

Ответы на вопросы экзамена по ХОБП

© Himera, 2004

**(спасибо А. А. Богданову, А. М. Копылову
и С. Д. Варфоломееву за предоставленные презентации;
хотя можно бы было их и получше сделать;-)**

I. ХПС

1. Что такое жизнь с точки зрения химика?

Для химика *жизнь* это, в первую очередь, биологическая клетка и те химические процессы, которые в ней протекают. Химию интересуют не связи между клетками в живых организмах или функционирование организма как целого, а лишь отдельные химические процессы, которые могут быть исследованы как обычные химические реакции. (Существует альтернативная точка зрения: химия жизни – лучший способ финансирования научных исследований)

Основные характеристики клетки:

- 1) Клетка – открытая система, то есть система, обменивающаяся с окружающей средой как энергией, так и веществом.
- 2) Высокая организация.
- 3) Высокий уровень регуляции.
- 4) Способность к репродукции.
- 5) Способность к эволюции.

По особенностям строения выделяют два основных типа клеток: *прокариотические* и *эукариотические*. В прокариотических клетках нет ядер, а ДНК находится в форме нуклеоида, – характерны для бактерий; в эукариотических клетках весь генетический материал находится в ядре, а также имеются митохондрии, вырабатывающие АТФ, – такой тип клеток характерен для большинства живых организмов.

2. Основные типы биополимеров и их функция.

а) Белки – высокомолекулярные соединения, построенные из полипептидных цепей (мономером которых являются α -L-аминокислоты).

Функции белков:

- 1) Транспортная (например, перенос вещества через биологические мембраны);
- 2) Каталитическая (ферменты);
- 3) Защитная (как механическая защита биологических мембран, так и защита иммунная).
- 4) Структурная (образование биологических мембран, соединительной ткани).
- 5) Двигательная.
- 6) Сигнальная (многие белки являются рецепторами, воспринимающими импульсы, приходящие от других клеток).

б) Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные линейные полярные биополимеры; полинуклеотиды, которые построены из нуклеотидных остатков.

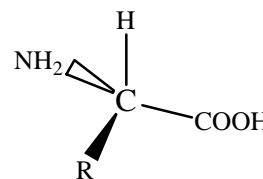
Функции нуклеиновых кислот:

- 1) Активное хранение генетической информации (ДНК)
- 2) Организация передачи генетической информации (ДНК и РНК).
- 3) Синтез полипептидных цепей белка (РНК).
- 4) Катализ (рибозимы).

3. Структура белка. Четыре уровня организации структуры белка.

Первичная структура белка – последовательность аминокислотных остатков, соединённых пептидными связями. В природных белках встречаются только L-аминокислоты.

Особенности пептидной связи – $\angle(C-N)$ на 10% меньше, чем в других молекулах, вращение затруднено; преимущественно транс-конфигурация. *Примеры аминокислот* (указан R): H (Gly – глицин), CH_3 (Ala – аланин),



CH₂OH (Ser – серин), CH₂COOH (Asp – аспаргиновая кислота), (CH₂)₄NH₂ (Lys – лизин), CH₂Ph (Phe – фенилаланин).

Вторичная структура белка – стабилизация последовательности аминокислотных остатков за счёт нековалентных взаимодействий близко расположенных участков молекулы.

Типы нековалентных взаимодействий в белковых молекулах:

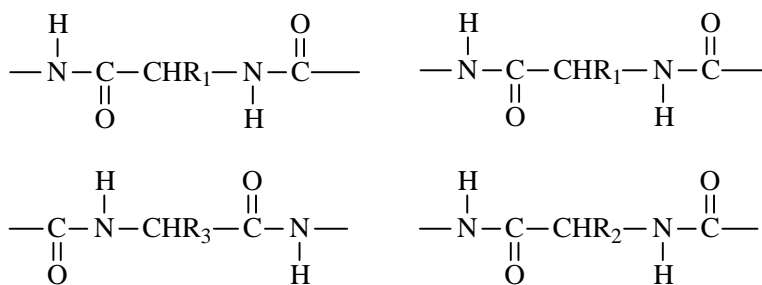
1) Водородная связь (между кислородом карбонильной группы и водородом аминогруппы).

2) Электростатическое взаимодействие.

3) Гидрофобное взаимодействие (если молекула гидрофобна, то ей выгодно связаться с ещё одной такой же молекулой для того, чтобы уменьшить общую поверхность, и, соответственно, уменьшить энергию взаимодействия с водой).

4) Ван-дер-Ваальсово.

Известны два типа вторичных структур: α -спираль (полипептидная цепь сворачивается в спираль за счёт водородных связей между аминогруппой и карбонильной группой, находящейся в четвёртом от этой аминогруппы пептидном фрагменте), β -складки (две полипептидные цепи связываются друг с другом; при этом возможны параллельная или антипараллельная ориентации. В обоих случаях гидрофобные радикалы направлены наружу, «защищая» от воды водородные связи).



Антипараллельная и параллельная ориентации полипептидных цепей в β -складках белка.

Третичная структура белка – стабилизация вторичной структуры за счёт образования контактов между отдельными её частями; образуется молекула белка, внутри которой обычно находится изолированное от воды «гидрофобное ядро».

Четвертичная структура белка – образование ассоциатов молекул, строение которых уникально и определяется первично структурой белка.

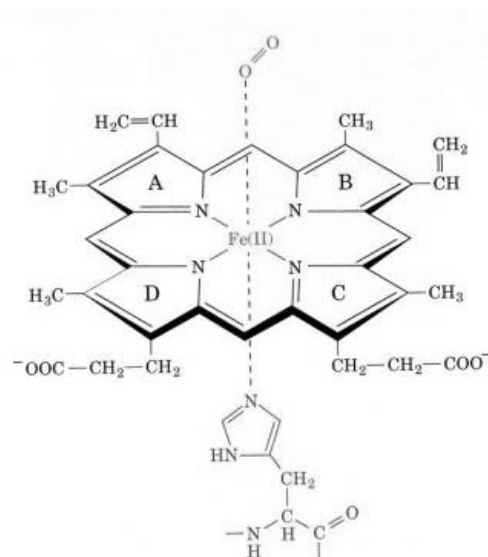
4. Конформация белка. Конформационные переходы.

Конформация белка – структура, образующаяся без разрыва ковалентных связей в первичной структуре белка; конформации могут различаться как количеством α -спиралей и β -складок, так и их взаимным расположением («укладкой» в молекуле).

Конформационные переходы: наблюдаются во многих белках и зачастую обуславливают их функциональные свойства. Например, в процессе присоединения кислорода к гемоглобину в молекуле последнего происходят конформационные переходы, облегчающие присоединение последующих молекул кислорода (см. 5). Подобные процессы также характерны для транспортных белков, входящих в состав биологических мембран (см. 7, 9).

5. Структура гемоглобина. Механизм связывания кислорода гемоглобином.

Гемоглобин состоит из четырёх субъединиц (две α и две β). Во всех четырёх субъединицах белковые фрагменты связаны с *гемом* – порфириновым



комплексом железа (важно иметь в виду, что в данном случае гем выступает в качестве лиганда, а белковый фрагмент глобин – в качестве центрального атома). Одну из аксиальных позиций в таком комплексе занимает гистидин, вторая – вакантна, её может занять молекула кислорода. В области высоких давлений кислорода гемоглобин присоединяет к себе четыре молекулы O₂, в области низких давлений – отдаёт их; так может осуществляться транспорт кислорода в живых организмах. Присоединение кислорода к гемоглобину является так называемым *кооперативным процессом*, поскольку присоединение к первой субъединице значительно ускоряет присоединение к остальным (это связано с изменением зарядового распределения в молекуле – на свободных гемах возрастает положительный заряд, эффективнее притягивающий к себе неподелённые пары кислорода). Гемоглобин входит в состав эритроцитов крови. Аналогичным образом работает мышечный белок миоглобин, состоящий из всего одной субъединицы, в которой одна молекула гема связана с пятью α-спиральными фрагментами белка.

6. Структура и функция биологических мембран.

Биологические мембраны – сложные высокоорганизованные системы, состоящие, в основном, из липидных бислоёв и белков.

Липидные бислои сформированы *фосфолипидами* – сложными эфирами глицерина или сфингозина. В обоих случаях R₁ и R₂ – длинные углеводородные фрагменты (C₁₂ – C₂₄), часто имеющие двойные связи в цис-конфигурации. X – обычно остаток холина –CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃. Сфингомиелины характерны только для животных клеток, тогда как глицериновые фосфолипиды встречаются почти во всех живых организмах.

Фосфолипид имеет гидрофильный и гидрофобный конец – подобное строение неминуемо приводит к образованию *бислоёв*, в которых гидрофильные холиновые концы ориентированы наружу, в водную среду, а гидрофобные углеводородные – внутрь. Толщина таких бислоёв – порядка 50 Å; бислои могут образовать длинную клеточную мембрану, замкнуться вокруг одной молекулы, образуя *липосому*, или же, попав в водную среду, образовать мицеллу – частицу коллоидного раствора. Структура клеточной мембраны является достаточно гибкой, поэтому в неё могут встраиваться особые мембранные белки; кроме этого внутренняя, гидрофобная часть бислоя способна растворять неполярные молекулы – обычно холестерин.

Функции биологических мембран:

1) Образование границ раздела (а также *компартиментов* – областей, «принадлежащих» клетке).
 2) Селективный транспорт.
 3) Генерация энергии.
 4) Передача электрического сигнала.
 5) Сенсорная.

Функции биологических мембран:

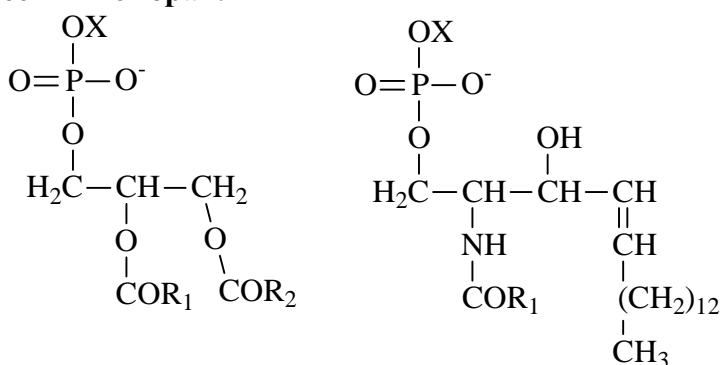
1) Образование границ раздела (а также *компартиментов* – областей, «принадлежащих» клетке).

2) Селективный транспорт.

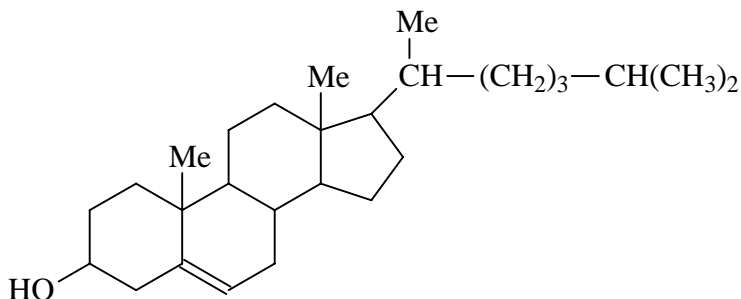
3) Генерация энергии.

4) Передача электрического сигнала.

5) Сенсорная.



Фосфолипиды – эфиры глицерина и сфингозина



Строение холестерина

7. Транспорт молекул через биологические мембраны.

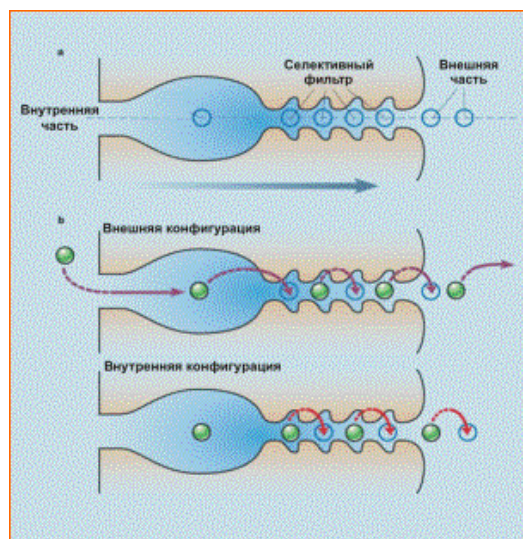
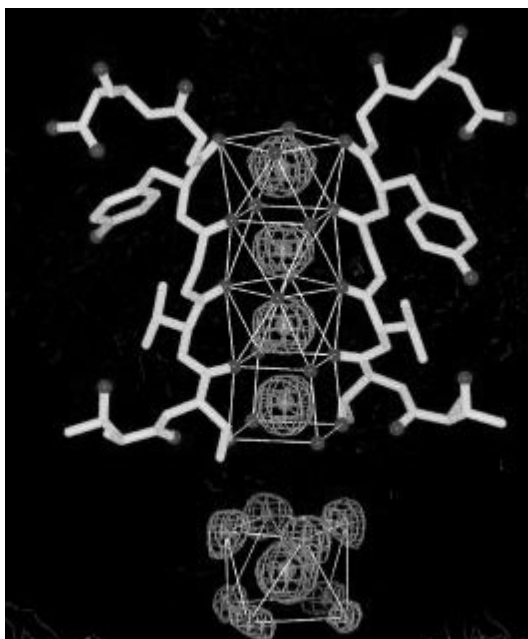
Транспорт через биологические мембраны можно разделить на *пассивный* (происходящий по градиенту концентрации) и *активный* (против градиента концентрации). Очевидно, что если пассивный транспорт протекает самопроизвольно, то активный транспорт требует затрат энергии. Результатом пассивного транспорта становится уравнивание концентраций того или иного вещества по разные стороны от мембраны, тогда как активный транспорт создаёт разность концентраций, обуславливающую разность химических (а иногда и электрических – см. 9) потенциалов на мембране.

Пассивный транспорт происходит по механизму обычной *диффузии* (самостоятельного проникновения вещества сквозь мембрану – характерно для гидрофобных молекул), с помощью трансмембранных белков (захватывающих переносимую молекулу и передающим её через мембрану за счёт смены конформации) или через *ионные каналы*, образованные специальным белком, встроенным в мембрану. Такие белки не являются ферментами в точном смысле этого слова, но как бы катализируют перенос молекул через мембрану, обладая высокой специфичностью. Ионные каналы являются узкими заполненными водой полостями, размеры которых таковы, что пропускают только молекулы (или гидратированные молекулы) определённого размера. Пример ионного канала приведён в 8.

Активный транспорт может быть *первичным* или *вторичным*. В первичном активном транспорте непосредственно задействуется энергия гидролиза АТФ до АДФ, во вторичном транспорте источником энергии служит одновременный перенос какого-либо вещества по градиенту концентрации (то есть пассивный транспорт). Первичный активный транспорт наиболее типичен для протонов (см. 10), ионов натрия и калия (см. 9). Вторичный транспорт характерен для аминокислот, углеводов и осуществляется за счёт переноса по градиенту Na^+/K^+ , уравнивающего концентрации, достигнутые действием Na-K насоса.

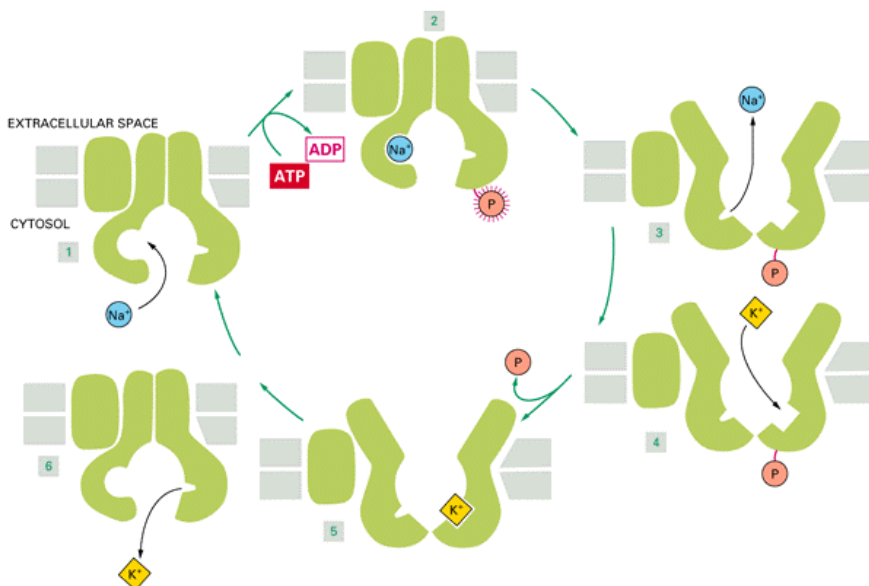
8. Калиевые каналы.

В клеточных мембранах существуют особые каналы, осуществляющие селективный транспорт ионов калия через мембрану. В этих каналах существует одна большая полость, способная вместить в себя до 80 молекул воды – сюда попадают различные гидратированные ионы. Далее канал сужается, причём размеры полостей таковы, что в них стабилизируются ионы калия, гидратированные восемью молекулами воды. Всего таких «узких» полостей семь; после прохождения через них ион калия выходит из мембраны и расширяет свою гидратную оболочку. Направление переноса соответствует градиенту концентрации K^+ (изнутри клетки наружу).



9. Механизм работы $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ насоса.

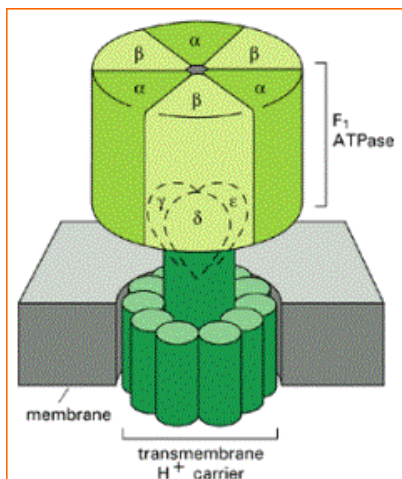
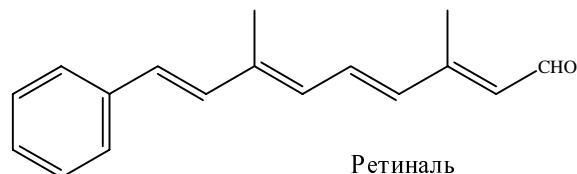
Активный транспорт ионов натрия и калия осуществляется специальным ферментом Na-K-ATPase . Этот фермент состоит из двух субъединиц, каждая из которых встроена в клеточную мембрану. Между субъединицами находятся несколько полостей, положение которых зависит от конформации белка. На



первом этапе работы насоса белок захватывает три иона Na^+ и, за счёт энергии гидролиза АТФ, переносит полости на внешнюю сторону мембраны. Там ионы натрия освобождаются, а на их место попадают два иона K^+ ; эти ионы перемещаются на внутреннюю сторону мембраны и выходят во внутреннюю среду клетки, после чего насос готов к новому циклу. Такой насос создаёт по разные стороны мембраны не только разность концентраций, но и разность зарядов, то есть электрический потенциал. Этот потенциал называется мембранным и может быть измерен, его величина составляет порядка (-50) мВ (разность между потенциалами внутри и снаружи).

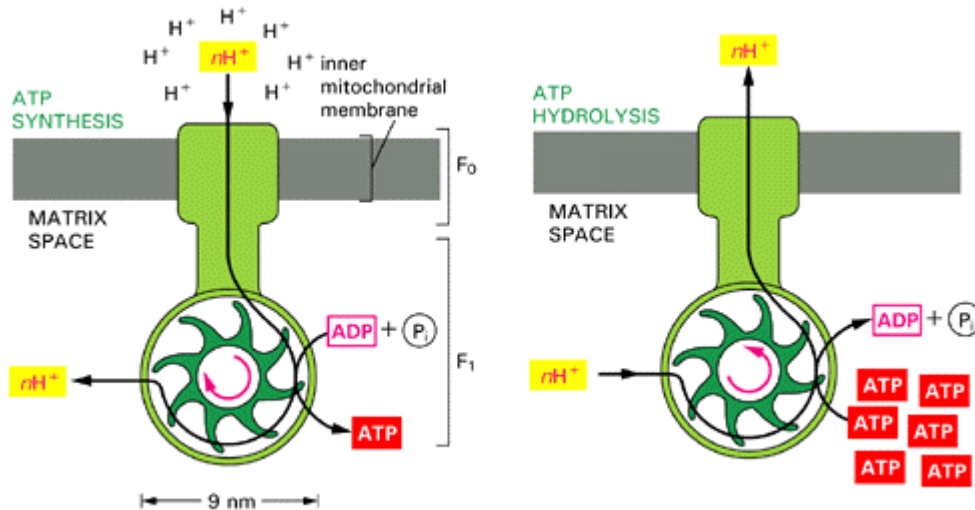
10. Бактериородопсин как протонная помпа.

Бактериородопсин – трансмембранный (то есть встроенный в клеточную мембрану) белок, состоящий из 7 α -спиралей. Обнаружен в бактериях солёных озёр. Для переноса протона необходим свет, поэтому в процессе переноса должен участвовать поглотитель света. Им является ретиналь, одна из двойных связей которого переходит в цис-конфигурацию; ретиналь присоединяется к азоту Lys-216 с образованием енамина. Затем трёхкоординированный азот протонируется за счёт Asp-96 (находится на одной стороне мембраны) и депротонируется с переходом протона на Asp-85 (находится на другой стороне мембраны). В результате этого процесса протон переходит через мембрану в направлении градиента концентрации H^+ – за счёт световой энергии создаётся разность химических потенциалов H^+ по разные стороны мембраны.



11. Строение и механизм работы АТФ-синтетазы.

АТФ-синтетаза – фермент, обеспечивающий синтез АТФ из АДФ и фосфатного остатка. АТФ встроена в мембрану так называемой γ -субъединицей, на конце которой чередуясь располагаются 3 α - и 3 β -субъединицы. Эта система имеет три активных центра, один из которых свободен, другой занимают АДФ и фосфатный остаток, третий – АТФ. Система



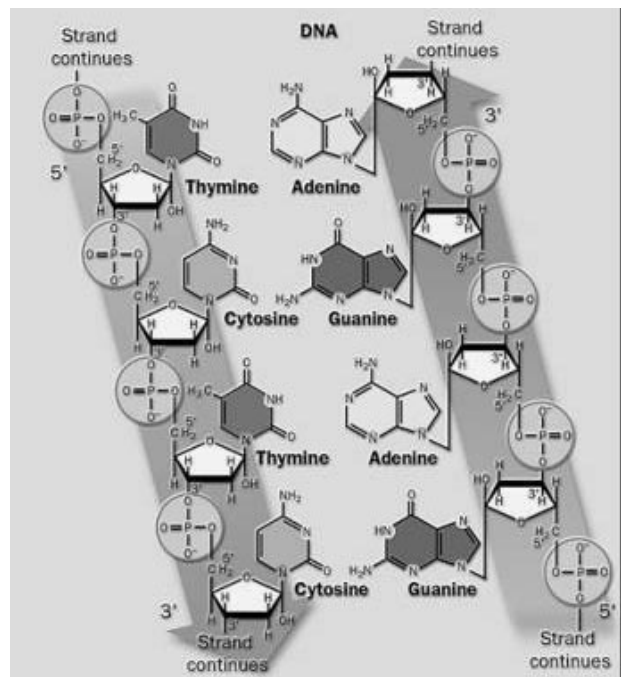
постоянно вращается вокруг γ -субъединицы, в результате чего образуется АТФ. Энергия, необходимая для этого процесса, поставляется бактериородопсином, обеспечивающим $\Delta\mu(\text{H}^+)$ по разные стороны мембраны. Фермент также может выступать в качестве АТФ-азы, транспортируя протоны против градиента концентрации за счёт энергии АТФ.

12. Структура ДНК.

Первичная структура ДНК – последовательность *нуклеотидов*, которые, в свою очередь, сформированы одним остатком фосфорной кислоты, 2'-дезоксирибозой и одним из четырёх азотных гетероциклических оснований. Фосфатные группы присоединены к 3' и 5'-атомам углерода дезоксирибозы, азотные основания – к 1'-атому. Для Т, С и G возможна кето-енольная таутомерия, что является одной из причин мутаций; соотношение кетонной и енольной форм обычно равно 10^4 . Средний размер гена – порядка 1000 нуклеотидов.

Вторичная структура ДНК – две цепочки сворачиваются в двойную спираль за счёт образования водородных связей между комплементарными парами азотных оснований (А–Т, С–G, *правило Чаргаффа*). Один шаг спирали содержит 10 пар нуклеотидов. Все пары азотных оснований лежат в параллельных плоскостях, поскольку для такой конфигурации возможны особые *стекинг-взаимодействия* (частный случай гидрофобных) между плоскими циклами, за счёт которых соседние пары сближаются на расстояния до 3 Å, обеспечивая плотную укладку; внутри двойной спирали воды нет. Цепи ориентированы антипараллельно, то есть «напротив» 5'-конца одной цепи находится 3'-конец другой. При нагревании вязкость ДНК понижается – происходит *денатурация*, распад вторичной структуры; при охлаждении происходит *ренатурация* – повторное образование двойной спирали.

Третичная структура ДНК: если два конца двойной спирали сблизятся, они могут соединиться, образовав кольцевую молекулу ДНК. Ни кольцевая, ни чисто линейная форма



неустойчивы, поскольку в обоих случаях они могут свернуться, образуя *сверхспираль*, стабилизированную дополнительными контактами между разными участками спирали. Все эти конформационные превращения определяются значением топологического инварианта $L = W + T_w$, где W – параметр Райзинга (скрюченность), а T_w – число оборотов одной цепи относительно другой. Двойные спирали сворачиваются в сверхспирали и разворачиваются обратно под действием особых ферментов – *топоизомераз* (потребляют энергию АТФ, а потому являются АТРазами).

13. Структура и функция РНК.

Первичная структура РНК образована последовательностью нуклеотидов, содержащих фосфатный остаток, остаток рибозы и азотного основания. Фосфаты присоединяются, как и в случае ДНК, к 3' и 5' атомам углерода рибозы. Тимин заменяется на урацил.

Вторичная структура РНК зависит от её функций: для м-РНК это α -спираль, аналогичная α -спиралям белков и удерживаемая за счёт стэкинг-взаимодействий между основаниями. Вторичная структура т-РНК – «клеверный лист», три «шпильки» и стебли комплементарных оснований; одна из «шпилек» обязательно содержит антикодон, а стебель без «шпильки» – конец, способный удерживать аминокислоту. Р-РНК образуют сложные структуры (пример приведён на рисунке).

Третичная структура РНК – образование сверхспиралей м-РНК и т-РНК; механизм образования таких сверхспиралей схож с механизмом образования сверхспиралей ДНК (см. 12).

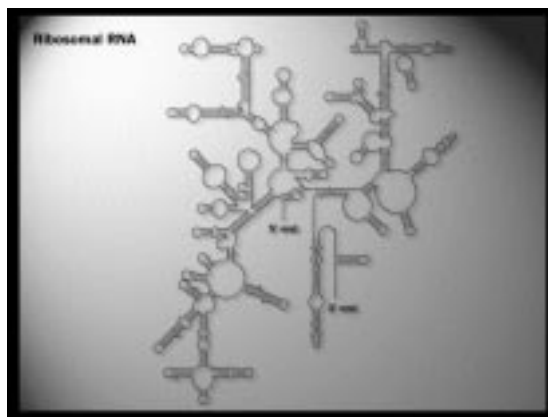
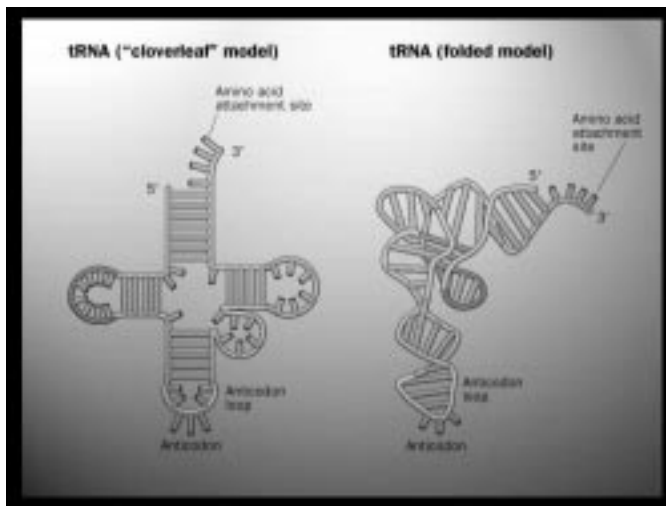
Функции РНК:

- 1) Передача генетической информации.
- 2) Синтез полипептидных цепей белка.
- 3) Каталитическая (рибозимы – ферменты, являющиеся комплексами РНК и белка; РНК также может катализировать сама себя, выступая в роли РНК-зависимой РНК-полимеразы).

14. Репликация ДНК.

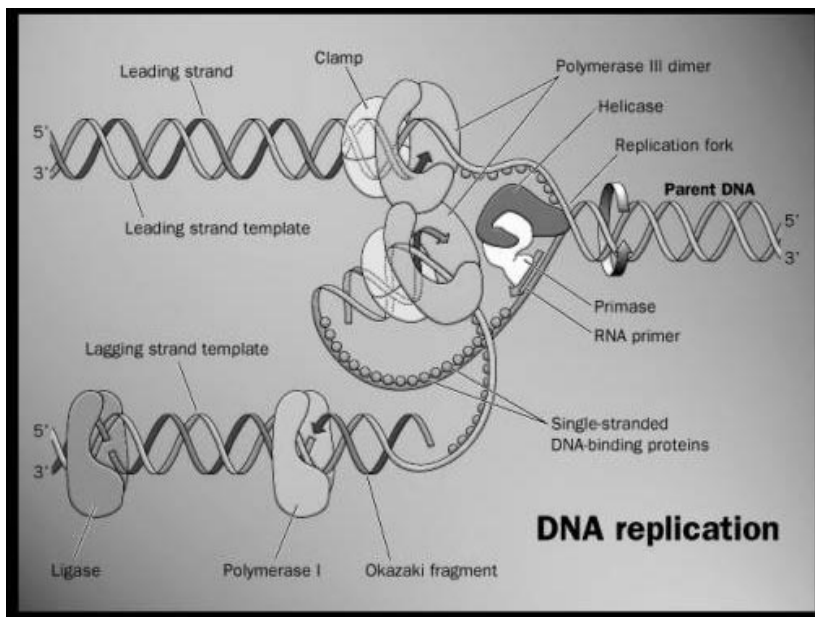
Репликация – удвоение молекулы ДНК, образование из одной молекулы двух, полностью идентичных исходной.

Процесс репликации начинается с раскручивания двойной спирали ДНК, происходящего под действием ферментов *геликаз* (потребляют энергию АТФ и являются АТРазами); существуют два типа геликаз, различающихся направлением движения вдоль цепей ДНК (от 5' к 3', или наоборот). В ходе раскручивания одной части цепи в ДНК, второй конец которых закреплён (например, в кольцевых ДНК), наблюдается сверхспирализация, устраняемая действием *топоизомераз*. Раскручивание обычно начинается с *особого участка ori* (origin of replication), после чего кольцевые ДНК раскручиваются сразу в двух направлениях, тогда как в линейных молекулах ДНК раскручивание происходит только в



одну сторону с образованием *вилки репликации*. На вилке репликации начинается выстраивание новых цепей.

Для выстраивания новой цепи необходимы: фермент *ДНК-полимераза* (не потребляет энергию АТФ, поскольку для образования новых связей используется энергия пирофосфатных связей субстрата), матрица (исходная цепь), субстрат (дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат) и растущая цепь, к которой “пришивается” новый нуклеотид. В начале

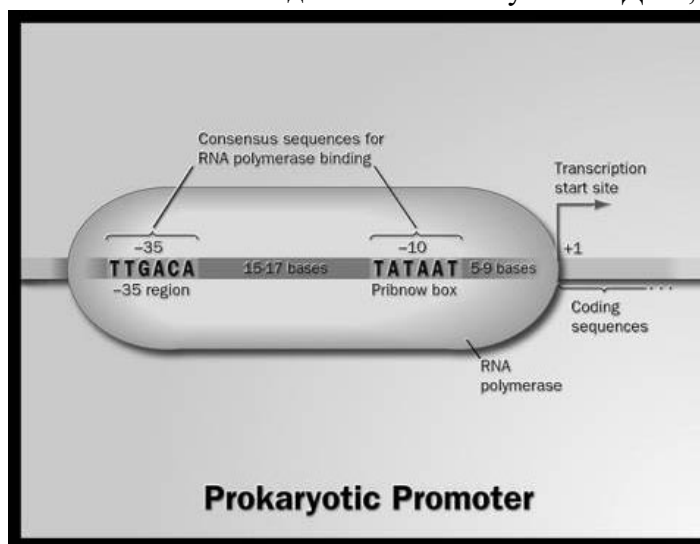


репликации участков растущей цепи ещё нет, поэтому необходимы *праймеры* – “затравочные” фрагменты, состоящие из нескольких нуклеотидов. Праймеры создаются при помощи фермента *праймазы*, обеспечивающего синтез коротких рибонуклеотидных участков в некоторых местах материнской цепи (они разбросаны неперидично с интервалом в несколько десятков нуклеотидов). После появления праймера начинается наращивание новой цепи при помощи ДНК-полимеразы. Однако, в отличие от геликаз, ДНК-полимераза может перемещаться только от 3'-конца к 5'-концу цепи; по этой причине только для одной (*ведущей*) цепи направление раскручивания совпадает с направлением наращивания новой цепи. Во второй (*запаздывающей*) цепи зачатки новой цепи появляются на каждом следующем праймере; такие зачатки получили название *фрагментов Оказаки*. В тот момент, когда фрагмент Оказаки достраивается до ближайшего праймера, этот праймер отщепляется либо под действием самой ДНК-полимеразы, либо с помощью особого фермента *РНКаза H*. Сшивание отдельных фрагментов Оказаки, освобождённых от праймеров, осуществляется при помощи *ДНК-лигазы*.

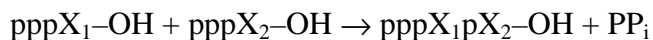
15. Транскрипция.

Транскрипция – процесс биосинтеза РНК на матрице ДНК. Образующиеся цепи РНК в дальнейшем могут превращаться во все три вида РНК, то есть использоваться при трансляции как м-РНК или т-РНК, а также формировать р-РНК.

В ходе транскрипции раскрученным оказывается только один небольшой участок ДНК, на котором в данный момент происходит синтез. Раскручивание происходит под действием ферментов *геликаз*. Инициация протекает на строго определённых участках матрицы, называемых промоторами (они селективно взаимодействуют с основным ферментом транскрипции – *РНК-полимеразой*); структуры промоторов различны, однако все они (для каждой конкретной РНК-полимеразы) близки к некой идеальной, наиболее эффективной (в смысле взаимодействия с ферментом) последовательности *консенсуса*. При инициации РНК-полимераза как бы

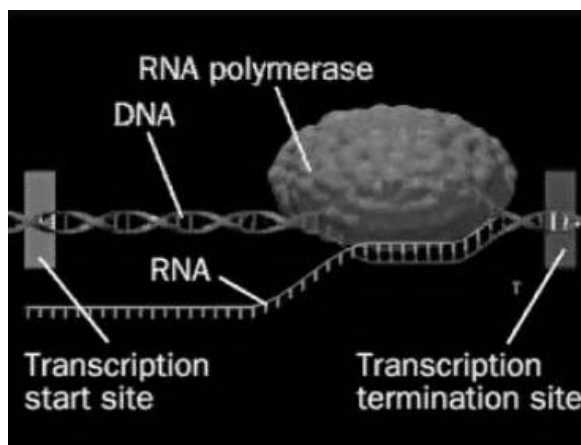


«закрепляется» на раскрученном участке одной из цепей ДНК и катализирует реакцию инициации, заключающуюся в сшивании первых двух рибонуклеозидтрифосфатов новой цепи, соответствующих нужному участку матричной цепи.



Затем РНК-полимераза начинает двигаться вдоль раскручивающейся цепи ДНК, достраивая в новую цепь следующие нуклеотиды. При этом «отработанные» участки ДНК сворачиваются обратно в спираль, не затрагивая образующуюся молекулу РНК.

Терминация транскрипции до конца не изучена; предполагается, что причиной терминации является появление в выстраиваемой РНК шпилек, для образования которых конец цепи отрывается от РНК-полимеразы, прерывая транскрипцию. Возможно также существование особых участков-терминаторов ДНК. После окончания транскрипции синтезированная РНК может претерпевать самые разные превращения в зависимости от своего предназначения.



16. Генетический код.

Генетический код – соответствие между 64 кодонами (тройками нуклеотидов) и 20 аминокислотами.

Свойства генетического кода:

- 1) Триплетный.
- 2) Вырожденный (большинству аминокислот соответствуют несколько кодонов).
- 3) Неперекрывающийся.
- 4) Существование открытых рамок считывания – областей, для которых на больших участках не встречаются кодоны-терминаторы.
- 5) Универсальный (одинаков для подавляющего большинства организмов).

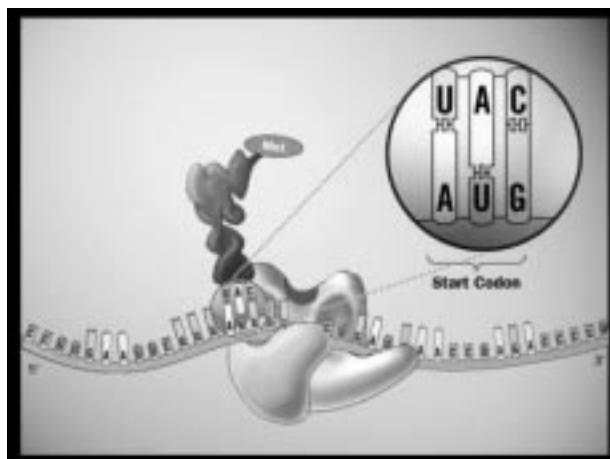
61 кодон кодирует аминокислоты, ещё 3 кодона (UAA, UAG, UGA) являются *кодонами-терминаторами*, останавливающими процесс трансляции. Обычно все последовательности кодонов начинаются с AUG (метионин).

Для расшифровки генетического кода используют специально синтезированные м-РНК, состоящие из одного и того же, повторяющегося кодона; при введении такой м-РНК в рибосому синтезируется белок, состоящий из всего одной аминокислоты – той, что кодирует этот кодон.

17. Биосинтез белка.

Трансляция – перевод генетического кода с языка последовательности нуклеотидов РНК-копии гена в аминокислотную последовательность белка.

Трансляция происходит на рибосоме – органелле клетки, состоящей из двух *субъединиц* (большой и малой). Молекула м-РНК находится между большой и малой субъединицами, причём рибосома может передвигаться вдоль м-РНК от 5' к 3'-концу. Аминокислоты, необходимые для синтеза, поставляются *аминоацил-т-РНК*,



образующимися при взаимодействии аминокислоты и т-РНК в присутствии фермента *аминоацил-т-РНК-синтетазы*. При этом специфичность взаимодействия определённых т-РНК с определёнными аминокислотами определяется исключительно специфичностью фермента, а не антикодоном т-РНК.

Аминоацил-т-РНК закрепляются на м-РНК за счёт взаимодействия между кодоном и антикодоном; обычно соединяются комплементарные пары оснований, хотя в некоторых случаях также возможно связывание антикодона,

содержащего одно некомплементарное к кодону основание. На стадии инициации инициаторная метиониновая т-РНК, а также «следующая» по коду т-РНК связываются с соседними кодонами м-РНК, после чего происходит перенос фрагмента метионина на соседнюю т-РНК с образованием пептидной связи.



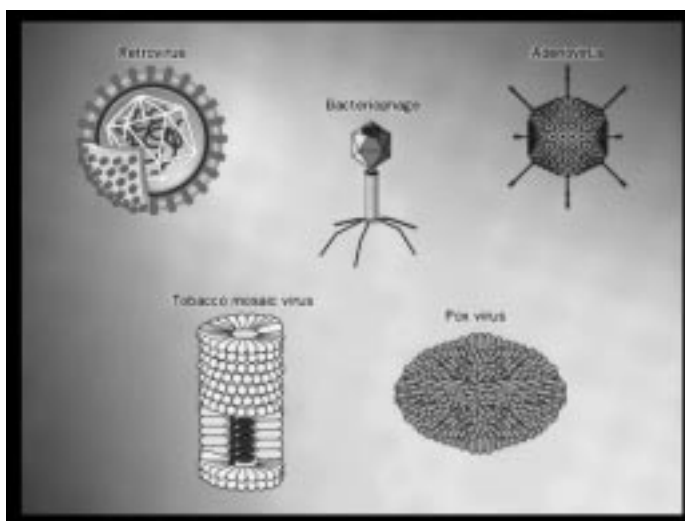
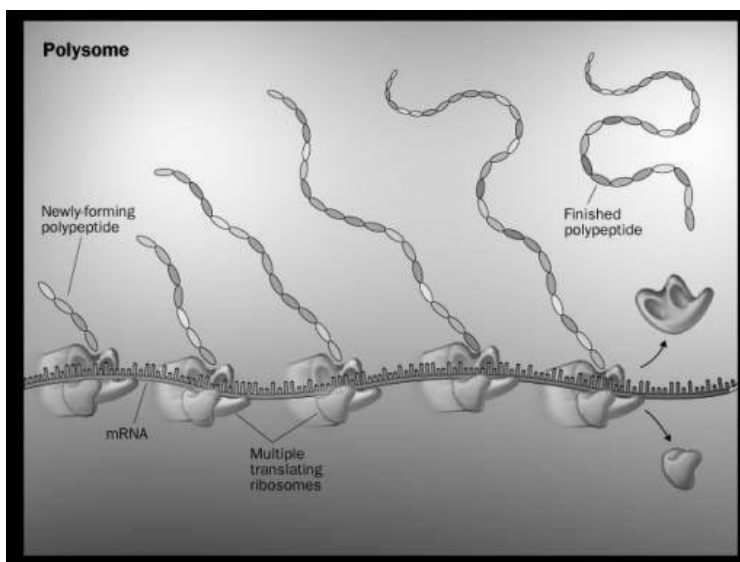
Затем продолжается аналогичный процесс, катализируемый ферментом *пептидилтрансферазой*, содержащимся в рибосомах (образование пептидной связи не требует АТФ – энергия запасается раньше, на стадии образования аминоксил-т-РНК). В результате пептидная цепь постепенно наращивается от N-конца к С-концу. Участок рибосомы, содержащий аминоксил-т-РНК, называют *A-участком*, а участок, содержащий т-РНК, несущую пептид, – *P-участком*. После переноса пептидного фрагмента на очередную аминокислоту рибосома сдвигается на три кодона вдоль м-РНК так, чтобы т-РНК, несущая пептид, вновь оказалась на P-участке. Для ускорения процесса трансляции используют *полисомы* – комплексы, состоящие из большого числа рибосом.

Кодонам-терминаторам не соответствует ни одна аминокислота, поэтому при достижении одного из таких кодонов пептидная цепь обрывается, а образовавшийся белок отрывается от т-РНК.

18. Плазмиды и вирусы.

Плазмида – небольшая кольцевая молекула ДНК, состоящая из нескольких тысяч нуклеотидов. Плазмиды обычно содержатся в прокариотических клетках и являются наиболее распространённым вектором в генной инженерии (см. 20).

Вирус – супрамолекулярный химический комплекс, не являющийся живой субстанцией, но способный при попадании в клетку существенно влиять на её жизнедеятельность. Все вирусы несут определённый генетический материал, находящийся в виде одно- или двунитевых ДНК или РНК. Общей задачей всех вирусов является внедрение своего генетического материала в клетку,



приводящее к синтезу специфических белков вируса. В дальнейшем эти белки способствуют образованию новых вирусных частиц, которые затем выходят из клетки, разрушая её мембрану. Специфические вирусы, атакующие бактерии, называют *бактериофагами*; они, как и плазмиды, нашли применение в генной инженерии (см. 20).

Механизм внедрения генетического материала вируса в геном клетки зависит от строения вируса. Если вирус содержит двунитевую ДНК, то, попадая в клетку, она участвует в процессе транскрипции точно также как ДНК клетки. В результате этого начинается синтез специфических белков вируса, которые зачастую могут выступать в роли праймеров, упрощая процесс транскрипции.

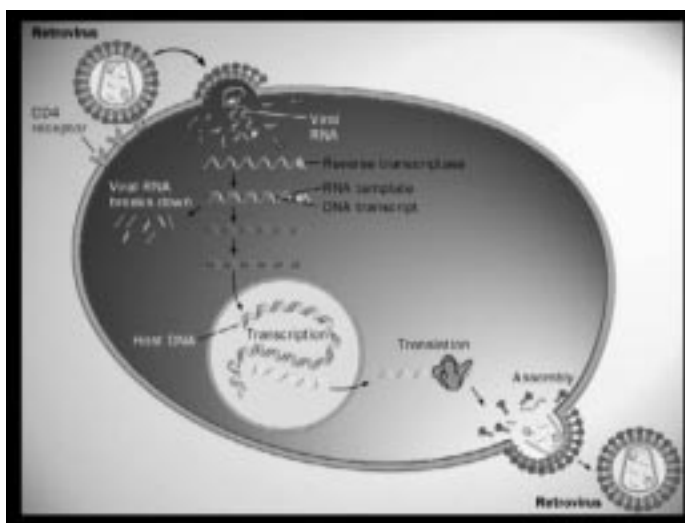
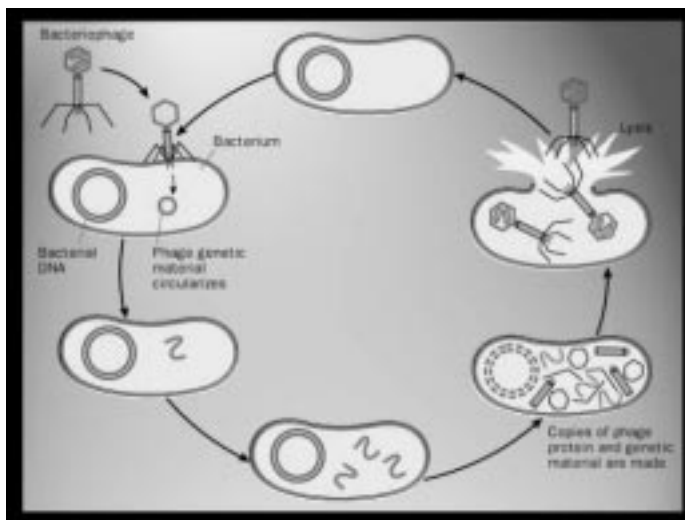
Если вирус содержит однострунчатую ДНК, то она, в первую очередь, участвует в процессе образования *репликативной формы ДНК* (достраивании второй цепи); при этом исходная цепь называется *плюс-цепью*, а достроенная – *минус-цепью*. Затем на минус-цепи начинается выстраивание новых плюс-цепей, которые либо превращаются в новые репликативные формы ДНК, либо входят в состав новых вирусных частиц.

РНК-содержащие вирусы могут иметь как плюс-, так и минус-цепи РНК. Отличие плюс-цепей состоит в том, что они могут выступать в качестве м-РНК для производства белков на рибосомах клетки. В обоих случаях новые цепи РНК выстраиваются на старых при помощи особого фермента *РНК-зависимой РНК-полимеразы (РНК-репликазы)*, которая либо синтезируется рибосомами на плюс-цепях, либо входит в состав вируса. Минус-цепи, выстраиваемые таким образом на плюс-цепях, участвуют в образовании новых плюс-цепей, при помощи которых синтезируются белки вируса или образуются новые вирусные частицы.

Наконец, отдельный класс вирусов составляют ретровирусы, содержащие фермент *РНК-зависимую ДНК-полимеразу*, обеспечивающий *обратную транскрипцию* – синтез нити ДНК на матрице вирусной РНК. Затем тот же самый фермент постепенно разрушает исходную цепь РНК, а однострунчатая ДНК достраивается до двунитевой ДНК. Последняя встраивается в ДНК клетки-хозяина и принимает участие в процессах транскрипции.

19. Регуляция транскрипции генов.

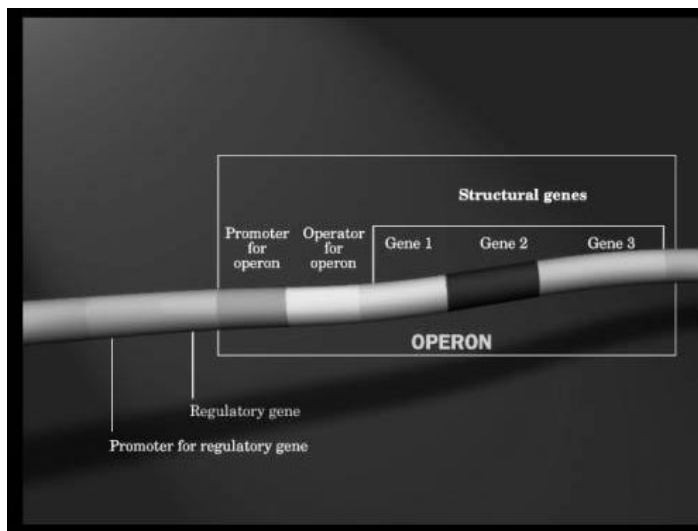
Гены в ДНК можно разделить на *конститутивные* (работающие в постоянном режиме – всегда подвергаемые транскрипции) и *регулируемые*. Регуляция транскрипции регулируемых генов осуществляется при помощи специальных *регуляторных белков*. Белки, подавляющие транскрипцию гена, называются *репрессорами*, а активирующие транскрипцию – *активаторами* (индукторами). Механизм действия регуляторных белков связан с образованием комплекса с определённым участком молекулы ДНК, называемым оператором. Оператор располагается рядом с промотером и затрудняет взаимодействие



промотора с РНК-полимеразой, подавляя транскрипцию.

Участок ДНК, подвергаемый регуляции, называется опероном и включает в себя: промотор, оператор, кодирующую часть и терминаторы транскрипции. Репрессия транскрипции может происходить в разных случаях: производство белка, катализирующего гидролиз лактозы, подавляется при отсутствии лактозы; производство белка, катализирующего реакцию образования триптофана, подавляется при появлении избытка триптофана.

Столь простая ситуация реализуется только для прокариотических клеток. В эукариотах связи между операторами и регулируемым геном более сложны – одним белком может контролироваться активность сразу нескольких генов, однако зачастую активность одного гена определяется сразу несколькими регуляторными белками.



20. Генетическая инженерия.

Основными задачами генетической инженерии являются искусственный синтез белков на рибосомах живой клетки, а также селективное изменение типичных белков клетки за счёт изменения её генетического кода. Для этого в ДНК клетки нужно ввести соответствующие необходимому белку гены. По этой причине главной задачей генной инженерии становится отбор необходимых генов, их размножение и внедрение в клетки для выработки белка.

Отбор генетического материала производится несколькими способами: можно синтезировать искомую последовательность нуклеотидов химическими методами, можно выделить из клеток, содержащих этот ген, все м-РНК (и перевести их в ДНК с помощью обратной транскрипции – см. 18), или же непосредственно вырезать (с помощью специальных ферментов) нужный участок ДНК. В последних двух случаях получить нужный ген в чистом виде практически невозможно, поэтому в дальнейшие манипуляции вводится «грязный» образец.

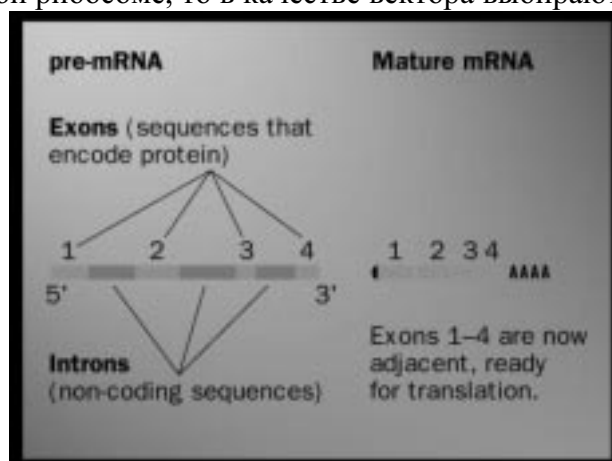
Для размножения полученного генетического материала необходимо ввести его в клетку, используя так называемые *вектора* – молекулы ДНК, способные автономно размножаться внутри клетки. Основные свойства векторов: способность к автономной репликации, наличие уникальных участков расщепления под действием эндонуклеаз рестрикции, наличие маркерных белков (соответствие генетического кода вектора белкам, обладающим специфическими свойствами). Обычно в качестве векторов используют плазмиды и вирусы (особенно бактериофаги).

Рассмотрим дальнейшие превращения на примере встраивания исследуемого гена в плазмиду рBR322, содержащую гены устойчивости к антибиотикам (ампициллину и тетрациклину). Под действием фермента, относящегося к группе *эндонуклеаз рестрикции* (ферменты, селективно расщепляющие нуклеотидную цепь в одном конкретном месте), такая плаزمида раскрывается на участке, ответственном за устойчивость к ампициллину. При этом образуется линейная молекула, имеющая так называемые *липкие концы* (однонитевые фрагменты d(pTrCpCpA)–ОН), к которым легко может присоединиться нуклеотид, обладающий необходимым набором сопряжённых оснований. Если встраиваемый генетический набор получен химическим путём, то внедрение таких наборов на концах цепи не составляет труда; если же фрагмент был выделен из м-РНК (ДНК) клетки, то необходимые липкие концы образуются под действием фермента *дезоксинуклеотидил*

трансферазы. После соединения липких концов, в результате действия ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы возникшие в ходе синтеза «дырки» зашиваются, образуется новая плаزمид, содержащая необходимый ген и называемая *рекомбинантной ДНК*. Полученные таким путём плазмиды внедряются в клетку-хозяина, где начинают реплицироваться.

Между тем, исследуемый ген внедряется далеко не во все плазмиды; для отбора необходимых плазмид требуется процедура, называемая *клонированием ДНК* или *скринингом* («разборкой» полученных молекул). В принципе, клон – генетически идентичное потомство одной клетки, поэтому само понятие «клонирование ДНК» бессмысленно. Однако традиционно процесс размножения генетического материала называют именно так, поскольку в ходе размножения рекомбинантных ДНК образуются клоны – семейства генетически идентичных клеток. Для отбора необходимых клеток используют свойства устойчивости к антибиотикам: вначале клоны помещают на тетрациклин (отсеиваются плазмиды, в которых внедрение произошло в неправильном месте), затем – на ампициллин (разделяются рекомбинантные ДНК и исходные плазмиды pBR322). Существует и другой способ отбора, называемый *молекулярной гибридизацией*: к характерному участку встраиваемого гена присоединяют последовательность комплементарных нуклеотидов, несущую радиоактивную метку, после чего отделяют радиоактивные ДНК от нерадиоактивных. Подобная операция особенно необходима в том случае, когда используемый генетический материал не является чистым, а выделен из ДНК или м-РНК; вначале образуется так называемая *библиотека комплементарных ДНК* (кДНК), из которой необходимо выбрать нужную.

Таким путём осуществляется размножение генетического материала; если целью исследования является синтез белка на природной рибосоме, то в качестве вектора выбирают плазмиду, разрывающуюся вблизи участка, содержащего активный промотор. В результате на рекомбинантной ДНК активирована транскрипция встроенного участка, что приводит к активной экспрессии внедрённого гена.



21. Рекомбинантные ДНК.

См. 20.

22. Структура генов эукариот. Сплайсинг.

Далеко не все гены эукариотов кодируют необходимую для клетки информацию. Установлено, что достаточно протяжённые участки м-РНК (называемые интронами) вообще не кодируют аминокислоты, а являются не несущими код вставками. Наиболее ярко подобная ситуация проявляется в хромосомах эукариот, где ДНК находится в форме переплетённых друг с другом цепей, причём участки, несущие информацию (экзоны), занимают лишь около 10 % длины этих цепей. По этой причине во всех эукариотических клетках в ходе транскрипции вначале образуются *pre-м-РНК*, точные копии одной из цепей ДНК, которые затем освобождаются от интронов при помощи операции *сплайсинга*.

Химический механизм сплайсинга заключается в атаке ОН-группы аденозильного остатка интрона по фосфодиэфирной связи на 5'-конце интрона; интрон образует петлю, а присоединённый к 5' концу экзон атакует 3' конец интрона. В результате интрон отделяется в виде петли, а экзоны соединяются в общую цепь. Катализатором этого процесса считают саму молекулу РНК – один из примеров катализа рибозимов (см. 13).

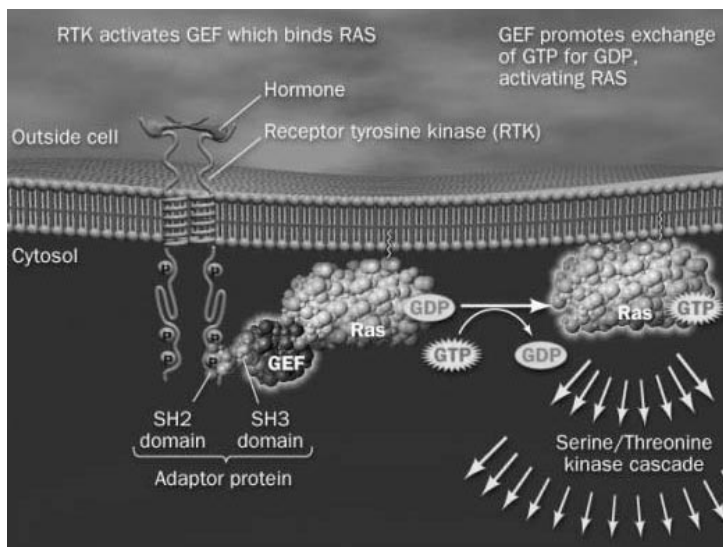
23. Полимеразная цепная реакция.

Полимеразная цепная реакция – способ воспроизведения генетического материала без участия векторов и клеток-хозяев. Для осуществления такой реакции необходимы два праймера и термостабильная ДНК-полимераза (выделяемая из термофильных микроорганизмов). Вначале исходную ДНК нагревают до 90⁰ для разделения цепей, затем смесь охлаждают – происходит присоединение праймеров, после чего на этих праймерах начинается синтез новых цепей. Многократное воспроизведение достигается повторением этой процедуры; каждый раз в промежутке между двумя праймерами образуется пара новых цепей, полностью идентичных исходным.

24. Вирусы. ВИЧ.

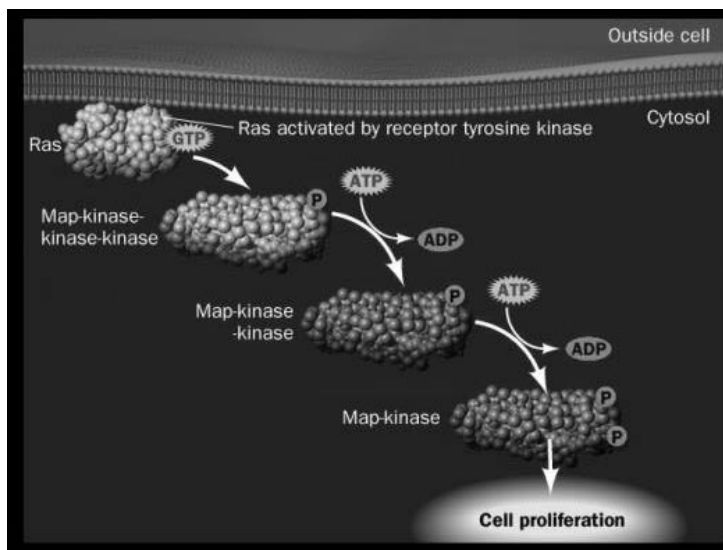
О вирусах см. 18.

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека, вызывает заболевание СПИД (синдром приобретённого иммунодефицита человека). ВИЧ состоит из двух молекул однонитевой РНК, каждая из которых содержит около 9200 нуклеотидов. ВИЧ является ретровирусом (см. 18) и инфицирует главным образом Т-хелперы (один из типов клеток Т-лимфоцитов, отвечающих за клеточный иммунитет), что приводит к постепенному разрушению иммунной системы. Основной особенностью ВИЧ является длительный латентный период (до 10 лет).



25. Рак как нарушение системы передачи сигнала.

Рак – заболевание, вызываемое неконтролируемым делением клеток. Причиной рака является нарушение системы передачи сигнала из-за особого белка RAS. RAS является так называемым р-белком, то есть работает не с АТФ, а с GTP (гуанидилтрифосфорной кислотой). В обычном, неактивном состоянии RAS связан с GDP, однако под действием особого фактора обмена GEF (guanine nucleotide exchange factor) может происходить замена GDP на GTP, активирующая RAS.



Процесс начинается с прихода сигнала EDF (фактора роста клеток) на рецепторы тирозинкиназы; она фосфорилируется и связывается с GEF, который, в свою очередь, связывается с RAS, закреплённым в неактивном состоянии на внутренней поверхности клеточной мембраны. В результате этого закреплённая на RAS GDP обменивается на GTP, которая фосфорилирует MAP-киназу – киназу, отвечающую за передачу сигнала деления и роста. В результате каскад MAP-киназ многократно усиливает сигнал на рост; клетка начинает неконтролируемо делиться.

26. Системы передачи сигналов в клетку.

Виды сигналов:

- 1) Гормоны.
- 2) Нейротрансмиттеры.
- 3) Свет, запах, вкус.
- 4) Антигены
- 5) Запуск развития.
- 6) Запуск деления.
- 7) Факторы роста.
- 8) Механика.

Виды ответов:

- 1) Жизнь (ничего не изменяется).
- 2) Деление (клетка делится, причём развитие двух новых клеток происходит по-разному).
- 3) Смерть (саморазрушение клетки – *апоптоз*; часто оказывается ответом на действие вируса; при таком разрушении клетка постепенно разрушается, а фагоциты легко перерабатывают её остатки – не возникает воспалительный процесс).

Системы передачи сигнала:

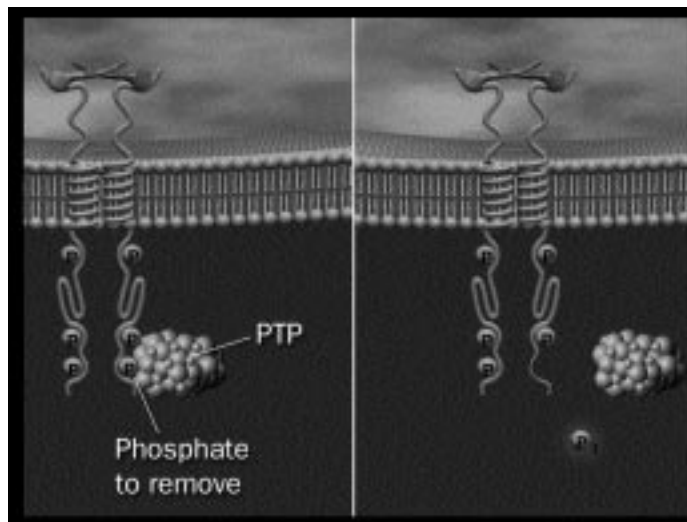
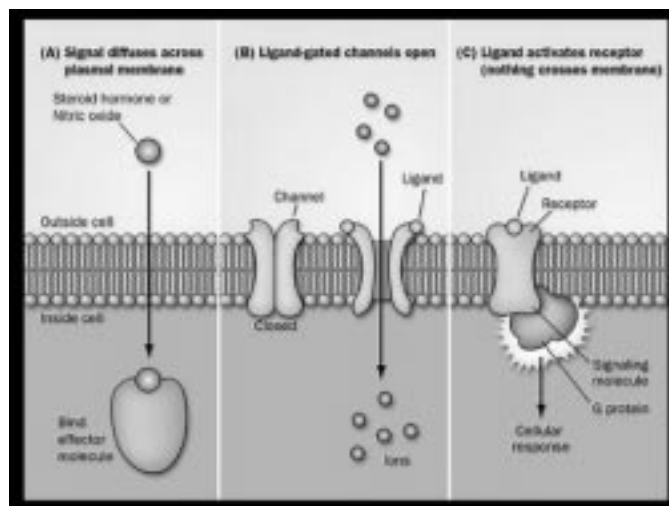
- 1) Ионные каналы (см. 7).
- 2) Прямой транспорт (диффузия через мембрану, см. 7).

3) Киназы – трансмембранные белки, подвергающиеся изменениям внутри клетки при получении сигнала извне (обычно при присоединении гормона).

Механизм действия киназ связан со способностью к фосфорилированию аминокислотных остатков Ser/Thr или Tyr: при поступлении сигнала на внешние рецепторы киназы внутри клетки гидролизует одна молекула АТФ, а отщепившийся фосфатный остаток фосфорилирует киназу. При этом изменяется конформация белка, и киназа становится ферментом – *фосфокиназой* (*протеинфосфокиназой*). По окончании действия сигнала фосфокиназа дефосфорилируется под действием фермента из класса фосфатаз, происходит снятие сигнала.

В реальности в клеточную мембрану встроено множество киназ, образующих *каскад*; при поступлении на такой каскад сигнала происходит его многократное усиление (амплификация). Подобные каскады являются одной из основных частей нейронных систем. В принципе, в любой нейронной системе могут быть выделены *входной слой* (первичная обработка информации – выделение нужного сигнала рецепторами), *скрытый слой* (последующая обработка информации – передача сигнала через мембрану при помощи киназ) и *выходной слой* (интеграция сигнала).

Свойства системы передачи сигнала:



- 1) Специфичность (осуществляется за счёт высокой селективности рецепторов).
- 2) Амплификация (способность к усилению сигнала – за счёт киназ).
- 3) Адаптация (снятие сигнала при окончании его действия – дефосфорилирование).
- 4) Интеграция (способность к объединению сигналов).

27. Что такое ген с точки зрения химика. Гены антител.

Ген – неопределимое (для Копылова) понятие; можно сказать, что ген – сегмент ДНК, который кодирует информацию для образования функционального продукта. Геном – совокупность всех генов.

Выделяют регуляторную и структурную (кодирующую) части гена – см. 19. Кроме этого, гены могут содержать некодирующие области – интроны (см. 22); количество интронов определяет частоту деления клетки. В клетках прокариот интронов нет, поэтому они делятся крайне часто и быстро; в клетках эукариот обычно содержится большое количество интронов – зачастую они не делятся вообще.

Гены антител – хрень какая-то.

II. Энзимология

1. Ферменты как белковые катализаторы. Основные отличия ферментативного катализа от традиционного химического. Ферменты в химии.

Ферменты – высокоактивные белковые катализаторы.

Отличия ферментативного катализа:

1) Высокая активность (разница в скорости одной и той же реакции, катализируемой ферментом или небелковой частицей – например, протоном – может составлять 10-15 порядков).

2) Высокая селективность (ферменты обычно катализируют только один конкретный химический процесс).

3) Высокая эффективность (отсутствие побочных продуктов и дисбаланса «продукт-субстрат»).

Ферменты в химии:

1) Физическая химия исследует структуры белков и активных центров методами РСА, ЯМР, ЭПР, а также кинетику и механизмы действия ферментов.

2) Органическая химия – тонкий органический синтез, крупномасштабные синтетические процессы.

3) Аналитическая химия – иммуноферментный анализ, биолюминесцентный анализ, биосенсоры.

4) Неорганическая химия исследует поведение ионов металлов в активных центрах.

5) Химическая технология – производство лекарств, аминокислот и др. веществ.

6) Электрохимия – биоэлектрокатализ, то есть ферментативный катализ электродных процессов.

7) Коллоидная химия изучает белки как коллоидные частицы, а также поведение ферментов в обращённых мицеллах (мицеллярная энзимология).

2. Энергия и силы в биосистемах. Взаимодействия в белковой молекуле: ковалентные, водородные связи, гидрофобные и электростатические взаимодействия.

Ковалентные связи – пептидная и дисульфидные мостики. Характерные значения энергий ковалентных связей (ΔG гидролиза): $(-5) - (-30)$ кДж/моль. $-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{HS}-\text{CH}_2- \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-$.

Водородные связи – слабые связи, возникающие за счёт притяжения несущего малый положительный заряд атома водорода к атомам, заряженным отрицательно (кислороду, азоту, галогенам). Характерные значения энергий: $0.1 - 2$ ккал/моль.

Гидрофобные взаимодействия возникают за счёт перестройки системы водородных связей воды вблизи неполярной гидрофобной группы. Вода вытесняет гидрофобную молекулу или группу (A) в гидрофобную область белка. Величина гидрофобного взаимодействия характеризуется величинами $\Delta G = -RT \ln \frac{[A]_{\text{белок}}}{[A]_{\text{вода}}}$ или $\pi = \lg \frac{[A]_{\text{белок}}}{[A]_{\text{вода}}}$ –

константа гидрофобности Ганча. В пересчёте на одну CH_2 -группу энергетический эффект гидрофобного взаимодействия составляет $\Delta H = -0.57$ ккал/моль, $T\Delta S = 0.34$ ккал/моль.

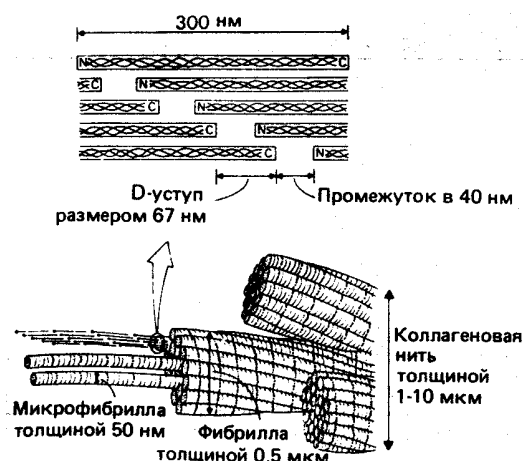
Электростатические взаимодействия – обычно достаточно слабы и проявляются лишь в сильно полярных растворах, где протонированная и потому заряженная положительно аминокислотная группа притягивается к депротонированной и заряженной отрицательно карбоксильной группе – образуется *солевой мостик*. Характерные значения энергий (ΔG разрыва солевого мостика) $(-3) - (-4)$ ккал/моль.

3. Уровни структурной организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры.

См. ХПС, 3. Необходимо иметь в виду, что по форме третичной структуры белки разделяют на *глобулярные* (формирующие глобулы – сферические частицы) и *фибриллярные* (формирующие волокна). Глобулярные белки могут быть образованы исключительно α -спиралями (α/α – субъединицы гемоглобина), исключительно β -складками (β/β – иммуноглобулин) или и теми, и другим одновременно (α/β , $\alpha + \beta$). Все ферменты являются глобулярными белками.

Типичная структура фибриллярного белка представлена на рисунке.

По четвертичной структуре обычно выделяют белки мономеры (состоящие из одной субъединицы – пероксидаза хрена), димеры (алкогольдегидрогеназа) и тетрамеры (красный флуоресцентный белок).



4. Методы выделения биополимеров: основные трудности. Методы фракционирования белков. Хроматографические методы: виды хроматографии, принципы разделения, сорбенты и носители. Электрофорез и изоэлектрическая фокусировка.

Основные трудности:

- 1) Большое разнообразие и незначительные различия в структуре.
- 2) Малые количества исследуемого вещества (миллиграммы, микрограммы).
- 3) Неустойчивость, лабильность структур.

Методы фракционирования:

- 1) Использование органических растворителей (ацетон, этанол) – понижение растворимости многих аминокислот и белков.
- 2) Использование минеральных солей – уменьшается электростатическое отталкивание одноимённо заряженных полиионов, что может приводить к осаждению некоторых компонентов.
- 3) Дробное осаждение.
- 4) Центрифугирование.
- 5) Гельфильтрация с использованием «молекулярных сит».
- 6) Диализ (отделение от низкомолекулярных компонентов при пропускании через полупроницаемые мембраны).
- 7) Ультрафильтрация.

Виды хроматографии: *газожидкостная* (распределение вещества между газом и жидкостью), *ионообменная* (распределение анионов и катионов на ионообменной смоле), *аффинная* (распределение вещества между фазами за счёт химического взаимодействия с носителем; например, белки хорошо удерживаются целлюлозой, активированной бромцианом), *тонкослойная* (распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами по полярности); если сорбент полярен, а растворитель неполярен, то реализуется обычная ТСХ; в обратном случае происходит обращённо-фазовая ТСХ.

Основные сорбенты и носители: целлюлоза и её модификации, сефадексы, сефарозы, полистиролы, полиакриламиды, силикагели.

Электрофорез – разделение заряженных частиц в электрическом поле. Условие электрофореза: $fv = neV$, где f – коэффициент вязкого трения, v – скорость перемещения частицы, V – потенциал внешнего электрического поля. На коэффициент вязкого трения влияют: величина и форма молекул, заряд; для наибольшей компенсации этих эффектов до электрофореза проводят денатурацию, химическими методами разделяя белок на отдельные аминокислотные последовательности.

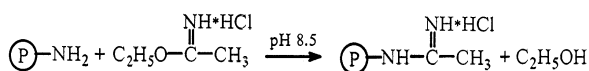
Изоэлектрическая фокусировка – разделение белков в среде с градиентом pH, создаваемым внешним электрическим полем (значение pH возрастает от анода к катоду). В такой среде белок движется в соответствии со знаком своего заряда до достижения изоэлектрической точки. Для поддержания градиента pH в раствор вводят так называемые амфолины – короткие полимерные молекулы, содержащие карбоксильные и аминогруппы, то есть амфолиты. В электрическом поле эти молекулы расходятся по своим изоэлектрическим точкам и создают градиент pH, одновременно работая в качестве буфера.

5. Химические модификации белков. Применение химической модификации для иммобилизации ферментов.

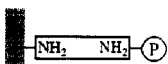
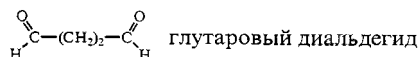
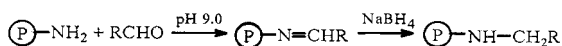
Химические модификации белков (используют для анализа или иммобилизации):

N- концевая α-аминогруппа, ε - аминогруппа лизина

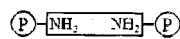
Имидозофилы



Альдегиды с последующим восстановлением боргидридом натрия

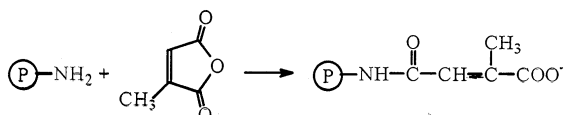


Иммобилизация на носителях, содержащих аминогруппу



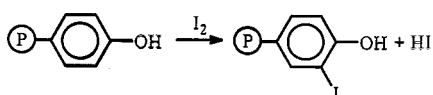
Получение конъюгатов белков

Ангидриды дикарбоновых кислот

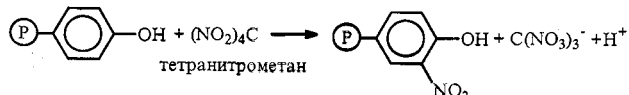


Тирозин

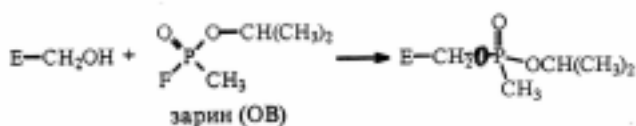
Иодирование



Нитрование

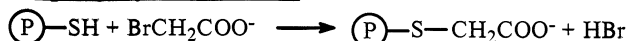


Ацетилхолинэстераза

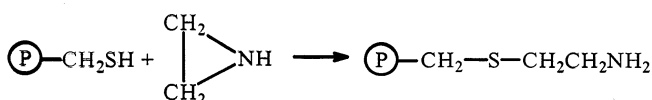


SH группа цистеина

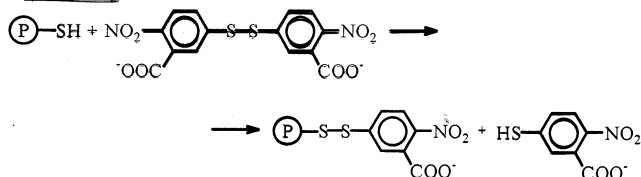
Бромуксусная кислота



Этиленимин



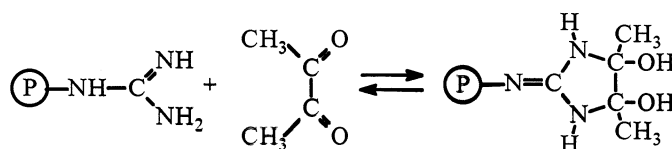
Реагент Элмана - Дитиобиснитробензойная кислота (DNTB)



хромогенный продукт

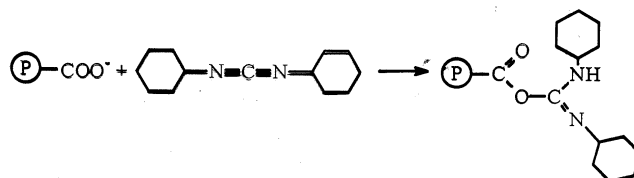
Гуанидиногруппа аргинина

Бутандион



Концевая карбоксильная группа, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот

Дициклокарбодиимид

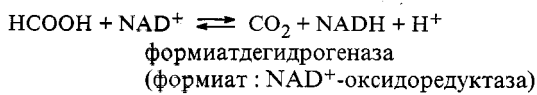
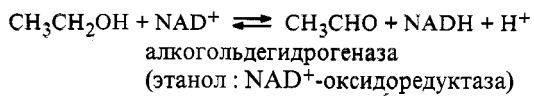
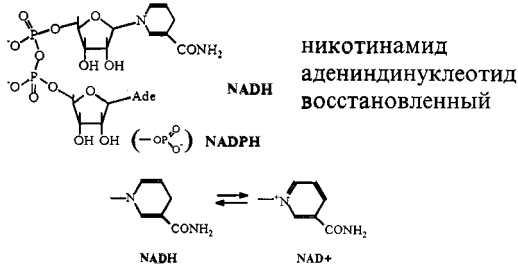


Химическая иммобилизация ферментов – обычно ферменты иммобилизуют, пришивая к инертной поверхности с помощью адсорбции или тиолов.

6. Классификация ферментов.

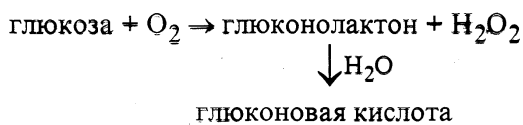
- 1) **Оксидоредуктазы** – катализируют окислительно-восстановительные реакции
- 2) **Трансферазы** – катализируют перенос радикала: $XY + Z \rightarrow X + YZ$, $Y = \text{Me, Ac, PO}_4$.
- 3) **Гидролазы** – катализируют реакции гидролиза (активируют молекулы воды) эфиров карбоновых кислот, гликозидов, простых эфиров и тиоэфиров, пептидов и белков.

NAD (NADP) зависимые дегидрогеназы

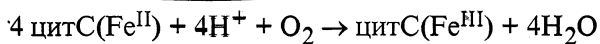


Оксидазы

восстановление кислорода до H₂O₂ или H₂O



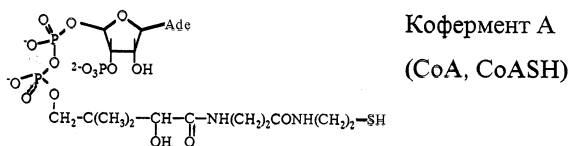
Глюкозооксидаза



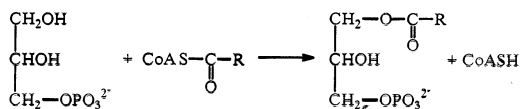
ЦитохромС оксидаза

терминальный фермент дыхательной цепи

Ацилтрансферазы

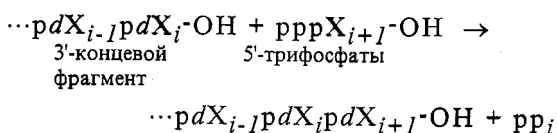


Биосинтез фосфолипидов и жиров



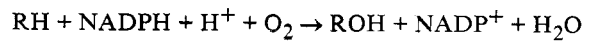
ДНК-полимераза

Синтез цепи ДНК на матрице ДНК



Моноксидазы

окисление органических соединений с включением одного атома кислорода в молекулу соединения и восстановление второго до воды

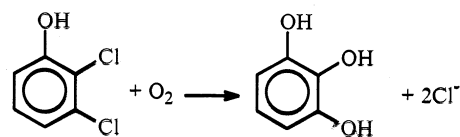


цитохромы Р 450

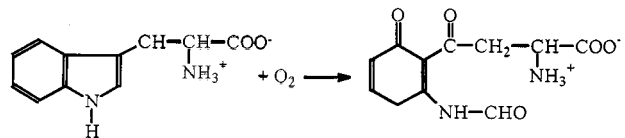
гидроксилирование чуждых соединений (ксенобиотиков)

Диоксигеназы

оба атома кислорода включаются в состав продукта



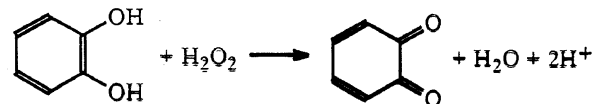
биоразрушение хлорорганических ароматических соединений



триптофан-2,3-диоксигеназа

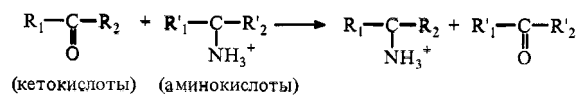
Пероксидазы

окисление пероксидом водорода

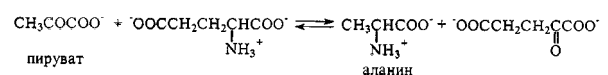
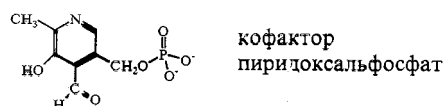


Аминотрансферазы

или Трансаминазы

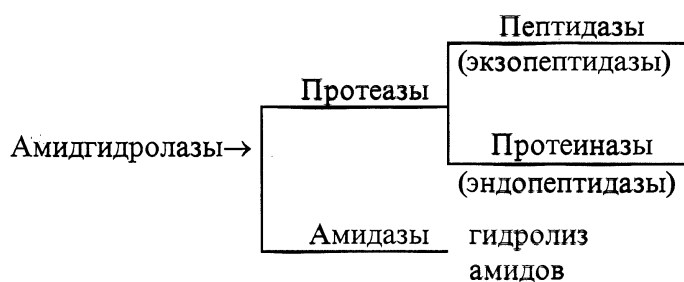


перенос аминогруппы



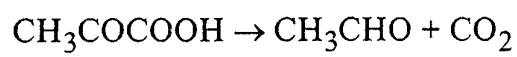
аланинаминотрансфераза

По структуре активного центра гидролазы разделяют на сериновые, цистеиновые, аспартатные, металлсодержащие. Названия даются по субстрату: целлюлаза – гидролиз целлюлозы, ДНКазы – гидролиз ДНК, амилазы – гидролиз крахмала.



4) **Лиазы** – катализируют негидролитическое расщепление с образованием кратной связи.

Пируватдекарбоксилаза

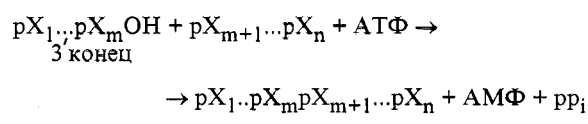


5) **Изомеразы** – катализируют реакции изомеризации.

б) **Лигазы** (синтетазы) – катализируют реакции конденсации, сопряжённые с гидролизом АТФ или ГТФ.

Реакции конденсации или присоединения, сопряженные с гидролизом АТФ или ГТФ.

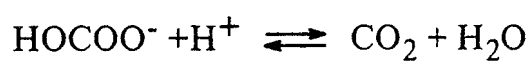
РНК лигаза



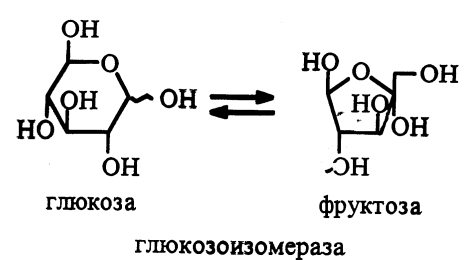
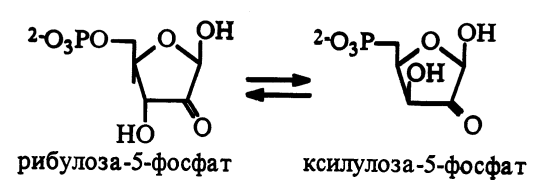
МЕХАНИЗМ

- $E - \text{CH}_2\text{OH} + \text{pppA} \rightleftharpoons E\text{CH}_2\text{OPA} + \text{ppi}$
- $E - \text{CH}_2\text{OPA} + pX_{m+1} \dots pX_n \rightarrow E\text{CH}_2\text{OH} + \text{App}X_{m+1} \dots pX_n$
смешанный ангидрид донора и АМФ
- $\text{App}X_{m+1} \dots pX_n + pX_1 \dots pX_m - \text{OH} \rightarrow pX_1 \dots pX_{m+1} \dots pX_n + p\text{-A}$

Карбангидраза



- рацемазы
- эпимеразы



7. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Методы обработки экспериментальных данных.

В стационарной кинетике ферментативных реакций существуют две простейшие схемы – *схема Михаэлиса* и *схема Анри*, которые затем могут быть модифицированы для более сложных случаев (см. 9).

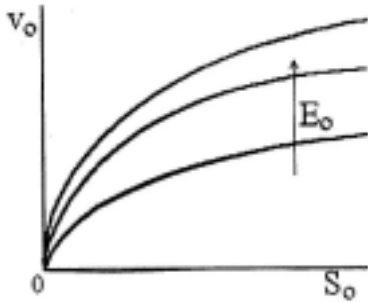
Схема Михаэлиса: предполагает, что реакция идёт по через обратимую стадию образования промежуточного продукта; $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} X \xrightarrow{k_2} E + P$. Система описывается

уравнениями $\frac{dX}{dt} = k_1ES_0 - (k_{-1} + k_2)X$, $v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2X$, $E_0 = E + X$ – первые два уравнения являются обычными кинетическими уравнениями для реакций первого и второго порядков, а

третье выражает условие материального баланса по ферменту. Записывая условие

стационарности $\frac{dX}{dt} = 0$, находим $k_1ES_0 = (k_{-1} + k_2)X \Rightarrow E = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1S_0} X$,

$$E_0 = \left(1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0}\right) X, \quad v_0 = \frac{k_2 E_0}{1 + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0}}. \quad \text{Обозначая } K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ – константа Михаэлиса,}$$



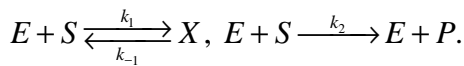
приходим к уравнению Михаэлиса-Ментен $v_0 = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0}$. При

$k_2 \ll k_{-1}$ $K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$ – константа диссоциации промежуточного

продукта (обычно фермент-субстратного комплекса). Для экспериментального определения параметров схемы Михаэлиса используют способ, представленный на рисунке; $v_m = k_2 E_0$ – скорость реакции при $S_0 \rightarrow \infty$.

Схема Анри предполагает, что образование продукта

реакции конкурирует с образованием некоего соединения фермента с субстратом. Это означает, что



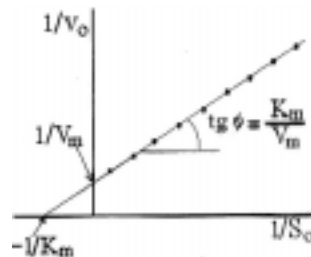
Система описывается уравнениями

$$\frac{dX}{dt} = k_1 E S_0 - k_{-1} X, \quad v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2 E S_0,$$

$E_0 = E + X$. Условие стационарности

$$\frac{dX}{dt} = 0 \Rightarrow X = \frac{k_1}{k_{-1}} S_0 E, \quad E = \frac{E_0}{1 + \frac{k_1}{k_{-1}} S_0}, \quad v_0 = k_2 S_0 E = \frac{k_2 E_0 S_0}{S_0 \frac{k_1}{k_{-1}} + 1} = \frac{k_2 K_A E_0 S_0}{K_A + S_0} \text{ – уравнение Анри, где}$$

K_A – константа равновесия образования X : $K_A = \frac{k_{-1}}{k_1}$.



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + S_0}{v_m \cdot S_0} = \frac{K_m}{v_m} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{v_m}$$

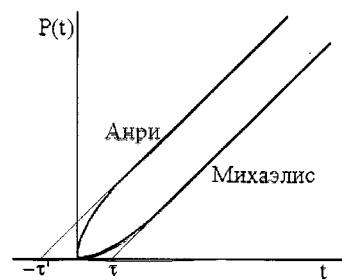
8. Дискриминация механизмов Михаэлиса и Анри.

В стационарном режиме зависимости v_0 от S_0 для схем Михаэлиса и Анри одинаковы (см. график в 7). Дискриминация возможна только для предстационарной кинетики; в схеме Михаэлиса временные зависимости концентраций задаются уравнениями

$$X(t) = \frac{E_0 S_0}{K_m + S_0} \left(1 - e^{-(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)t}\right), \quad P(t) = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0} t + \frac{k_2 E_0 S_0}{(K_m + S_0)(k_1 S_0 + k_{-1} + k_2)} \left(e^{-(k_1(S_0 + K_m))t} - 1\right). \text{ Для}$$

$$\text{схемы Анри } X(t) = \frac{E_0 S_0}{K_A + S_0} \left(1 - e^{-k_1(S_0 + K_A)t}\right), \quad P(t) = \frac{k_2 K_A E_0 S_0}{K_A + S_0} t - \frac{k_2 E_0 S_0^2}{(K_A + S_0)k_1} \left(e^{-k_1(S_0 + K_A)t} - 1\right).$$

Теперь схемы легко дискриминируются по зависимостям $P(t)$.



$$\tau = \frac{1}{k_1(S_0 + K_m)}$$

$$\tau' = \frac{S_0}{k_1 K_A (K_A + S_0)}$$

9. Трёхстадийная схема ферментативного катализа. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата для реакции с участием N промежуточных соединений.

Трёхстадийная схема характерна для сериновых протеаз. Константы уравнения

Михаэлиса могут быть вычислены как $k_{kat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$, $K_m = \frac{K_s k_3}{k_2 + k_3}$; при $k_2 \gg k_3$ $k_{kat} \approx k_3$ лимитирующей стадией является деацилирование; при $k_3 \gg k_2$ $k_{kat} = k_2$ – ацилирование (ЕА – ацилированный фермент).

Механизм с участием N промежуточных соединений:
 $E + S \xrightleftharpoons{K_s} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} \dots X_i \xrightarrow{k_{i+1}} \dots X_n \xrightarrow{k_{n+1}} E + P$; схема описывается уравнениями
 $v_0 = \frac{dP}{dt} = k_{n+1} X_n = k_2 X_1$, $\frac{dX_i}{dt} = k_i X_{i-1} - k_{i+1} X_i = 0 \Rightarrow k_i X_{i-1} = k_{i+1} X_i$. Учитывая уравнение материального баланса $E_0 = E + \sum_i X_i$, найдём $v_0 = \frac{k_{kat} E_0 S_0}{K_m + S_0}$, $k_{kat} = \frac{1}{\sum_{j=2}^{n+1} \frac{1}{k_j}}$, $K_m = \frac{K_s}{k_2} \frac{1}{\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}}$.

Если j -ая стадия является лимитирующей, то $k_{kat} = k_j$, $K_m = \frac{K_s k_j}{k_2}$.

10. Температурные зависимости скоростей ферментативных реакций. Термоинактивация ферментов. Особенности ферментов, выделенных из термофильных микроорганизмов.

Температурные зависимости скоростей ферментативных реакций подчиняются обычным закономерностям химической кинетики – уравнению Аррениуса $k(T) = \frac{kT}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$ и правилу Вант-Гоффа (при повышении температуры на 10^0 скорость химической реакции увеличивается в среднем в 2-5 раз).

Термоинактивация ферментов – потеря каталитической активности при повышении температуры; термоинактивация вызвана постепенной денатурацией белка и в простейшем случае подчиняется зависимости $A(t) = A_0 e^{-k_{in}(T)t}$, где k_{in} подчиняется уравнению Аррениуса. Таким образом, зависимость активности фермента от температуры «колоколообразна»: при низких температурах энергия отдельных частиц слишком мала для того, чтобы преодолеть энергетический барьер, – низкая активность; при высоких температурах фермент инактивируется – также низкая активность. Для уменьшения скорости инактивации фермент нужно стабилизировать созданием дополнительных связей (водородных, дисульфидных, образованием солевых мостиков).

Особенности ферментов, выделенных из термофильных организмов:

- 1) Высокая стабильность.
- 2) Высокая энергия активации.
- 3) Низкая активность при комнатной температуре.

Одним из таких ферментов является гидрогеназа – белок, активирующий молекулу водорода. Он очень устойчив даже в кипящей воде и может быть использован в топливных элементах, системах биофотолитиза воды, конверсии топлив, биокаталитического восстановления CO_2 .

11. Ингибирование ферментов.

Необратимое ингибирование – образование прочной (не разрушаемой в условиях проведения катализа) химической связи ингибитора с функционально важными группами активного центра фермента. Необратимое ингибирование описывается схемой $E + I \xrightarrow{k} EI$. Считая $I_0 \gg E_0$, запишем кинетическое уравнение для реакции второго порядка. Пример необратимого ингибирования – аспирин и простагландин-Н-синтетаза.

Обратимое ингибирование (образование комплексов фермент-ингибитор) может быть конкурентным и неконкурентным.

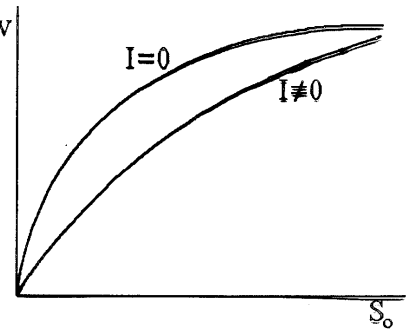
В процессе конкурентного ингибирования протекают реакции $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$, $E + S \xrightleftharpoons{K_m} ES \xrightarrow{k_{кат}} E + P$; $E_0 \ll S_0, E_0 \ll I_0$. Величины EI и ES можно записать через константы равновесия соответствующих реакций $EI = \frac{E \cdot I_0}{K_i}$, $ES = \frac{E \cdot S_0}{K_m}$; тогда условие

материального баланса по ферменту примет вид $E_0 E + ES + EI = E \left(1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} \right)$. Скорость

определяющей является стадия образования P , поэтому наблюдаемая скорость реакции определяется уравнением v

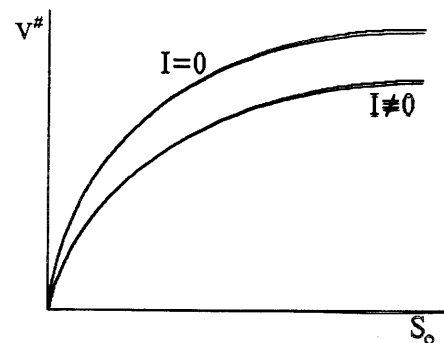
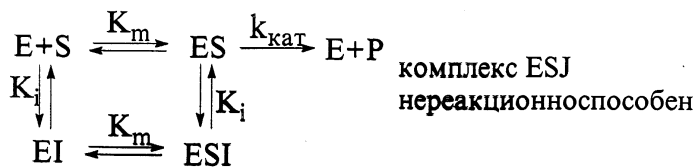
$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_{кат} ES = \frac{k_{кат} E \cdot S_0}{K_m} = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_m \left(1 + \frac{I_0}{K_i} \right) S_0}$$

Таким образом, ингибитор не влияет на предельное уравнение ($S_0 \rightarrow \infty$) схемы Михаэлиса-Ментен (см. 8) $v_m = k_{кат} E_0$, уменьшает наблюдаемую скорость реакции, но увеличивает наблюдаемое значение K_m . Зависимость v от S_0 представлена на рисунке.



Неконкурентное ингибирование протекает по представленной схеме. Используя величины EI , ES , полученные для случая конкурентного ингибирования, найдём

$$ESI = \frac{E \cdot I_0 \cdot S_0}{K_m K_i}. E_0 = E + ES + EI + ESI = E \left(1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} + \frac{I_0 S_0}{K_m K_i} \right)$$



$$v_0 = \frac{k_{кат} S_0}{K_m} \frac{E_0}{1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} + \frac{I_0 S_0}{K_m K_i}} = \frac{S_0 \frac{k_{кат} E_0}{K_m + S_0}}{1 + \frac{I_0}{K_i}}$$

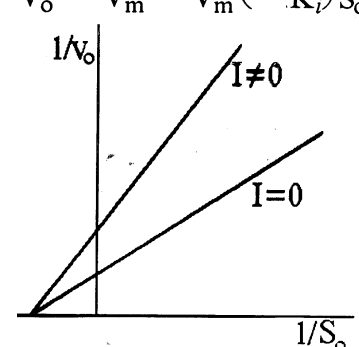
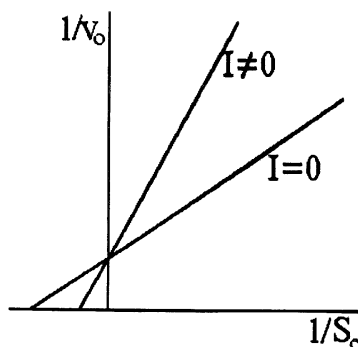
Ингибитор влияет на скорость реакции, но не

изменяет наблюдаемое значение K_m . Зависимость $v(S_0)$ представлена на рисунке.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I_0}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{S_0}$$

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1 + \frac{I_0}{K_i}}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{I_0}{K_i} \right) \frac{1}{S_0}$$

Дискриминация конкурентного и неконкурентного ингибирования осуществляется по зависимостям $1/v_0$ от $1/S_0$ как показано на рисунке (справа – конкурентное ингибирование; слева –



неконкурентное).

12. Влияние pH на скорость ферментативных реакций.

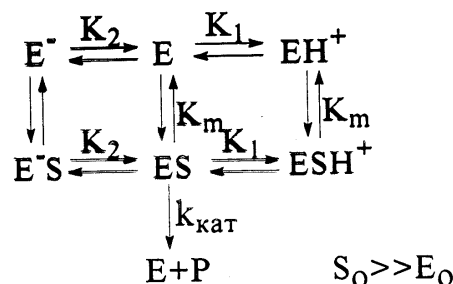
Ферментативные процессы, протекающие с участием протона, представлены на схеме.

Записывая константы равновесий, $K_1 = \frac{E \cdot H^+}{EH^+}$, $K_2 = \frac{E^- \cdot H^+}{E}$, выразим через E и ES концентрации, необходимые для записи уравнения материального баланса по ферменту:

$$E = E + EH^+ + E^- + ES + EH^+S + ES^- = E \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right) + ES \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right) =$$

$$= E \left(1 + \frac{S_0}{K_m} \right) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right) \Rightarrow E = \frac{E_0}{\left(1 + \frac{S_0}{K_m} \right) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right)}$$

$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_{kat} ES = \frac{k_{kat} E \cdot S_0}{K_m} = \frac{k_{kat} E_0 S_0}{(K_m + S_0) \left(1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right)}$$

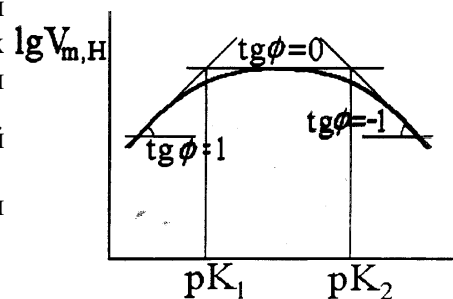


Зависимость $\lg v(\text{pH})$ представлена на рисунке. Обозначая $v_m = k_{kat} E_0 S_0$, найдём зависимости $\lg v(\text{pH})$ для некоторых областей графика. В кислой области

$H^+ \gg K_1, K_2 \Rightarrow v = \frac{v_m K_1}{H^+}$, $\lg v = \text{const} + \text{pH}$. В нейтральной

области $H^+ \ll K_1, H^+ \gg K_2 \Rightarrow v \approx v_m$. В щелочной области

$H^+ \ll K_1, K_2 \Rightarrow v = \frac{v_m H^+}{K_2}$, $\lg v = \text{const} - \text{pH}$.



13. Активные центры ферментов. Каталитические и сорбционные подцентры. Основные структурные элементы. Специфичность и эффективность ферментативного катализа.

См. 17.

Каталитический цикл – последовательность большого числа отдельных элементарных стадий, которые являются быстрыми, нелимитирующими (за счёт реализующихся гидрофобных, электростатических взаимодействий, водородных связей), а потому приближены к переходному состоянию с минимальной энергией.

Предложено несколько объяснений высокой специфичности ферментов:

1) Концепция «ключ-замок» – характерное строение активного центра фермента, допускающее только соответствующий ему по строению субстрат.

2) Концепция «дыбы» – фермент активирует субстрат, растягивая и дестабилизируя связи.

3) Концепция индуцированного соответствия – только «отдельные» субстраты способны вызвать необходимые конформационные изменения в белке.

Кроме «обычной» специфичности по субстрату ферменты зачастую обладают стереоспецифичностью – действуют только на один из энантиомеров; причина такого эффекта состоит в ориентации гидрофобного фрагмента, который отвечает за связывание субстрата путём гидрофобного взаимодействия.

Цепи переноса заряда – к чему это??:

1) В свободном активном центре нуклеофил обладает низкой реакционной способностью, существенно ниже чем OH^- или алкоксильный ион.

2) В комплексе с высокоспецифичным субстратом фермента нуклеофил близок к

алкоксильному иону.

3) На стадии деацилирования в ацилферменте реакционная способность воды близка к реакционной способности гидроксильного иона.

14. Методы биоинформатики. Выравнивание последовательности аминокислот, энтропия Шеннона как критерий консервативности аминокислот в семействах ферментов.

Биоинформатика – наука о компьютерном анализе генетических текстов, аминокислотных последовательностей, пространственной структуры и функции белков.

Для сравнения аминокислотных последовательностей используют так называемое *выравнивание* – сравнение положений совпадающих участков. Выравнивание используют для моделирования пространственной структуры по гомологии, а также поиска сходных объектов по базам данных.

Виды выравнивания:

- 1) По количеству вовлечённых последовательностей – парное и множественное;
- 2) По характеру сходства – локальное и общее;
- 3) По структуре остатков – с пропусками (в некоторых цепях возможны разрывы между совпадающими участками) и непрерывное.

Статистическая вероятность попадания i -ой аминокислоты в j -ое

положение $p_i^j = \frac{n_i^j}{\sum_i n_i^j}$; эта величина

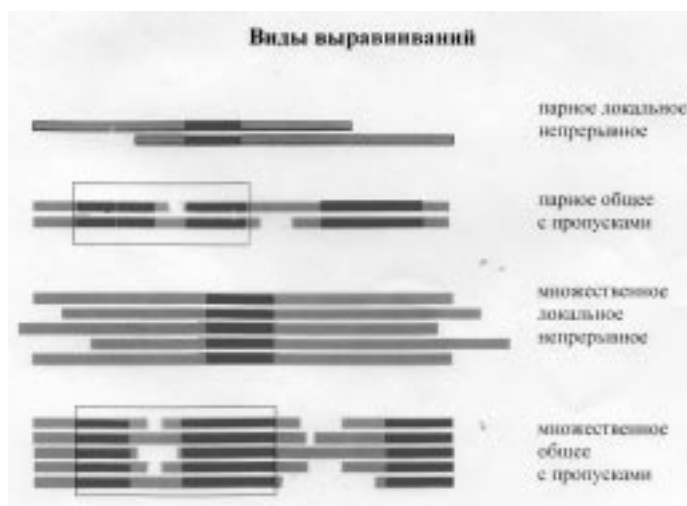
позволяет определить *энтропию Шеннона* для положения j
 $H_j = -\sum_i p_i^j \log_2 p_i^j$. Если $H_j = 0$, то для

всех i либо $p_i^j = 0$, либо $p_i^j = 1$, то есть в данной позиции однозначно находится только одна аминокислота, которая является абсолютно консервативной.

Если значение энтропии Шеннона отлично от 0, то его можно рассматривать как меру консервативности – меру упорядоченности аминокислотной последовательности.

Основные принципы:

- 1) Каталитически важные группы выявляются как консервативные аминокислоты при множественном выравнивании последовательностей аминокислот в семействах ферментов.
- 2) Наиболее важной аминокислотой при формировании активны центров является глицин.
- 3) Аспарагиновая кислота, гистидин, аргинин, наиболее часто встречаются в активных центрах ферментов и «работают» как нуклеофильно-электрофильные агенты.
- 4) Цистеин и пролин – структурообразующие аминокислоты, необходимые при формировании архитектуры активных центров.



15. Константы скорости в элементарных стадиях ферментативного катализа. Механизмы лимитирования.

Для определения характерных значений k_{cat} и K_m было исследовано распределение значений этих величин на выборке из 500 ферментов. Результаты анализа представлены на рисунках.

Лимитирующие стадии:

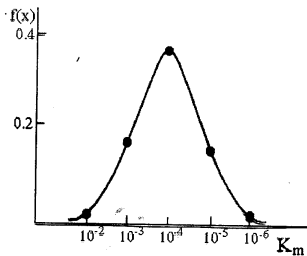
1) Диффузия (зависимость константы скорости от диффузии определяется уравнением

$$k = 2\pi(R_1 + R_2)(D_1 + D_2) \frac{N}{1000}, \quad D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

– коэффициент диффузии.

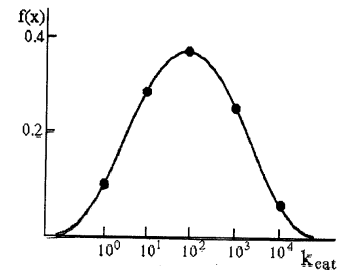
2) Изменение конформации.

3) Перенос протона (наблюдается сильный кинетический изотопный эффект).



Типичное значение

$$K_m = 10^{-4} \text{ M}$$



Типичное значение

$$k_{cat} = 10^2 \text{ c}^{-1}$$

16. Общий кислотно-основной катализ в механизме действия ферментов.

Общим кислотным катализом называются процессы ускорения реакций под действием кислот (электрофильных агентов), а общим основным катализом – процессы ускорения под действием оснований (нуклеофильных агентов). Специфическим кислотным (основным) катализом называются процессы ускорения реакций под действием H^+ (OH^-).

Общая зависимость константы скорости от концентрации кислот и оснований даётся уравнением $k_{набл} = k_{раст} + k_{H^+}[H^+] + k_{OH^-}[OH^-] + k_{BH^+}[BH^+] + k_B[B]$, $k_{раст}$ характеризует скорость процесса с участием раствора. Зависимость констант от силы кислоты (основания) даётся уравнением Бренстеда $\lg k_{B^-} = \lg k_{OB} + \beta pK_a$, $\lg k_{HA} = \lg k_{OA} + \alpha pK_a$, где α и β – коэффициенты Бренстеда, характеризующие степень переноса протона в переходном состоянии реакции.

Примеры приведены на рисунках.

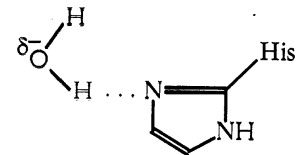
Применение:

1) Увеличение реакционной способности атакующего центра.

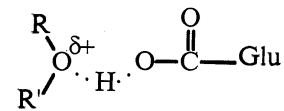
2) Увеличение реакционной способности атакующих групп (цепи переноса заряда) – см. 13.

3) Использование быстрых реакций для оптимизации структуры переходного состояния.

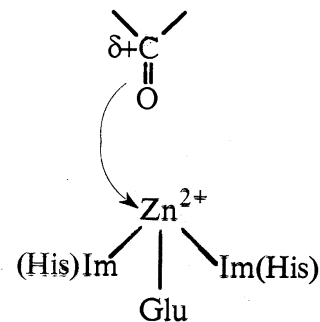
Общий основной катализ



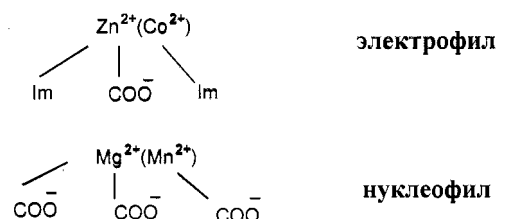
Общий кислотный катализ



Электрофильный катализ



17. Активные центры ферментов и механизмы катализируемых реакций. 4 группы гидролаз. Молекулярные механизмы действия α -химотрипсина, пепсина, папаина, карбоксипептидазы, органофосфатгидролазы, пирофосфатазы, экзонуклеазы.



Активный центр фермента – группа атомов, осуществляющих сорбцию, химическую активацию и трансформацию реагирующего вещества. Обычно эти процессы происходят в разных частях активного центра, что позволяет выделить в нём *сорбционный* и *каталитический подцентры*. Механизм химической активации в активном центре фермента связан, вероятно, с тем, что в силу особенностей строения белка отдельные участки фермента по-разному взаимодействуют с разными атомами реагирующей молекулы, растягивая её связи и создавая напряжения – химическая активность повышается. Взаимодействие фермента с реагирующей молекулой обычно является гидрофобным, электростатическим или образовано водородными связями и очень сильно зависит от строения фермента, что обуславливает высокую специфичность. Для переходного состояния предлагается двухцентровая модель (ход реакции описывается нижней кривой на рисунке).

Выделяют **4 группы гидролаз**:

- 1) Активация воды карбоксильными группами (пепсин, лизоцим).
- 2) Активация воды имидазольными группами гистидина (папаин, рибонуклеаза).
- 3) Zn, Co, Ni-зависимые гидролазы (карбоксипептидаза А, органофосфатгидролаза, Ni-зависимая уреаза, щелочная фосфатаза).
- 4) Mg, Mn-зависимые гидролазы (пирофосфатаза, экзонуклеаза, ДНК-полимеразы).

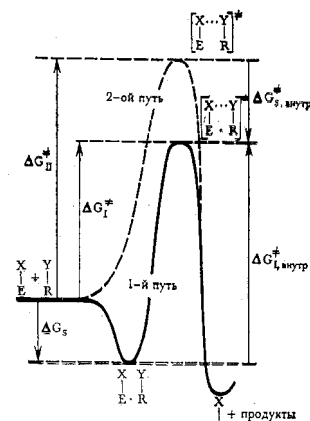
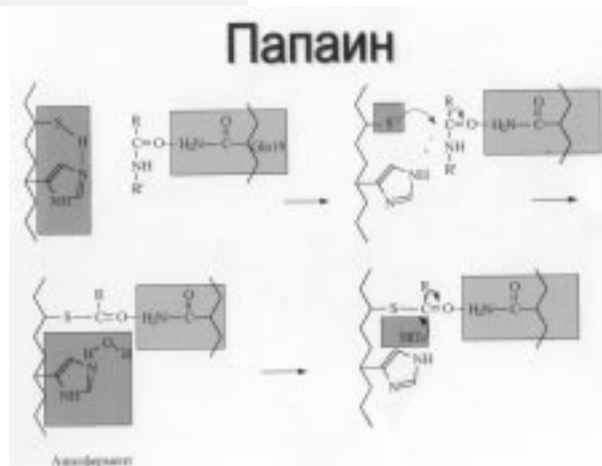
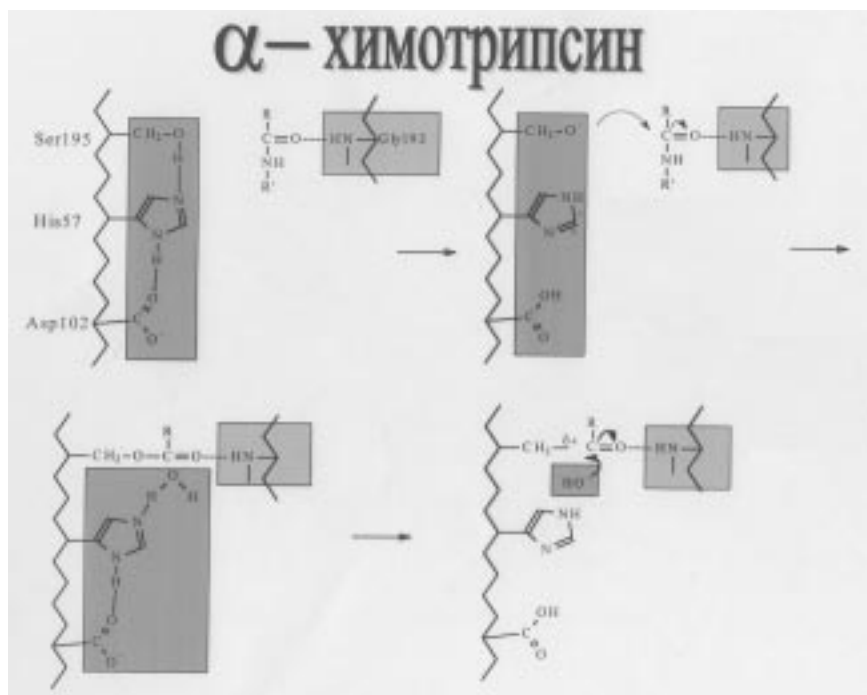
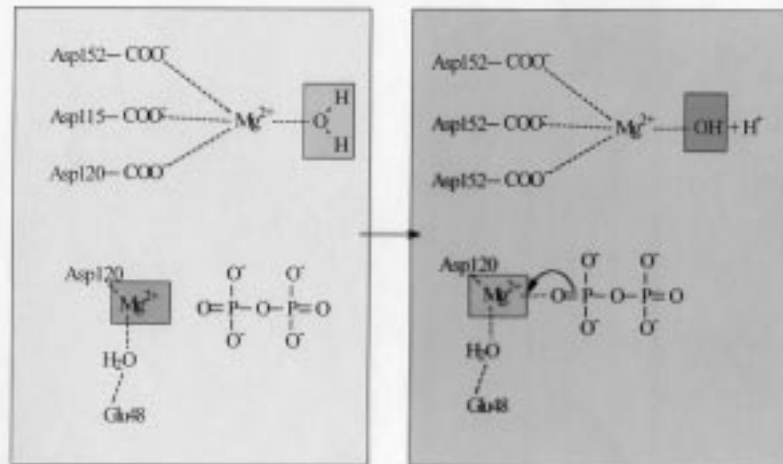


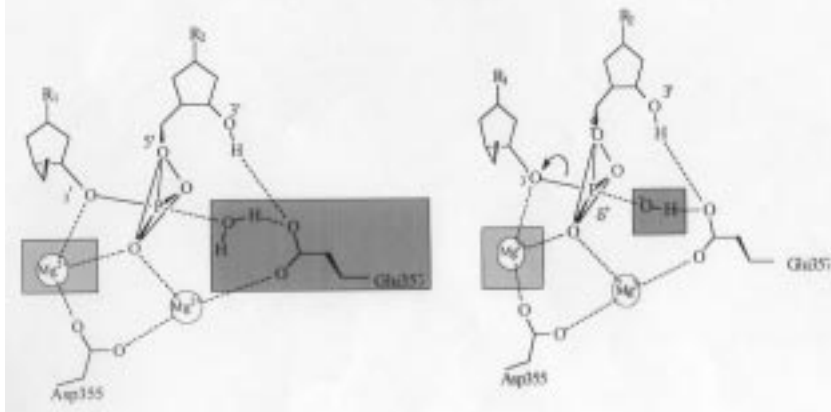
Диаграмма изменений стандартной свободной энергии по координате реакции:
 1-й путь – для процесса (2.1); 2-й путь – для (2.2); направление стрелок определяет знак величины свободной энергии (вверх – положительный, вниз – отрицательный)



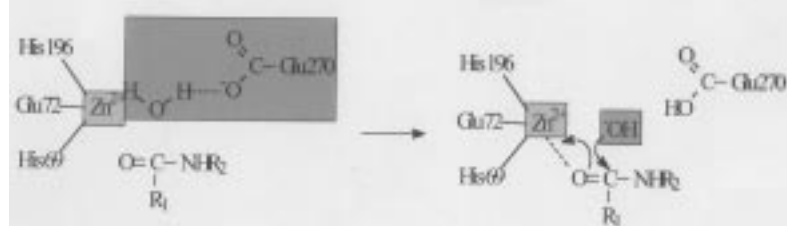
Пирофосфатаза



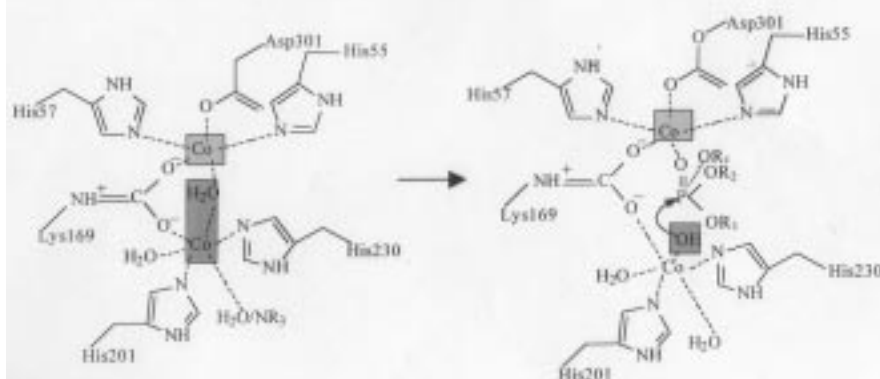
Эксонуклеаза



Карбоксипептидаза



Органофосфатгидролаза



18. Основные мишени действия лекарственных препаратов.

Основные мишени:

- 1) Бактерии (антибактериальные химиотерапевтические средства называются антибиотиками) – пенициллины.
 - 2) Ферменты (лекарства являются ингибиторами определённых ферментов) – см. 19.
 - 3) Рецептор, ионные каналы – ингибиторы ацетилхолинэстеразы.
- Примеры – см. 19, 20.

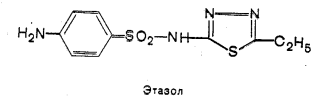
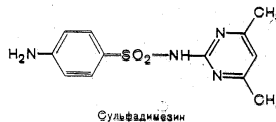
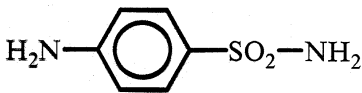
19. Лекарственные препараты, регулирующие активность ферментов. Лекарственные препараты на основе ферментов.

Причины заболеваний: нарушение синтеза клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, циклосерин); нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны (полимиксины), нарушение синтеза РНК (рифампицин), нарушение синтеза белка на уровне рибосом (тетрациклины, левомицетин, макролиды, аминогликозиды).

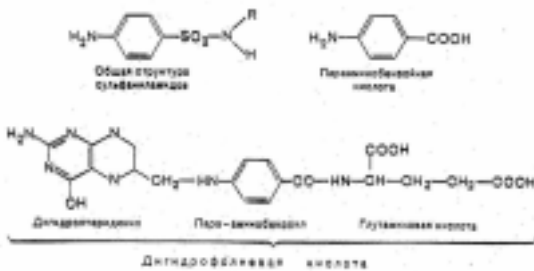
Лекарственные препараты на основе ферментов:

1) Сульфамидные препараты

производные сульфаниловой кислоты



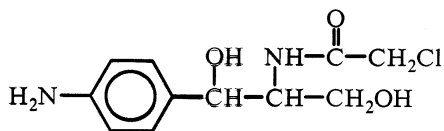
Нарушают синтез дигидрофолиевой кислоты



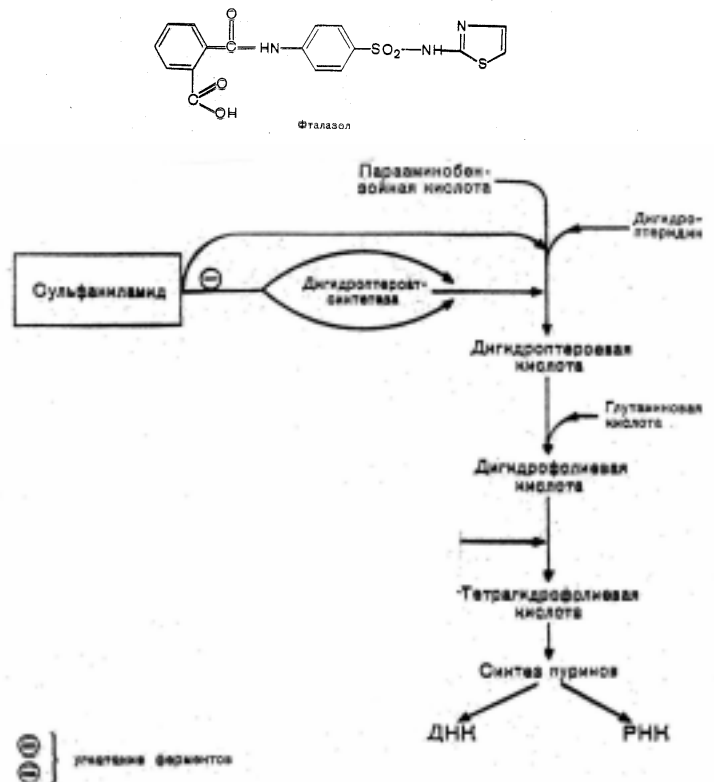
2) Левомицетин

Левомицетин

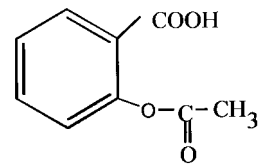
(хлора. мфеникол, хлорид, хлорнитрин)



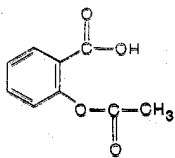
Блокирует рибосомальный синтез белка, ингибирует фермент пептидилтрансферазу



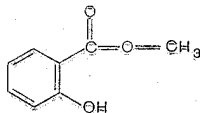
3) Ингибиторы простагландин-Н-синтетазы (простагландин-Н-синтетаза – PGH – катализирует синтез эйкозаноидов, стимулирующих сокращение гладкомышечной ткани, биосинтез стероидных гормонов, секрецию желудочного сока, агрегацию тромбоцитов, болевые реакции и воспалительные процессы)



Производные салициловой кислоты

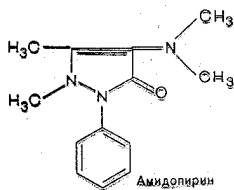


Кислота ацетилсалициловая

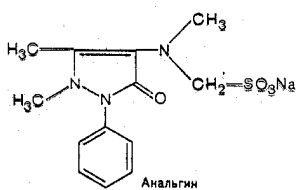


Метилсалицилат.

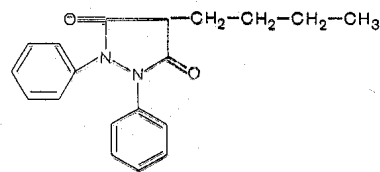
Производные пиразолона



Амидопирин

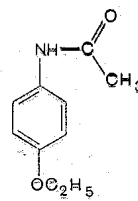


Анальгин

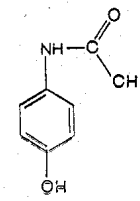


Бутадмон

Производные анилина

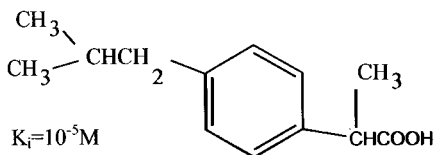


Фенацетин



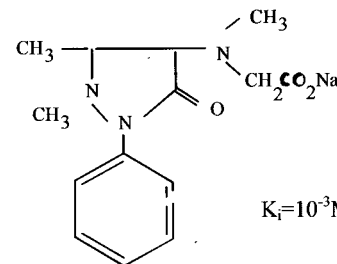
Парацетамол

Аспирин – медленный необратимый ингибитор

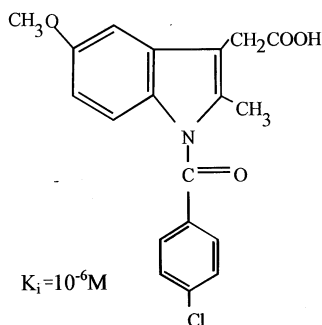


$K_i=10^{-5}M$

Бруфен и аналгин – быстрые обратимые ингибиторы

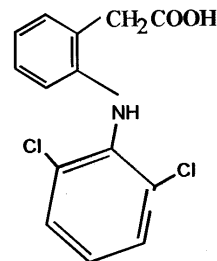


$K_i=10^{-3}M$



$K_i=10^{-6}M$

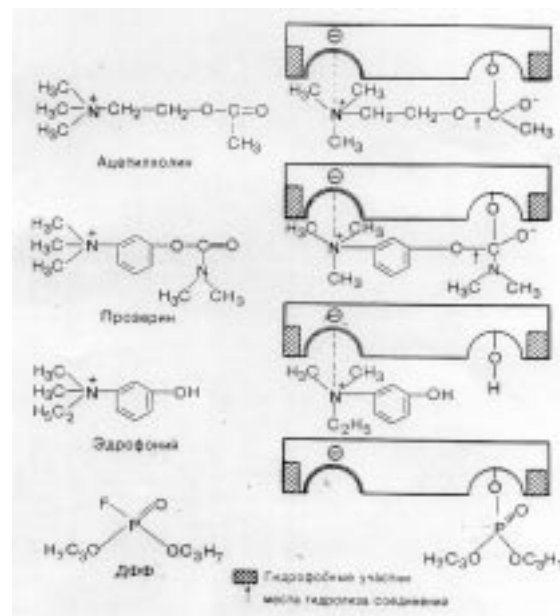
Индометацин и вольтарен – медленные обратимые ингибиторы

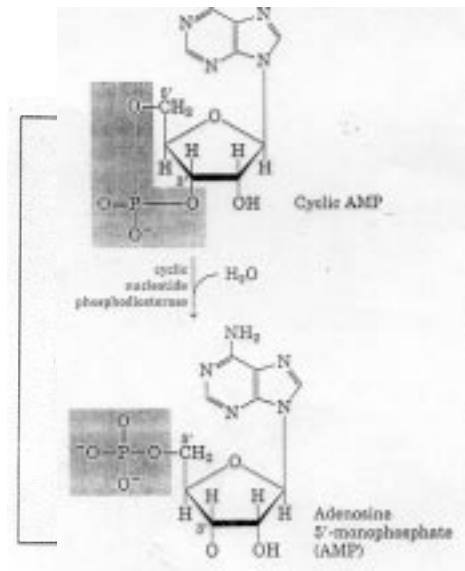
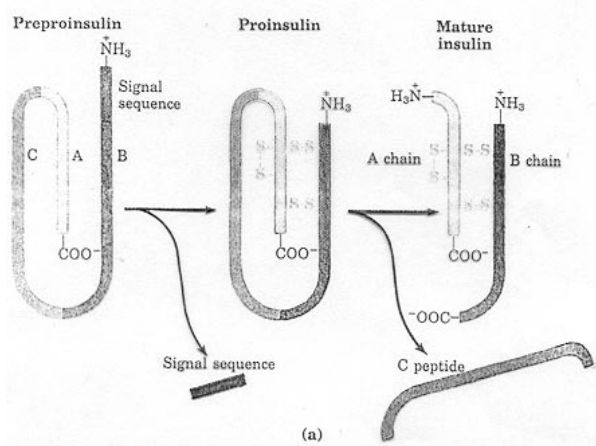


$K_i=2 \cdot 10^{-6}M$

4) Ингибиторы ацетилхолинэстеразы – фермента, участвующего в передаче нервных импульсов (см. 21).

Лекарственные препараты на основе ферментов – например, инсулин, регулятор уровня глюкозы в крови.

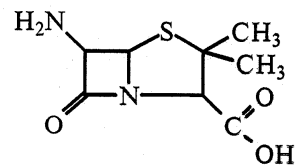




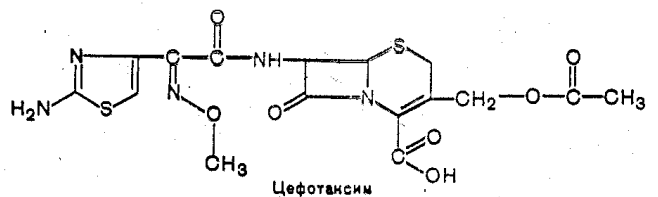
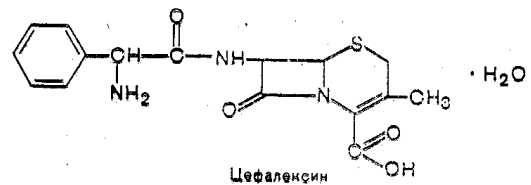
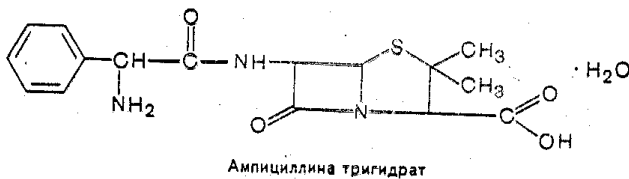
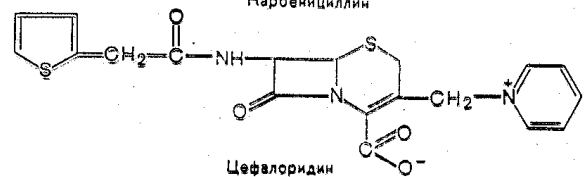
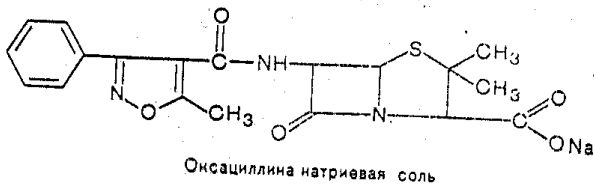
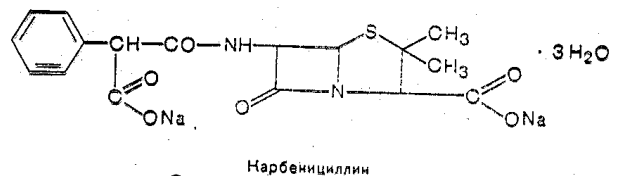
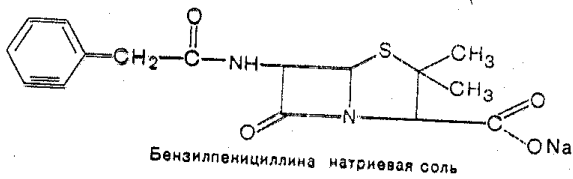
20. Нестероидные противовоспалительные препараты.

Антибиотики:

1) Пенициллины



6-аминопенициллановая кислота



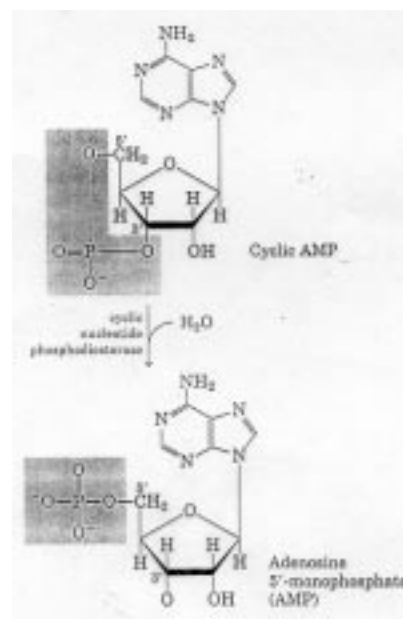
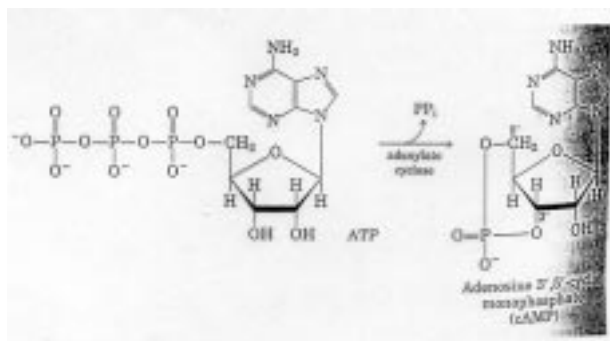
2) Левомецитин – см. 19.

21. Рецепторы и системы передачи сигнала.

Нервные импульсы в организме передаются особыми нервными клетками, называемыми нейронами. Особенностью нейронов является наличие отростков – дендритов (получение сигнала) и аксонов (передача сигнала). Между отростками нейронов имеются щели, называемые *синаптическими* (процесс передачи сигнала от одного нейрона к другому – синапс). В спокойном состоянии *предсинаптическая мембрана* (мембрана передающего аксона) поляризована за счёт действия Na–K насоса (см. ХПС, 9). При поступлении сигнала мембрана деполяризуется, что приводит к открытию Ca^{2+} -каналов, располагающихся на

окончании аксона ионы кальция поступают внутрь аксона, инициируя процесс экзоцитоза – выброса *нейротрансмиттеров* в синаптическую щель. В качестве нейротрансмиттеров могут выступать ацетилхолин, аминокислоты и некоторые производные аденина; нейротрансмиттеры проходят через синаптическую щель и попадают в соответствующие рецепторы. Для ацетилхолина известно два типа рецепторов – мускариновый и никотиновый; оба при получении сигнала открывают на короткое время ионные каналы для натрия и калия, создавая на постсинаптической мембране разность потенциалов, передаваемую далее. Избыток ацетилхолина расщепляется до холина и уксусной кислоты ферментом ацетилхолин-эстеразой; некорректная работа этого фермента является причиной многих заболеваний и может быть излечена его ингибированием (см. 19).

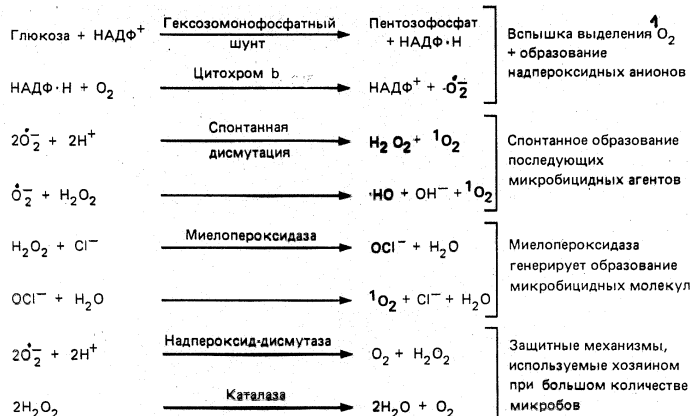
Другим путём передачи сигналов являются гормоны – сигнальные вещества, образующиеся в клетках эндокринных желёз и переносимые кровью. Рецепторами гормонов являются трансмембранные белки, активирующие замещение GDP на GTP в особом Gs белке (находится внутри клетки) при попадании гормона на рецептор. Активированный Gs белок активирует аденилатциклазу, катализирующую образование 3'-5'-циклоАМФ. Последняя активирует протеинкиназу А, фосфорилирующую Ser/Thr или Tyr (см. ХПС, 26). По-видимому, здесь просто изложен подробнее механизм, приведённый в ХПС, 26.



22. Специфический и неспецифический иммунитет. Антитела.

Иммунный ответ организма может быть как *неспецифичным* (одни и те же частицы одинаковым образом атакуют все чужеродные объекты), так и *специфичным* (производится атака только на один конкретный вирус). Частицами, отвечающими за разрушение чужеродных объектов, являются *фагоциты*, а сам процесс уничтожения называется *фагоцитозом*.

Неспецифический иммунитет обеспечивается самими фагоцитами – макрофагами



(первичное разрушение вируса в клетке) и нейтрофилами. Фагоцитоз состоит из восьми стадий, которые представлены на рисунке – хематаксис, адгезия, активация мембраны, начало фагоцитоза, образование фagosомы, слияние, уничтожение и переваривание, выброс продуктов деградации. Известны как кислородзависимые, так и кислороднезависимые механизмы фагоцитоза. Первые представлены на схеме; вторые связаны с действием катионных белков, лизоцимов, лактоферринов, протеолитических и других гидролитических ферментов, а также повреждением мембран микроорганизмов, расщеплением мукопептидами клеточной стенки бактерий, лишением пролиферирующих бактерий железа и простым перевариванием убитых микроорганизмов.

Специфический иммунитет связан с действием *антител* (иммуноглобулинов) – сложных образований, имеющих форму буквы Y. Строение антитела представлено на рисунке; оно содержит как константные, так и переменные области, причём именно переменные области ответственны за узнавание антигена, то есть специфической нуклеотидной последовательности вируса. Отметим, что большие цепи антитела являются тяжёлыми, а малые внешние цепи – лёгкими. Расщепление антитела по точке изгиба антитела происходит под действием папаина, по середине тяжёлых цепей – пепсина; наконец, восстановление S-S связей приводит к полному разрушению антитела.

На первом этапе специфического иммунного ответа особые клетки *B-лимфоциты* узнают антиген и активируют плазматические клетки, начинающие синтез антител, специфичных по отношению к этому антигену. Антитела легко связываются как с антигеном, так и с поверхностью фагоцита, притягивая вирус к фагоциту и инициируя фагоцитоз.

23. Основы культивирования клеток. Фазы развития клеточных популяций. Зависимость скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата.

Фазы развития клеточных популяций:

- 1) Индукционный период (лаг-фаза).
- 2) Экспоненциальный рост.
- 3) Линейный рост.
- 4) Замедление роста.
- 5) Стационарная фаза.
- 6) Фаза отмирания культуры (лизис).

Развитие популяции описывается уравнением

$\frac{dN}{dt} = \mu(S, t)N(t)$, где N – число клеток в популяции, μ – скорость роста, а S – концентрация субстрата.

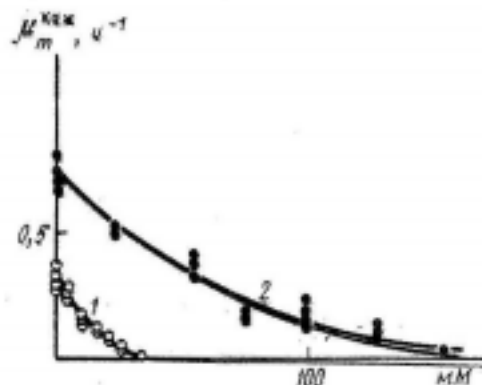
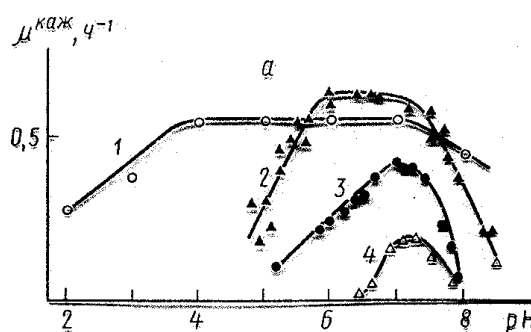
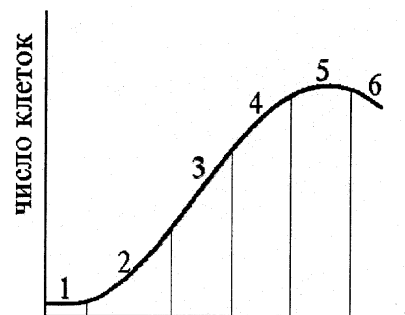
На первой, экспоненциальной фазе развития можно считать $\mu = \text{const}$, поэтому

$\frac{dN}{N} = \mu dt \Rightarrow N = N_0 e^{\mu t}$, $\ln N = \ln N_0 + \mu t$. Скорость

роста определяется как тангенс угла наклона графика $\ln N(t)$ – например, измерением значений N в два фиксированных момента времени. Зависимость скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата S_0 даётся уравнением

Моно
$$\mu(S) = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}, \quad \frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m S_0}$$
 –

зависимость линеаризуется в координатах $1/\mu$ –



$1/S_0$. Величина скорости также определяется μ и

$$\mu_m^{\text{как}} = \frac{\mu_m}{1 + \frac{I}{K_i}}$$

Ограничения роста:

- 1) «Контактное торможение».
- 2) Расход лимитирующего субстрата.
- 3) Ингибирование продуктом.
- 4) Появление субпопуляции, потерявшей способность

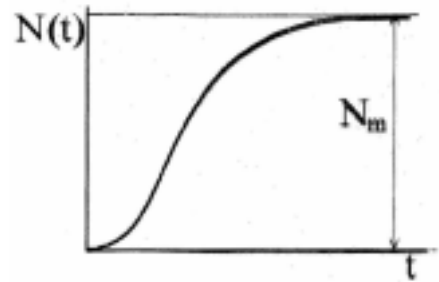
к делению.

«Контактное торможение» в простейшем случае описывается зависимостью

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \mu \frac{N^2}{N_m} \Rightarrow \frac{dN}{N \left(1 - \frac{N}{N_m}\right)} = \mu dt \Rightarrow \frac{N}{N_0} = \frac{be^{\mu t}}{1 + a e^{\mu t}}, \quad a = \frac{1}{\frac{N_m}{N_0} - 1}, \quad b = \frac{\frac{N_m}{N_0}}{\frac{N_m}{N_0} - 1}$$

При $t \rightarrow \infty$

$$\frac{N_0}{N_m} e^{\mu t} \gg 1, \quad N(t) = N_m = \text{const} - \text{остановка роста.}$$



Контактное торможение

24. Клеточный рост в открытых системах.

Наиболее проста и удобна для рассмотрения система хемостата – ферментера с перемешиванием, в котором концентрации всех компонентов поддерживаются стационарными. Рост популяции в хемостате описывается уравнением

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - \frac{U}{V} N = \mu N - DN, \quad \text{где } D = U/V - \text{ скорость разбавления, являющаяся константой и}$$

характеристикой конкретного хемостата. Кроме этого,

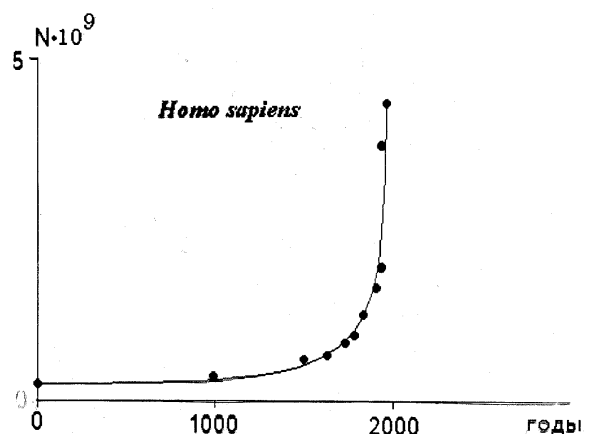
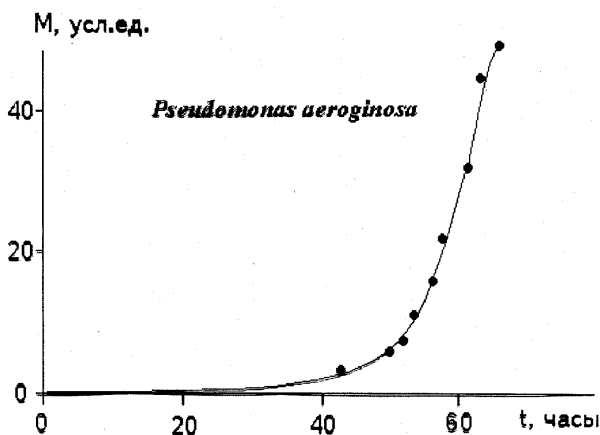
$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \frac{1}{Y_s} \mu(S)N, \quad \frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_p} \mu(S)N - DP, \quad \text{где } S - \text{ концентрация субстрата, } P -$$

концентрация продукта, а параметр Y_s показывает экономическую эффективность системы, то есть долю субстрата, перешедшего в биомассу (продукт). Записывая условия

стационарности $\frac{dN}{dt} = \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = 0$ и решая полученную систему дифференциальных

уравнений, находим $N = Y_s (S_0 - S) = Y_s \left(S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right)$ – концентрация биомассы линейно

зависит от концентрации вводимого в ферментер субстрата,



$N = 0 \Rightarrow S_0 - \frac{D_c K_s}{\mu_m - D_c} = 0, D_c = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}$ – существует предельное значение скорости разбавления, выше которой рост популяции не наблюдается (здесь буквами S и N обозначены стационарные концентрации субстрата и биомассы).

Для культивирования микроорганизмов в режиме хемостата $\frac{dN}{dt} = \mu N - DN = 0 \Rightarrow \mu = D$ – скорость роста равна скорости разбавления. Если, согласно уравнению Моно (см. 23), $\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_s + S_0} = D$, то $S = \frac{DK_s}{\mu_m - D}$ – стационарная концентрация субстрата не зависит от его начальной концентрации, а определяется скоростью разбавления и параметрами роста.

25. Основные направления инженерной энзимологии.

- 1) Промышленные катализаторы на основе ферментов (см. 27)
- 2) Белковый дизайн ферментов (см. 27)
- 3) Тонкий органический синтез (см. 28)
- 4) Имобилизованные ферменты и клетки (см. 27)
- 5) Микроанализ (см. 26)
- 6) Биоэлектрокатализ и биоэлектроника.
- 7) Ферменты как лекарственные средства (см. 19)
- 8) Биокатализ в охране окружающей среды.

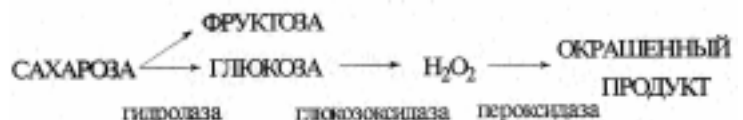
26. Ферменты в аналитической химии. Ферментативные метода анализа метаболитов. Иммуноферментный и билюминесцентный анализы. Биосенсоры.

Основные направления:

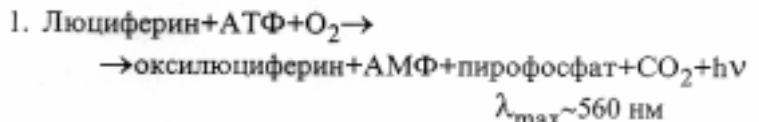
- 1) Ферменты как аналитические реагенты.
- 2) Иммуноферментный анализ.
- 3) Билюминесцентный анализ.
- 4) Биосенсоры.

Ферменты в клиническом анализе: глюкоза, мочевины, молочная кислота, спектр аминокислот, этанол, ацетальдегид, АТФ, АДФ, полиненасыщенные жирные кислоты, пенициллин, креатинфосфат. Пример использования представлен схемой.

Методы детектирования продуктов (в скобках предел обнаружения): электрохимические (10^{-5} М), амперометрические (10^{-6} М), флуориметрические (10^{-9} М), билюминесцентные (10^{-12} М).



Билюминесцентный анализ: образование активно люминесцирующих веществ; например, определение АТФ.



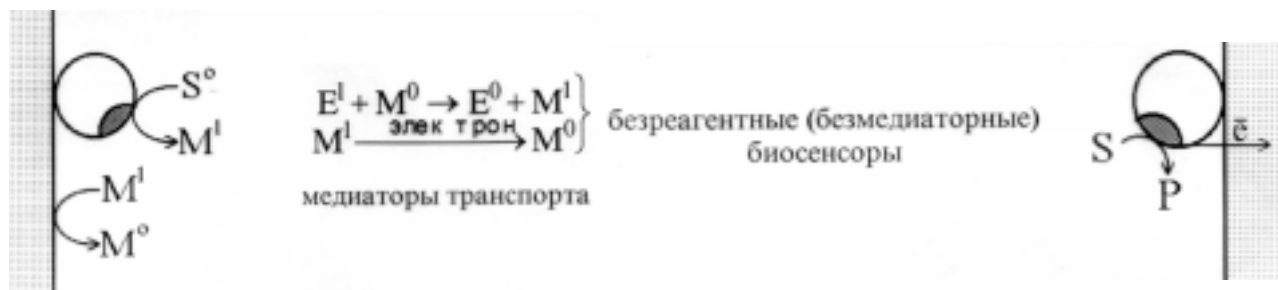
Иммуноферментный анализ – очень чувствительный способ анализа, основанный на ферментном усилении сигнала: выбирают подходящее антитело и образуют его конъюгат с определяемым ферментом. Затем этот конъюгат вводят во взаимодействие с антигеном и выделяют комплекс; наконец, добавляя субстрат,



получают продукт и по нему определяют количество фермента.

Биосенсоры: общая схема работы представлена на рисунке. Примером биосенсора может быть ферментный ион-селективный электрод, используемый для ионометрического определения глюкозы.

В работе биосенсоров могут реализовываться как перенос электрона при помощи медиаторов транспорта от электрода к активному центру фермента, так и прямой электрический контакт между электродом и активным центром фермента (туннелирование электрона).



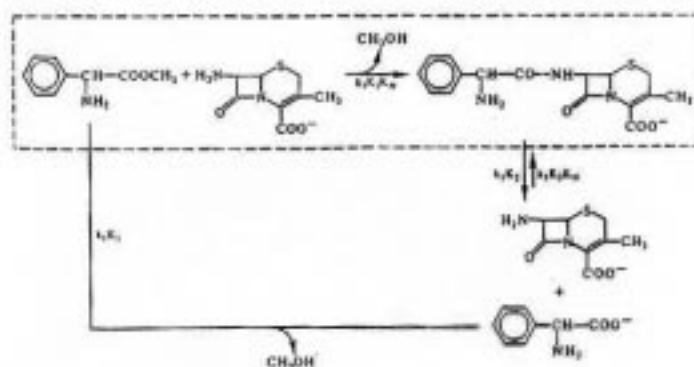
27. Промышленное получение и использование ферментов.

В промышленности ферменты получают в несколько стадий: вначале проводят сополимеризацию в однородном растворе, затем – в микроэмульсии; полученный полимер стабилизируют адсорбцией на инертную матрицу. После стабилизации матрицу убирают и вводят в молекулу «химические» скобки – группы, скрепляющие отдельные участки цепей, глобулы. Для непосредственного использования ферменты иммобилизуют (см. 5).

Область промышленного применения ферментов пока достаточно узка и ограничивается различными процессами, связанными с синтезом углеводов и полисахаридов; так, на ферментных катализаторах в промышленности осуществляют изомеризацию глюкозы во фруктозу и изготовление глюкозо-фруктозных сиропов.

28. Ферменты в тонком органическом синтезе.

- 1) Ферменты в органических растворителях.
- 2) Ферментативная модификация β -лактамных антибиотиков.
- 3) Ферментативное разделение рацематов.
- 4) Синтез с использованием гидролаз.
- 5) Регенерация кофакторов.
- 6) Синтез аминокислот.
- 7) Синтез изотопомеченных соединений.
- 8) Синтез простаноидов.
- 9) Модификация сахаров.
- 10) Синтез пептидных связей, направленная модификация белков.



Созданы биокатализаторы следующих процессов: анаэробного получения этанола, получения лизина, получения уксусной кислоты, регенерации NAD и NADP, получения безлактозного молока (гидролиза лактозы), синтеза простагландинов и лейкотриенов, синтеза липоксинов, синтеза энантиомеров алкиламинфосфоновых и алкиламинфосфонистых кислот, синтеза β -лактамных антибиотиков, получения меченых нуклеозидфосфатов, синтеза циклодекстринов, синтеза ряда антиагрегационных агентов: аджоенов, пиридоксазолов, синтеза меченных фосфором 32,32 – нуклеозидфосфатов с помощью оригинальной системы отдельных биореакторов.