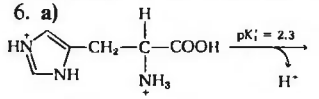
$$CH_3CHOHCOOH \rightleftarrows CH_3CHOHCOO^- + H^+.$$

Вследствие этого pH крови и мышечной ткани снижается. Усиленное дыхание полезно, так как при этом удаляются ионы водорода [см. пункт (б)] и в результате повышается pH крови и тканей в преддверии будущего накопления кислоты.

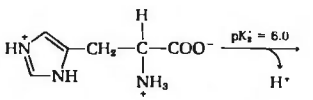
Глава 5

1. +17,9 град · мл/(дм · г); удельное вращение не указывает на то, является ли цитруллин D- или L-аминокислотой.

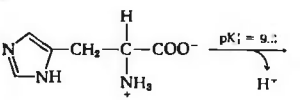
2. Определите абсолютную конфигурацию α-углеродного атома и сравните ее с D- и L-глицеральдегидом.
3. 1) Глицин (б); 2) аланин (е); 3) валин (е); 4) серин (а); 5) пролии (з); 6) фенилаланин (д); 7) триптофан (д); 8) тирозин (к); 9) аспарагиновая кислота (и); 10) глутаминовая кислота (и); 11) метионин (г); 12) цистеин (л); 13) гистидин (ж); 14) аргинин (м); 15) лизин (в); 16) аспарагин (н).
4. а) I, б) II, в) IV, г) II, д) IV, е) II и IV, ж) III, з) III, и) II, к) V, л) III, м) IV, н) V, о) II, п) III, р) IV, с) V, т) I, III и V, у) V.
5. б) Одна десятимиллионная часть.
6. **а)**



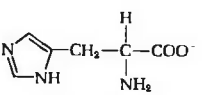
1



2



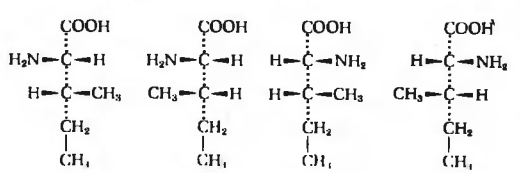
3



4

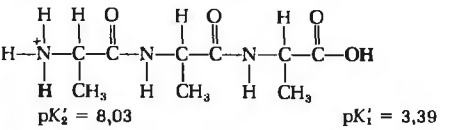
б)	pH	Структура	Суммарный заряд	Направление движения
1	1		+2	Катод (−)
4	2		+1	Катод (−)
8	3		0	Не движется
12	4		−1	Анод (+)

7. 0,879 л 0,1 М глицина и 0,121 л 0,1 М глицин-гидрохлорида.
8. а) К аноду: Glu; б) к катоду: Lys, Arg и His; в) остались на старте Gly и Ala.
9. а) Asp; б) Met; в) Glu; г) Gly; д) Ser.
10. а) 27; б) 6.
11. а) 2; б) 4;
в)



г) 2S, 3R, 2S, 3S, 2R, 3R и 2R, 3S соответственно.

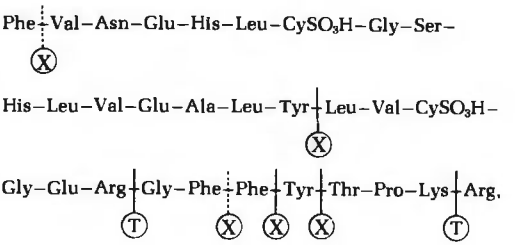
12. а)



б) Ионизация первого протона и в Ala, и в Ala-олигопептиде приводит к образованию основания цвиттерионной природы. Это равновесие сдвигается вправо из-за того, что создаются благоприятные условия для взаимодействия между карбоксилатным анионом и протонированной аминогруппой. Поскольку протонированная аминогруппа ближе к карбоксилатному аниону в Ala, чем в Ala-олигопептиде, равновесие в первом случае сдвигается сильнее, на что указывает более низкое значение pK_1. в) Ионизация второго протона и в Ala, и в Ala-олигопептиде нарушает условия, благоприятствовавшие взаимодействию заряженных группировок. Поскольку эти группировки ближе друг к другу в Ala, чем в Ala-олигопептиде, то в Ala труднее удалить второй протон и соответственно pK_2' для Ala выше, чем pK_2' для Ala-олигопептида.

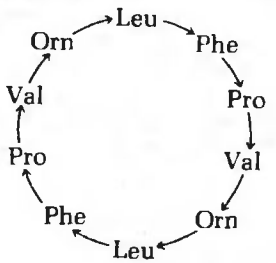
Глава 6

1. 3500 молекул.
2. а) 32 100 г/моль; б) 2.
3. 1200; 12 200 г/моль.
4. +2; +1; 0; −2; pI = 7,8.
5. —COO^-; Asp и Glu.
6. Lys, His, Arg; электростатическое притяжение между отрицательно заряженными остатками фосфора в ДНК и положительно заряженными основными остатками в гистонах.
7. а) $(Glu)_{20}$; б) $(Lys—Ala)_3$; в) $(Asn—Ser—His)_5$; г) $(Asn—Ser—His)_5$.
8.



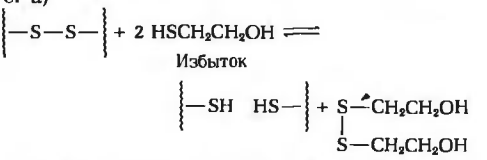
Пунктирные линии показывают плохо расщепляющиеся связи; Т – трипсин, Х – химотрипсин.

9. Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu.
10. а) 1 – к аноду; 2 – к катоду; 3 – к катоду; 4 – к аноду; б) pH 7–9.
11. а) При добавлении высоких концентраций солей из молекул белка удаляется гидратная вода, в результате чего растворимость белка уменьшается. б) Выберите такую концентрацию $(NH_4)_2SO_4$, при которой белок А осаждается, а белок В остается в растворе. Соберите осажденный белок А центрифугированием.
12. Промойте колонку большим избытком свободного лиганда с тем, чтобы вытеснить лиганд, связанный с полимером.
13.



Глава 7

1. а) Короткие связи – это сильные связи высокого порядка, т.е. не одинарные, а двойные или тройные связи. Связь C—N занимает промежуточное положение между одинарной и двойной связью. б) Пептидная связь представлена двумя резонансными структурами. в) Вращение вокруг пептидной связи при физиологических температурах затруднено.
2. Основные структурные единицы полипептидов шерстяных волокон – это следующие друг за другом витки α-спирали, интервал между которыми составляет 0,54 нм. При вытягивании и пропаривании волокон полипептидная цепь удлиняется и расстояние между R-группами в β-конформации увеличивается до 0,70 нм.
3. Около 40 пептидных связей в одну секунду.
4. Отталкивание отрицательно заряженных карбоксильных групп полиглутаминовой кислоты при pH 7 вызывает развертывание полипептидной цепи. К такому же результату приводит отталкивание положительно заряженных аминогрупп полилизина при pH 7.
5. Дисульфидные мостики в остатках цистина служат для образования поперечных сшивок между белковыми цепями; эти мостики повышают жесткость и механическую прочность белка.
6. Шерсть «садится» вследствие перехода полипептидной цепи из вытянутой конформации (β-структура складчатого слоя) в α-спиральную конформацию.
7. Остатки цистина препятствуют полному развертыванию белка.
8. а)



б) Из-за окисления на воздухе цистеина до цистина.

9. В слоях Gly уложен напротив Gly, а Ala/Ser напротив Ala/Ser.
10. 30 аминокислот; 89%.
11. Данные о том, что ^{14}C-гидроксипролин не включается в коллаген, свидетельствуют против первого предположения и согласуются со вторым.
12. Способность бактерии проникать в ткань объясняется тем, что она может разрушать соединительнотканный барьер хозяина, секретируя фермент коллагеназу. Бактерии коллагена не содержат.

Глава 8

1. В положениях 7 и 19; в положениях 13 и 24.
2. Снаружи – Asp, Gln, Lys; внутри – Leu, Val: Ser – в любом месте.
3. В большинстве случаев функциональная трехмерная укладка полипептидной цепи, т.е. нативная структура белка, представляет собой его наиболее стабильную конформацию. Следовательно, хотя белки синтезируются в виде линейных полимеров, они спонтанно принимают правильную трехмерную конформацию. Подтверждение этой мысли можно найти в классической работе Анфинсена по рибонуклеазе (см. рис. 8-8).
4. а) Только комбинации, обнаруженные в нативной структуре, дают функциональную активность. б) Нативная структура определяется первичной структурой белка. в) Нативная структура инсулина не является наиболее стабильной конформацией.
5. а) Сравнивая между собой количества (в молях) содержащегося в белке валина и его производного, можно установить чис-

ло NH_2-концов и тем самым число полипептидных цепей. б) 4.

6. а) 16400 г/моль; б) это значит, что в гемоглобине четыре атома железа.
7. а) $3{,}2 \times 10^{-11}$ г; б) 300 миллионов; в) 90 мкм^3; г) 0,55; д) объем упаковки 94 мкм^3; е) поскольку вышеприведенный расчет показывает, что молекулы гемоглобина соприкасаются друг с другом и заполняют весь эритроцит, при изменении взаимодействия соседних молекул форма клетки также должна меняться. При серповидноклеточной анемии гемоглобин находится в клетке не в кубической упаковке, а в виде длинных параллельных нитей. В результате эритроцит также становится вытянутым в направлении этих нитей.
8. а) $7{,}8 \times 10^{-4}$ г O_2 на 1 кг ткани; б) $1{,}3 \times \times 10^{-2}$ г O_2 на 1 кг ткани; 17/1; в) 7,8%.
9. а) Гемоглобин F. б) Благодаря этому обеспечивается поступление кислорода из материнской крови в кровь плода. в) ДФГ уменьшает сродство гемоглобина к кислороду. Тот факт, что при связывании ДФГ кривая насыщения гемоглобина А сдвигается больше, чем кривая насыщения гемоглобина F, свидетельствует о том, что гемоглобин А связывает ДФГ прочнее, чем гемоглобин F.
10. а) Он расщепляет пептидные связи с карбоксильной стороны остатков Lys и Arg. б) $G_{\text{Филадельфия}}$; в) электрофорезом интактной α-цепи.
11. С помощью элекрофореза при pH 7.

Глава 9

1. Фермент, ответственный за превращение сахара в крахмал, инактивируется при нагревании.
2. $2{,}4 \times 10^{-6}$ М.
3. $9{,}5 \times 10^{8}$ лет.
4. а) 15,5 нм; 18,8 нм. б) При образовании трехмерной конформации фермента эти аминокислоты оказываются в непосредственной близости друг от друга. в) Белок служит «каркасом», поддерживающим каталитические группы в правильной ориентации.
5. Определите величину K_M; измерьте начальную скорость (скорость исчезновения NADH, фиксируемую с помощью спектрофотометра) при нескольких определенных концентрациях фермента; начертите график изменения начальной скорости при повышении концентрации фермента.
6. $V_{max} \sim 140$ мкмол/л·мин; $K_M \sim 1 \times 10^5$ М.
7. По-видимому, они выделили одну и ту же форму фермента. Величина V_{max} зависит от концентрации фермента. Чтобы разрешить противоречие, им следует определить число оборотов каждого из препаратов фермента.
8. а) $1{,}7 \times 10^{-3}$ М; б) 0,33, 0,67, 0,91.
9. $K_M = 2{,}2$ мм; $V_{max} = 0{,}51$ мг/мин.
10. $2{,}0 \times 10^{7}$ мин$^{-1}$.
11. 29 000; нам следует предположить, что каждая молекула фермента содержит всего одну способную титроваться сульфгидрильную группу.
12. Фермент-субстратный комплекс стабильнее, чем фермент и субстрат, взятые по отдельности.
13. Измерить суммарную активность кислой фосфатазы в присутствии и в отсутствие тартрат-иона.
14. Тот факт, что ацетазоламин понижает V_{max} фермента, но не изменяет его K_M, свидетельствует о том, что этот ингибитор действует неконкурентным образом.
15. Этанол конкурирует с метанолом за активный центр алкогольдегидрогеназы.
16. Glu-35 протонирован; Asp-52 депротонирован.

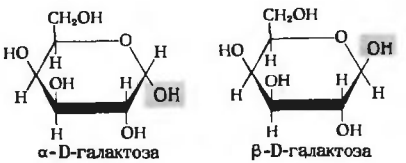
Глава 10

1. а) Никотиновая кислота необходима для биосинтеза Trp и в то же время она сама может синтезироваться из Trp. б) Кукуруза бедна триптофаном.
2. Недостаточность тиамина.
3. Скорость образования молочной кислоты зависит от количества рибофлавина в культуральной среде.
4. Пиридоксин превращается в пиридоксальфосфат, который служит простетической группой, выполняющей центральную роль в реакциях переаминирования.
5. а) Бактериальное заражение. б) Авидин связывает свободный биотин и препятствует росту бактерий. в) Он предохраняет развивающийся эмбрион от разрушительного действия бактерий в течение инкубационного периода.
6. При добавлении в питательную среду тимидина бактерии могут обходиться без тетрагидрофолата, для синтеза которого требуется фолиевая кислота.
7. Недостаток витамина B_{12} в бактериальной флоре.
8. Высокая растворимость витаминов группы В приводит к их быстрому выведению из организма.
9. У взрослых витамин А запасается в печени.

10. Витамин D_3; повреждение почек препятствует полному гидроксилированию витамина D_3 и образованию его биологически активной формы.
11. а) Он может действовать как ингибитор в ферментативных реакциях, зависящих от витамина К. б) У них возникают сильные кровотечения, обусловленные кажущимся дефицитом витамина К. в) Антагонист витамина К понижает концентрацию факторов свертывания крови.
12. Недостаточность витамина B_{12}.
13. а) Фитиновая кислота связывает цинк и препятствует его всасыванию в тонком кишечнике. б) Дрожжи разрушают фитиновую кислоту.

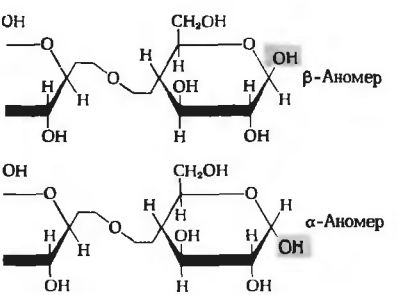
Глава 11

1. а)



б) В свежеприготовленном растворе α-D-галактозы происходит мутаротация, приводящая к образованию равновесной смеси α- и β-D-галактозы. В результате мутаротации чистой α- или β-D-галактозы образуется смесь обеих форм одного и того же состава. в) 72% β-формы и 28% α-формы.

2. а) Измерить изменение оптического вращения в зависимости от времени. б) Направление оптического вращения смеси противоположно направлению оптического вращения раствора сахарозы. в) 0,63 части сахарозы гидролизуется; конечный состав смеси: глюкоза и фруктоза – 0,77 частей, сахароза – 0,23 части.
3. Приготовить сердцевину шоколадки из пасты, содержащей сахарозу и воду; добавить небольшое количество инвертазы; сразу же покрыть шоколадом.
4. а)



б) Гидролиз обоих аномеров лактозы приводит к образованию смеси, состоящей из α- и β-D-глюкозы и α- и β-D-галактозы.

5. Сахароза не принадлежит к редуцирующим сахарам.
6. 7840 остатков/с.
7. Природная целлюлоза состоит из мономеров глюкозы, соединенных между собой посредством β(1 → 4)-гликозидной связи. Благодаря β-связям остатки глюкозы образуют вытянутую полимериую цепь (см. рис. 11-16). Между несколькими параллельными цепями возникают межмолекулярные водородные связи, в результате чего формируются длинные жесткие нерастворимые волокна. Гликоген также состоит из остатков глюкозы, но они соединены друг с другом α(1 → 4)-связями. Такая α-связь между остатками глюкозы вызывает изгиб цепи и препятствует образованию длинных нитей. Кроме того, гликоген сильно разветвлен (рис. 11-15). Эти структурные свойства обеспечивают высокую степень гидратации гликогена, поскольку многие гидроксильные группы обращены к воде. Поэтому гликоген можно экстрагировать в диспергированном виде горячей водой.

   Физические свойства этих двух полимеров хорошо подходят для выполнения ими их биологической функции. Целлюлоза служит структурным материалом в растениях, что согласуется с ее способностью агрегировать с образованием нерастворимых волокон. Гликоген играет роль запасного «горючего» в организме животных. Сильно гидратированные и незащищенные гранулы гликогена быстро гидролизуются гликогенфосфорилазой до глюкозо-1-фосфата. Этот фермент действует только на нередуцирующие концы, поэтому высокая степень разветвления полимера обеспечивает наличие в нем множества мест, доступных действию гликогенфосфорилазы.
8. 10,8 с.
9. а) Из остатков, находящихся в точках ветвления, образуется 2,3-диметилглюкоза, тогда как из других остатков полимера получается 2,3,6-триметилглюкоза. б) 3,74%.
10. D-глюкопиранозил-(1 → 1)-D-глюкопиранозид.

Глава 12

1. Число двойных *цис*-связей. Каждая двойная *цис*-связь вызывает изгиб углеводо-

родной цепи, затрудняя ее упаковку в кристаллической решетке.

2. Ненасыщенные жиры (например, сливочное масло) легко окисляются молекулярным кислородом.
3. Фосфатидилхолин превращает жир в эмульсию.
4. а) Натриевые соли пальмитиновой и стеариновой кислот, а также глицерол; б) в мягких условиях гидролиза – натриевые соли пальмитиновой и олеиновой кислоты и глицерол-3-фосфорилхолин; в жестких условиях гидролиза – натриевые соли пальмитиновой, олеиновой и фосфорной кислот, а также глицерол и холин.
5. а) 0; б) 0; в) -1.
6. Воск предохраняет от потери воды.
7. 63.
8. Гидрофобные группы: а) две жирные кислоты; б, в, г) одна жирная кислота и углеводородная цепь сфингозина; д) углеводородный остов.
   Гидрофильные группы: а) фосфоэтаноламин; б) фосфохолин; в) D-галактоза; г) несколько молекул сахаров; д) спиртовая группа (—OH).
9. а) Липиды, образующие бимолекулярные слои, относятся к амфипатическим молекулам, т.е. они содержат гидрофильную и гидрофобную части. Чтобы уменьшить соприкосновение гидрофобной части молекулы с водой, липиды формируют двумерные пленки, в которых гидрофильные части обращены к воде, а гидрофобные расположены на внутренней стороне пленки. Более того, чтобы воспрепятствовать взаимодействию гидрофобных краев такой пленки с водой, липидные бислои смыкаются. В силу тех же причин образовавшееся в пленке отверстие затягивается, поскольку мембрана полужидкая.
   б) Из этих свойств липидов вытекают важные биологические следствия, а именно: липидные пленки образуют замкнутые мембранные поверхности, в результате чего возникают клетки и внутриклеточные компартменты («отсеки») – органеллы.
10. Им приходится проходить сквозь неполярную среду, составляющую внутреннюю часть мембраны.
11. Додецилсульфат натрия и холат натрия солюбилизируют гидрофобные части мембран, действуя как мыла или детергенты (рис. 12-2).
12. а) Сахара представляют собой гидрофильные соединения. б) Гликопротеины не могут перевернуться и оказаться на внешней стороне мембраны.
13. а) Внутренние мембранные белки должны находиться в жидкой среде, чтобы иметь возможность принять свою функциональную конформацию. б) Повышенный уровень ненасыщенных кислот снижает температуру плавления мембраны.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов перевода . . 5

Предисловие 7

Часть I. БИОМОЛЕКУЛЫ 11

Глава 1. **Биохимия – молекулярная логика живых организмов** . . . 12

1.1. Для живой материи характерны некоторые отличительные особенности 12
1.2. Биохимия стремится понять природу живого состояния 13
1.3. Все живые организмы содержат органические макромолекулы, построенные по общему плану . . 14
1.4. Обмен веществ и энергии в живых организмах 16
1.5. Ферменты, играющие роль катализаторов в живых клетках, управляют сложно организованной сетью химических реакций . . . 17
1.6. Клетки используют энергию в химической форме 18
1.7. Процессы клеточного метаболизма находятся под постоянным контролем 19
1.8. Живые организмы способны к точному самовоспроизведению . 20

Глава 2. Клетки 25

2.1. Все клетки обладают некоторыми общими структурными характеристиками 25
2.2. Клетки должны иметь очень малые размеры 26
2.3. Существуют два больших класса клеток – прокариотические и эукариотические 28
2.4. Прокариоты – самые простые и самые мелкие клетки 29
2.5. *Escherichia coli* – самая известная из прокариотических клеток . . 30
2.6. Эукариотические клетки крупнее и сложнее прокариотических . . 33
2.7. Ядро эукариот – это очень сложная структура 34
2.8. Митохондрии – «силовые установки» эукариотических клеток, поставляющие энергию 36
2.9. Эндоплазматический ретикулум образует каналы в цитоплазме . . 38
2.10. Тельца Гольджи – секреторные органеллы 39
2.11. Лизосомы – контейнеры с гидролитическими ферментами . . . 39
2.12. Пероксисомы – пузырьки, разрушающие перекись водорода . . 40
2.13. Микрофиламенты участвуют в сократительных процессах клеток 40
2.14. Микротрубочки также связаны с клеточными движениями . . . 41
2.15. Микрофиламенты, микротрубочки и микротрабекулярная сеть образуют цитоскелет 42
2.16. Реснички и жгутики позволяют клеткам передвигаться 42
2.17. В цитоплазме содержатся также гранулярные тельца 43
2.18. Цитозоль – непрерывная водная фаза цитоплазмы 44
2.19. Клеточная мембрана имеет большую площадь поверхности . . . 44
2.20. На поверхности многих животных клеток имеются также «антенны» 45
2.21. Эукариотические клетки растений имеют некоторые специфические особенности 46
2.22. Вирусы – надмолекулярные паразиты 48
Краткое содержание главы . . . 50
Вопросы и задачи 52

Глава 3. **Состав живой материи: биомолекулы** 55

3.1. Химический состав живой материи отличается от химического состава земной коры 55
3.2. Большинство биомолекул содержит углерод 57
3.3. Биомолекулы имеют специфическую форму и определенные размеры 58
3.4. Функциональные группы органических биомолекул определяют их химические свойства 62
3.5. Многие биомолекулы ассиметричны 63
3.6. Основные классы биомолекул в клетках представлены очень крупными молекулами 65
3.7. Макромолекулы образуются из небольших молекул, играющих роль строительных блоков . . . 67
3.8. Молекулы, используемые в качестве строительных блоков, имеют простую структуру 68
3.9. Структурная иерархия в молекулярной организации клеток . . . 70
3.10. Биомолекулы первыми возникли в процессе химической эволюции 72
3.11. Химическую эволюцию можно воспроизвести в лабораторных условиях 73
Краткое содержание главы . . . 75
Вопросы и задачи 76

Глава 4. **Вода** 79

4.1. Необычные физические свойства воды обусловлены ее способностью участвовать в образовании водородных связей 79
4.2. Водородные связи широко распространены в биологических системах и играют в них важную роль 81
4.3. Вода как растворитель обладает необычными свойствами 82
4.4. Растворенные вещества изменяют свойства воды 85
4.5. Состояние равновесия обратимых реакций характеризуется константой равновесия 86
4.6. Ионизацию воды можно охарактеризовать величиной константы равновесия 87
4.7. Шкала pH: обозначения концентраций ионов H^+ и OH^- . . . 89
4.8. Свойства кислот и оснований тесно связаны со свойствами воды 91
4.9. Слабые кислоты имеют характерные кривые титрования 92
4.10. Буферы – это смеси слабых кислот и сопряженных с ними оснований 95
4.11. Фосфат и бикарбонат – важные биологические буферные системы 98
4.12. Приспособленность живых организмов к водной среде 102
4.13. «Кислые» дожди загрязняют наши озера и реки 102
Краткое содержание главы . . . 103
Вопросы и задачи 104

Глава 5. **Аминокислоты и пептиды** . . 107

5.1. Общие структурные свойства аминокислот 108
5.2. Почти все аминокислоты содержат асимметрический атом углерода 108
5.3. Стереоизомеры обозначаются в соответствии с их абсолютной конфигурацией 110
5.4. Оптически активные аминокислоты в белках представляют собой L-стереоизомеры 114
5.5. Классификация аминокислот на основе их R-групп 115
5.6. Восемь аминокислот содержат неполярные R-группы 115
5.7. Семь аминокислот содержат незаряженные полярные R-группы 115
5.8. Две аминокислоты содержат отрицательно заряженные (кислые) R-группы 117
5.9. Три аминокислоты содержат положительно заряженные (основные) R-группы 117
5.10. В некоторых белках присутствуют нестандартные аминокислоты 117
5.11. В водных растворах аминокислоты ионизированы 118
5.12. Аминокислоты могут вести себя и как кислоты, и как основания 119
5.13. Аминокислоты имеют характерные кривые титрования 119
5.14. По кривой титрования можно предсказать, какой электрический заряд несет данная аминокислота 121
5.15. Аминокислоты различаются по своим кислотно-основным свойствам 122
5.16. Кислотно-основные свойства аминокислот служат основной для аминокислотного анализа . . 123
5.17. Электрофорез на бумаге позволяет разделять аминокислоты в соответствии с их электрическим

зарядом 124
5.18. Ионообменная хроматография служит более эффективным способом разделения аминокислот 124
5.19. Химические реакции, характерные для аминокислот 126
5.20. Пептиды – это цепочки аминокислот 127
5.21. Разделение пептидов может быть основано на различиях в их ионизационных свойствах 128
5.22. Химические реакции, характерные для пептидов 129
5.23. Некоторые пептиды обладают высокой биологической активностью 130
Краткое содержание главы . . . 132
Вопросы и задачи 133

Глава 6. **Белки: ковалентная структура и биологические функции** . . 137

6.1. Белки обладают множеством различных биологических функций 138
6.2. Белки можно классифицировать также по форме их молекул . . . 140
6.3. В ходе гидролиза белки распадаются на аминокислоты 141
6.4. Некоторые белки имеют в своем составе не только аминокислоты, но и другие химические группы 142
6.5. Белки – это очень крупные молекулы 143
6.6. Белки можно выделить и подвергнуть очистке 143
6.7. Определение аминокислотной последовательности полипептидных цепей 146
6.8. Инсулин – это первый белок, для которого была установлена аминокислотная последовательность 152
6.9. В настоящее время известны последовательности многих других белков 153
6.10. Гомологичные белки разных видов имеют гомологичные последовательности 155
6.11. Различия между гомологичными белками можно выявить по иммунной реакции 157
6.12. Белки претерпевают структурные изменения, называемые денатурацией 158
Краткое содержание главы 160
Вопросы и задачи 161

Глава 7. **Фибриллярные белки** 165

7.1. Термины «конфигурация» и «конформация» имеют разный смысл 165
7.2. Как это ни парадоксально, нативные белки имеют только одну или всего лишь несколько конформаций 167
7.3. α-Кератины – фибриллярные белки, синтезируемые клетками эпидермиса 167
7.4. Рентгеноструктурный анализ показывает, что в кератинах имеются повторяющиеся структурные единицы 168
7.5. Рентгеноструктурные исследования пептидов свидетельствуют о жесткости и плоской конфигурации пептидных групп 168
7.6. В α-кератине полипептидные цепи имеют форму α-спирали 169
7.7. Некоторые аминокислотные остатки препятствуют образованию α-спирали 171
7.8. В α-кератинах содержится много аминокислот, способствующих образованию α-спиральной структуры 172
7.9. В нативных α-кератинах α-спиральные полипептидные цепи скручены наподобие каната . . . 172
7.10. α-Кератины нерастворимы в воде из-за преобладания в их составе аминокислот с неполярными R-группами 173
7.11. β-Кератины имеют другую конформацию полипептидной цепи, называемую β-структурой . . . 174
7.12. Перманентная завивка волос – пример биохимической технологии 175
7.13. Коллаген и эластин – главные фибриллярные белки соединительных тканей 176
7.14. Коллаген – самый распространенный белок у высших животных 176
7.15. Коллаген обладает как обычными, так и необычными свойствами 177
7.16. Полипептиды в коллагене представляют собой трехцепочечные спиральные структуры 178
7.17. Структура эластина придает особые свойства эластической ткани 179
7.18. Что говорят нам фибриллярные белки о структуре белков? . . . 181
7.19. Другие типы фибриллярных или нитевидных белков, встречающихся в клетках 182
Краткое содержание главы 183
Вопросы и задачи 184

Глава 8. **Глобулярные белки: структура и функция гемоглобина** 187

8.1. Полипептидные цепи глобулярных белков свернуты в плотную компактную структуру 187
8.2. Рентгеноструктурный анализ миоглобина – выдающееся достижение в исследовании белков . . 188
8.3. Миоглобины, выделенные из разных видов, имеют сходную конформацию 192
8.4. Глобулярные белки различных типов имеют неодинаковую структуру 192
8.5. Аминокислотная последовательность белка определяет его третичную структуру 195
8.6. Силы, стабилизирующие третичную структуру глобулярных белков 197
8.7. Свертывание полипептидных цепей происходит с очень высокой скоростью 199
8.8. Олигомерные белки имеют как третичную, так и четвертичную структуру 199
8.9. Метод рентгеноструктурного анализа позволил установить как третичную, так и четвертичную структуру гемоглобина 200
8.10. По своей третичной структуре α- и β-цепи гемоглобина очень сходны с миоглобином 202
8.11. Была установлена четвертичная структура и некоторых других олигомерных белков 203
8.12. Эритроциты – специализированные клетки, переносящие кислород 205
8.13. Для миоглобина и гемоглобина характерны разные кривые связывания кислорода 206
8.14. Кооперативное связывание кислорода делает гемоглобин более эффективным переносчиком кислорода 208
8.15. Гемоглобин служит также переносчиком CO_2 и ионов H^+ . . . 208
8.16. Оксигенация гемоглобина вызывает изменение его пространственной конформации 210
8.17. Серповидноклеточная анемия – «молекулярная болезнь» гемоглобина 215
8.18. Гемоглобин больных серповидноклеточной анемией имеет измененную аминокислотную последовательность 216
8.19. Серповидная форма эритроцитов обусловлена склонностью молекул гемоглобина S к агрегации 218
8.20. «Неправильные» аминокислоты появляются в белках в результате генных мутаций 219
8.21. Можно ли найти «молекулярное лекарство» для серповидноклеточного гемоглобина? 220
Краткое содержание главы 221
Вопросы и задачи 222

Глава 9. **Ферменты** 226

9.1. История биохимии – это в значительной мере история исследования ферментов 227
9.2. Ферменты обнаруживают все свойства белков 228
9.3. Ферменты классифицируются на основе реакций, которые они катализируют 229
9.4. Ферменты ускоряют химические реакции, снижая энергию активации 230
9.5. Концентрация субстрата оказывает огромное влияние на скорость реакций, катализируемых ферментами 231
9.6. Существует количественная связь между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции 233
9.7. Каждый фермент имеет характерную величину K_M для данного субстрата 237
9.8. Многие ферменты катализируют реакции с участием двух субстратов 238
9.9. Каждый фермент имеет определенный оптимум pH 239
9.10. Количество фермента можно определить по его активности . . . 239
9.11. Ферменты проявляют специфичность по отношению к своим субстратам 241
9.12. Ферменты можно ингибировать определенными химическими соединениями 242
9.13. Существуют обратимые ингибиторы двух типов – конкурентные и неконкурентные 244
9.14. Неконкурентное ингибирование тоже обратимо, но не может быть ослаблено или устранено повышением концентрации субстрата 246
9.15. Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов 248

9.16. Рентгеноструктурный анализ выявил важные структурные особенности ферментов 250
9.17. В ферментных системах есть «дирижер», роль которого выполняет регуляторный фермент 256
9.18. Аллостерические ферменты регулируются путем некбвалентного присоединения к ним молекул модуляторов 257
9.19. Аллостерические ферменты ингибируются или активируются их модуляторами 259
9.20. Поведение аллостерических ферментов не описывается уравнением Михаэлиса–Ментен . . . 260
9.21. Субъединицы аллостерических ферментов сообщаются между собой 261
9.22. Некоторые ферменты регулируются путем обратной ковалентной модификации 263
9.23. Многие ферменты существуют в нескольких формах 265
9.24. Нарушение каталитической активности ферментов может быть обусловлено мутациями 266
Краткое содержание главы 267
Вопросы и задачи 269

Глава 10. **Витамины и микроэлементы: их роль в функционировании ферментов** 273

10.1. Витамины – незаменимые органические микрокомпоненты пищи 273
10.2. Витамины являются важными компонентами коферментов и простетических групп ферментов 274
10.3. Витамины можно разделить на два класса 275
10.4. Тиамин (витамин B_1) функционирует в форме тиаминпирофосфата 275
10.5. Рибофлавин (витамин B_2) – компонент флавиновых нуклеотидов 277
10.6. Никотинамид – это активная группа коферментов NAD и NADP 279
10.7. Пантотеновая кислота – компонент кофермента А 280
10.8. Пиридоксин (витамин B_6) играет важную роль в метаболизме аминокислот 281
10.9. Биотин является активным компонентом биоцитина – простетической группы некоторых ферментов, катализирующих реакции карбоксилирования 283
10.10. Фолиевая кислота служит предшественником кофермента тетрагидрофолиевой кислоты . . . 284
10.11. Витамин B_{12} – предшественник кофермента B_{12} 286
10.12. Биохимическая функция витамина С (аскорбиновой кислоты) не известна 288
10.13. Жирорастворимые витамины представляют собой производные изопрена 289
10.14. Витамин А, вероятно, выполняет несколько функций 290
10.15. Витамин D – предшественник гормона 291
10.16. Витамин Е защищает клеточные мембраны от кислорода . . 291
10.17. Витамин К – компонент карбоксилирующего фермента 293
10.18. В пище животных должны содержаться многочисленные неорганические вещества 294
10.19. Для действия многих ферментов требуется железо 295
10.20. В некоторых окислительных ферментах содержится также медь 296
10.21. Для действия многих ферментов необходим цинк 296
10.22. Некоторым ферментам требуются ионы марганца 296
10.23. В состав витамина B_{12} входит кобальт 296
10.24. Селен является и незаменимым микроэлементом. и ялом . . . 296
10.25. Для действия некоторых ферментов требуются другие микроэлементы 297
Краткое содержание главы 298
Вопросы и задачи 299

Глава 11. **Углеводы: строение и биологические функции** 302

11.1. Углеводы делятся на три класса в зависимости от числа остатков сахаров 302
11.2. Существуют два семейства моносахаридов: альдозы и кетозы 303
11.3. Моносахариды обычно содержат несколько асимметрических центров 304
11.4. Типичные моносахариды имеют циклическую структуру 306
11.5. Простые моносахариды могут служить восстановителями . . 307
11.6. Дисахариды содержат две моносахаридные единицы 308
11.7. Полисахариды содержат боль-

шое число моносахаридных остатков 311
11.8. Некоторые полисахариды представляют собой форму запасания «клеточного топлива» . . . 311
11.9. Целлюлоза – наиболее распространенный структурный полисахарид 313
11.10. Клеточные стенки содержат в больших количествах структурные и защитные полисахариды 316
11.11. Гликопротеины – гибридные молекулы 318
11.12. На поверхности клеток животных присутствуют гликопротеины 319
11.13. Гликозаминогликаны и протеогликаны – важные компоненты соединительной ткани 320
Краткое содержание главы 322
Вопросы и задачи 323

Глава 12. **Липиды и мембраны** . . . 325

12.1. Жирные кислоты – структурные компоненты большинства липидов 325
12.2. Триацилглицеролы – это глицероловые эфиры жирных кислот 329
12.3. Триацилглицеролы – форма запасания липидов 331
12.4. Воска – эфиры жирных кислот и длинноцепочечных спиртов . . 333
12.5. Фосфолипиды – основные липидные компоненты мембран . . 333
12.6. Сфинголипиды – также важные компоненты мембран 335
12.7. Стероиды – неомыляемые липиды, обладающие специфическими функциями 338
12.8. Липопротеины сочетают свойства липидов и белков 339
12.9. Полярные липиды образуют мицеллы, монослои и бислои . . 340
12.10. Полярные липиды и белки – основные компоненты мембран . . 342
12.11. Мембраны имеют жидкостно-мозаичную структуру 345
12.12. Мембраны асимметричны, т.е. имеют неравноценные стороны 346
12.13. Мембраны эритроцитов исследованы очень подробно . . . 347
12.14. Лектины – специфические белки, способные связываться с определенными клетками и вызывать их агглютинацию 348
12.15. Мембраны имеют очень сложные функции 349
Краткое содержание главы 350
Вопросы и задачи 351

Приложение. Ответы 353

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Альберт Л. Ленинджер

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Том 1

Научный редактор Н. М. Амельянчик
Мл. научн. редактор З. В. Соллертинская
Художник Г. А. Шипов
Художественный редактор А. Я. Мусин
Технический редактор И. И. Володина
Корректор Т. И. Стифеева

ИБ № 4075

Сдано в набор 08.08.84. Подписано к печати 29.04.85. Формат 70 × $100^{1}/_{16}$. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 11,5 бум. л. Усл. печ. л. 29,9. Усл. кр.-отт. 59,8. Уч. изд. л. 33,64. Изд. № 4/3304. Тираж 25000 экз. Зак. 767. Цена 2 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Можайск, ул. Мира, 93.

В издательстве „Мир“ выйдет в свет в 1985 г.

Гудвин Т., Мерсер Э. ВВЕДЕНИЕ В БИОХИМИЮ РАСТЕНИЙ, в двух томах. Пер. с англ., 6 р. 10 к. за комплект.

Монография охватывает практически все аспекты биохимии растений. В первый том вошли материалы по структуре и функциям растительной клетки, биоэнергетике, фотосинтезу, углеводному и азотистому обмену. Второй том посвящен нуклеиновым кислотам, терпенам, терпеноидам, хлорофиллу, алкалоидам, фенолам и фитогормонам. Рассмотрена роль этих соединений в жизнедеятельности растений.

Предназначена для студентов и аспирантов биологических факультетов и сельскохозяйственных институтов, а также для агрономов и научных работников.