

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова»

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА БИОПОЛИМЕРОВ

краткий курс лекций

для аспирантов

Направление подготовки
06.06.01 Биологические науки

Профиль подготовки
Биохимия

Саратов 2014

УДК 577.1
ББК 28.072
Д73

Структура и свойства биополимеров: краткий курс лекций для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биохимия) / Сост.: Б.И. Древко, П.В. Смутнев // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 77 с.

Краткий курс лекций составлен в соответствии с рабочей программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 06.06.01 Биологические науки (профиль подготовки – Биохимия). Краткий курс лекций содержит теоретический материал по основным вопросам структуры и свойств биополимеров. Направлен на формирование у аспирантов знаний об основных биохимических законах и их использовании в профессиональной деятельности.

УДК 577.1
ББК 28.072

©Древко Б.И. 2014
©Смутнев П.В., 2014
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

Введение

Раздел «Структура и свойства биополимеров» является одним из важнейших разделов биологической химии. Целью освоения дисциплины «Структура и свойства биополимеров» является формирование у аспирантов навыков применения химических методов исследования структуры и свойств биополимеров в профессиональной деятельности.

Краткий курс лекций по дисциплине «Структура и свойства биополимеров» содержит характеристику основных биополимеров. Курс нацелен на формирование ключевых компетенций дисциплины, грамотный подбор условий и химических компонентов для решения профессиональных задач, использование навыков основных законов естественнонаучных дисциплин для теоретических и экспериментальных исследований в биохимии.

Лекция 1

Специфическая роль белковых веществ в явлениях жизни.

1.1 Основные различия в строении белковых молекул

БЕЛКИ или ПРОТЕИНЫ - это высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, линейные гетерополимеры, структурным компонентом которых являются аминокислоты, связанные пептидными связями.

Кроме понятия «белок», в химии встречается термины «ПЕПТИД» и «ПОЛИПЕПТИД». Пептидом обычно называют олигомер, состоящий не более чем из 10 аминокислот. Но встречаются и молекулы, содержащие от 10 до 100 аминокислот – они относятся к группе небольших ПОЛИПЕПТИДОВ, крупные же полипептиды могут содержать и более 100 аминокислот. Столько же аминокислот могут содержать и некоторые небольшие белки. Поэтому граница по количеству аминокислотных остатков, а, стало быть, и по молекулярной массе, между белками и полипептидами, весьма условна.

В природе встречаются десятки тысяч различных белков. И все они отличаются друг от друга по пяти основным признакам.

1. По количеству аминокислот
2. По соотношению количества различных аминокислот. Например, в белке соединительной ткани коллагене 33% от общего количества аминокислот составляет глицин, а в молекуле белкового гормона инсулина, вырабатываемого в поджелудочной железе, содержание глицина гораздо меньше – всего 8%.
3. Различная последовательность чередования аминокислот. Это означает, что даже при одинаковом соотношении разных аминокислот в каких-нибудь двух белках порядок их расположения этих аминокислот различен, то это будут разные белки.
4. Количество полипептидных цепей в различных белках может варьировать от 1 до 12, но если больше единицы, то обычно четное (2, 4, 6 и т.п.)
5. По наличию небелкового компонента, который называется «ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА». Если ее нет, то это – простой белок, если есть – сложный белок

В природе встречается около 150 аминокислот. Для построения белков используются только 20 из них, хотя в метаболизме организма человека участвует большее количество аминокислот. Эти 20 аминокислот имеют несколько общих признаков строения (общие свойства аминокислот):

1. Все они являются альфа-аминокислотами. Аминогруппа общей части всех аминокислот присоединена к альфа-углеродному атому.
2. По стереохимической конфигурации альфа-углеродного атома все они принадлежат к L-ряду.

Следовательно, все эти 20 аминокислот имеют совершенно одинаковый фрагмент молекулы. Различаются они по строению радикалов.

Атом кислорода сильнее притягивает электроны, чем атомы водорода, поэтому электронное облако смещено в сторону кислорода. Степень полярности определяется величиной частичных зарядов и расстоянием между центрами тяжести этих зарядов. Таким образом, молекула воды является диполем. Молекулы воды структурированы и образуют кластеры.

В эти кластерные структуры хорошо встраиваются молекулы, которые сами

являются полярными, потому что полярные вещества хорошо растворимы в воде. Полярными являются все те молекулы, которые содержат электроотрицательные атомы. В молекулах белков электроотрицательными атомами являются О (кислород), N (азот) и S (сера).

Высокая полярность обеспечивает остальные общие свойства аминокислот:

3. Хорошая растворимость в воде благодаря наличию общего фрагмента молекулы. Общий фрагмент обладает полярными свойствами, потому что содержит карбоксильную группу $-\text{COOH}$ (при физиологическом значении pH эта группа заряжена отрицательно), и аминогруппы $-\text{NH}_2$ (при физиологическом значении pH заряжена положительно).

4. Способность к электролитической диссоциации. Аминокислоты существуют в водном растворе в виде амфионов (биполярных ионов). В целом такая молекула при нейтральном значении pH (при $\text{pH}=7$) электронейтральна.

5. Наличие ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ (ИЭТ, pI). (ИЭТ) - это значение pH среды, при котором молекула амфотерного вещества (например, аминокислоты) находится в электронейтральном состоянии.

1.2. Типы связи между аминокислотами в молекуле белка

2 группы:

1. КОВАЛЕНТНЫЕ СВЯЗИ - обычные прочные химические связи.

а) пептидная связь

б) дисульфидная связь

2. НЕКОВАЛЕНТНЫЕ (СЛАБЫЕ) ТИПЫ СВЯЗЕЙ - физико-химические взаимодействия родственных структур. В десятки раз слабее обычной химической связи. Очень чувствительны к физико-химическим условиям среды. Они неспецифичны, то есть соединяются друг с другом не строго определенные химические группировки, а самые разнообразные химические группы, но отвечающие определенным требованиям.

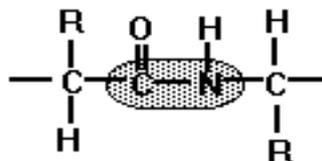
а) Водородная связь

б) Ионная связь

в) Гидрофобное взаимодействие

ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ.

Формируется за счет COOH -группы одной аминокислоты и NH_2 -группы соседней аминокислоты. В названии пептида окончания названий всех аминокислот, кроме последней, находящейся на «С»-конце молекулы меняются на «ил»



пептидная связь
(заштрихована)

ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ формируется ТОЛЬКО ЗА СЧЕТ АЛЬФА-АМИНОГРУППЫ И СОСЕДНЕЙ COOH -ГРУППЫ ОБЩЕГО ДЛЯ ВСЕХ АМИНОКИСЛОТ ФРАГМЕНТА МОЛЕКУЛЫ. Если карбоксильные и аминогруппы входят в состав

радикала, то они никогда не участвуют в формировании пептидной связи в молекуле белка.

Любой белок - это длинная неразветвленная полипептидная цепь, содержащая десятки, сотни, а иногда более тысячи аминокислотных остатков. Но какой бы длины ни была полипептидная цепь, всегда в основе ее - стержень молекулы, абсолютно одинаковый у всех белков. Каждая полипептидная цепь имеет N-конец, на котором находится свободная концевая аминогруппа и С-конец, образованный концевой свободной карбоксильной группой. На этом стержне сидят как боковые веточки радикалы аминокислот. Числом, соотношением и чередованием этих радикалов один белок отличается от другого. Сама пептидная связь является частично двойной в силу лактим-лактаманной таутомерии. Поэтому вокруг нее невозможно вращение, а сама она по прочности в полтора раза превосходит обычную ковалентную связь. На рисунке видно, что из каждых трех ковалентных связей в стержне молекулы пептида или белка две являются простыми и допускают вращение, поэтому стержень (вся полипептидная цепь) может изгибаться в пространстве.

Хотя пептидная связь довольно прочная, ее сравнительно легко можно разрушить химическим путем – кипячением белка в крепком растворе кислоты или щелочи в течении 1-3 суток.

К ковалентным связям в молекуле белка помимо пептидной, относится также **ДИСУЛЬФИДНАЯ СВЯЗЬ**.

Цистеин - аминокислота, которая в радикале имеет SH-группу, за счет которой и образуются дисульфидные связи.

Дисульфидная связь - это ковалентная связь. Однако биологически она гораздо менее устойчива, чем пептидная связь. Это объясняется тем, что в организме интенсивно протекают окислительно-восстановительные процессы. Дисульфидная связь может возникать между разными участками одной и той же полипептидной цепи, тогда она удерживает эту цепь в изогнутом состоянии. Если дисульфидная связь возникает между двумя полипептидами, то она объединяет их в одну молекулу.

Слабые типы связей

В десятки раз слабее ковалентных связей. Это не определенные типы связей, а неспецифическое взаимодействие, которое возникает между разными химическими группировками, имеющими высокое сродство друг к другу (сродство – это способность к взаимодействию). Например: противоположно заряженные радикалы.

Таким образом, слабые типы связей - это физико-химические взаимодействия. Поэтому они очень чувствительны к изменениям условий среды (температуры, рН среды, ионной силы раствора и так далее).

ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ - это связь, возникающая между двумя электроотрицательными атомами за счет атома водорода, который соединен с одним из электроотрицательных атомов ковалентно (см. рисунок).

Водородная связь примерно в 10 раз слабее, чем ковалентная. Если водородные связи повторяются многократно, то они удерживают полипептидные цепочки с высокой прочностью. Водородные связи очень чувствительны к условиям внешней среды и присутствию в ней веществ, которые сами способны образовывать такие связи (например, мочевины).

ИОННАЯ СВЯЗЬ - возникает между положительно и отрицательно заряженными группировками (дополнительные карбоксильные и аминогруппы), которые встречаются в радикалах лизина, аргинина, гистидина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

ГИДРОФОБНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ - неспецифическое притяжение, возникающее в молекуле белка между радикалами гидрофобных аминокислот - вызывается силами Ван-дер-Ваальса и дополняется выталкивающей силой воды. Гидрофобное взаимодействие ослабевает или разрывается в присутствии различных органических растворителей и некоторых детергентов. Например, некоторые последствия действия этилового спирта при проникновении его внутрь организма обусловлены тем, что под его влиянием ослабляются гидрофобные взаимодействия в молекулах белков.

Вопросы для самоконтроля

1. Основные различия в строении белковых молекул
2. Типы связи между аминокислотами в молекуле белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2

7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
8. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 2

УРОВНИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ

2.1 Уровни структурной организации белков

В основе каждого белка лежит полипептидная цепь. Она не просто вытянута в пространстве, а организована в трехмерную структуру. Поэтому существует понятие о 4-х уровнях пространственной организации белка, а именно - первичной, вторичной, третичной и четвертичной структурах белковых молекул.

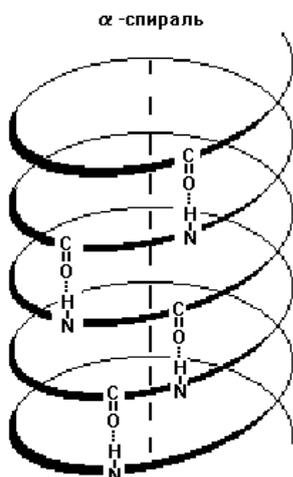
ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

Первичная структура белка - последовательность аминокислотных фрагментов, прочно (и в течение всего периода существования белка) соединенных пептидными связями. Существует период полужизни белковых молекул - для большинства белков около 2-х недель. Если произошел разрыв хотя бы одной пептидной связи, то образуется уже другой белок.

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА

Вторичная структура - это пространственная организация стержня полипептидной цепи. Существуют 3 главных типа вторичной структуры:

1) **Альфа-спираль** - имеет определенные характеристики: ширину, расстояние между двумя витками спирали. Для белков характерна правозакрученная спираль. В этой спирали на 10 витков приходится 36 аминокислотных остатков. У всех пептидов, уложенных в такую спираль, эта спираль абсолютно одинакова. Фиксируется альфа-спираль с помощью водородных связей между NH-группами одного витка спирали и C=O группами соседнего витка. Эти водородные связи расположены параллельно оси



спирали и многократно повторяются, поэтому прочно удерживают спиралеобразную структуру. Более того, удерживают в несколько напряженном состоянии (как сжатую пружину).

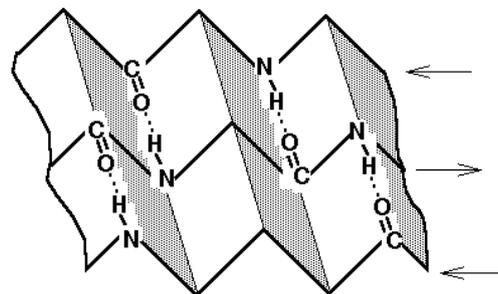
Бета-складчатая

структура - или структура складчатого листа. Фиксируется также

водородными связями между C=O и NH-группами. Фиксирует два участка полипептидной цепи. Эти цепи могут

быть параллельны или антипараллельны. Если такие связи образуются в пределах одного пептида, то они всегда антипараллельны, а если между разными полипептидами, то параллельны.

3) **Нерегулярная структура** - тип вторичной структуры, в котором расположение различных участков полипептидной цепи относительно друг друга не имеет регулярного (постоянного) характера, поэтому нерегулярные структуры могут иметь различную конформацию.



β - складчатая структура (антипараллельная).

(стрелками показано направление полипептидных цепей)

ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА

Это трехмерная архитектура полипептидной цепи – особое взаимное расположение в пространстве спиралеобразных, складчатых и нерегулярных участков полипептидной цепи. У разных белков третичной структуры различна. В формировании третичной структуры участвуют дисульфидные связи и все слабые типы связей.

Выделяют два общих типа третичной структуры:

1) В фибриллярных белках (например, коллаген, эластин) молекулы которых имеют вытянутую форму и обычно формируют волокнистые структуры тканей, третичная структура представлена либо тройной альфа-спиралью (например, в коллагене), либо бета-складчатыми структурами.

2) В глобулярных белках, молекулы которых имеют форму шара или эллипса (латинское название: *GLOBULA* - шар), встречается сочетание всех трех типов структур: всегда есть нерегулярные участки, есть бета-складчатые структуры и альфа-спирали.

Обычно в глобулярных белках гидрофобные участки молекулы находятся в глубине молекулы. Соединяясь между собой, гидрофобные радикалы образуют гидрофобные кластеры (центры). Формирование гидрофобного кластера вынуждает молекулу соответствующим образом изгибаться в пространстве. Обычно в молекуле глобулярного белка бывает несколько гидрофобных кластеров в глубине молекулы. Это является проявлением двойственности свойств белковой молекулы: на поверхности молекулы - гидрофильные группировки, поэтому молекула в целом - гидрофильная, а в глубине молекулы - спрятаны гидрофобные радикалы.

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА

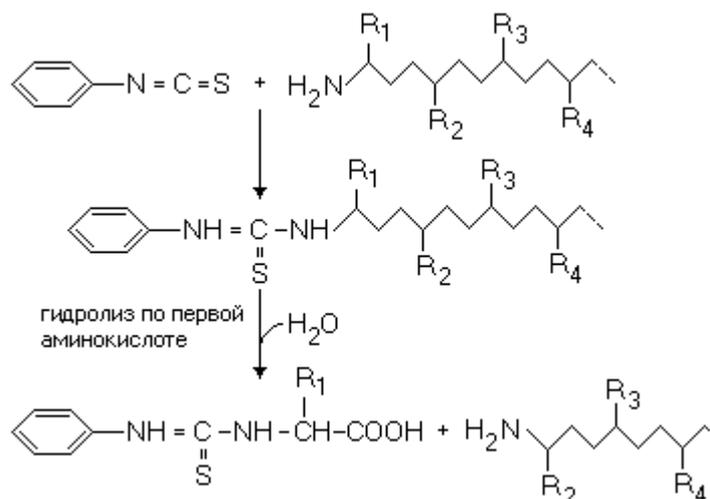
Встречается не у всех белков, а только у тех, которые состоят из двух или более полипептидных цепей. Каждая такая цепь называется **СУБЪЕДИНИЦЕЙ** данной молекулы (или **ПРОТОМЕРОМ**). Поэтому белки, обладающие четвертичной структурой, называют **ОЛИГОМЕРНЫМИ** белками. В состав белковой молекулы могут входить одинаковые или разные субъединицы. Например, молекула гемоглобина «А» состоит из двух субъединиц одного типа и двух субъединиц другого типа, то есть является тетрамером. Фиксируются четвертичные структуры белков всеми типами слабых связей, а иногда еще и дисульфидными связями.

2.2. Методы определения первичной структуры белка

1) Дегградация по Эдмону

К раствору белка добавляют реактив Эдмона, содержащий фенилизотиоцианат.

Фенилизотиоцианат взаимодействует с альфа-аминогруппой первой (N-концевой) аминокислоты, а затем происходит ее отщепление от полипептидной цепи путем гидролиза:



После этого идентифицируют первую аминокислоту. Затем процесс повторяется.

В настоящее время процесс автоматизирован.

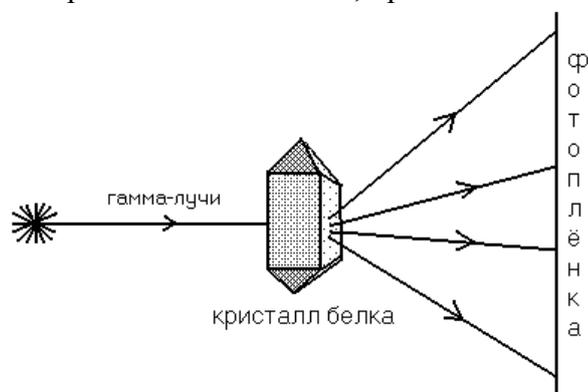
2) Секвенирование ДНК

Первичная структура любой белковой молекулы напрямую зависит от структуры ДНК-генома. Поэтому сначала выделяют ген, в котором закодирована структура белка. Далее определяют последовательность азотистых оснований в ДНК. Каждая аминокислота в белковой молекуле закодирована сочетанием трех азотистых оснований - триплетом (кодоном) в молекуле ДНК. Например, сочетание трех оснований аденина (AAA) кодирует аминокислоту фенилаланин, а последовательность из трех оснований цитозина – глицин. Это дает возможность получить информацию о первичной структуре белковой молекулы, а, значит, прогнозировать строение всей молекулы в целом, поскольку именно первичная структура определяет строение всех высших уровней организации – и вторичной, и третичной, а, иногда и четвертичной структур.

Для проверки предположений о строении высших структур используется еще один метод:

3) Рентгеноструктурный анализ

Схема, поясняющая принцип этого метода, представлена на рисунке:



В результате облучения на фотопленке фиксируется карта электронной плотности (похожа на географическую карту). Далее производится компьютерный анализ полученного изображения, в результате чего строится пространственная модель

белковой молекулы.

5) Электронная микроскопия

Может быть использована для выяснения структуры белковых молекул с большой молекулярной массой – от 500.000 до 1.000.000 Да (дальтон). **Дальтон (Да) и килодальтон (кДа)**– единицы измерения массы белков. $1\text{кДа}=10^3\text{ Да}$. 1 дальтон равен 1/16 массы атома кислорода (кислородная единица массы).

Вопросы для самоконтроля

1. Уровни структурной организации белков.
2. Методы определения первичной структуры белка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-Х
5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.

8. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А. Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 3

ВЕЛИЧИНА И ФОРМА БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ

3.1 Размер белковых молекул

Эти физико-химические показатели удалось установить после применения ультрацентрифугирования, двойного лучепреломления, диффузии, сканирующей микроскопии, рентгеноструктурного анализа. Указанные методы позволили понять, что в природе существуют глобулярные и фибриллярные белки. Оказалось также, что все белки ассиметричны. Что касается размеров, то они, как говорится, познаются в сравнении. Так, размер (в нм) аланина равен 0,5; миоглобина – $4,4 \times 4,4 \times 2,5$; гемоглобина – 6,8 (поперечник); фибриногена – $3,8 \times 3,8 \times 70$; миозина – $2 \times 2 \times 150$; тропоколлагена – $1,5 \times 1,5 \times 300$.

3.2. Форма белковых молекул

В зависимости от конформации белки разделяют на два основных класса.

- фибриллярные белки (лат. *fibrilla* - волокно). Они нерастворимы в воде и разбавленных солевых растворах, но набухают в них. Полипептидные цепи этих белков располагаются параллельно друг другу, образуя длинные волокна или слои. Фибриллярные белки – структурные элементы соединительной ткани животных. У крупных позвоночных на долю фибриллярных белков приходится одна треть общего содержания белков. Они являются основой коллагена сухожилий и костной ткани, кератина волос, кожи, ногтей и перьев, когтей и рогов, эластина соединительной ткани. Соотношение А и В осей в фибриллярных белках достигает несколько тысяч. Различные R-группы этих белков расположены по разные стороны от оси полипептидной цепи, способствуя как связи между отдельными цепями, так и взаимодействию белка с другими соединениями. Некоторые фибриллярные белки состоят из прямых длинных полипептидных цепей, другие из извитых цепей (α -кератин), которые при растягивании расправляются (β -кератин).

α -Кератин – основной тип фибриллярных белков. В этих белках повторяются структурные единицы длиной 0,54 нм, расположенные вдоль оси волоса. В α -кератинах полипептидные цепи имеют форму α -спирали. В волосе три α -спиральные цепи скручены одна вокруг другой, образуя суперспирализованную структуру. Она напоминает трехжильный кабель, все N-концевые остатки аминокислот оказываются на одном и том же конце. В α -кератине полипептидные цепи прочно соединены друг с другом ковалентными поперечными связями между остатками цистина. Самые прочные кератины, например, панциря черепахи, содержат до 18% цистина. α -Кератины не только прочны, но и нерастворимы в воде при pH 7 и физиологических значениях температуры. Это является следствием большого числа аминокислот, содержащих гидрофобные, нерастворимые в воде R-группы (Фен, Изолей, Вал, Мет, Ала), которые расположены снаружи полипептидной цепи.

β -Кератины, по сравнению с α -кератинами, более гибкие структуры, они с трудом поддаются растяжению, имеют структурные единицы длиной 0,70 нм, не спиральную, а зигзагообразную форму. В них параллельные цепи уложены в виде складок, нет внутрицепочечных водородных связей, напротив, межцепочечных водородных связей много. В β -кератинах нет поперечных цистиновых связей между соседними цепями и

они обычно направлены в противоположные стороны, т.е. расположены антипараллельно. β -Структура может образоваться только в том случае, если R-группы аминокислотных остатков имеют небольшие размеры (Гли, Ала).

Главными фибриллярными белками соединительной ткани являются коллаген, эластин и протеогликаны – белки, ковалентно связанные с полисахаридами. Фибриллы коллагена не растягиваются, а эластины имеют высокую степень растяжимости. Фибриллы коллагена обладают очень большой прочностью на разрыв. Они выдерживают нагрузку, вес которой в 10000 раз превышает их собственный вес, т.е. по прочности они превосходят стальную проволоку равного поперечного сечения. Сухожилия, при помощи которых мышечное усилие передается костям, состоят в основном из коллагена, а связки, богатые эластином, соединяют кости скелета и удерживают их в суставах. При кипячении коллаген превращается в желатин. Коллагены содержат 35% остатков глицина и 11% остатков аланина, а на сумму пролина и 4-гидроксипролина приходится около 21% всех аминокислотных остатков. Поэтому питательная ценность коллагена и желатина очень низкая. Протеогликаны выполняют функцию основного вещества, в которое погружены или которым покрыты волокнистые элементы соединительной ткани. Они служат также смазочным материалом в суставах.

Упругие артериальные стенки, как известно, помогают распределять нагнетаемую сердцем кровь по кровеносным сосудам и сглаживать пульсовые колебания давления крови, создаваемые сокращениями сердца. Это становится возможным благодаря белку эластину. Его много в желтой эластической ткани связок и стенках крупных артерий. Субъединицей эластина является тропоэластин, его молекулярная масса составляет 72000, он состоит примерно из 800 остатков аминокислот, богат глицином и аланином, содержит мало лизина и пролина.

Следовательно, трехмерные конформации фибриллярных белков приспособлены к выполнению весьма специализированных функций. α -Спираль α -кератина приспособлена к тому, чтобы образовывать наружные защитные структуры – волосы, перья, рога, чешую. β -Конформация способствует образованию гибких и нерастяжимых нитей в соединительной ткани, шелке и паутине прочных на разрыв. Такие свойства объясняются последовательностью остатков аминокислот.

- глобулярные белки (лат. *globules* - шарик). Большинство этих белков растворимо в водных растворах, они выполняют в клетке динамические функции и легко диффундируют. Глобулярных белков очень много, к ним относятся все 2500 ферментов, гормоны, глобулины и альбумины яичного белка, молока, сыворотки крови, зерновых растений, транспортные белки, антитела, компоненты мембран и рибосом и др. Глобулярные белки имеют длину малой оси 20-60 Å, а большой – 20-200 Å. Так, отношение большой оси к малой у яичного альбумина равно 3, глобулина сыворотки крови – 7,5, а зеина кукурузы – 20.

В качестве примера разберем роль и структуру одного глобулярного белка гемоглобина:

- α - и β -цепи Нв имеют почти одинаковую третичную структуру, они более чем на 70% состоят из α -спиралей. Все α -спиральные участки почти одинаковы по длине и в местах изгиба образуют примерно одни и те же углы;

- Нв разных видов позвоночных сходны и по четвертичной структуре;

- третичная структура α - и β -цепей Нв и МиоНв сходны, что лежит в основе их одинаковых биологических функций.

Кровь ежедневно переносит от легких к тканям около 600л кислорода и лишь

небольшая часть его переносится плазмой, т.к. O_2 плохо растворим в водных растворах. Почти весь кислород связан с Hb эритроцитов; 100 мл крови связывает примерно 20 мл газообразного кислорода. Hb эритроцитов в артериальной крови насыщен кислородом примерно на 96%, а в венозной крови, которая возвращается в сердце лишь на 64%, т.е. одна треть O_2 оставляется тканям. Кроме кислорода Hb осуществляет перенос еще двух лигандов, конечных продуктов тканевого дыхания: CO_2 и H^+ . Они доставляются к легким и почкам, которые обеспечивают их выделение. Hb переносит около 20% общего количества диоксида углерода и H^+ , образующихся в тканях. Причем, присоединение этих лигандов снижает способность гемоглобина связывать O_2 , т.е. он больше отдается тканям. Наоборот, в легких выделение CO_2 и повышение pH крови ($H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$) приводит к увеличению сродства Hb к кислороду. Это так называемый эффект Бора. Все эти лиганды связываются с разными участками молекулы гемоглобина: O_2 с атомами железа в геме, H^+ - с R-группами остатков гистидина, а CO_2 - с концевыми α -аминогруппами каждой из четырех полипептидных цепей. При этом образуется карбаминогемоглобин.

Четвертым лигандом гемоглобина является 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ). При добавлении ДФГ к раствору гемоглобина, его сродство к кислороду значительно снижается. Это наблюдается, например, при гипоксии. Долгое время было непонятно, почему в консервированной крови возрастает сродство к кислороду. Это клинически очень важно, ибо если больному перелить кровь с высоким сродством к кислороду, то возникает опасность недостатка кислорода в тканях. Сейчас установлено, что этот эффект связан со снижением в консервированной крови ДФГ, с 4,5 до 0,5 мМ за 10 дней хранения. В русле крови эритроциты восстанавливают половину нормального уровня ДФГ лишь за 24 часа, что неприемлемо для тяжелых больных. Поэтому в консервирующую среду надо добавлять инозин, который, проходя, через мембрану клеток, внутри клетки превращается в ДФГ.

Некоторые из белков принадлежат к промежуточному типу. Они имеют длинные структуры как фибриллярные белки и в то же время растворимы в водных солевых растворах как глобулярные (миозин, фибриноген). Иногда глобулярные белки могут переходить в фибриллярные. При этом у них под влиянием внешних факторов происходит развертывание полипептидной цепи, например, в актине мышц.

Вопросы для самоконтроля

1. Размер белковых молекул
2. Форма белковых молекул

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина;

гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1

2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2

3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-Х

5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2

6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.

7. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7

8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.

9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 4

КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

4.1 Понятие о лигандах

Взаимодействие белка с каким-нибудь веществом иногда приводит к связыванию молекулы этого вещества молекулой белка. Это явление известно как «**сорбция**» (**связывание**). Обратный же процесс - освобождение другой молекулы от белковой называется «**десорбция**».

Если для какой-нибудь пары молекул процесс сорбции преобладает над десорбцией, то это уже **специфическая сорбция**, а вещество, которое сорбируется, называется «**лиганд**».

Виды лигандов:

- 1) Лиганд белка-фермента – субстрат.
- 2) Лиганд транспортного белка – транспортируемое вещество.
- 3) Лиганд антитела (иммуноглобулина) – антиген.
- 4) Лиганд рецептора гормона или нейромедиатора – гормон или нейромедиатор.

Белок может изменять свою конформацию не только при взаимодействии с лигандом, но и в результате любого химического взаимодействия. Примером такого взаимодействия может служить присоединение остатка фосфорной кислоты.

В природных условиях белки имеют несколько термодинамически выгодных конформационных состояний. Это нативные состояния (природные). *Natura* (лат.) – природа.

4.2. Гидратация и сольватация белков

Гидратация и сольватация белков приводят к изменению структуры и свойств белковой молекулы, что имеет большое значение в различных процессах *взаимодействия белков* с веществами среды. Сорбированные молекулы неэлектролитов вклиниваются между витками полипептидной цепи и разрывают водородные связи между ними. Гидратация белков влияет на вязкость их растворов.

Существенна роль сольubilизации в живых организмах - в процессах миграции и усвоения различных олеофильных веществ, например жиров, лекарственных средств, при *взаимодействии белков* с липидами. Сольubilизация в растворах солей желчных кислот жиров (и других олеофиль-ных веществ) является одной из ступеней сложного процесса их ассимиляции организмом.

Каким образом влияет химическая структура полимера на такие факторы, как избирательность сорбции, толщина адсорбированного слоя, сохранение белка в нативной форме; каковы особенности *взаимодействия сорбированных белков* с кровью в короткие и длительные сроки наблюдения, как эта поверхность влияет на тромбоциты и другие компоненты крови - ответ на эти вопросы еще предстоит найти. Но эти данные еще недостаточны. Главное же затруднение состоит в том, что изучение этих процессов, его определяющих факторов натолкнулось на несовершенство известных методик изучения такого взаимодействия. Оказалось, что охарактеризовать склонность материала вызывать или замедлять тромбоз само по себе является сложной проблемой и до сих пор нет единого мнения относительно методов такой оценки. Классические методы биохимии - время свертывания крови во всех своих разновидностях,

тромбиновый и протромбиновый индексы, наличие или изменение наиболее важных факторов крови - имеют ряд крупных недостатков: контакт крови с посторонними поверхностями и воздухом, необходимость использования стабилизаторов крови, искусственные условия проведения исследований и др. Эти недостатки и не позволяют получить надежной корреляции между результатами лабораторных исследований и поведением полимеров в условиях организма. И хотя этими методами до сих пор характеризуют тромборезистентность полимеров, большинство исследователей понимает, что получаемые показатели не дают реального представления о свойствах полимеров.

4.3 Кристаллические белки

Кристаллизация белков и установление их структур являются одними из самых перспективных направлений современной биологии. В их основе лежит свойство биомолекул образовывать кристаллы, способные рассеивать рентгеновские лучи. Закон Брэгга, описывающий зависимость между углами и фазами падающих и отраженных волн и расстояниями между атомами в кристаллической решетке, позволяет воссоздать трехмерную кристаллическую структуру по картине дифракции кристаллами рентгеновских лучей. В настоящее время сотни лабораторий в самых разных странах мира занимаются либо исключительно кристаллизацией и установлением структур белков, либо используют этот процесс в качестве дополнения и доказательства правильности тех или иных теорий и моделей, основанных на биохимических данных. Сотни структур публикуются каждый год в самых престижных биологических журналах мира, пополняя компьютерную базу данных GenBank. Эта цифра продолжает расти из года в год. К 1971 году было известно только 7 структур. За последние несколько лет это направление значительно прогрессировало и к 2003 году в базе данных www.pdb.ru насчитывалось более 20000 кристаллических структур молекул белков. Несмотря на значительный прогресс последних лет, кристаллография остается весьма трудоемким процессом, в котором многое зависит от простой удачи. Универсальных правил и гарантий получения кристаллов, которые будут достаточно хорошо рассеивать проходящие через них рентгеновские лучи, на настоящий момент не существует. Обычно процесс получения третичной структуры белка может занимать, в зависимости от опытности кристаллографа, интенсивности работы и других факторов, от нескольких месяцев до пары лет. Кристаллизация белков используется: а) как завершающая стадия очистки, б) для доказательства гомогенности белка, в) как метод стабилизации при хранении (многие фирмы продают чистые ферменты в виде суспензии кристаллов, помещенных в раствор сульфата аммония), г) для определения третичной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа. Кристаллы растут из пересыщенных растворов вследствие агрегации высокоупорядоченным образом. Выращивание кристаллов занимает много времени, особенно чтобы получить более крупные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа. Чаще всего в таблице, отражающей ход очистки белка, кристаллизация представлена в качестве последнего этапа. Это указывает на то, что фермент получен в достаточно чистом состоянии, и такой кристаллический препарат пригоден для длительного хранения. Но кристаллы могут образовываться и в очень разнородных смесях белков. Если примеси не находятся в перенасыщенном состоянии, то агрегировать будет тот белок, который присутствует в этом состоянии, и могут образоваться его кристаллы. Например, метод очистки кроличьей альдолазы заключался в том, что к мышечному экстракту добавляли

сульфат аммония до 50% насыщения, осадок удаляли. В надосадочной жидкости альдолаза составляла около 15% от всех белков. При увеличении концентрации сульфата аммония до 52% насыщения альдолаза начинала медленно кристаллизоваться. Отсюда следует, что само образование кристаллов фермента не может служить доказательством того, что раствор, из которого он выпал, содержит чистый фермент. Методы кристаллизации. Чтобы началась кристаллизация, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для этой цели используют осадители (вещества, уменьшающие растворимость): сульфат аммония, полиэтиленгликоль, органические растворители. Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка: рН, концентрации буфера и осадителя, ионов металлов. Используют следующие приемы: 1. равновесный диализ против осадителя, 2. диффузия паров летучих веществ (методы «висящей и «сидящей» капли). Метод «висящей капли» Осадитель помещают на дно стаканчика, капля концентрированного раствора белка находится на внутренней стороне стеклышка, закрывающего этот стакан. За счет диффузии паров происходит медленное возрастание концентрации осаждающего вещества в капле раствора белка. Раствор белка может также содержать следы ионов металлов. Например, известно, что для кристаллизации инсулина необходимы ионы цинка. Метод «сидящей капли» В этом методе раствор белка помещают на пьедестал, возвышающийся над резервуаром с осадителем. 3. метод свободной диффузии Концентрированные растворы белка и осадителя наслаиваются, идет диффузия. В отличие от метода 2 происходит быстрое пересыщение белкового раствора и образование центров кристаллизации. При дальнейшей диффузии идет понижение концентрации белка и осадителя. Очень важна скорость образования зародышей кристаллов, которая зависит от концентрации белка, а чем меньше кристаллов, тем больше их размер. Скорость же роста кристаллов зависит от растворимости белка, т.е. от концентрации растворителя. Иногда чтобы вырастить большие кристаллы, в раствор белка вносят затравку – мелкие кристаллы этого белка. Кристалл белка может храниться полгода в специальном растворе, который не содержит белка. Подбирается такая концентрация осадителя, при которой кристалл не растворялся бы и не трескался. Кроме того, в раствор добавляют азид натрия или толуол против бактериального заражения.

Вопросы для самоконтроля

1. Понятие о лигандах
2. Гидратация и сольватация белков
3. Кристаллические белки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Дмитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Дмитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское

издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1

2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2

3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X

5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6

6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2

7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.

8. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7

9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.

10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 5

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ. ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

5.1 Простые белки

Простыми называются белки, которые при гидролизе распадаются только на аминокислоты. Название является достаточно условным, так как большая часть так называемых простых белков в клетках связаны с другими молекулами небелкового строения. Тем не менее традиционно выделяют следующие группы **простых белков**:

1. Гистоны – низкомолекулярные основные белки, участвуют в упаковке ДНК клетки, являются весьма консервативными белками, мутации в них губительны. Выделяют пять фракций гистонов: фракция Н1 – богатые лизином, фракции Н2а и Н2б – умеренно богатые лизином, фракции Н3 и Н4 – богатые аргинином. Аминокислотная последовательность гистонов мало изменилась в процессе эволюции, гистоны млекопитающих, растений и дрожжей очень сходны друг с другом. Например, Н4 человека и пшеницы отличаются лишь несколькими аминокислотами, к тому же размер молекулы белка и ее полярность довольно постоянны. Из этого можно заключить, что гистоны были оптимизированы еще в эпоху общего предшественника животных, растений и грибов (более 700 млн лет назад). Хотя с тех пор в гистоновых генах происходили бесчисленные точечные мутации, все они, очевидно, приводили к вымиранию мутантных организмов.

2. Протамины – группа простейших низкомолекулярных белков, обладают выраженными основными свойствами за счет содержания 60–85% аргинина, хорошо растворимы в воде, являются аналогами гистонов, но более плотно упаковывают ДНК в сперматозоидах позвоночных, чтобы избежать разрывов при делении клеток.

3. Проламины – белки злаков, содержат 20–25% глутаминовой кислоты и 10–15% пролина, растворимы в 60–80% спирте, в то время как остальные белки в этих условиях выпадают в осадок. В проламинах почти полностью отсутствует лизин, что существенно снижает пищевую ценность растительных белков.

4. Глютеины – также белки растительного происхождения, составляют основную массу клейковины злаков.

5. Альбумины – белки крови, составляют больше половины белков крови, относятся к глобулярным белкам, растворимы в воде и слабых растворах солей, выпадают в осадок в насыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, изоэлектрическая точка – 4,7, имеют высокий отрицательный заряд при рН крови. Альбумин крови человека состоит из одной полипептидной цепи, включающей 584 аминокислотных остатков с повышенным содержанием аспарагиновой и глутаминовой кислот. В молекуле имеются три повторяющихся гомологичных домена, каждый из которых содержит шесть дисульфидных мостиков. Можно предположить, что в ходе эволюции ген, детерминирующий этот белок, дважды дуплицировался. Альбумин обуславливает основное осмотическое давление крови (его называют онкотическим) и обладает способностью связывать липофильные вещества, вследствие чего он может транспортировать жирные кислоты, билирубин, лекарственные вещества, некоторые стероидные гормоны, витамины, ионы кальция и магния. Альбумины существуют и в растительных клетках, там они характеризуются повышенным содержанием метионина и триптофана.

6. Глобулины – глобулярные белки плазмы крови, растворяются только в слабом

растворе NaCl, в ненасыщенном растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ выпадают в осадок, в результате чего их можно отделить от альбуминов. Соотношение альбуминов и глобулинов – важная биохимическая характеристика крови, сохраняется на постоянном уровне. Глобулины при электрофорезе делят на несколько фракций:

α_1 – антитрипсин, антихимотрипсин, протромбин, транскортин, переносящий кортикостероиды, переносчик прогестерона, тироксин-переносящий глобулин;

α_2 – антитромбин, холинэстераза, плазминоген, макроглобулин, связывающий протеиназы и переносящий ионы цинка, ретинол-переносящий белок, витамин D-переносящий белок;

β – содержит трансферрин, переносящий железо, церулоплазмин, переносящий медь, фибриноген, глобулин, переносящий половые гормоны, транскобаламин, переносящий витамин B_{12} , С-реактивный протеин, активирующий систему комплемента;

γ – фракция иммуноглобулинов.

Существуют также глобулины растений, они характеризуются повышенным содержанием аргинина, аспарагина и глутамина и состоят из двух фракций.

7. Склеропротеиды – белки, нерастворимые или ограниченно растворимые в воде, водных растворах нейтральных солей, этаноле и смесях этанола с водой. Это фибриллярные белки (кератины, коллаген, фиброин и др.), они отличаются высокой устойчивостью к химическим реактивам, действию протеолитических ферментов и выполняют в организме структурную функцию.

8. Токсические белки – токсины яда змей, скорпионов, пчел. Они характеризуются очень низкой молекулярной массой.

Сложные белки – это белки, при гидролизе распадающиеся на аминокислоты и небелковое вещество. Если небелковое вещество прочно связано с белковым компонентом, то его называют простетической группой.

5.2 Сложные белки

Сложные белки делятся на типы в зависимости от небелкового компонента.

Хромопротеиды – содержат в качестве простетической группы окрашенное вещество. Делят на три группы:

а) гемопротеиды (железопорфирины) – гемоглобин, миоглобин, цитохромы, каталаза, пероксидаза,

б) магнийпорфирины – хлорофилл,

в) флавопротеиды – ФАД и ФМН, входящие в состав оксидоредуктаз.

Металлопротеиды – содержат помимо белка ионы какого-либо одного или нескольких металлов. К ним относятся белки, содержащие негеминное железо, а также белки, координационно связанные с атомами металлов в составе сложных белков-ферментов:

а) ферритин – высокомолекулярный водорастворимый сложный белок, содержащий около 20% железа, сосредоточен в селезенке, печени, костном мозге, выполняет роль депо железа в организме. Железо в ферритине находится в окисленной форме $(\text{FeO}\cdot\text{OH})_8\cdot(\text{FeO}\cdot\text{PO}_3\text{H}_2)$, причем атомы железа координационно связываются с атомами азота пептидных групп;

б) трансферрин – входит в состав фракции β -глобулинов, содержит 0,13% железа, является переносчиком железа в организме. Атом железа соединяется с белком координационными связями по гидроксильным группам тирозина.

Фосфопротеиды – белки, содержащие фосфорную кислоту, присоединенную сложноэфирной связью к гидроксильным радикалам серина и треонина. Содержание фосфорной кислоты достигает в фосфопротеидах 1%. Выполняют питательную функцию, запасая фосфор для построения костной и нервной ткани. Представителями фосфопротеидов являются:

а) вителлин – белок яичного желтка;

б) ихтулин – фосфопротеид икры рыб.

в) казеиноген – фосфопротеид молока, существует в виде растворимой соли с Ca^{2+} , при створаживании молока Ca^{2+} отсоединяется и казеин выпадает в осадок;

Липопротеиды – белки, содержащиеся в качестве простетической группы нейтральные жиры, свободные жирные кислоты, фосфолипиды, холестериды. Липопротеиды входят в состав цитоплазматической мембраны и внутриклеточных мембран ядра, митохондрий, эндоплазматического ретикулула, а также присутствуют в свободном состоянии (в основном, в плазме крови). Липопротеиды стабилизируются нековалентными связями различной природы.

Липопротеиды плазмы крови имеют характерное строение: внутри находится жировая капля (ядро), содержащая неполярные липиды (триацилглицериды, этерифицированный холестерин); жировая капля окружена оболочкой, в состав которой входят фосфолипиды и свободный холестерин, полярные группы которых обращены к воде, а гидрофобные погружены в ядро; белковая часть представлена белками, называемыми апопротеинами. Апопротеины играют решающую роль в функционировании липопротеинов: они служат молекулами узнавания для мембранных рецепторов и необходимыми партнерами для ферментов и белков, которые участвуют в метаболизме и обмене липидов. Липопротеиды плазмы крови делят на несколько групп:

- хиломикроны (ХМ), осуществляют транспорт липидов из клеток кишечника в печень и ткани;

- пре- β -липопротеиды (липопротеиды очень низкой плотности – ЛПОНП), осуществляют транспорт липидов, синтезируемых в печени;

- β -липопротеиды (липопротеиды низкой плотности – ЛПНП), осуществляют транспорт холестерина в ткани;

- α -липопротеиды (липопротеиды высокой плотности – ЛПВП), осуществляют транспорт холестерина из тканей в печень, удаляют избыток холестерина из клеток, являются донором апопротеинов для остальных липопротеинов.

Чем больше липидное ядро, то есть чем большую часть составляют неполярные липиды, тем меньше плотность липопротеинового комплекса. Хиломикроны не могут проникать внутрь сосудистой стенки из-за своих больших размеров, а ЛПВП, ЛПНП и частично ЛПОНП могут. Однако ЛПВП из-за своего малого размера легче удаляются из стенки через лимфатическую систему, кроме того они имеют более высокий процент белка и фосфолипидов и метаболизируются быстрее, чем богатые холестерином и триацилглицеридами ЛПНП и ЛПОНП.

Гликопротеиды – содержат углеводы и их производные, прочно связанные с белковой частью молекулы. Углеводные компоненты, помимо информативной (иммунологической) функции, значительно повышают стабильность молекул к различного рода химическим, физическим воздействиям и предохраняют их от действия протеиназ. Гликозилированными чаще всего являются белки наружной стороны цитоплазматической мембраны и секретируемые из клетки белки. Связь между углеводным компонентом и белковой частью в разных гликопротеидах

осуществляется посредством связи через одну из трех аминокислот: аспарагин, серин или треонин.

К гликопротеинам относятся все белки плазмы крови, кроме альбуминов, гликопротеиды цитоплазматической мембраны, некоторые ферменты, некоторые гормоны, гликопротеины слизистых оболочек, антифризы крови антарктических рыб.

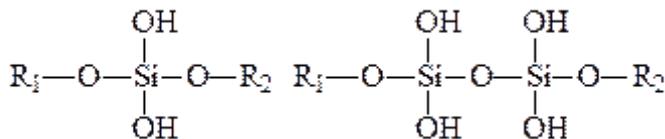
Примером гликопротеинов являются иммуноглобулины – семейство Y-образных гликопротеинов, у которых обе вершины могут связывать антиген. Иммуноглобулины в организме находятся в виде мембранных белков на поверхности лимфоцитов и в свободном виде в плазме крови (антитела). Молекула IgG представляет собой крупный тетрамер из двух идентичных тяжелых цепей (H-цепей) и двух идентичных легких цепей (L-цепей). В обеих H-цепях имеется ковалентно связанный олигосахарид. Тяжелые цепи IgG состоят из четырех глобулярных доменов V, C₁, C₂, C₃, легкие цепи – из двух глобулярных доменов V и C. Буква C обозначает константные области, V – переменные. Обе тяжелые цепи, а также тяжелая цепь с легкой, связаны дисульфидными мостиками. Домены внутри также стабилизированы дисульфидными мостиками. Домены имеют длину около 110 аминокислотных остатков и обладают взаимной гомологией. Такая структура, очевидно, возникла благодаря дупликации гена. В центральной области молекулы иммуноглобулина расположен шарнирный участок, который придает антителам внутримолекулярную подвижность. Иммуноглобулины расщепляются ферментом папаином на два F_{ab} и один F_c-фрагмент. Оба F_{ab}-фрагмента состоят из одной L-цепи и N-концевой части H-цепи и сохраняют способность связывать антиген. F_c-фрагмент состоит из C-концевой половины обеих H-цепей. Эта часть IgG выполняет функции связывания с клеточной поверхностью, взаимодействия с системой комплемента и участвует в переносе иммуноглобулинов клетками.

Гликофорин – гликопротеин мембраны эритроцитов, содержит около 50% углеводов в форме длинной полисахаридной цепи, ковалентно присоединенной к одному из концов полипептидной цепи. Углеводная цепь выступает наружу с внешней стороны мембраны, она содержит антигенные детерминанты, определяющие группу крови, кроме того, на ней имеются участки, связывающие некоторые патогенные вирусы. Полипептидная цепь погружена внутрь мембраны, расположенный в середине молекулы гликофорина гидрофобный пептидный участок проходит через липидный бислой, полярный конец с отрицательно заряженными остатками глутамата и аспартата погружен в цитоплазму.

Протеогликаны – отличаются от гликопротеидов соотношением углеводной и белковой части. В гликопротеидах крупная молекула белка в некоторых местах гликозилирована углеводными остатками, протеогликаны состоят из длинных углеводных цепей (95%), связанных с небольшим количеством белка (5%). Протеогликаны представляют собой основную субстанцию межклеточного матрикса соединительной ткани, их также называют гликозаминогликанами, мукополисахаридами. Углеводная часть представлена линейными неразветвленными полимерами, построенными из повторяющихся дисахаридных единиц, в их состав обязательно входят остатки мономера глюкозамина или галактозамина и D- или L-идуроновая кислота.

В состав протеогликанов входит 0,04% кремния, то есть на 130-280 повторяющихся звеньев животных протеогликанов приходится один атом этого элемента, у представителей растительного царства содержание кремния в пектинах примерно в пять раз выше. Предполагают, что ортокремниевая кислота Si(OH)₄ реагирует с

гидроксильными группами углеводов, в результате чего образуются эфирные связи, которые могут играть роль мостиков между цепями:



5.3 Гомологичные белки

Гомологичными называются белки, выполняющие у разных видов одинаковые функции, например, гемоглобин у всех позвоночных осуществляет транспорт кислорода, цитохром *c* во всех клетках участвует в процессах биологического окисления.

Гомологичные белки большинства видов:

- а) имеют одинаковую или очень близкую молекулярную массу;
- б) во многих положениях содержат одни и те же аминокислоты, называемые инвариантными остатками;
- в) в некоторых положениях наблюдаются значительные различия в аминокислотной последовательности, так называемые переменные области;
- г) содержат гомологичные последовательности – совокупность сходных черт в аминокислотной последовательности сравниваемых белков; кроме идентичных аминокислот, эти последовательности содержат хотя и разные, но близкие по физико-химическим свойствам аминокислотные радикалы.

Сравнение аминокислотной последовательности гомологичных белков выявило:

- 1) консервативные, инвариантные аминокислотные остатки важны для формирования уникальной пространственной структуры и биологической функции данных белков;
- 2) наличие гомологичных белков говорит об общем эволюционном происхождении видов;
- 3) число переменных аминокислотных остатков в гомологичных белках пропорционально филогенетическим различиям между сравниваемыми видами;
- 4) в некоторых случаях даже небольшие изменения аминокислотной последовательности могут вызвать нарушения свойств и функций белков;
- 5) однако далеко не все изменения аминокислотной последовательности вызывают нарушения биологических функций белков;
- 6) наибольшие нарушения структуры и функции белков возникают при замене аминокислот входящих в ядро сворачивания белка, входящих в состав активного центра, на участках пересечения полипептидной цепи при образовании третичной структуры.

Белки, имеющие гомологичные участки полипептидной цепи, сходную конформацию и родственные функции, выделяют в семейства белков. Например, сериновые протеиназы – семейство белков, выполняющих функцию протеолитических ферментов. Некоторые аминокислотные замены привели к изменению субстратной специфичности этих белков и возникновению функционального многообразия внутри семейства.

Вопросы для самоконтроля

1. Простые белки

2. Сложные белки
3. Гомологичные белки

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Дмитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Дмитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 6

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Получение чистых химических индивидуальных белков включает в себя как удаление небелковых примесей, так и разделение между собой собственно белковых компонентов. Последняя часть задачи в силу сходства физико-химических свойств белков особенно сложна, поэтому именно ее решение определяет выбор тех или иных схем выделения белка. Схемы выделения белков, использующие только один какой-либо принцип, редки, обычно различные подходы к фракционированию сочетаются и дополняют друг друга.

6.1 Разделение белков по молекулярной массе. Гель-хроматография

Каждому белку в зависимости от размеров его молекулы соответствует свое значение, на чем и основано разделение при гель-хроматографии. Понятно, что если объем элюции близок к свободному объему, то стремится к нулю и разделения белков, молекулы которых практически не входят в поры геля, не произойдет. Точно так же молекулы небольших размеров, для которых проникаем весь объем геля, в геле с данными характеристиками не разделятся. Наилучшее разрешение получается, если находится в пределах 0,4 - 0,6. Разумеется, пределы разделения можно расширить, используя для высокомолекулярных белков крупнопористые, а для небольших — мелкопористые гели.

Строго говоря, при гель-хроматографии разделение белков определяется не молекулярной массой, а геометрическими размерами молекулы. Соответственно, молекулы вытянутой формы за счет "кувыркания" в растворе труднее проникают в гели, чем сферические молекулы такой же молекулярной массы. Этим объясняется ранняя элюция денатурированных белков, которые ведут себя как неупорядоченный рыхлый клубок, а не как компактная глобула.

При использовании данного метода необходимо учитывать ограничения, возникающие из-за того, что гель, образующий материал не вполне инертен, как это предполагает теория метода, и может взаимодействовать с разделяемыми веществами, что искажает зависимость объема элюции от размера молекулы. Это особенно сказывается при разделении малых количеств белка, так как сорбционная емкость матрицы геля невелика и в крупномасштабных опытах ее взаимодействие с белком мало отражается на процессе.

Связывание белков гелеобразующими материалами может быть вызвано ионообменными взаимодействиями, в частности содержанием отрицательно заряженных групп в полисахаридных матрицах (сефароза, сефадекс), а также в полиакриламидных материалах. В последних карбоксильные группы возникают при спонтанном гидролизе амидов, в полисахаридах же они могут образовываться в результате окисления. Задержка при гель-хроматографии, вызванная ионообменными взаимодействиями с матрицей, особенно характерна для катионных белков, например лизоцима и некоторых субтилизинов. Нередко она весьма значительна и может даже препятствовать отделению солей от белка. В аналитических опытах такое удерживание удается подавить значительным повышением ионной силы раствора.

Разрешающая способность метода не очень велика, в то же время простота проведения и мягкость условий эксперимента являются его бесспорными

преимуществами. Применимость метода на первых этапах очистки ограничивается тем, что для удовлетворительного фракционирования белков объем наносимого раствора не должен превышать 3-5% общего объема колонки. Ввиду этого к гель-хроматографии обычно прибегают в середине или на завершающих этапах выделения белка. Разумеется, при отделении низкомолекулярных примесей, в частности при обессоливании, объем образца может быть значительно большим, поскольку не требуется высокого разрешения. В таком упрощенном варианте гель-фильтрацию используют особенно часто.

Несмотря на указанные ограничения, гель-хроматография — удобный способ фракционирования белков. Его применяют и для отделения от белков низкомолекулярных примесей, в том числе солей.

6.2 Ионообменная хроматография белков

Метод ионообменной хроматографии, основанный на различиях в соотношении и распределении заряженных групп на поверхности белка, принадлежит к числу наиболее используемых. В хроматографии белков практически не применяют синтетические ионообменные смолы на основе полистирола, весьма популярные в аналитической химии аминокислот и пептидов. Это объясняется, во-первых, большим содержанием поперечных сшивок, делающих материалы такого рода практически непроницаемыми для белков, во-вторых, сорбцией белков, подчас необратимой, на гидрофобной поверхности полистирола.

В последнее время в хроматографии белков все шире применяют ионообменники на основе гидрофильных органических полимеров, получаемых в форме шариков строго одинакового диаметра (10 мкм) и обладающих большой рабочей поверхностью. Стандартность гранул таких ионитов снижает размывание хроматографических пиков за счет различий во времени диффузии белковых молекул внутри сорбента — фактор, ограничивающий эффективность обычных ионообменников с неодинаковыми гранулами. Носители этого типа жестки, что позволяет достигать весьма высоких скоростей протекания растворов через колонку при давлении порядка 20 атм. Совместное действие этих факторов резко повышает эффективность и скорость хроматографии белков на такого рода сорбентах, получившей название быстрой жидкостной хроматографии белков (английское сокращенное обозначение FPLC). В качестве сорбентов используют Моно-Q — сильный анионит с четвертичными аммонийными группами, Моно-S — сильный катионит, содержащий сульфогруппы, или Моно-P — катионит с фосфатными группами.

6.3 Гидрофобная хроматография белков

Как известно, поверхность белковой глобулы богата гидрофильными аминокислотами, но в то же время содержит немало (до половины от их общего содержания) гидрофобных остатков, нередко образующих скопления ("гроздь"). Такие гидрофобные зоны, развитые в большей или меньшей степени, представляют характерную особенность структуры каждого белка, на чем и основан метод гидрофобной хроматографии. Соответствующие сорбенты синтезируют, включая гидрофобные группировки в гидрофильную матрицу, например в поперечно-сшитую агарозу — сефарозу. По такому принципу построены, в частности, октил- и фенилсефароза:

При пропускании белкового раствора через фенилсефарозу гидрофобные участки поверхности белков образуют контакты с фенильными группами, вытесняя прилегающие к этим структурам молекулы воды. Число и прочность таких контактов весьма различны у разных белков. Повышению их прочности способствует сорбция белков из концентрированных растворов солей, например сульфата аммония. Плавное понижение концентрации соли в растворе, протекающем через колонку с фенилсефарозой, приводит к поочередной десорбции белков.

Сходным образом действуют сорбенты, полученные присоединением к макропористому кремнезему гидрофобных алкильных радикалов различной длины. Они, будучи жесткими, особенно подходят для работы при повышенном давлении в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, англ. HPLC). Те из них, которые содержат длинные – углеводородные цепи, малопригодны для разделения белков из-за слишком сильного, нередко необратимого связывания, но могут применяться для хроматографии пептидов. Лучшие результаты дает хроматография белков на сорбентах, содержащих более короткие – С₄ – углеводородные цепи.

Нередко гидрофобная хроматография сочетается с другими эффектами. Например, присоединение к активированной бромцианом сефарозе диаминов различной длины дает сорбенты, в которых содержатся гидрофобные углеводородные цепочки наряду с двумя катионными группами. Объединение черт гидрофобного сорбента и анионита в одном хроматографическом материале обогащает его.

Описанный выше способ проведения хроматографии на гидрофобном сорбенте — далеко не единственно возможный. Для сорбции белков не обязательно введение в раствор повышенной концентрации соли, а для элюции можно применять добавление органических растворителей, сдвиг рН. В некоторых случаях, когда связывание белка основано на сочетании гидрофобных и ионных взаимодействий, хорошие результаты дает элюция растворами солей. Отметим также, что признаки гидрофобной хроматографии встречаются и в других приемах разделения белков, в особенности в аффинной хроматографии.

6.4 Аффинная, или биоспецифическая. Хроматография белков

Способы разделения белков, основанные на различиях в их физико-химических свойствах, не могут быть высокоспецифичными. С этой точки зрения гораздо перспективнее препаративные методы, которые базируются на функциональных различиях белков. Для множества белков, включая ферменты, их ингибиторы, транспортные белки, иммуноглобулины, регуляторные белки, токсины, рецепторы, — главная функциональная черта состоит в способности избирательно связывать те или иные лиганды — субстраты, коферменты, аллостерические эффекторы, антигены и т.п.

Такое связывание по существу своему весьма специфично, и это свойство резко выделяет тот или иной белок из множества других. На использовании функционально обусловленной способности белков обратимо связываться с соответствующими лигандами и основан метод аффинной, или биоспецифической, хроматографии.

Для синтеза аффинного сорбента отвечающий специфичности данного белка лиганд (субстрат или его аналог при хроматографии фермента) присоединяют к инертной матрице так, чтобы возможно меньше затронуть те элементы его структуры, которые непосредственно участвуют во взаимодействии с белком. Иногда лиганд прямо вводят в реакцию с функциональными группами на поверхности матрицы, однако чаще их

соединяют через промежуточное звено ("вставку", "ножку" и т.п.), чтобы отдалить лиганд от матрицы и уменьшить пространственные препятствия для его сближения с белком.

К каждому из элементов структуры аффинного сорбента предъявляются определенные требования. Матрица должна быть инертной и не создавать стерических препятствия для белка. Чаще всего в качестве матрицы используют микропористые гели, образованные поперечно-сшитыми гидрофильными полимерами, например производное агарозы — сефарозу, синтетические полимеры или неорганические носители макропористые производные кремнезема — силикагель или стекло. Присоединение лигандов к сефарозе (непосредственно или через вставку) обычно проводят, активируя ее бромцианом. Бромциан в щелочной среде реагирует с гидроксильными группами сефарозы, образуя весьма активный эфир изоциановой кислоты.

Последний взаимодействует затем с аминогруппами лиганда L или "вставки" с образованием производного изобочевны, которое является сильным основанием и в обычном диапазоне pH несет положительный заряд:

Таким образом, присоединение лиганда к сефарозе, активированной бромцианом, одновременно создает на матрице эквивалентное содержанию лиганда число катионных групп. Следовательно, такой сорбент помимо био- специфического связывания белка лигандом может проявлять свойства анионита, что необходимо учитывать при его использовании.

Известны и другие способы присоединения лигандов к матрице, однако в каждом случае следует учитывать изменения в характере носителя, сопровождающие реакцию с лигандом, а также большую или меньшую неустойчивость образовавшейся связи, которая иногда может вызывать постепенную "утечку" лиганда. Например, изомочевина может превращаться в производное гуанидина в присутствии значительных концентраций первичных аминов или аммиака, что влечет за собой отщепление лиганда.

Сложнее требования, предъявляемые к лиганду. Он прежде всего должен достаточно сильно взаимодействовать с белком. Так, принято считать, что для получения сорбентов, предназначенных для выделения ферментов, в качестве лигандов могут быть использованы такие ингибиторы или аналоги субстрата, которые имеют константу ингибирования (субстратную константу), т.е. константу диссоциации фермент — лиганд, не хуже 10^{-4} М. При этом учитывается, что присоединение лиганда к матрице ухудшает (т.е. повышает) константу ингибирования по крайней мере на один порядок.

При подборе лигандов для аффинной хроматографии ферментов приходится изменять структуру субстрата, чтобы предотвратить возможность его превращения ферментом в продукт, например, расщепления пептидного лиганда, если речь идет о хроматографии протеиназ. Очевидно, что сорбент, содержащий в качестве лиганда истинный субстрат, будет трансформирован при первом же контакте с ферментом и окажется непригодным.

При пропускании раствора, содержащего сложную смесь белков, других биополимеров, низкомолекулярных соединений, солей, пигментов и т.п., через биоспецифический сорбент, построенный по описанной выше схеме, лиганд образует комплекс только с тем белком, который имеет участок связывания, комплементарный структуре лиганда. В результате именно этот белок удерживается аффинной колонкой, тогда как все остальные компоненты смеси проходят через нее не задерживаясь.

После промывания колонки для удаления неспецифически удерживаемых примесей белок элюируют, изменяя состав протекающего через колонку раствора так, чтобы ослабить взаимодействие белка с лигандом. Для этого прибегают к изменению pH, добавляют к элюенту неорганические соли, органические растворители. Все эти факторы, воздействуя на структуру зоны связывания лиганда и подавляя отдельные виды белок-лигандных взаимодействий, например ионные связи и гидрофобные контакты, обеспечивают десорбцию. В отдельных случаях прибегают к аффинной элюции раствором лиганда или его аналога. Этот прием, основанный на конкуренции за связывание белка между присоединенным к матрице и растворенным лигандами, весьма специфичен и эффективен, но дорог.

Еще эффективнее сорбенты, содержащие такие лиганды, которые взаимодействуют не только с зоной связывания, но и с каталитическим центром фермента. Например, производные бензилянтарной кислоты оказались хорошими лигандами для выделения карбоксипептидаз — ферментов, отщепляющих аминокислоты от карбоксильного конца пептидной цепи. Сходство лигандов с субстратами карбоксипептидаз на первый взгляд невелико, однако оказывается, что группа HOOC- способна выступать в качестве своеобразного аналога пептидной связи.

В результате карбоксильная группа бензилянтарной кислоты взаимодействует с каталитическим центром фермента, а боковая бензильная группа и ошарбоксил — с компонентами зоны связывания субстрата. Образующийся комплекс лиганда, обычно присоединяемого к матрице через аминогруппу, введенную в параположение бензольного кольца, связывает фермент весьма прочно.

Широко используют своеобразный вариант аффинной хроматографии, основанный на применении в качестве лигандов синтетических красителей антрахинонового ряда, например цибакрона голубого.

6.5 Иммуносорбция

К числу наиболее специфических принадлежит взаимодействие белков с антителами — иммуноглобулинами. Это свойство с успехом используют для создания биоспецифических сорбентов, в которых роль лиганда выполняют специфические в отношении выделяемого белка иммуноглобулины. Получение и применение такого рода сорбентов происходят примерно так же, как и в обычной аффинной хроматографии, отличаясь лишь немногими особенностями. Во-первых, присоединение иммуноглобулина G к матрице необходимо проводить в щадящих условиях. Установление между молекулой антитела и носителем множества ковалентных связей (которое может произойти, если добиваться повышения емкости сорбента) благоприятствует денатурации белка и может, следовательно, привести к утрате специфичности антитела.

Во-вторых, использование обычных, поликлональных, антител, которые представляют собой весьма сложную смесь молекул иммуноглобулинов различного строения, приводит к получению сорбента, в котором содержатся антитела с широким диапазоном сродства к выделяемому белку-антигену. Это затрудняет его сорбцию и в особенности десорбцию, так как диссоциация целого набора неодинаковых комплексов антиген—антитело может потребовать вариации условий элюции в весьма широком интервале, вплоть до весьма жестких. Это осложнение снимается, если доступны моноклональные антитела, представляющие собой однородные молекулы иммуноглобулина. Десорбция и в этом случае может доставлять некоторые трудности

из-за прочности комплекса, однако их удается преодолеть, подавляя нековалентные взаимодействия между выделяемым белком и иммуноглобулином при помощи изменения рН, ионной силы, добавления в элюент органических растворителей или мочевины.

Иммуносорбция особенно уместна как высокоспецифичный метод выделения небольших количеств особо ценных белков из сложных смесей, поскольку используемые сорбенты дороги и недолговечны из-за склонности иммуноглобулинов к денатурации. Очень важно, что к иммуносорбции можно прибегнуть даже в таких случаях, когда сведения о свойствах белка, в том числе и о его функции, скудны. Если известна первичная структура, определенная по нуклеотидной последовательности гена, то возможно синтезировать ряд фрагментов его пептидной цепи и, присоединив их к белку-носителю, иммунизировать таким конъюгатом животное. Это дает возможность получить антитела к исследуемому белку, несмотря на то что он не только не выделен, но и его функция пока неизвестна. Иммуносорбенты, синтезируемые присоединением таких антител к подходящему носителю, позволяют выделить белок.

6.6 Перспективы использования белковой инженерии для выделения белков

Методы генной инженерии позволяют присоединять к структурному гену белка последовательности, кодирующие такие белки или их фрагменты (домены), которые облегчают выделение конструкции в целом. Полученный гибридный ("химерный") белок во многих случаях, хотя и не всегда, жизнеспособен, причем обе части "химеры" не зависимо друг от друга свертываются в компактные структуры. Это дает возможность, используя характерные свойства присоединенной к целевому белку структуры, провести специфическое выделение гибрида, после чего расщепить "шарнир", соединяющий обе его части.

Так, белки-гибриды, в которых одной из составных частей является белок А стафилококков, могут быть очищены хроматографией на колонках, содержащих присоединенные ковалентно иммуноглобулины. Белок А прочно связывается с последними. Гибридные белки, в состав которых входит β -галактозидаза или ее крупные фрагменты, могут быть очищены на колонках, специфически сорбирующих этот фермент, например содержащих ковалентно связанный аналог субстрата — амнофенилтиогалактозид. По завершении очистки гибридный белок подвергают ограниченному протеолизу или расщепляют связь между объединенными в его структуре белками специфическими химическими методами, например действием бромциана, и отделяют "целевой" белок от белка-носителя, что, как правило, не составляет затруднений.

Иногда к структурному гену белка присоединяют олигонуклеотидные фрагменты, которые кодируют короткие аминокислотные последовательности, наращивающие этот белок с аминного или карбоксильного конца. Эти последовательности выбирают так, чтобы они не препятствовали свертыванию белка и в то же время сообщали всей конструкции то или иное характерное свойство, которое позволяет легко выделить такую молекулу даже из очень сложной смеси. Затем эти фрагменты отщепляют в мягких условиях.

Вопросы для самоконтроля

1. Разделение белков по молекулярной массе. Гель-хроматография.
2. Ионообменная хроматография белков.

3. Гидрофобная хроматография белков.
4. Аффинная, или биоспецифическая. Хроматография белков.
5. Иммуносорбция.
6. Перспективы использования белковой инженерии для выделения белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Дмитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Дмитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, ЮА. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. [Комов, В.П.](#) Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 7

ОЛИГО- И ПОЛИСАХАХАРИДЫ

7.1 Основные представители олигосахаридов и их свойства

Олигосахариды – продукты конденсации нескольких (от двух до десяти) остатков моносахаридов, соединённых гликозидной связью. Существуют два типа связывания моносахаридных остатков:

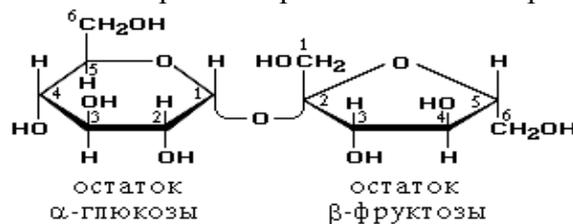
1. За счет полуацетальной группы OH одного моносахарида и любой OH группы другого (1→4 или 1→6), при этом происходит отщепление молекулы воды и образование O-гликозидной связи в α- или β-конфигурации; это группа восстанавливающих дисахаридов;

2. С участием полуацетальных групп OH обоих моносахаридов (1→1 или 1→2); это группа невосстанавливающих дисахаридов.

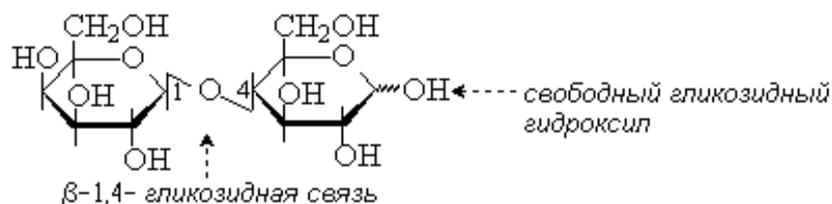


Дисахариды - наиболее распространённые олигомерные углеводы, встречающиеся в свободной форме. По химической природе представляют собой гликозиды, которые содержат 2 моносахарида, соединённые гликозидной связью в α- или β-конфигурации. Основными дисахаридами пищи являются:

Сахароза. Источником служат растения: сахарная свёкла, сахарный тростник. Поэтому тривиальное название сахарозы - "тростниковый сахар".



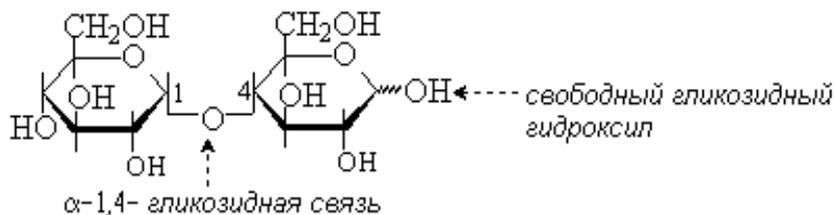
Лактоза – молочный сахар. В лактозе аномерная OH-группа первого углеродного атома остатка D-галактозы связана β-гликозидной связью с четвёртым углеродным атомом D-глюкозы (β-1,4-связь). Лактоза относится к восстанавливающим сахарам.



β-D-галакопиранозил -1,4- α(или β)-D-глюкопираноза (α(или β)-лактоза)

Мальтоза поступает с продуктами, содержащими частично гидролизованный крахмал (солодовый сахар) и также образуется при расщеплении крахмала в

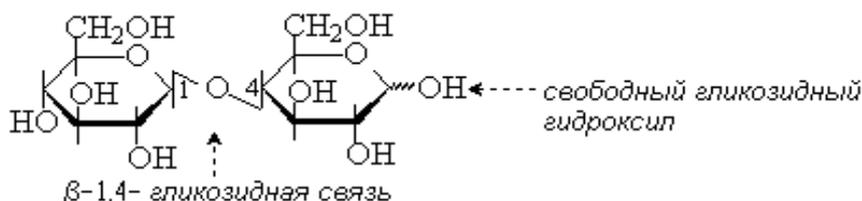
кишечнике. Состоит из двух остатков D-глюкозы, соединённых α -1,4-гликозидной связью.



α -D-глюкопиранозил -1,4- α (или β)-D-глюкопираноза (α (или β)-мальтоза)

Изомальтоза - промежуточный продукт, образующийся при расщеплении крахмала в кишечнике. Состоит из двух остатков D-глюкозы, но соединены эти моносахариды α -1,6-гликозидной связью.

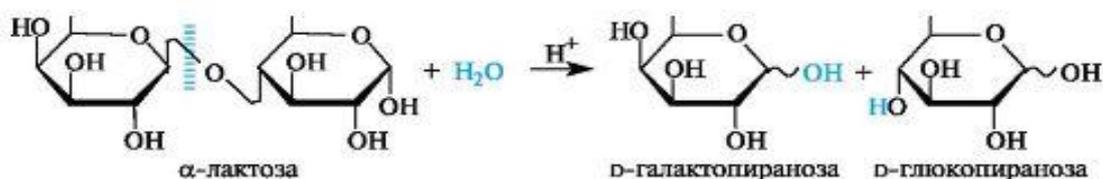
Целлобиоза - дисахарид, в котором остатки двух молекул D-глюкопиранозы связаны β (1-4)-гликозидной связью.



β -D-глюкопиранозил -1,4- α (или β)-D-глюкопираноза
(α (или β)-целлобиоза)

По *химической сути* олигосахариды являются гликозидами, а восстанавливающие олигосахариды обладают еще и признаками моносахаридов, так как содержат потенциальную альдегидную группу (в открытой форме) и полуацетальный гидроксил. Этим и определяется их химическое поведение. Они вступают во многие реакции, свойственные моносахаридам: образуют сложные эфиры, способны окисляться и восстанавливаться.

Наиболее характерной реакцией дисахаридов является кислотный (ферментативный) гидролиз, приводящий к расщеплению гликозидной связи с образованием моносахаридов:



7.2. Особенности полисахаридов

Структурные различия между полисахаридами определяются: строением моносахаридов, составляющих цепь; типом гликозидных связей, соединяющих мономеры в цепи; последовательностью остатков моносахаридов в цепи.

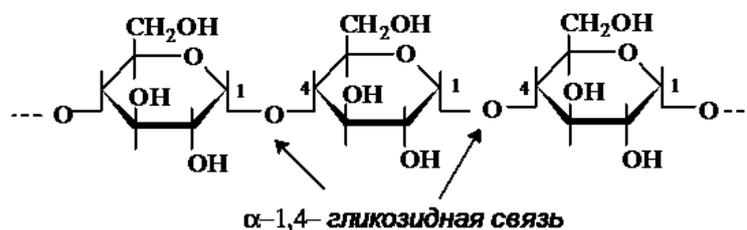
В зависимости от строения остатков моносахаридов полисахариды делят на *гомо-* и *гетерополисахариды*. Оба типа полисахаридов могут иметь как линейное расположение мономеров, так и разветвлённое. В зависимости от выполняемых ими функций делят на 3 основные группы:

- *резервные полисахариды*, выполняющие энергетическую функцию. Могут накапливаться в клетке: крахмал - в клетках растений, гликоген - в клетках животных;
- *структурные полисахариды* обеспечивают клеткам и органам механическую прочность;

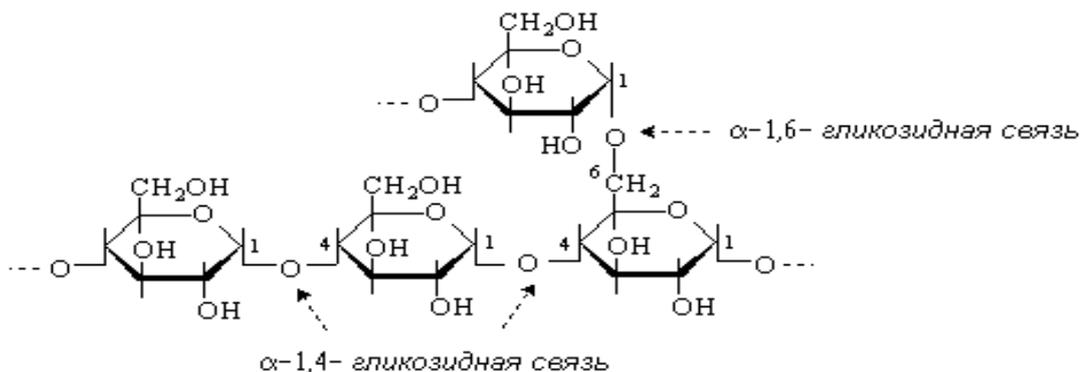
- *полисахариды, входящие в состав межклеточного матрикса*, принимают участие в образовании тканей, а также в пролиферации и дифференцировке клеток.

Крахмал - это резервный полисахарид растений, содержащийся в наибольшем количестве (до 45% от массы сухого вещества) в зёрнах злаков. Находится в клетках растений в виде гранул, практически нерастворим в воде.

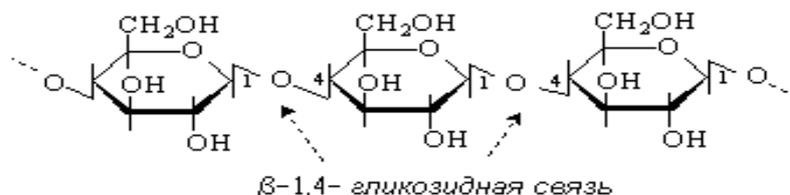
Крахмал - гомогликан, состоит из остатков α -глюкозы и по типу гликозидных связей, соединяющих мономеры в цепи делит на амилозу и амилопектин. Амилоза - неразветвлённый полисахарид, включающий 200-300 остатков глюкозы, связанных α -1,4-гликозидной связью. Благодаря α -конфигурации глюкозного остатка, полисахаридная цепь имеет конформацию спирали.



Амилопектин имеет разветвлённую структуру. В местах ветвления остатки глюкозы соединены α -1,6-гликозидными связями. Линейные участки содержат примерно 20-25 остатков глюкозы. При этом формируется древовидная структура.



Целлюлоза (клетчатка) - основной структурный полисахарид растений. Это линейный гомогликан, построенный из остатков глюкозы, соединённых между собой β -1,4-гликозидными связями. Пищеварительная система человека и моногастричных животных (лошадь) не имеет ферментов, гидролизующих β -связи. Поэтому целлюлоза является балластным веществом и необходима для нормального протекания переваривания.



Гликоген - полисахарид животных и человека. В клетках выполняет резервную функцию, но, так как в пище содержится лишь небольшое его количество, он не имеет пищевого значения. Это структурный аналог крахмала, но имеет большую степень

ветвления: примерно на каждые 10 остатков глюкозы приходится одна α -1,6-гликозидная связь.

Вопросы для самоконтроля

1. Основные представители олигосахаридов и их свойства
2. Особенности полисахаридов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Дмитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Дмитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 8

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

8.1 Строение биомембран

Мембрана – это клеточная граница, служащая, с одной стороны, барьером между содержимым клетки и внешней средой, а с другой – полупроницаемой перегородкой, через которую могут проходить молекулы воды и некоторые из растворенных в ней веществ. Основные сведения о мембранах были получены при изучении следующих типов мембран:

- миелиновой оболочки, которая состоит из плазматических мембран, образуемых так называемыми шванновскими клетками. Они служат как бы «изолятором» нервных волокон;

- плазматических мембран эритроцитов человека;

- мембран бактерий;

- наружных члеников рецепторных клеток сетчатки глаза или палочек.

Основными мембранными структурами клеток являются плазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум, пластинчатый комплекс, митохондриальная и ядерная мембраны.

. Главными компонентами мембран являются белки и липиды. Как правило, в мембранах содержится 50-75% белков. Остальную часть в основном составляют липиды. В мембранах содержится небольшое количество углеводов, за исключением плазматических мембран, где их может быть до 10%. Кроме того, в мембранах присутствуют следы РНК, менее 0,1%. Мембраны одного типа, но в клетках разной специализации отличаются между собой. Так, плазматическая мембрана эритроцитов отличается от плазматической мембраны мышечных клеток. Мембраны одной и той же клетки, но разных частей ее могут быть неодинаковыми. Несмотря на эти различия, все мембраны имеют общий план строения.

Липиды мембран. Способ упаковки белков и липидов приводит к образованию пластинчатых структур или мембран. Именно липиды определяют основные физико-химические свойства мембран: высокое электрическое сопротивление, непроницаемость для ионов и других полярных соединений и проницаемость для неполярных веществ. Установлено, что примерно на 90% липиды мембран представлены фосфолипидами, гликолипидами и холестерином. Фосфолипиды могут быть двух типов: глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды. Глицерофосфолипиды являются производными фосфатидной кислоты.

Из нее после присоединения холина, этаноламина, серина, инозитола или других веществ образуются соответствующие глицерофосфолипиды:

Если фосфолипиды содержат аминспирт сфингозин, то они называются сфингофосфолипидами или сфингомиелинами и являются производными церамидов. Их строение приведено ниже:

В сфингофосфолипидах водород гидроксильной группы у первого атома углерода церамида замещен на фосфохолин, фосфоэтаноламин или фосфосерин.

Другим важным компонентом мембран являются гликолипиды. В них углеводная и липидная части связаны между собой ковалентно. Углеводы в гликолипидах представлены, как правило, моносахаридами или олигосахаридами:

Нередко углеводным компонентом служит N-ацетилнейраминавая кислота.

Такие гликолипиды называются ганглиозидами. За счет гидрофобных взаимодействий углеводородные цепочки липидных молекул удерживаются друг возле друга в вытянутом состоянии, тогда как полярные группы фосфолипидных молекул взаимодействуют с белковыми молекулами, расположенными по обе стороны от липидного бислоя. Еще одним из представителей группы липидов является холестерин. Молекулы фосфолипидов и гликолипидов являются амфифильными. Иными словами, один конец у них гидрофобный, а другой – гидрофильный. Гидрофобный конец – это углеводородные радикалы жирных кислот и сфингозина, их длина составляет примерно 75% от длины всей молекулы. Гидрофильный конец образован углеводной частью или фосфатным остатком, к которому присоединены холин, этаноламин или серин. Амфифильность позволяет липидам в водной среде образовывать различные мультимолекулярные структуры.

Причем, гидрофобные части вытесняются из водной среды и взаимодействуют друг с другом, а гидрофильные контактируют с водой. Указанные особенности чрезвычайно важны для строения биологических мембран; основу мембран составляет бимолекулярный липидный слой.

Третий липидный компонент мембран – холестерин, в основном является гидрофобным соединением. Поэтому в мембранах его вытянутая молекула практически вся находится в гидрофобной части бимолекулярного липидного бислоя. И она ориентирована параллельно гидрофобным цепям фосфолипидов. Гидроксильная группа холестерина примыкает к гидрофильным головкам фосфолипидов. Содержание холестерина в плазматических мембранах всегда выше, чем в мембранах субклеточных структур.

Белки мембран. Различают интегральные белки, они полностью погружены в мембрану, и периферические белки – они располагаются на поверхности мембраны. В гидрофобных белках содержится большое количество аминокислот с гидрофобными радикалами. В результате этого такие белки в липидном бислое занимают строго определенное положение. В плазматических мембранах находятся также гликопротеины, углеводную часть которых составляют моносахаридные или олигосахаридные остатки. Некоторые интегральные белки пронизывают мембрану насквозь. Одним из таких белков является гликофорин – углевод-содержащий белок плазматической мембраны эритроцитов (рис.79).

Гликофорин состоит примерно из 200 остатков аминокислот. К нему присоединено около 20 олигосахаридных цепей длиной по 12 моносахаридов, которые находятся на N-конце и выс-тупают наружу клетки. Гидрофобный участок гликофорина, который прошивает мембрану состоит из 30 аминокислот и имеет конформацию α -спирали. С-гидрофильная часть белка находится в цитозоле и не имеет углеводных цепей.

Мембрана каждого эритроцита содержит около 300 тысяч молекул гликофорина. Белки мембран выполняют разные функции: структурную, каталитическую, трансмембранный перенос соединений, рецепторную и др.

8.2. Свойства биологических мембран

Если мембрану разорвать, то на концах ее поверхностное натяжение будет больше, чем в других местах. Это позволяет краям мембраны стягиваться и сливаться. Каждая мембрана имеет внутреннюю и внешнюю поверхности. Причем свойства их существенно различаются. Так, наиболее типичным фосфолипидом в мембранах эритроцитов многих млекопитающих является фосфатидилхолин, тогда как у жвачных

он заменен сфингомиелином. Далее, большая часть реакционноспособных аминокрупп обнаруживается на внутренних поверхностях мембран. В результате различий в липидном составе мембран, белки в основном присоединяются к внутренним поверхностям мембран, а не к внешним. В то же время углеводная часть гликолипидов находится на внешней поверхности мембран, образуя так называемый гликокалекс. Различия поверхности одной и той же мембраны по составу липидов, белков и углеводов получило название поперечной асимметрии.

Во всех организмах при нормальных физиологических условиях липидные компоненты большинства мембран находятся в жидком состоянии. Жидкое состояние липидов в мембране объясняется тремя причинами:

- липиды мембран в основном содержат ненасыщенные жирные кислоты, понижающие температуру плавления;

- у *Bacillus subtilis*, которые не содержат ненасыщенных жирных кислот при выращивании при 37°C, жирные кислоты в мембране имеют дополнительные метильные группы. Эти группы способствуют понижению температуры плавления и увеличивают площадь поверхности монослоя в 1,5 раза;

- понижение температуры плавления липидов может быть обусловлено также тем, что в их состав входят циклопропансодержащие жирные кислоты.

Молекулы липидов и белков, входящих в состав мембран могут перемещаться друг относительно друга. Это латеральная диффузия. Скорость латеральной диффузии липидов в бислоях и белков (антигенов) на поверхности клеток весьма высока, примерно 10^7 с^{-1} . Кроме того, данные ЯМР и ЭПР показывают, что наружные слои бислоев находятся как бы в более твердом состоянии, чем внутренние. Интегральные белки также способны к латеральной диффузии, однако скорость ее из-за больших размеров белков ограничена. Поперечная диффузия в мембранах практически не регистрируется.

Мембраны эритроцитов, после помещения их в раствор детергента, легко разрушаются. Однако если детергент удалить, то компоненты мембран снова объединяются и образуют мембранные пузырьки. Самосборка мембран происходит потому, что их составные части имеют такое строение, которое отвечает минимуму свободной энергии. Это значит, что информация о структуре и энергия, необходимая для самосборки содержится в самих строительных блоках. При самосборке мембран особое значение имеют гидрофобные взаимодействия между компонентами мембраны и гидрофильные взаимодействия этих компонентов с окружающей водной средой.

Следовательно, основными свойствами мембран являются асимметрия, жидкостность (жидкокристалличность) и способность к самосборке. Эти свойства мембран применяются для создания искусственных структур мембранного типа – липосом. Липосомы используются для изучения свойств мембран и в качестве контейнеров для точной доставки лекарств в пораженный орган.

8.3. Трансмембранный перенос веществ

Транспортные системы выполняют несколько важных функций:

- регулируют объем клетки и поддерживают внутриклеточное значение pH, а также ионный состав в узких пределах колебаний. В результате создаются благоприятные условия для проявления активности ферментов;

- экстрагируют из среды и концентрируют субстраты энергетического и пластического обмена, способствуют выведению токсических веществ;

- создают ионные градиенты, что необходимо для поддержания возбудимости нервов и мышц.

Различают три способа переноса веществ через мембраны: простая диффузия, облегченная диффузия и активный транспорт.

Молекулы воды, диоксида углерода, кислорода, аммиака, мочевины, этанол, гидрофобные низкомолекулярные органические вещества диффундируют через мембраны без участия каких-либо специальных механизмов. Если концентрация веществ по одну сторону мембраны больше, чем по другую, то скорость диффузии в сторону меньшей концентрации будет больше до тех пор, пока сохраняется трансмембранный градиент концентрации. Это простая диффузия.

Для облегченной диффузии, кроме градиента концентрации, необходимы специальные трансмембранные белки-переносчики (транслоказы). Эти белки имеют центр связывания, комплементарный переносимому веществу. Значит, транслоказы обладают высокой избирательностью к переносимым соединениям. После присоединения вещества изменяется конформация белка-переносчика, в мембране открывается канал и соединение освобождается с другой стороны мембраны. Транспорт веществ путем простой и облегченной диффузии называют пассивным транспортом, т.к. при этом перенос происходит по градиенту концентрации. С значительно большей частотой перенос веществ совершается против градиента концентрации. Это *активный транспорт*.

Таким образом, происходит перенос минеральных ионов из межклеточной жидкости в клетку или обратно, перенос аминокислот из просвета кишечника в клетки кишечника, перенос глюкозы из первичной мочи через клетки канальцев почки в кровь. Активный транспорт требует расхода энергии, которая образуется либо при гидролизе АТФ (первично-активный транспорт), либо за счет энергии другого вещества, которое движется по градиенту своей концентрации (вторично-активный транспорт). Подробно представим транспорт против градиента концентрации для ионов натрия (рис.82).

Активный транспорт этих ионов происходит при участии транспортных АТФаз (ионных насосов). Ионные насосы – это белковые устройства, которые избирательно присоединяют ион, при этом гидролизует АТФ, а ее энергия трансформируется в энергию разности концентраций ионов по сторонам мембраны. Три иона Na^+ присоединяются к Na, K-ATPase , этот фермент гидролизует АТФ, при этом остаток фосфата присоединяется к АТФазе. В результате изменяется конформация фермента: ионный канал закрывается с внутренней стороны мембраны и открывается с наружной. В это время сродство центров связывания к ионам натрия уменьшается примерно в 10 раз. В результате три иона натрия покидают фермент и к нему присоединяются два иона K^+ . Эти ионы так изменяют конформацию АТФазы, что создаются условия для отщепления остатка фосфата. При этом ионный канал закрывается с наружной стороны и открывается с внутренней. Сродство к ионам калия снижается и они освобождаются в цитозоль.

Перенос ионов натрия и калия не эквивалентен, т.е. в межклеточное пространство переносится три иона натрия, а в цитозоль – два иона калия. Поэтому одновременно с разностью концентраций этих ионов возникает и разность электрических потенциалов. Так формируется трансмембранный электрохимический потенциал $\Delta\mu$.

Натриевый насос находится в плазматической мембране всех клеток. Он функционирует очень интенсивно. Основная функция натриевого насоса состоит в том, чтобы по обе стороны мембраны создать такую разность потенциалов, которая бы уравновешивала избыток концентрации веществ внутри клетки. Кроме того, натриевый

насос участвует в создании градиента концентрации ионов, необходимого для передачи нервного импульса и для переноса через мембрану веществ путем вторично-активного транспорта.

Активный транспорт необходим и для переноса ионов Ca^{2+} . Этот процесс осуществляется за счет Са-АТФазы (кальциевый насос). Энергия гидролиза одной молекулы АТФ позволяет переносить два иона кальция против градиента концентрации. Са-АТФаза плазматической мембраны переносит ионы кальция из цитозоля клетки в межклеточное пространство. Са-АТФаза эндоплазматического ретикулума переносит ионы кальция из цитозоля в полость ретикулума, создавая внутриклеточное депо таких ионов. Са-АТФаза является необходимым компонентом механизма, регулирующего цикл сокращения и расслабления мышечного волокна.

Некоторые транспортные АТФазы функционируют как протонные насосы (H^+ -АТФазы). Они перекачивают через мембраны ионы водорода. Это приводит к возникновению как разности концентраций протонов (разность рН), так и разности электрических потенциалов – $\Delta\mu\text{H}^+$. Благодаря действию протонной АТФазы в лизосомах, в секреторных гранулах хромоаффинных клеток мозгового слоя надпочечников и др. создается кислая среда, необходимая для функционирования этих структур.

Вторично-активный транспорт. Этот перенос осуществляется за счет энергии градиента концентрации другого вещества. Переносчик, который необходим в этом процессе, имеет специфические центры связывания для обоих веществ. Например, вещество X перемещается путем облегченной диффузии по градиенту концентрации. Переносчик вещества X имеет центр связывания и для другого вещества Y, которое транспортируется попутно (симпорт), в т.ч. и против градиента своей концентрации. Аналогичным образом происходит и антипорт – перемещение вещества против градиента своей концентрации в направлении противоположном перемещению другого вещества по его градиенту концентрации (рис.83). Таков, например, механизм всасывания аминокислот из кишечника и глюкозы из первичной мочи, а также из кишечника. Считают, что для переноса углеводов, аминокислот и других метаболитов вторично-активный транспорт имеет особое, большое значение.

Важным этапом переноса является кинетика трансмембранного переноса веществ. При простой диффузии скорость трансмембранного переноса веществ зависит от градиента концентрации. При облегченной диффузии и активном транспорте особое значение приобретает кинетика насыщения. Это означает, что при насыщающей концентрации переносимого вещества в процесс переноса вовлекаются все центры молекул переносчика, а скорость транспорта становится максимальной и больше увеличиваться не может. Известен яркий пример кинетики трансмембранного переноса. Установлено, что для переносчика глюкозы, который реабсорбирует глюкозу из первичной мочи, насыщающая концентрация этого углевода равна 180 мг/дл (почечный порог). Если концентрация глюкозы в крови больше этого значения, то в моче появляется сахар (гликозурия). Иногда (наследственная почечная гликозурия) почечный порог снижен и гликозурия появляется при концентрации глюкозы в крови около 150 мг/дл. Некоторые лекарственные средства (строфантин, убаин, флоридзин и др.) являются ингибиторами трансмембранных переносчиков.

Экзо- и эндоцитоз. Перенос вещества из среды в клетку вместе с частью плазматической мембраны называется эндоцитозом. Если в клетку вводятся растворимые вещества, то процесс называется пиноцитозом, а если не растворимые вещества, то фагоцитозом (рис.84).

Такая функция клетки широко распространена, но особенно активно эндоцитоз осуществляют лейкоциты, макрофаги и клетки эндотелия капилляров. Многие клетки ритмично, без всякого влияния, поглощают из окружающей среды внеклеточную жидкость и содержащиеся в ней вещества. В других клетках эндоцитоз наступает после контакта лиганда с плазматической мембраной. Наконец, в большинстве клеток имеются специальные рецепторы, которые после присоединения комплементарных лигандов индуцируют эндоцитоз. Для впячивания мембраны и образования эндоцитозного пузырька в клетке имеются специальные белки: клатрин, актин, миозин. Они необходимы для образования мембранного пузырька и отделения его внутрь клетки.

Эндоцитоз – энергозависимый процесс. Потребителями энергии гидролиза АТФ являются микрофиламенты актина и миозина. Именно их сокращение обеспечивает впячивание мембраны и отделение пузырька. Установлено, что некоторые клетки с большой скоростью и постоянно поглощают части собственной мембраны. Так, фибробласты поглощают половину своей мембраны за 1 час, а макрофага – за 15 мин. Естественно, что с такой же скоростью мембраны регенерируют, т.е. общая площадь поверхности клетки остается постоянной. Синтез новой мембраны происходит в аппарате Гольджи. В нем часть мембраны отделяется, образуя пузырек, который перемещается к плазматической мембране и сливается с ней.

Внутриклеточными мембранными пузырьками являются лизосомы. Они содержат большой набор гидролитических ферментов, способных деполимеризовать белки, липиды, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Такие мощные ферменты изолированы от цитозоля мембраной и поэтому не разрушают собственные субклеточные структуры. Это с одной стороны. С другой – ферменты в сильно кислой среде лизосом (рН примерно 5,0) не разрушаются, т.к. они сильно гликозилированы и поэтому недоступны для протеаз. Лизосомы поглощают и разрушают компоненты, которые поступают в клетку путем эндоцитоза из внеклеточной жидкости (гетерофагия) или же, которые образуются в самой клетке (аутофагия). Лизосомы образуются в аппарате Гольджи.

В клетках синтезируются вещества, которые затем должны использоваться в других частях организма. Это белки и гетерополисахариды межклеточного матрикса, белки плазмы крови, пищеварительные ферменты, белковые гормоны, белки и липиды молока. Все эти соединения гидрофильные и мембрана клеток для них непроницаема. Поэтому их секреция происходит путем экзоцитоза, т.е. они, прежде чем выйти из клетки, окутываются мембраной, образовавшейся в аппарате Гольджи, достигают плазматической мембраны, сливаются с ней и содержимое их освобождается во внеклеточную жидкость. Таков основной механизм внутриклеточного переноса гидрофильных соединений. Известны и другие механизмы экзоцитоза.

8.4. Функции биологических мембран

Сложная структура мембран позволяет им обеспечивать многие фундаментальные процессы жизнедеятельности, что невозможно для отдельных макромолекул и других надмолекулярных комплексов. Известны следующие функции биомембран:

- разделительная. Мембраны разделяют внутри- и внеклеточные пространства;
- интегративная. Мембраны объединяют отдельные разрозненные биохимические процессы в единое структурное целое, являясь своеобразными коммуникациями между разными участками клетки;

- транспортная – перенос веществ между различными пространствами клетки и внеклеточной средой;
- осмотическая. Она обеспечивает концентрирование веществ между внутри- и внеклеточными пространствами;
- электрическая. Мембраны создают условия для неравномерного распределения зарядов по обе стороны ее, что приводит к возникновению разности электрических потенциалов;
- энерготрансформирующая. Мембрана обеспечивает превращение электрической и осмотической энергии в химическую энергию АТФ;
- рецепторная. Мембрана воспринимает сигналы из окружающей среды благодаря наличию на ее внешней поверхности специальных белков-рецепторов. Воспринятый сигнал передается внутрь клетки. Причем через рецепторы воспринимаются не только химические, но и фотосигналы (например, фоторецепторами сетчатки глаза);
- регуляторная. Мембраны участвуют в образовании внутриклеточных регуляторов обмена веществ – 3'-5'-АМФ и 3'-5'-ГМФ;
- метаболическая. Благодаря ферментам мембран происходят превращения как природных, так и чужеродных веществ;
- антигенная. Гликопротеины клеточных мембран определяют их способность вызывать образование специфических антител;
- адгезивная, или контакт с другими клетками, зависит от узнающих зон, содержащих углеводные компоненты.

Вопросы для самоконтроля

1. Строение биомембран.
2. Свойства биологических мембран
3. Трансмембранный перенос веществ.
4. Функции биологических мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4

7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-Х
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 9

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

9.1 Общая характеристика и функции нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты (НК) – высокомолекулярные, водорастворимые природные полимеры, содержащиеся в ядрах (nucleus – ядро) растительной, живой или бактериальной клеток, клеточной плазме и рибосомах. Полимерные цепи нуклеиновых кислот построены из мономерных единиц – нуклеотидов, которые, связываясь с белками солеобразными и водородными связями, образуют *нуклеопротеиды*.

Делятся на рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК).

ДНК отвечает за хранение и передачу наследственных признаков. Роль посредника между ДНК и местом синтеза белка выполняет РНК. Процесс синтеза белка на основе генетической информации включает две основные стадии: считывание информации (*транскрипция*) и синтез белка (*трансляция*). Клетки содержат 3 типа РНК:

- *информационная* или *матричная* РНК считывает и переносит генетическую информацию от ДНК, содержащихся в хромосомах, к рибосомам.

- *транспортная* РНК переносит аминокислоты к рибосомам, где они соединяются пептидными связями в определенной последовательности, которая задает м-РНК.

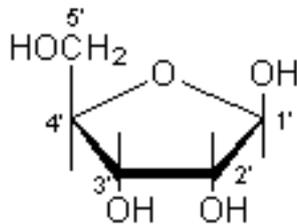
- *рибосомальная* РНК непосредственно участвует в синтезе белков на рибосомах.

Также НК выполняют функции кофакторов, аллостерических эффекторов.

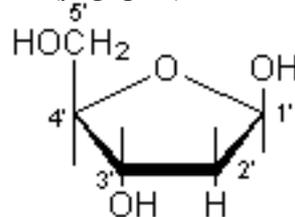
9.2. Химический состав нуклеиновых кислот

Нуклеотид – представляет собой трехкомпонентное образование, включающее гетероциклическое основание, углеводный остаток и фосфорную кислоту.

Углеводными компонентами служат 2 пентозы (β -форма):



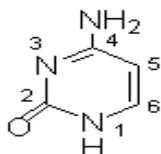
β -D-Рибофураноза



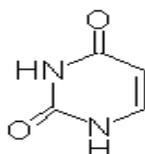
2-Дезокси- β -D-рибофураноза

Азотистыми основаниями являются производные пурина (аденин и гуанин) и пиримидина (цитозин, урацил, тимин), которые входят в состав НК в лактамной форме. Причем, А, Г и Ц входят в состав РНК и ДНК. У – только в РНК, а Т – в ДНК:

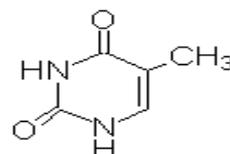
Пиримидиновые основания



Цитозин (Ц)
(4-амино-2-оксопиримидин)

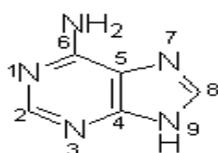


Урацил (У)
(2,4-диоксопиримидин)

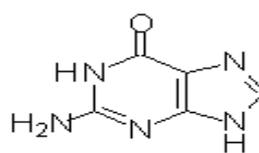


Тимин (Т)
(5-метил-2,4-диоксопиримидин)

Пуриновые основания



Аденин (А)
(6-аминопурин)

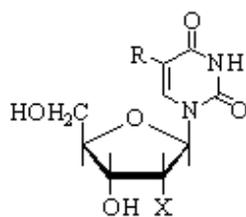


Гуанин (Г)
(2-амино-6-оксопурин)

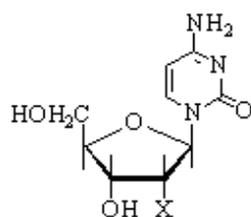
9.3. Схема образования нуклеозида и нуклеотида ДНК и РНК

Пентозы, соединяясь с азотистыми основаниями, образуют **нуклеозиды**. Пуриновые основания присоединяются по 9-му, а пиримидиновые - по 1-му атому азота β -N-гликозидной связью:

Пиримидиновые нуклеозиды

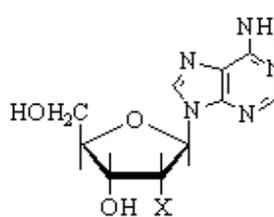


Уридин (R=H, X=OH)
Тимидин (R=CH₃, X=H)

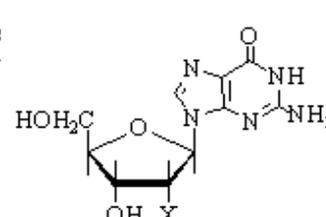


Цитидин (X=OH)
Дезоксицитидин (X=H)

Пуриновые нуклеозиды

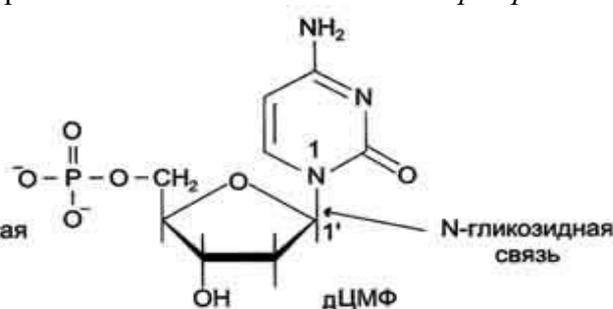
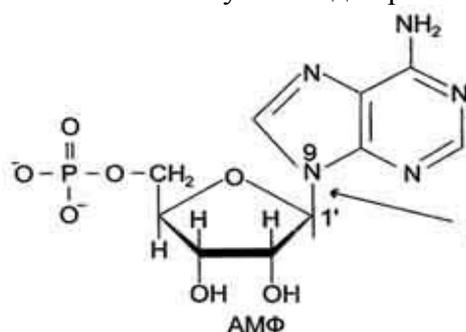


Аденозин (X=OH)
Дезоксиаденозин (X=H)

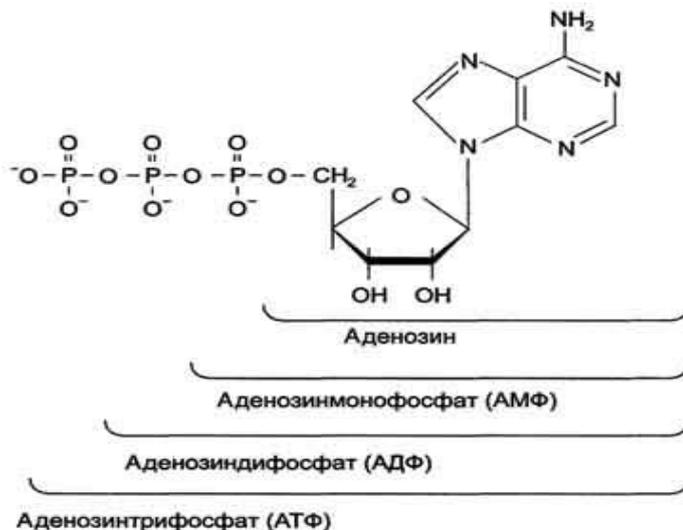


Гуанозин (X=OH)
Дезоксигуанозин (X=H)

Нуклеозид взаимодействует с фосфорной кислотой, которая присоединяется по 5 атому углерода пентозы сложноэфирной связью, с образованием **нуклеотида**. При названии мононуклеотида прибавляется цифра 5' или слово «моно» и слово «фосфат»:

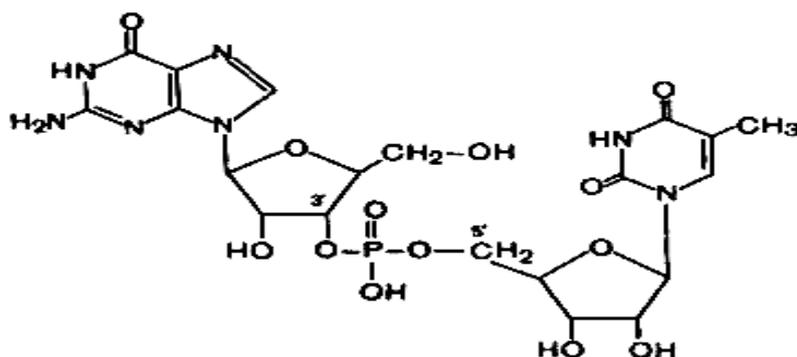


Нуклеозид может присоединять два и три остатка H_3PO_4 , образуя ди- и трифосфаты. При этом ангидридная связь между остатками H_3PO_4 является макроэргической:



9.4. Структура нуклеиновых кислот

Первичная структура НК (ДНК и РНК) – специфический порядок чередования мононуклеотидов (АМФ, ТМФ, ЦМФ, УМФ и ГМФ) в длинной цепи. Мононуклеотиды связаны между собой за счет остатков фосфорной кислоты 3,5-сложноэфирной связью:



Вторичная структура – это форма молекулы в пространстве.

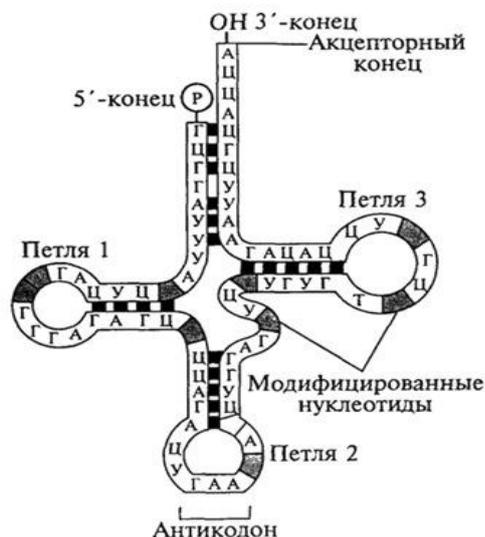
Вторичная структура ДНК: Д. Уотсон и Ф. Крик в 1953 г предложили пространственную модель молекулы ДНК: макромолекула представляет собой спираль, состоящую из двух полинуклеотидных цепей, закрученных вокруг общей оси. Пуриновые и пиримидиновые основания направлены внутрь спирали. Между пуриновым и пиримидиновым основанием возникают водородные связи: А=Т и Г≡Ц (*правило Чаргаффа*). В каждой паре оснований, связанных водородными связями, одно из оснований пуриновое, другое пиримидиновое. Таким образом, две спирали в молекуле ДНК комплементарны друг другу, последовательность нуклеотидов в одной из них однозначно определяет строение другой.

Двухспиральная структура с комплементарностью цепей обеспечивает возможность самоудвоения (*репликации*) этой молекулы.

Вторичная структура РНК: Макромолекулы представляют собой одну полипептидную цепь, принимающую различные пространственные формы, в том числе и спиралеобразные. Число нуклеотидов может колебаться от сотни до нескольких тысяч, что значительно меньше, чем в ДНК.

Полинуклеотидные цепи т-РНК имеют форму «клеверного листа». В ней различают: *акцепторный конец* – к нему прицепляется своей -COOH группой аминокислота.

Антикодоновая петля – содержит специальный триплет нуклеотидов, который кодирует определенную аминокислоту (стандартных триплетов = 64).



Третичная структура РНК – это форма спирали в виде клубка, свернутого листа и др.

Вопросы для самоконтроля

1. Общая характеристика и функции нуклеиновых кислот
2. Химический состав нуклеиновых кислот
3. Схема образования нуклеозида и нуклеотида ДНК и РНК
4. Структура нуклеиновых кислот.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
8. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 10

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК)

10.1 Модель структуры ДНК

В 1953 г. Дж. Уотсон и Ф. Крик предложили модель структуры ДНК. При построении модели они основывались на следующих фактах:

1. ДНК представляет собой полимер, состоящий из нуклеотидов, соединенных 3'-5'-фосфодиэфирными связями.

2. Состав нуклеотидов ДНК подчиняется правилам Чаргаффа: В любой ДНК содержание пуриновых нуклеотидов (А+G) всегда равно содержанию пиримидиновых нуклеотидов (Т+С); число остатков А всегда равно числу остатков Т, число остатков G – числу остатков С.

3. Рентгенограммы волокон ДНК указывают на то, что молекула обладает спиральной структурой и содержит более одной полинуклеотидной цепи.

4. Кислотно-щелочное титрование ДНК показывает, что ее структура стабилизируется водородными связями.

Согласно модели Уотсона - Крика ДНК представляет собой правильную правовинтовую спираль, образованную двумя полинуклеотидными цепями (*вторичная структура*) (рис.7). Две полинуклеотидные цепи имеют *антипараллельную* структуру (в одной цепи фосфодиэфирные связи имеют направление 3'-5', а в другой 5'-3'. Двойная спираль стабилизируется с помощью водородных связей между пуринами одной цепи и пиримидинами другой (А-Т, G-С).

Основания, образующие пары, получили название *комплементарных* (рис.8). В АТ-паре основания соединены двумя водородными связями, в GC-паре – тремя водородными связями, поэтому GC-пары существенно более стабильны. Канонические пары энергетически наиболее выгодны. Кроме канонических, основания способны образовывать другие, неканонические пары. Однако, образование таких пар нарушает геометрию спирали, поэтому неканонические пары в составе ДНК в норме не встречаются. Т.о., последовательность оснований в одной цепи определяет их последовательность в другой. *Комплементарность последовательности оснований в двух полинуклеотидных цепях – ключевое свойство ДНК.*

Пуриновые и пиримидиновые основания уложены в стопку и направлены внутрь спирали, расстояние между парами оснований 0,34 нм. Плоскости колец оснований перпендикулярны главной оси спирали. Длина витка спирали (полный оборот спирали, шаг спирали) – 3,4 нм. На один виток спирали приходится 10 нуклеотидных остатков в одной цепи. Диаметр спирали – 2 нм (20 А).

В водном растворе азотистые основания (являются гидрофобными), располагаются друг над другом, уменьшая тем самым контакт с молекулами воды. При образовании таких стопок во взаимодействие вступают функциональные группы одного основания и пи-электронные системы соседнего с ним по вертикали основания. "Вертикальные" взаимодействия (*стекинг-взаимодействия*) обусловлены в основном ван-дер-ваальсовыми силами. Т.о. вторичная структура ДНК поддерживается водородными связями и стекинг-взаимодействиями.

Двойная спираль имеет 2 бороздки (желобка): малый (около 12 А шириной) и большой (около 22 А).

Позднее было установлено, что модель Уотсона-Крика описывает структуру одной

из нескольких форм двойной спирали, названной *B-формой*. Это основная форма двуспиральной ДНК, в которой большая часть ее молекул существует в клетке.

10.2 Формы двойной спирали

Правые спирали образуют два семейства: А-семейство и В-семейство (отличаются конформацией в молекуле сахара). Структуры в пределах каждого из семейств в зависимости от условий (концентрации соли, температуры) могут иметь разное число пар на виток спирали, разный наклон пар к оси спирали и т.д.

А-семейство ДНК. Еще до открытия двойной спирали Р. Франклин получила экспериментальные свидетельства существования весьма упорядоченной структуры в ориентированных вытягиванием и подсушенных (влажность 75%) волокнах ДНК. Эта структура получила название А-форма ДНК. Этой форме долго не придавали значения, т.к. она возникала при малой влажности, т.е. не при физиологических условиях.

Параметры А-формы: 11 оснований на виток; основания образуют угол 20 градусов к оси спирали; расстояние между парами оснований 0,256 нм; диаметр 2,3 нм (23 А). Требуется присутствие ионов Na^+ , K^+ , Cs^+ .

РНК, как правило, представляет собой одну полинуклеотидную цепь, но, навиваясь сама на себя, она может образовывать короткий участок двойной спирали. Оказалось, что двойная спираль из цепей РНК имеет структуру А-формы при 100% влажности (в этих условиях ДНК всегда существует в В-форме). Это открытие поставило А-конформацию в ряд биологически значимых.

В неблагоприятных условиях некоторые бактерии превращаются в споры. Их ДНК находится в А-форме. В этом состоянии ДНК в 10 раз более устойчива к действию ультрафиолетового излучения.

При транскрипции ДНК в области активного центра РНК-полимеразы (40 н.п.) образуются гибридные спирали ДНК-РНК. Кроме того, гибридные спирали образуются при образовании РНК-праймеров при синтезе ДНК (репликации). Структура таких гибридных спиралей близка к структуре А-ДНК.

В-семейство: Характерно структурное разнообразие.

В-форма: 10 пар оснований на виток; шаг спирали – 3,4 нм; расстояние между парами оснований – 0,34 нм; диаметр спирали – 2 нм (20 А).

С-форма: Образуется при 66% влажности в присутствии ионов Li^{2+} . 9,3 пар оснований на виток; шаг спирали – 3,32 нм; расстояние между парами оснований – 0,332 нм; диаметр 1,9 нм (19 А).

Д и Е-формы. 8 и 7,5 пар оснований на виток, обнаружены в молекулах ДНК, не содержащих гуанина.

Z-форма ДНК: Левая спираль. Обнаружена у полинуклеотида с чередующейся последовательностью dG-dC. В растворе с низкой ионной силой этот полинуклеотид образует двойные спирали В-типа. При высокой концентрации солей (MgCl_2 , NaCl) или добавлении спирта эта двойная спираль переходит в левую Z-форму. Стэкинг-взаимодействия связывают только остатки цитозина.

Параметры: 12 оснований на виток; шаг спирали – 3,71 нм (3,4 нм); расстояние – 0,37 нм; диаметр – 1,8 нм (18 А).

В-форма и Z-форма переходят друг в друга при изменении ионной силы раствора. Для осуществления перехода не требуется расхождения цепей. Он инициируется разрывом водородных связей у нескольких пар оснований.

Наличие в ДНК эукариот последовательности G-C связывают с регуляцией

транскрипции генов. Z-форма имеет огромное значение для спирализации; переход В- в Z-форму на небольшом участке используется клеткой в процессе экспрессии генов. Переход в Z-форму нарушает структуру нуклеосом, и соответственно, структуру нуклеосом. Z-форма, вероятно, выполняет какую-то регуляторную роль. Кроме того, предполагается, что в участках Z-формы происходит кроссинговер.

Каждая форма ДНК имеет малый и большой желобки определенного размера. У Z-ДНК есть только один малый желобок, через который проходит ось спирали, он глубокий и узкий. С различными размерами желобков связана специфическая способность форм ДНК к комплексообразованию. В большей степени они доступны молекулам воды и ионам металлов. Стабилизирующее действие молекул воды направлено на усиление стэкинг-взаимодействий. Гидратация ДНК играет важную роль в превращении А-формы в В-форму и наоборот. Катионы связываются в основном с пентозофосфатным остовом, располагаясь преимущественно в малом желобке двойной спирали (рис.9).

Третичная структура ДНК. Под третичной структурой подразумевается общая форма молекул. На этом уровне структура как белков, так и нуклеиновых кислот не имеет определенных типов с жестко заданными параметрами. ДНК может иметь линейную или кольцевую форму. Третичная структура линейных и кольцевых форм ДНК характеризуется спирализацией и супер(сверх)спирализацией.

Четвертичная структура ДНК - укладка молекул в полимолекулярные ансамбли. Для нуклеиновых кислот это – ансамбли, включающие также молекулы белков (хроматин).

Денатурация и ренатурация ДНК. Водородные связи между комплементарными основаниями могут быть разорваны (при повышении температуры, добавлении спирта и др.); в результате этого разрыва образуются одностранные ДНК. Данный процесс называется *денатурацией (плавлением)*. Обратный процесс восстановления двойной спирали - *ренатурацией*. Температура плавления – 85-90 градусов, увеличивается при увеличении доли G-C пар.

Вопросы для самоконтроля

1. Модель структуры ДНК
2. Формы двойной спирали

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks

5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-Х
5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
8. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 11

РИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (РНК)

11.1 Виды РНК

Содержание РНК в любых клетках в 5-10 раз превышает содержание ДНК. Основная роль РНК состоит в трансляции генетической информации с образованием белков, а также в осуществлении некоторых специализированных эндонуклеазных функций, возможно регулирующих различные этапы экспрессии генов.

Виды РНК.

1. Рибосомальная (рРНК)
2. Транспортная (тРНК)
3. Информационная, или матричная (мРНК)
4. Малые цитоплазматические РНК (мцРНК)
5. Малые ядерные РНК (мяРНК)

Около 80-85% массы клеточной РНК составляют рРНК, около 10% - тРНК. На долю нескольких тысяч различных матричных РНК приходится менее 5% клеточной РНК, а на долю мяРНК и мцРНК – менее 2% от общего количества РНК.

Транспортные РНК. Главная функция - перенос аминокислот к рибосомам. Последовательность тРНК включает 70-90 нуклеотидов. В состав тРНК входит много модифицированных оснований. Вторичная структура – *клеверный лист*. Состоит из двухцепочечных стеблей и трех одноцепочечных петель. Различают акцепторный стебель – к нему присоединяется аминокислота, отвечающая последовательности антикодона триплета в антикодонной петле. Две другие петли носят название псевдоуридиновой и дигидроуридиновой. Для тРНК возможна третичная структура – L-форма. Она является функционально активной (рис.10).

Рибосомные РНК. Являются структурной основой для формирования рибосом. Вторичная структура рРНК характеризуется спирализацией самой на себя полинуклеотидной цепи. Укладываясь в структуры высшего порядка образуют пространственную структуру рибосомы (рис.11).

Матричные РНК. В последовательности нуклеотидных остатков несет информацию, обеспечивающую синтез специфического белка, а также информацию о времени, количестве, месте и условиях синтеза этого белка. В составе мРНК есть информативные, т.е. работающие как матрицы в процессе биосинтеза белка и неинформативные участки (КЭП, НТО, поли А) (рис.12).

мяРНК. Присутствуют в ядре в комплексе с белками. Их обозначают как U-РНК из-за большого содержания урацила. Обнаружены в составе сплайсингосом млекопитающих.

мцРНК. Функция определена только для одной – перенос новосинтезированных и связанных с мембранами полипептидов через липидный слой ЭПР.

11.2 Генетический код

Генетический код – система записи генетической информации, выраженной в последовательности нуклеотидов.

Генетический код читается по РНК и записывается при помощи 4 оснований РНК (А, У, Г, Ц) (рис.13).

Свойства кода.

1. Триплетность. Три нуклеотида кодируют одну аминокислоту. Этого достаточно для кодирования 20 аминокислот ($4^3 = 64$).
2. Неперекрываемость.
3. Вырожденность. Одной аминокислоте соответствует один или несколько кодонов.
4. Вырожденность третьего основания.
5. Коллинеарность. Соответствие последовательности нуклеотидов последовательности аминокислот в полипептиде.
6. Код не имеет "запятых".

Каждый триплет (кодон) мРНК узнается антикодоном тРНК. Существует 64 возможных триплета, в т.ч. 61 -смысловый и 3- стоп-кодона. Каждой из 20 аминокислот соответствует более одного кодона, и более одной тРНК; такие тРНК называются *изоакцепторными*.

Вопросы для самоконтроля

1. Виды РНК
2. Генетический код

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие / Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7

4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова,О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 12-13

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

12-13.1 Трансляция белка

Трансляция (синтез белка) это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с «языка» последовательности нуклеотидов в мРНК «переводится» (транслируется) на «язык» последовательности аминокислот в полипептидной молекуле. Синтез белка протекает в несколько стадий: 1) активация аминокислот; 2) аминоацилирование тРНК; 3) собственно трансляция; 4) посттрансляционная модификация полипептидной цепи. Для биосинтеза белка необходима информация о структуре синтезируемого белка (она заложена в нуклеотидной последовательности мРНК), рибосомы, транспортных РНК, 20 аминокислот, специфические ферменты аминоацил-тРНК-синтетазы, осуществляющие активацию аминокислот и присоединение их к тРНК, белковые факторы трансляции, АТФ и ГТФ, ионы Mg^{2+} .

12-13.2 Белоксинтезирующая система клетки

В состав белоксинтезирующей системы входят следующие компоненты: 1) рибосомные субъединицы 30S и 50S, образующие у прокариот рибосому 70S, или субъединицы 40S и 60S, образующие у эукариот рибосому 80S; 2) мРНК; 3) полный комплект аминоацил-тРНК, для образования которых необходимы аминокислоты, аминоацил-тРНК-синтетазы, тРНК и АТФ; 4) инициаторная aa-тРНК. У прокариот – формилметионил-тРНК, у эукариот – метеонил-тРНК; 5) белковые факторы инициации трансляции. У прокариот – IF-1, IF-2, IF-3, у эукариот 9 факторов: eIF-1, eIF-2, eIF-3, eIF-4A, eIF-4B, eIF-4C, eIF-4D, eIF-5, eIF-6. Для инициации трансляции у эукариот абсолютно необходимы eIF-2, eIF-3 и eIF-5, остальные факторы усиливают функции этих трех; 6) белковые факторы элонгации: у прокариот – EF-Tu, EF-Ts, EF-G (Tu, Ts, G), у эукариот – EF-1 (аналог Tu), EF-2 (аналог EF-G); 7) белковые факторы терминации (или освобождения): у прокариот – RF-1 (R1), RF-2 (R2), RF-3 (S), у эукариот – eRF (для проявления активности ему необходим ГТФ); 8) некоторые другие факторы, еще недостаточно хорошо изученные (факторы диссоциации, ассоциации, высвобождения и др. белки); 9) ГТФ; 10) неорганические катионы Mg^{2+} или Ca^{2+} и одновалентные (K^+ или NH_4^+) в определенной концентрации.

В отличие от прокариот, у эукариот мРНК моноцистронны и каждая мРНК кодирует строение только одной полипептидной цепи. В клетках эукариот синтез белка и транскрипция разобщены. Транскрипция осуществляется в ядре клетки, трансляция в цитоплазме, куда из ядра поступают «зрелые», функционально активные молекулы мРНК. Инициация трансляции Рибосома должна узнать первый триплет кодирующей последовательности и там начать трансляцию. Необходима абсолютно точная инициация, поскольку правильность трансляции мРНК рибосомой зависит от правильной рамки считывания. Если произойдет сдвиг рамки считывания, аминокислотная последовательность полипептида, синтезированного в этом случае, окажется ошибочной, а образовавшийся продукт будет не способен выполнять функции белка, закодированного в данном гене. У эукариот инициация трансляции называется терминальной инициацией. В этом случае 40S-частица сначала присоединяется к 5-концу мРНК, затем движется по мРНК до тех пор, пока не встретит

инициирующий кодон. Этот процесс называют сканированием мРНК; он требует затраты энергии и является АТФ-зависимым. В АТФ-зависимом расплетании вторичной структуры мРНК и сканировании ее первичной структуры участвует специальный эукариотический фактор инициации eIF4, обладающий АТФ-азной и хеликазной активностью. Когда рибосомная частица 40S встречается с иницирующим кодоном, антикодон инициаторной Met-тРНК Met взаимодействует с ним и сканирование прекращается (рибосомная частица нашла начало кодирующей последовательности мРНК). Старт-кодоном в мРНК эукариот также является кодон AUG, но данный триплет может находиться в любой части мРНК, т.к. кодирует аминокислоту – метионин. В связи с этим существуют две различные тРНК, специфичные для метионина. Обе обладают одним и тем же кодоном, но одна используется только для инициации трансляции, а другая – только для включения метионина в процессе элонгации. Инициаторная тРНК имеет структурные особенности, которые распознаются инициаторным белком, или фактором инициации eIF-2, осуществляющим ее доставку к формирующемуся инициаторному комплексу. Образование иницирующего 70S- комплекса у прокариот Участки Р и А окончательно формируются только при присоединении 50S-субчастицы. Во время синтеза белка Р-сайт оккупируется молекулой тРНК, на которой находится растущая полипептидная цепь; А-сайт занят аминоацил-тРНК. Растущая полипептидная цепь проходит через туннель на большой субчастице. Реакции протекают в следующей последовательности. Вначале в результате взаимодействия между белковым фактором EF-Tu и GTP образуется относительно нестабильный комплекс EF-Tu-GTP. Образованный комплекс неспецифически связывает одну молекулу любой aa-тРНК: $EF-Tu-GTP + aa-тРНК \rightarrow aa-тРНК-EF-Tu-GTP$ Далее происходит связывание aa-тРНК-EF-Tu-GTP на R-участке, которое происходит, вероятно, еще во время предыдущего рабочего цикла рибосомы. Комплекс aa-тРНК- EF-Tu-GTP некоторое время удерживается на участке предварительного узнавания (до переноса на А-сайт). Механизм этого переноса остается неизвестным. $70S-мРНК + aa-тРНК- EF-Tu-GTP \rightarrow 70S-мРНК-aa-тРНК- EF-Tu-GTP$ Следующий этап гидролиз GTP до GDP, который остается в комплексе с EF-Tu и H₂O₄. Они высвобождаются из рибосомы. В цитоплазме происходит при участии фактора EF-Ts возвращение EF-Tu-GDP в исходное состояние: $EF-Tu-GDP + EF-Ts + GTP \rightarrow EF-Tu-GTP + EF-Ts + GDP$ Стадия 2. Транспептидация. Свободная NH₂-группа aa-тРНК ориентируется рядом с этерифицированным карбоксилем пептидил-тРНК. Такое пространственное сближение субстратов пептидилтрансферазного центра (ПТЦ) является необходимым и достаточным условием образования между ними пептидной связи. Эта реакция катализируется самим ПТЦ. В процессе транспептидации пептидил, связанный через COO-группу с тРНК в донорном центре, покидает свою тРНК (она становится деацилированной) за счет замыкания пептидной связи переносится на NH₂-группу аминокислоты aa- тРНК. В результате единичной транспептидации пептидил удлиняется на один аминокислотный остаток. Необходимая для этого энергия запасена в сложноэфирной связи пептидила (fmet) и концевом аденозине тРНК. Важным следствием транспептидации является резкое снижение прочности удержания измененных субстратов ПТЦ- деацилированную тРНК в донорном участке и пептидил-тРНК в акцепторном участке, что необходимо для прохождения следующей стадии цикла – транслокации. Стадия 3. Транслокация. После замыкания пептидной связи донорная тРНК, лишившаяся пептидила, занимает донорный участок, а пептидил оккупируется связанным с акцепторной тРНК в А-участке. Такое состояние рибосомы и пептидил-

тРНК называется претранслоцированным. Чтобы рибосома могла присоединить очередную aa-тРНК и образовать следующую пептидную связь, в ней должны произойти пространственные перемещения некоторых компонентов. Этот процесс получил название транслокации. Она включает следующие события: 1). Перемещение пептидил-тРНК с акцепторного на донорный участок – транслокация тРНК; 2). Вытеснение деацилированной тРНК из Р-участка; 3). Перемещение рибосомы вдоль мРНК в направлении 5' → 3' на один кодон и установка в акцепторном участке нового кодона – транслокация рибосомы или транслокация мРНК. Во время транслокации очередная aa-тРНК, вероятно, перемещается из Р-участка в А-участок. Транслокация в клетке происходит с участием белкового фактора EF-G связанного с GTP (транслоказа). Для удаления EF-G из рибосомы, которое происходит сразу после транслокации, необходим гидролиз GTP. Такое состояние рибосомы называется посттранслоцированным. Рибосома способна повторить весь цикл снова. Таким образом, на этап элонгации затрачивается две молекулы GTP. Терминация трансляции – это процесс завершения синтеза п/п цепи и освобождение ее из связи с последней тРНК и рибосомой. Сигналом о завершении трансляции является один из трех бессмысленных кодонов: UAA, UAG, UGA. Помимо терминирующих кодонов в терминации трансляции участвуют три белковых фактора – RF-1, RF-2, RF-3.

Основные стадии терминации:

1). Узнавание терминирующего кодона. Рибосома должна находиться в посттранслоцированном состоянии. 2). Гидролиз сложноэфирной связи между С-концом пептидила и ССА-концом донорной тРНК. 3). Освобождение рибосомы из комплекса с мРНК и тРНК. Фактор ERF, фактор элонгации EF-G и GTP. Механизм неизвестен. 4). Диссоциация рибосомы 70S Эта стадия протекает с участием IF-3, который специфически взаимодействует с 30S, способствует ее отделению от 50S..

12-13.3 Шапероны

Для образования правильной структуры с еще невернувшейся пептидной цепью связываются специальные белки – шапероны. Шапероны обладают сродством к экспонированным гидрофобным участкам п/п цепи. Связывание с шаперонами препятствует агрегации с другими белками и тем самым создает условия для нормального сворачивания растущего пептида. Взаимодействие с шаперонами – процесс энергозависимый: при освобождении шаперонов гидролизуются АТФ. Шапероны принадлежат к трем белковым семействам, т.н. белкам теплового шока – heat shock proteins (hsp60, hsp70, Hsp90). Свое название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры и других формах стресса. При этом они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. Белки – представители семейства hsp70 – связываются на начальной фазе образования растущего пептида. Одни из них контролируют процесс сворачивания белка hsp60 охватывают синтезированный полипептид наподобие бочонка, тем самым обеспечивая условия для принятия правильной конформации. Роль шаперонов в фолдинге полипептидной цепи. Превращение линейной немодифицированной пептидной цепи в полноценный функциональный белок (созревание) осуществляется в результате многостадийного процесса, который начинается сразу же после начала трансляции и протекает в просвете ЭР. Прежде всего соответствующая пептидаза отщепляет сигнальный пептид. Фермент узнает точку расщепления в составе специфической N-концевой последовательности белка. Путем окисления боковых цепей цистеина образуются дисульфидные мостики, правильность положения которых контролируется

протеиндисульфид-изомеразой. Пептидилпролил- изомераза контролирует цис-транс-изомеризацию X-Про-связей в синтезируемом пептиде (3). Трансгликозидазы переносят олигосахариды в блоке с долихолом (длинноцепочечным изопреноидом) на определенные остатки ас- парагиновой кислоты в белке, тем самым осуществляя N-гликозилирование Гликозидазы «подстригают» олигосахариды, отщепляя избыточные остатки глюкозы и маннозы.

Вопросы для самоконтроля

1. Трансляция белка
2. Белоксинтезирующая система клетки
3. Шапероны

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-Х
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.

7. Осипова, О.В. Биорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А. Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 14

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ КОВАЛЕНТНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

14.1 Посттрансляционная модификация

Посттрансляционная модификация – это процесс формирования вторичной, третичной и четвертичной структуры белка, который также совершается при участии ферментов и с затратой энергии.

Многие белки и секретируемые пептиды претерпевают различные структурные изменения в результате котрансляционных и посттрансляционных модификаций, т.е. во время или после завершения их синтеза рибосомами. Описано более 100 различных посттрансляционных модификаций белков. Роль большинства этих модификаций не выяснена; некоторые из них случайны и, по-видимому, не имеют функционального значения, но есть и такие, которые важны для жизни клетки, так как они тщательно контролируются специфическими ферментами. Модификации происходят в эндоплазматической сети и аппарате Гольджи. В этих органоидах, например, ферменты гликозилирования добавляют к белкам сложные цепи остатков сахаров, образуя гликопротеины. Единственный известный случай гликозилирования в цитозоле клеток млекопитающих – это добавление к белкам N-ацетилглюкозамина. Однако множество других ковалентных модификаций протекает в первую очередь именно в цитозоле. Некоторые из них стабильны и необходимы для активности белка, например, ковалентное присоединение коферментов (биотина, липолевой кислоты или пиридоксальфосфата).

Одной из широко распространенных химических постсинтетических модификаций является фосфорилирование остатков серина и треонина, например, в молекуле гистоновых и негистоновых белков, а также казеина молока. Фосфорилирование OH-группы серина абсолютно необходимо для множества ферментов, например для активности гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы. Фосфорилирование некоторых остатков тирозина в молекуле белка в настоящее время рассматривается как один из возможных и специфических этапов формирования онкобелков при малигнизации нормальных клеток. Этим обеспечивается не только защита от внешних денатурирующих агентов, но и образование нативной конформации и проявление биологической активности.

Определенные ковалентные модификации, происходящие в цитозоле, обратимы и служат для регуляции активности многих белков.

Посттрансляционные модификации включают в себя фосфорилирование факторов транскрипции протеинкиназами, гликозилирование, N-концевое ацилирование, циклизацию N-концевого остатка с образованием пироглутаминовой кислоты, C-концевое аминирование последовательностей освобождающихся пептидов, гидроксильное, метилирование различных остатков аминокислот.

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям, либо будучи ещё связанными с рибосомами, либо после завершения синтеза. Эти конформационные и структурные изменения полипептидных цепей получили название посттрансляционных изменений. Они включают удаление части полипептидной цепи, ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов, приобретение белком нативной конформации.

Многие модификации осуществляются в ЭР. Здесь происходят фолдинг

полипептидных цепей и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков. Причём для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное формирование дисульфидных связей.

14.2 Частичный протеолиз

Многие белки, секретируемые из клеток, первоначально синтезируются в виде молекул-предшественников, функционально неактивных. Удаление части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами приводит к образованию активных молекул. Некоторые белки-предшественники расщепляются в ЭР или аппарате Гольджи, другие - после секреции. Так, неактивные предшественники секретируемых ферментов - зимогены - образуют активный фермент после расщепления по определённым участкам молекулы: зимоген панкреатической железы трипсиноген превращается в активный трипсин после секреции в тонкий кишечник.

Наглядным примером последовательного двухстадийного протеолиза служит образование активных форм пептидных гормонов (например, инсулина или глюкагона) из препрогормонов. Первоначально N-концевой сигнальный пептид молекулы-предшественника удаляется в ЭР в процессе синтеза белка и образуется неактивный прогормон. Затем прогормон в секреторных гранулах, формирующихся в аппарате Гольджи, подвергается действию эндо- и/или экзопротеаз и превращается в активный гормон.

14.3 Ковалентные модификации

Структурные белки и ферменты могут активироваться или инактивироваться в результате присоединения различных химических групп: фосфатных, ацильных, металльных, олигосахаридных и некоторых других.

Фосфорилирование белков осуществляется по гидроксильным группам серина, треонина и, реже, тирозина ферментами из группы протеинкиназ, тогда как дефосфорилирование катализируют гидролитические ферменты фосфопротеинфосфатазы (см. раздел 2).

Гликозилирование. Белки, входящие в состав плазматических мембран или секретирующиеся из клеток, подвергаются гликозилированию. Углеводные цепи присоединяются то гидроксильным группам серина или треонина (O-гликозилирование) либо аспарагина (N-гликозилирование). Последовательное наращивание углеводного фрагмента происходит в ЭР и аппарате Гольджи.

Многочисленным модификациям подвергаются боковые радикалы некоторых аминокислот: в тиреоглобулине йодируются остатки тирозина; в факторах свёртывания крови карбоксилируются остатки глутамата; в ЭР фибробластов гидроксилируются остатки пролина и лизина в цепях тропоколлагена.

Вопросы для самоконтроля

1. Посттрансляционная модификация
2. Частичный протеолиз
3. Ковалентные модификации

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
6. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
7. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
8. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
9. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Лекция 15

ПРОБЛЕМЫ КЛОНИРОВАНИЯ ДНК

15.1 Принципы генной инженерии

Важную роль в становлении генной инженерии сыграло открытие явления *специфической трансдукции* бактериальных генов некоторыми умеренными фагами. Это явление дало возможность сформировать представления о молекулах-переносчиках генов.

В начале 1970-х годов широкое распространение получили исследования нуклеиновых кислот *in vitro*, а также направленное применение методов физико-химической биологии, позволившее синтезировать, выделять и перемещать гены. Таким образом, созрели условия для перехода от *анализа генов к их синтезу*, от *изучения генетической природы организмов к их переработке*.

Считают, что генная инженерия как самостоятельная отрасль науки зародилась в 1972 году, когда в лаборатории лауреата Нобелевской премии Пола Берга была получена *in vitro* первая рекомбинантная молекула ДНК путем объединения линейных фрагментов ДНК с помощью искусственно созданных у них «липких» концов.

Принято считать, что генная инженерия состоит из двух разделов - собственно *генной инженерии* и *геномной инженерии*. Собственно генная инженерия методами *in vivo* и *in vitro* решает задачи введения в геном *реципиентной клетки* одного или нескольких чужеродных генов, либо создания в геноме новых типов регуляторных связей. В этих случаях видовая принадлежность реципиентных организмов не изменяется, но появляются не свойственные им признаки.

Перед геномной инженерией стоят задачи более глубокого вмешательства в геном, вплоть до создания новых видов организмов. Методы решения таких задач различны для вирусов, а также для прокариотических и эукариотических клеток.

Основными объектами генно-инженерных экспериментов были и до сих пор остаются различные бактериальные штаммы *Escherichia coli* (например, штамм К-12), *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*, *Streptomyces pneumoniae*, а также некоторые штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и другие микроорганизмы. Основными методами являются:

- 1) мутагенез (спонтанный или вызванный мутагенами) и последующая селекция;
- 2) рекомбинация ДНК, которая, в свою очередь, подразделяется на общую, или гомологичную, генетическую рекомбинацию и генетическую рекомбинацию с использованием *подвижных генетических элементов*.

Рекомбинацию генов и целых наборов генов можно осуществить в условиях *in vitro* и получить при этом сочетания генов, не встречающиеся в природных условиях. Разработанная в последние 30-35 лет технология конструирования рекомбинантных ДНК с применением векторных молекул ДНК является важнейшим достижением современной молекулярной биологии.

Генная инженерия, или *техника рекомбинантных ДНК* — это набор различных методов молекулярной биологии, позволяющий, что очень важно, в условиях *in vitro* переносить *наследуемый* генетический материал из одного *организма - донора* в другой *организм - реципиент*. Перенос генетического материала в условиях *in vitro* позволяет преодолевать межвидовые различия и передавать только отдельные признаки.

В общем виде процесс встраивания чужеродного фрагмента ДНК связан с

использованием генетического материала реципиентной клетки, который может быть выделен в чистом виде и после рекомбинации снова возвращен в реципиентную клетку. Таким образом, основные задачи, которые необходимо решать при встраивании и осуществлении экспрессии чужеродных генетических элементов в реципиентных клетках сводятся к следующему:

1) выделение соответствующей молекулы ДНК реципиента, при этом данная векторная ДНК должна сохранять способность к репликации и транскрипции после рекомбинации;

2) полученная рекомбинантная ДНК должна стабильно наследоваться;

3) в распоряжении исследователя должны быть различные способы соединения *отдельных чужеродных генов с вектором* (наличие полного арсенала рестриктирующих эндонуклеаз, а также других вспомогательных ферментов) и методы введения *рекомбинантного вектора* в реципиентную клетку;

4) наличие методов и подходов, позволяющих отличать клетки, несущие рекомбинантную ДНК, от всех других клеток;

5) решение проблемы экспрессии гена, встроенного в вектор, особенно в случае экспрессии генов эукариот в реципиентной прокариотической клетке. Эта проблема неизбежно возникает при попытках экспрессировать гены, выделенные из эукариотических клеток, и сложность данного этапа связана с необходимостью предварительного удаления интронов из генов эукариот. Хорошо известно, что прокариотические иРНК не содержат интронов и, соответственно, бактериальные клетки, в том числе наиболее часто используемые в генно-инженерных работах, не имеют ферментативного аппарата сплайсинга.

Возможность проведения различных манипуляций с ДНК *in vitro* всецело зависит от наличия высокоочищенных ферментов, которые способны специфически разрезать, модифицировать и соединять различные фрагменты ДНК. До сих пор отсутствуют чисто химические методы, с помощью которых можно было бы осуществлять перестройки молекул ДНК с такими же селективностью и разнообразием, которые характерны для ферментативных реакций. Часто даже с помощью довольно небольшого числа ферментов удается получать рекомбинантные молекулы ДНК. Большая часть ферментов, используемых в генно-инженерных работах, была открыта при обстоятельствах, никак не связанных с их применением при получении рекомбинантных ДНК. В действительности каждый фермент предназначен для катализа того или иного естественного химического процесса, протекающего в клетке, из которой он был выделен. Использование же ферментов в качестве *инструмента* при манипулировании с ДНК *in vitro* зависит, во-первых, от их доступности и стабильности, во-вторых, от степени их чистоты и наличия или отсутствия примесей, способных влиять на ферментативную активность.

Эволюция наделила различные виды бактерий уникальными рестриктирующими эндонуклеазами, позволяющими им отличать их собственную ДНК от чужеродной. Тем самым природа снабдила исследователей уникальным набором высокоспецифичных «реактивов», позволяющих осуществлять разрезание молекул ДНК только по определенным точкам. Огромное значение имеют две важные особенности рестриктирующих эндонуклеаз. Первая связана с замечательной способностью каждого фермента узнавать свои специфические короткие нуклеотидные последовательности в ДНК. Вторая состоит в том, что в бактериальных клетках разных видов существует большое количество различных эндонуклеаз рестрикции, каждая из которых узнает и разрезает определенную последовательность.

Для соединения выделенных фрагментов чужеродной ДНК и реципиентной ДНК используется набор рестрикционных эндонуклеаз (рестриктаз). Отдельные свойства и типы рестриктаз рассматривались ранее в разделе, описывающем системы рестрикции и модификации у прокариот. Основным инструментом при конструировании рекомбинантных молекул ДНК и при анализе структуры ДНК являются рестриктазы т.н. второго типа, способные создавать "липкие концы".

Характерной особенностью рестриктаз является их способность действовать только на двухцепочечные молекулы ДНК. Ферменты рестрикции типа II узнают специфические короткие нуклеотидные последовательности и связываются с ними, но в отличие от эндонуклеаз типов I и III они производят двухцепочечные разрезы по специфическим фосфодиэфирным связям либо в пределах самого сайта узнавания, либо на вполне определенном расстоянии от него. Ферменты типа II гидролизуют фосфодиэфирные связи между 3'-гидроксильной группой и фосфатом, в результате чего образуется 5'-фосфатная группа с одной стороны от разрыва и 3'-гидроксильная группа - с другой. Широко используемая рестриктаза типа II, которую выделяют из штамма *Escherichia coli* K12 - *Eco* III, разрезает молекулы ДНК в тех местах, где присутствует последовательность:



Можно видеть, что данная последовательность представляет собой палиндром. *Eco* RI гидролизует фосфодиэфирные связи между остатками G и A в каждой цепи. Поскольку рестриктаза *Eco* RI расщепляет обе цепи в тех местах, где встречается палиндромная последовательность, каждая молекула ДНК может быть разрезана на характерный для нее набор фрагментов (метод *finger print* - "отпечатков пальцев").

Фермент производит ступенчатые двухцепочечные разрезы, при этом у фрагментов ДНК на 5'-концах образуются короткие комплементарные одноцепочечные уступы из четырех нуклеотидов:

В зависимости от ионной силы раствора и температуры, короткие комплементарные участки после расщепления соответствующих связей могут либо оставаться спаренными, либо денатурировать, и тогда образуются отдельные фрагменты с упоминавшимися выше выступами на 5'-концах. Сформированные в результате эндонуклеолитического расщепления рестриктазами II типа концы получили название «липких» вследствие того, что при последующем их взаимодействии друг с другом формируются гоуг-ршон-ные двухспиральные участки.

Важным следствием образования ступенчатых разрывов при действии определенных рестриктаз является то, что полученные фрагменты двух разных ДНК могут соединяться с помощью «липких» концов в соответствии с правилом комплементарности. При этом видовые различия в структуре ДНК на процесс соединения фрагментов не влияют. Другими словами, если обработать ДНК вектора и встраиваемую чужеродную ДНК одной и той же рестриктазой, специфичной к какой-либо определенной последовательности, то в результате акта рестрикции будут получены совершенно одинаковые «липкие» концы у молекулы вектора и у встраиваемого фрагмента ДНК. В результате последующей совместной инкубации вектора и встраиваемого фрагмента ДНК (данная процедура получила название «отжиг»), вследствие комплементарности «липких» концов, происходит самосборка вектора с чужеродным фрагментом ДНК.

15.2 Лигирование рекомбинантной ДНК

Таким образом, получение рекомбинантных молекул ДНК включает объединение *in vitro* сегментов ДНК из различных источников. В результате «отжига» эти сегменты достаточно легко соединяются благодаря наличию «липких» концов, однако водородные связи, удерживающие их вместе, в обычных условиях оказываются относительно слабыми и легко разрушаются. Для прочного ковалентного сшивания фрагментов используют ДНК-лигазу, которая, как известно, катализирует образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами. Чтобы лигирование было успешным, в объединяемых двухцепочечных фрагментах должен произойти отжиг комплементарных («липких») концов. В этом случае происходит лигирование обеих цепей. Уникальная ДНК-лигаза фага T4 (но не лигаза *E. coli*) способна соединять двухцепочечные молекулы ДНК с «тупыми» концами (хотя и с низкой эффективностью), катализируя образование фосфодиэфирных связей в обеих рекомбинируемых цепях.

В процессе конструирования рекомбинантных ДНК широкое применение находят короткие синтетические олигонуклеотиды. Для того чтобы придать фрагменту нуклеиновой кислоты необходимые для встраивания в определенный участок векторной молекулы «липкие» концы, синтезируются так называемые *линкеры* - двухцепочечные олигонуклеотиды, которые содержат какую-либо последовательность, расщепляемую той или иной рестрикционной эндонуклеазой.

В большинстве случаев в качестве линкеров применяются самокомплементарные олигонуклеотиды длиной 8–10 нуклеотидных звеньев.

При работе с рекомбинантными молекулами ДНК часто бывает необходимо заменить один тип «липких» концов на другой. Такая ситуация возникает в тех случаях, когда «вырезание» встраиваемого фрагмента целесообразно осуществить с помощью одной рестриктазы, а удобный сайт разрезания векторной ДНК специфичен к другой рестриктазе. Для соединения таких молекул ДНК используются *адапторные линкеры* - частично двухцепочечные олигонуклеотиды, содержащие «липкие» концы, соответствующие двум разным рестрикционным эндонуклеазам.

Одним из этапов синтеза искусственных двухцепочечных фрагментов ДНК является их клонирование в составе многокопийного вектора с тем, чтобы химически синтезированная последовательность могла быть наработана в достаточных количествах. Для этого синтез фрагментов осуществляют таким образом, чтобы они содержали на концах участки, идентичные получающимся при расщеплении ДНК, определенными рестрикционными эндонуклеазами, например, *Eco* RI и *Bam* HI. Таким образом, химически синтезированный фрагмент может быть вставлен в векторную плазмиду и клонирован в *E. coli* (рис. 10.5 на цв. вкл.). При необходимости размножившуюся рекомбинантную плазмиду выделяют из бактериальных клеток, а интересующий исследователя фрагмент вырезают под действием тех же двух рестриктаз.

В тех случаях, когда возникает необходимость синтезировать ген, обладающий большими размерами, процедуру синтеза планируют таким образом, чтобы можно было клонировать составные части последовательности гена по отдельности. Для успешного клонирования модулей синтетического гена в определенных участках его последовательности должны присутствовать подходящие сайты, узнаваемые рестриктазами. Наличие таких рестрикционных сайтов необходимо:

- 1) для введения каждого модуля в векторную ДНК;

- 2) регенерации каждого фрагмента из векторной молекулы после клонирования;
- 3) соединения отдельных частей гена с целью получения полной нуклеотидной последовательности.

Обычно для этого используются сайты, исходно присутствующие в последовательности синтезируемого гена.

Однако чаще всего необходимых внутренних рестрикционных сайтов в синтезируемом гене либо нет, либо их мало. Это сильно ограничивает возможности химико-ферментативного синтеза ДНК и создает необходимость использования специальных приемов.

В основе молекулярного клонирования лежит встраивание нужного фрагмента ДНК в другую молекулу ДНК, которая способна реплицироваться в соответствующей клетке-хозяине. Молекулы ДНК, используемые для переноса встроеного материала в бактериальные клетки, называют *векторами*. Такое встраивание осуществляется *in vitro*, а затем полученные рекомбинантные ДНК вводят в клетки. Векторная молекула непременно должна содержать точку начала репликации - *ori*. Кроме того, для репликации необходимы специфические ферменты и вспомогательные белковые факторы. Их источником служит клетка-хозяин или они кодируются самим вектором. Вектором может быть любой небольшой внехромосомный элемент - плаزمид, ДНК фага или ДНК вируса. Каждый из этих элементов встречается в природе в клетках определенных видов, и большинство из них реплицируется только в природном хозяине или клетках близкородственных видов. В большинстве случаев эволюция механизма репликации внехромосомных генетических элементов протекала в направлении создания оптимальных условий для их размножения в клетке. При этом клетка-хозяин выступала поставщиком метаболитов, ферментов, белковых факторов, а также предоставляла свой аппарат белкового синтеза. Поэтому главным инструментом молекулярного клонирования всегда является двухкомпонентная система - совместимое сочетание хозяина и вектора.

Наиболее широко применяются такие комбинации, когда в роли хозяина выступает штамм *E. coli* K12, а в роли вектора - плазмиды и разные фаги *E. coli*. Предпочтительное использование этого штамма обусловлено тем, что именно в клетках *E. coli* K12 беспрепятственно реплицируются многие бактериофаги и плазмиды, которые могут быть использованы в качестве потенциально полезных векторов. Детальное знание свойств штамма *E. coli* K12 и соответствующих векторов позволило использовать его в экспериментах с рекомбинантными ДНК.

Другими известными системами хозяин - вектор являются системы на основе *Bacillus subtilis*. Наиболее целесообразно их применение в тех случаях, когда ставится задача получения в большом количестве конкретного белка, кодируемого клонированным геном.

В настоящее время существует много разных способов классификации плазмид. В основу одного из них использования модульных сегментов ДНК. Каждый модульный сегмент может содержать один или несколько генов, или цис-действующих элементов таких, как, например, локус *ogg*. Функционально родственные модули в различных и независимо выделенных плаزمидках часто оказываются и структурно родственными. Каждая плаزمидка должна иметь, по крайней мере, один репликационный модуль, который позволит ей активно размножаться в реципиентной клетке. Репликация и сегрегация (разделение) F-плазмид регулируются согласованно с репликацией бактериального генома, и в каждой клетке содержится одна или две копии плазмиды. О таком типе репликации говорят как о репликации со строгим контролем. Второй тип

репликационного модуля свободен от такого контроля, что приводит к появлению в клетке многих копий плазмид. Подобный тип репликации получил название репликации с ослабленным контролем. Наличие других модулей, отличных от репликационных, не является обязательным для каждой конкретной плазмиды. Половые факторы, называемые конъюгативными плазмидами (например, F-фактор), имеют модули, содержащие гены и регуляторные области, необходимые для переноса плазмиды из одной клетки в другую. Половые факторы, несущие фрагменты ДНК, полученные от бактериальной хромосомы, отмечают штрихом.

Модули другого типа содержат гены, белковые продукты которых обеспечивают инактивацию антибиотиков. Плазмиды, несущие такие модули, часто называют R-плазмидами (от англ. resistance - устойчивость). Нередко одна плаزمиды придает устойчивость к нескольким антибиотикам, при этом несколько или даже все гены резистентности разного типа могут быть сгруппированы в одном модуле. Некоторая часть R-плазмид не способна осуществлять функцию полового фактора, поскольку они не содержат модуля конъюгации. Тем не менее некоторые из неконоъюгативных плазмид могут быть перенесены из одной клетки в другую, если они совмещены в донорной клетке с половым фактором.

Использование плазмидных векторов предусматривает клонирование и отбор клеток, содержащих рекомбинантную плазмиду. Рекомбинантный фаговый геном легко клонировать непосредственно. При таком клонировании на газоне чувствительных клеток-хозяев образуются бляшки - светлые полупрозрачные концентрические участки. Фрагмент чужеродной ДНК, встроенный в фаговую векторную ДНК *in vitro*, можно ввести в клетки подходящего хозяина как в виде изолированной ДНК (трансакция), так и в форме реконструированных вирусных частиц (инфекция). В любом случае в клетке, инфицированной молекулой рекомбинантного вирусного вектора, образуется вирусное потомство, которое лизирует клетку и будет инфицировать соседние клетки, что в конечном **итоге** и приводит к формированию бляшек или, как их еще называют, негативных колоний. Само по себе образование бляшек уже свидетельствует об успехе инфекции (или трансфекции). В целом же фаговые векторы более эффективны, чем плазмидные, особенно при клонировании крупных вставок, и скрининг большого числа негативных колоний на содержание вставки провести проще, чем скрининг большого количества бактериальных колоний. Самыми распространенными векторами для *E. coli* являются два бактериофага - фаги λ и M13.

Космиды - один из типов гибридных векторов, которые характеризуются плазмидным типом репликации и обладают способностью упаковываться в условиях *in vitro* в головки фага λ . Типичная космида содержит область начала репликации, включает уникальные сайты рестрикции и селективные маркеры, принадлежащие плазмидной ДНК, которая объединена с фрагментом ДНК фага λ , содержащим фаговые «липкие» концы (cos-сайты).

При расщеплении фаговой ДНК с помощью соответствующих рестриктаз образуются фрагменты, часть которых содержит cos-сайты. Эти фрагменты включают в стандартный плазмидный вектор. Для последующей упаковки космидной ДНК, несущей вставку, достаточно, чтобы фрагмент с cos-сайтом имел длину всего 250 пар нуклеотидов. Однако важно, чтобы этот фрагмент содержал cos-сайт и последовательность, необходимую для связывания терминазы.

Если кольцевую космидную ДНК разрезать по какому-либо сайту рестрикции, смещать с фрагментом чужеродной ДНК, содержащим такие же «липкие» концы, и осуществить отжиг, то образуются длинные конкатемеры. При добавлении к

конкатемерам белков, обеспечивающих упаковку ДНК фага ДНК разрезается терминазой по *sos*-сайтам и упаковывается в головки обычным способом.

Характерной особенностью большинства космидных векторов является их способность включать вставки ДНК размером до 45 000 пар оснований, поскольку, как известно, успешная упаковка ДНК в головки фага λ происходит тогда, когда расстояние между *sos*-сайтами составляет от 38 000 до 52 000 пар нуклеотидов.

Реципиентные клетки-хозяева приобретают упакованные в вирионы космиды в результате инфицирования «фальшивыми» фаговыми частицами. Попав в клетку, рекомбинантная ДНК амплифицируется и сохраняется в ней в виде плазмиды.

К настоящему времени разработано несколько эффективных систем переноса ДНК и экспрессирующих векторов, которые работают в ряде растительных клеток. Одним из важнейших методов такого рода является трансформация растений *Ti*-плазмидой из *Agrobacterium tumefaciens*.

Грамотрицательная почвенная бактерия *Agrobacterium tumefaciens* — фитопатоген, который в процессе своего жизненного цикла трансформирует клетки растений. Эта трансформация приводит к образованию корончатого галла — опухоли, нарушающей нормальный рост растения. Этой болезни, имеющей серьезные агрономические последствия, подвержены только двудольные растения, в частности виноград, косточковые фруктовые деревья, розы.

Образование корончатого галла начинается с проникновения, интеграции в геном растительных клеток и экспрессии специфического сегмента бактериальной плазмидной ДНК — так называемой Т-ДНК (от англ. transferred DNA). Т-ДНК — это часть плазмиды, индуцирующей развитие опухоли (tumor-inducing plasmid, *Ti*-плазмиды); ее несут большинство штаммов *A. tumefaciens*.

Длина Т-ДНК варьирует от 12 до 24 т. п. н. в зависимости от штамма. Штаммы *A. tumefaciens*, не содержащие *Ti*-плазмиды, неспособны индуцировать развитие корончатого галла.

Инфекционный процесс начинается с прикрепления *A. tumefaciens* к клеткам растения в месте повреждения, часто у основания стебля (у корневой шейки). Ранее предполагалось, что *A. tumefaciens* заражает именно поврежденные растения вследствие разрушения клеточной стенки и устранения физического барьера, затрудняющего проникновение бактерий в клетку. Однако сейчас считается, что все дело в специфических фенольных соединениях, ацетосирингоне и гидроксиацетосирингоне, которые выделяет поврежденное растение. Эти соединения сходны с некоторыми продуктами основного пути синтеза у растений вторичных метаболитов, таких как лигнины и флавоноиды. Ацетосирингон и гидроксиацетосирингон активируют гены вирулентности (*vir*), которые локализованы в участке *Ti*-плазмиды длиной 35 т. п. н., находящемся за пределами Т-ДНК. Продукты *vir*-генов необходимы для транспорта и интеграции Т-ДНК в геном растительной клетки. Существуют по меньшей мере семь разных *vir*-генов. После присоединения *A. tumefaciens*, несущей *Ti*-плазмиду, к растительной клетке и активации *vir*-генов Т-ДНК транспортируется в клетку, по-видимому, с помощью механизма, аналогичного механизму переноса плазмидной ДНК из донорной клетки в реципиентную в процессе конъюгации. При этом Т-ДНК находится в одноцепочечной форме, и именно в такой форме она встраивается в хромосомную ДНК растения.

Достижения молекулярной биотехнологии позволяют разрабатывать подходы для лечения наследственных заболеваний. Методы генной терапии можно отнести к двум принципиально различным классам: *in vivo* и *ex vivo*.

Генная терапия *ex vivo*, как правило, включает следующие этапы:

1. Получение клеток от больного.
2. Исправление генетического дефекта с помощью переноса нужного гена в изолированные клетки.
3. Отбор и наращивание генетически «исправленных» клеток.
4. Инфузия или трансплантация этих клеток пациенту.

Генная терапия *in vivo* предполагает доставку «терапевтического» гена непосредственно в клетки определенной ткани пациента.

Вопросы для самоконтроля

1. Принципы генной инженерии
2. Лигирование рекомбинантной ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
2. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
3. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
5. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
7. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Дополнительная

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. – ISBN 5-225-03558-2
3. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
4. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
5. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
6. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2

7. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
8. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
9. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
10. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4

Библиографический список

1. Березов, Т.Т. Биологическая химия /Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2002. – 704 с. – ISBN 5-225-02709-1
2. Биологическая безопасность. Термины и определения / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: Медицина, 2011. – 151 с. –ISBN 5-225-03558-2
3. Биологическая химия [Электронный ресурс]: учебник / А.Д. Таганович [и др.]. – Минск: Вышэйшая школа, 2013. – 672 с. – ISBN 978-985-06-2321-8 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
4. биология / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов. – М.: Мединформагентство, 2003. – 417 с. – ISBN: 5-89481-140-6
5. Димитриев, А.Д. Биохимия: учебное пособие / А.Д. Димитриев, Е.Д. Амбросьева. – М.: Дашков и К, 2013. – 168 с. – ISBN 978-5-394-01790-2 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
6. Жимулёв, И.Ф. Общая и молекулярная генетика [Электронный ресурс]: учебное пособие для вузов; доп. УМО / И.Ф. Жимулёв. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2007. – 479 с. – ISBN 978-5-379-00375-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
7. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия : учебник./Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина – М. : Высшая школа, 2002. – 479 с. – ISBN 5-06-003720-7
8. Комов, В.П. Биохимия: учебник / В.П. Шведова В.Н. Комов. – М. : Дрофа, 2004. – 640 с. – ISBN 5-7107-5613-X
9. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев – М. : Высшая школа, 1998. – 496 с. – ISBN 5-89481-027-2
10. Овчинников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А.Овчинников – М. : Просвещение, 1987. – 815 с.
11. Осипова, О.В. Биоорганическая химия : Конспект лекций / О.В. Осипова, А.В. Шустов. – М. : Эксмо, 2007. – 192 с. – ISBN 978-5-699-21544-7
12. Пинчук, Л.Г. Биохимия: учебное пособие/ Л.Г. Пинчук, Е.П. Зинкевич, С.Б. Гридина; гриф УМО. – Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2011. – 364 с. – ISBN 978-5-89289-680-1 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
13. Плакунов, В.К. Основы динамической биохимии [Электронный ресурс]: учебник / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев. – М.: Логос, 2010. – 216 с. – ISBN 978-5-98704-493-3 // Доступ с сайта научной библиотеки СГАУ – ЭБС IPRbooks
14. Строев, Е.А. Биологическая химия : учебник / Е.А.Строев – М. : Высшая школа, 1989. – 479 с.
15. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия : учебник / Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков, С.Э. Зурабян. – М. : Дрофа, 2010. – 416 с. – ISBN 978-5-9704-2102-4
16. Филиппович, Ю.Б. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.Б. Филиппович, Н.И. Ковалевская, Г.А. Севастьянова. – М.: Академия, 2008. – 256 с. – ISBN 978-5-7695-4774-4
17. Щербаков, В.Г. Биохимия: учебник / В.Г. Щербаков, В.Г. Лобанов, Т.Н. Прудникова. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 472 с. – ISBN 5-98879-008-9

Содержание

Введение	3
Лекция 1 Специфическая роль белковых веществ в явлениях жизни	4
1.1 Основные различия в строении белковых молекул	4
1.2. Типы связи между аминокислотами в молекуле белка	5
Вопросы для самоконтроля	7
Список литературы	7
Лекция 2. Уровни структурной организации белков	9
2.1 Уровни структурной организации белков.	9
2.2. Методы определения первичной структуры белка.....	10
Вопросы для самоконтроля	12
Список литературы	12
Лекция 3 Величина и форма белковых молекул	14
3.1 Размер белковых молекул	14
3.2. Форма белковых молекул.....	14
Вопросы для самоконтроля	16
Список литературы	16
Лекция 4. Комплексы белков с низкомолекулярными соединениями.	18
4.1 Понятие о лигандах.....	18
4.2. Гидратация и сольватация белков	18
4.3 Кристаллические белки	19
Вопросы для самоконтроля	20
Список литературы	20
Лекция 5 Классификация белков. Простые и сложные белки.	22
5.1 Простые белки	22
5.2 Сложные белки.....	23
5.3 Гомологичные белки.....	26
Вопросы для самоконтроля	26
Список литературы	27
Лекция 6. Специфические методы очистки белков.	28
6.1 Разделение белков по молекулярной массе. Гель-хроматография.....	28
6.2 Ионообменная хроматография белков	29
6.3 Гидрофобная хроматография белков	29
6.4 Аффинная, или биоспецифическая. Хроматография белков.....	30
6.5 Иммуносорбция.....	32
6.6 Перспективы использования белковой инженерии для выделения белков	33
Вопросы для самоконтроля	33
Список литературы	34
Лекция 7 Олиго- и полисахариды	35
7.1 Основные представители олигосахаридов и их свойства	35
7.2. Особенности полисахаридов.....	36
Вопросы для самоконтроля	38
Список литературы	38
Лекция 8 Биологические мембраны	39
8.1 Строение биомембран.....	39
8.2Свойства биологических мембран.....	40
8.3. Трансмембранный перенос веществ.	41
8.4 Функции биологических мембран.....	44

Вопросы для самоконтроля	45
Список литературы	45
Лекция 9 Нуклеиновые кислоты.	47
9.1 Общая характеристика и функции нуклеиновых кислот	47
9.2. Химический состав нуклеиновых кислот	47
9.3. Схема образования нуклеозида и нуклеотида ДНК и РНК.....	48
9.4. Структура нуклеиновых кислот.....	49
Вопросы для самоконтроля	50
Список литературы	50
Лекция 10 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).	52
10.1 Модель структуры ДНК.....	52
10.2 Формы двойной спирали	53
Вопросы для самоконтроля	54
Список литературы	54
Лекция 11 Рибонуклеиновая кислота (РНК).	56
11.1 Виды РНК.....	56
11.2 Генетический код	56
Вопросы для самоконтроля	57
Список литературы	57
Лекция 12-13 Биосинтез белка	59
12-13.1 Трансляция белка.....	59
12-13.2 Белоксинтезирующая система клетки	59
12-13.3 Шапероны.....	61
Вопросы для самоконтроля	62
Список литературы	62
Лекция 14 Посттрансляционная ковалентная модификация белков.	64
14.1 Посттрансляционная модификация.....	64
14.2 Частичный протеолиз	65
14.3 Ковалентные модификации.....	65
Вопросы для самоконтроля	65
Список литературы	66
Лекция 15 Проблемы клонирования ДНК	67
15.1 Принципы генной инженерии.....	67
15.2 Лигирование рекомбинантной ДНК.....	70
Вопросы для самоконтроля	74
Список литературы	74
Библиографический список	76
Содержание.....	77