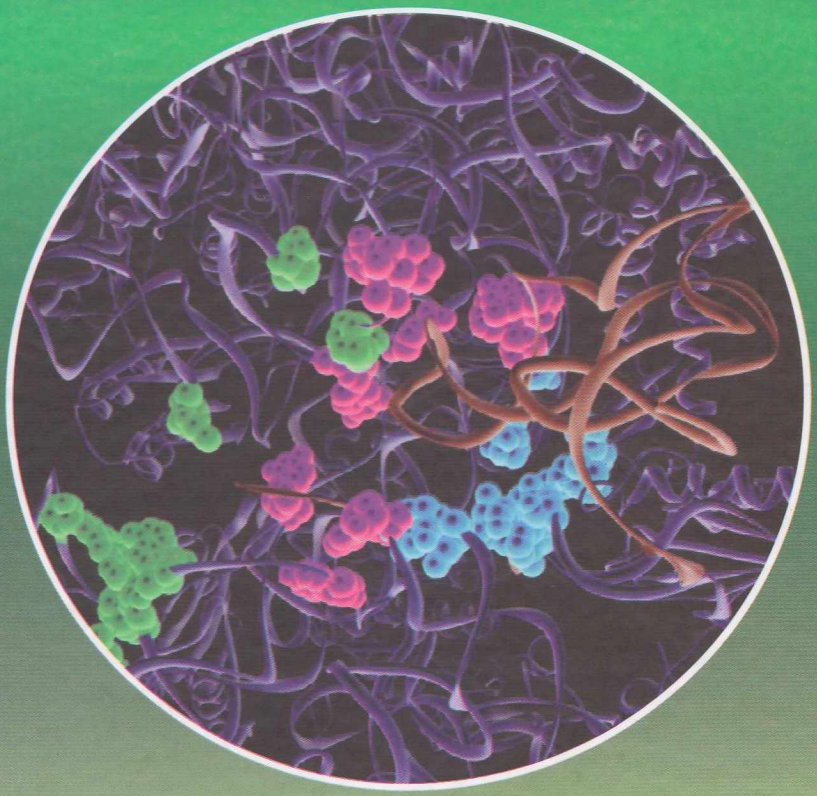
ЕО
Б635

Д. Г. Кнорре, Т. С. Годовикова
С. Д. Мызина, О. С. Федорова

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

**Д. Г. Кнорре, Т. С. Годовикова, С. Д. Мызина,
О. С. Федорова**

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Учебное пособие

Новосибирск
2011

УДК 547(075)
ББК Г2я73-1
Б635

Биоорганическая химия: Учебное пособие / **Д.Г. Кнорре, Т.С. Годовикова, С.Д. Мызина, О.С. Федорова**; Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2011. 480 с.

ISBN 978-5-94356-996-8

Предлагаемое учебное пособие рассчитано на читателей, желающих получить представление о современном состоянии биоорганической химии – одной из главных дисциплин, составляющих современную физико-химическую биологию и нацеленных на понимание химических и физических основ строения и функционирования живых организмов.

Рецензент
д-р хим. наук Э. Г Малыгин

ISBN 978-5-94356-996-8

© Новосибирский государственный университет, 2011
© Кнорре Д. Г., Годовикова Т. С., Мызина С. Д., Федорова О. С., 2011

Оглавление

Предисловие 9

Введение 11

Глава 1. Нуклеиновые кислоты. Строение и главные функции 15
§ 1.1. Мономеры, формирующие нуклеиновые кислоты 15
§ 1.2. Фосфодиэфирные связи. Первичная структура нуклеиновых кислот. Образование межнуклеотидных связей 17
§ 1.3. Комплементарные последовательности нуклеотидов 20
§ 1.4. Прокариоты и эукариоты. Хромосомы и хроматин 22
§ 1.5. Матричные ферменты. Репликация ДНК 23
§ 1.6. РНК-полимеразы. Транскрипция 24
§ 1.7. Трансляция и генетический код 26
§ 1.8. Посттранскрипционные и пострепликационные превращения нуклеиновых кислот 29
§ 1.9. Вирусы и инфекционные нуклеиновые кислоты 34

Глава 2. Биоорганическая химия нуклеотидов и нуклеиновых кислот .. 36
§ 2.1. Нуклеотиды 36
2.1.1. Негенетические нуклеозид-5'-трифосфаты. Нуклеозидциклофосфаты 36
2.1.2. Конформация полинуклеотидной цепи. Взаимная ориентация пентозного гетероцикла в нуклеиновых кислотах 37
2.1.3. Спектральные характеристики нуклеозидов и нуклеотидов 39
§ 2.2. Реакции по гетероциклическим основаниям 41
2.2.1. Реакционные центры в гетероциклических основаниях 41
2.2.2. Таутомерные превращения и кислотно-основные свойства нуклеозидов и нуклеотидов 43
2.2.3. Реакции с электрофильными реагентами 46
2.2.4. Присоединение нуклеофильных реагентов по атомам C6 и C4 пиримидиновых оснований 48
2.2.5. Реакции по атомам N пиридинового типа. Метилирование гетероциклов 51
2.2.6. Реакции по NH-C=O группам 52
2.2.7. Окисление по двойной связи C5=C6 53
2.2.8. Реакции по экзоциклическим аминогруппам 53
2.2.9. Реакции с бифункциональными реагентами 54
2.2.10. Фотохимические реакции пиримидиновых гетероциклов 55
2.2.11. Реакции гетероциклических оснований со свободными радикалами 57
§ 2.3. Реакции по углеводным остаткам 58

§ 2.4. Реакции по остаткам фосфорной кислоты 62
§ 2.5. Расщепление фосфодиэфирных связей в нуклеиновых кислотах 66

Глава 3. Первичная структура нуклеиновых кислот 69
§ 3.1. Общие принципы установления первичной структуры биополимеров 69
§ 3.2. Фрагментация ДНК 70
§ 3.3. Прямое секвенирование полидезоксирибонуклеотидов 73
§ 3.4. Сборка полной структуры полидезоксирибонуклеотида (генома) .. 78
§ 3.5. Банки данных для последовательностей нуклеотидов в нуклеиновых кислотах 79

Глава 4. Пространственная структура нуклеиновых кислот. Ее значение для функционирования нуклеиновых кислот 82
§ 4.1. Двуспиральные нуклеиновые кислоты. A-, B- и Z-формы нуклеиновых кислот. Суперспирализация 82
4.1.1. Уотсон-криковские взаимодействия 82
4.1.2. Стекинг-взаимодействия. Интеркаляция. Плавление дуплексов. Гибридизация 84
4.1.3. Искажения структуры дуплекса. Суперспирализация 88
4.1.4. Трех- и четырехнитевые структуры 92
§ 4.2. Однонитевые нуклеиновые кислоты. Шпилечные структуры. Псевдоузлы 93
§ 4.3. Применение химической модификации для изучения пространственной структуры нуклеиновых кислот 97

Глава 5. Химико-ферментативный синтез нуклеиновых кислот 100
§ 5.1. Общая стратегия синтеза нуклеиновых кислот. Защитные группы 100
§ 5.2. Методы образования межнуклеотидных связей 102
§ 5.3. Синтез олигорибонуклеотидов 105
§ 5.4. Твердофазный метод синтеза олиго- и полинуклеотидов. Автоматические методы в олигонуклеотидном синтезе 107
5.4.1. Твердофазный синтез олигонуклеотидов 107
5.4.2. Олигонуклеотидные микрочипы 111
§ 5.5. Полимеразная цепная реакция 113
§ 5.6. Соединение олигонуклеотидов, расположенных стык в стык на комплементарной матрице 116
§ 5.7. Производные и аналоги олигонуклеотидов 119

Глава 6. Белки. Основные принципы строения и функции 123
§ 6.1. Аминокислоты и полипептиды 123
6.1.1. Аминокислотный состав белков и первичная структура 123
6.1.2. Конформации и пространственная структура 128
6.1.3. Кислотно-основные свойства аминокислот и белков. Изоэлектрические точки 128
6.1.4. Спектральные свойства аминокислот и белков 130
§ 6.2. Основные функции белков 130

6.2.1. Белки как катализаторы (ферменты) 130
6.2.2. Регуляторные функции белков. Основные регуляторные системы животных ... 131
6.2.3. Основные белки иммунной системы ... 134
6.2.4. Белковые факторы транскрипции и трансляции ... 137
6.2.5. Специальные функции белков ... 138

Глава 7. Биоорганическая химия аминокислот и белков ... 141
§ 7.1. Пептидная связь. Установление аминокислотного состава пептидов и белков ... 142
§ 7.2. Определение концевых амино- и карбоксильных групп ... 144
§ 7.3. Химическая модификация функциональных групп белков ... 146
7.3.1. Химическая модификация белков ... 146
7.3.2. Реакции нуклеофильного замещения ... 148
7.3.3. Реакции нуклеофильного присоединения-отщепления (элиминирования) ... 157
7.3.4. Реакции электрофильного замещения ... 161
7.3.5. Реакции по гуанидиновой группе аргинина ... 161
7.3.6. Окислительно-восстановительные реакции ... 162
§ 7.4. Посттрансляционная модификация белков ... 164

Глава 8. Первичная структура пептидов и белков ... 174
§ 8.1. Общие принципы установления первичной структуры белков. Специфическая фрагментация полипептидных цепей ... 174
§ 8.2. Секвенирование пептидов. Метод Эдмана. MS/MS-секвенирование ... 181
§ 8.3. Банки данных для последовательностей аминокислот в белках ... 185

Глава 9. Пространственная структура белков ... 187
§ 9.1. Вторичная, третичная и доменная структура белков ... 187
9.1.1. Глобулярные белки. Формирование их пространственной структуры. Шапероны. Прионы ... 187
9.1.2. Вторичная структура белков. α-Спирали и β-складки ... 189
9.1.3. Третичная структура белков ... 193
9.1.4. Фибриллярные белки ... 197
§ 9.2. Белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей (четвертичная структура белков). Нуклеопротеиды ... 198

Глава 10. Химический синтез пептидов и белков ... 203
§ 10.1 Общие проблемы химического синтеза полипептидов ... 203
§ 10.2 Методы образования пептидных связей. Метод смешанных ангидридов ... 205
§ 10.3. Карбодиимидный метод синтеза ... 208
§ 10.4. Метод активированных сложных эфиров ... 211
§ 10.5. Защитные группы в пептидном синтезе. Блокирование α-аминогрупп ... 214
§ 10.6. Блокирование α-карбоксильных групп ... 218
§ 10.7. Блокирование боковых групп в аминокислотах ... 219

§ 10.8. Механизм рацемизации производных аминокислот и пептидов. 236
§ 10.9. Твердофазный синтез пептидов. Автоматизация синтеза 239
§ 10.10. Образование дисульфидных мостиков в синтетических пептидах 243

Глава 11. Химические методы получения производных белков и нуклеиновых кислот (дериватизация). Методы и задачи 247
§ 11.1. Иммобилизация биополимеров на нерастворимых носителях.... 247
§ 11.2. Введение меток в белки и нуклеиновые кислоты для их последующей детекции 252

Глава 12. Специфические взаимодействия биополимеров. Природа и применение в биоорганической химии 255
§ 12.1. Аффинные сорбенты 255
§ 12.2. Аффинная модификация биополимеров. Необратимые ингибиторы ферментов и рецепторов 257
§ 12.3. Антисмысловые нуклеиновые кислоты и их аналоги 267
§ 12.4. Установление областей контакта нуклеиновой кислоты. Футпринтинг 272
§ 12.5. Основные структурные элементы белков, ответственные за взаимодействия с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами. Цинковые пальцы 274
§ 12.6. Молекулярная селекция нуклеиновых кислот. Аптамеры..... 276

Глава 13. Биоорганическая химия углеводов 278
§ 13.1. Моносахариды. Номенклатура. Способы изображения..... 278
13.1.1. Проекционные формулы Фишера 279
13.1.2. Альдозы и кетозы 281
13.1.3. Циклические формы моносахаридов. Перспективные формулы Хеуорса 284
13.1.4. Конформация фуранозных циклов..... 286
13.1.5. Конформация пиранозных циклов 288
§ 13.2. Окисленные и восстановленные формы моносахаридов..... 290
§ 13.3. Другие превращения сахаров..... 293
§ 13.4. Олигосахариды и полисахариды 296
§ 13.5. Гликопротеины и протеогликаны..... 303
§ 13.6. Химический синтез олигосахаридов 307

Глава 14. Биоорганическая химия липидов..... 315
§ 14.1. Жирные кислоты – гидрофобные компоненты омыляемых липидов 315
§ 14.2. Простые омыляемые липиды. Триацилглицерины. Алкильные производные жирных кислот. Воска 320
§ 14.3. Сложные липиды..... 322
§ 14.4. Неомыляемые липиды..... 328

Глава 15. Биологические мембраны 331
§ 15.1. Основные функции и принципы строения биологических мембран 331
§ 15.2. Мембранные рецепторы 333
§ 15.3. Транспортные белки мембран 336
§ 15.4. Трансмембранные потенциалы 339

Глава 16. Химия ферментов 342
§ 16.1. Ферментативный катализ 342
§ 16.2. Белки как кислотно-основные и нуклеофильные катализаторы.. 349
§ 16.3. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции 352
§ 16.4. Химия кофакторов некоторых лиаз, трансфераз и лигаз 363
§ 16.5. Рибозимы 368

Глава 17. Гормоны 378
§ 17.1. Эндокринная регуляция физиологических процессов. Гормоны и вторичные посредники 378
§ 17.2. Гормоны – производные аминокислот 379
§ 17.3. Белково-пептидные гормоны 382
§ 17.4. Гормональные функции окиси азота 383
§ 17.5. Стероидные гормоны 384
§ 17.6. Простагландины 388

Глава 18. Витамины 390
§ 18.1. Витамины и их биологическое значение 390
§ 18.2. Витамины как кофакторы, коферменты и их предшественники 391
§ 18.3. Витамин B_{12} 396
§ 18.4. Витамин С (аскорбиновая кислота) 398
§ 18.5. Жирорастворимые витамины 400
§ 18.6. Витаминоподобные вещества 406

Глава 19. Антибиотики 409
§ 19.1. Общие представления об антибиотиках. Принципы их классификации 409
§ 19.2. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной клеточной стенки 410
§ 19.3. Антибиотики, нарушающие функционирование плазматических мембран 420
§ 19.4. Антибиотики – ингибиторы трансляции 425
§ 19.5. Антибиотики – ингибиторы репликации и транскрипции 431

Глава 20. Биоинформатика 452
§ 20.1. Представление последовательностей в компьютерном формате 453
§ 20.2. Сравнение последовательностей макромолекул 455
§ 20.3. Алгоритм BLAST быстрого поиска локального сходства 458
§ 20.4. Поиск мотивов и функциональных сайтов в базе данных PROSITE 458

§ 20.5. Предсказание вторичной структуры РНК 460
§ 20.6. Банк данных PDB 461
§ 20.7. Программы визуализации пространственных структур макромолекул 463

Приложение 466

Список рекомендуемой литературы 470

Предметный указатель 471

Предисловие

Настоящее учебное пособие написано группой сотрудников Института химической биологии и фундаментальной медицины (изначально Новосибирский институт биоорганической химии) Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Оно создано по материалам лекций, которые на протяжении ряда лет читаются авторами пособия студентам факультета естественных наук Новосибирского государственного университета.

Вторая половина XX века характеризуется глубоким прорывом методов и концепций химии и физики в изучении живых организмов, строения и механизмов, лежащих в основе их функционирования. До середины XX века эти вопросы были прерогативой биологической химии. По мере ее развития, в первую очередь, широкого введения в исследование биополимеров рентгеноструктурного анализа для установления их пространственной структуры и установления принципов хранения и реализации наследственной информации, эта область знания трансформировалась в физико-химическую биологию. Наряду с биохимией она включила в себя биологическую физику и молекулярную биологию. Биоорганическая химия получила признание в качестве самостоятельной научной дисциплины как наука, изучающая структуру биологически значимых органических соединений и ее связь с биологической функцией.

В данное время в России по этому важному разделу физико-химической биологии написана и издана лишь фундаментальная монография Юрия Анатольевича Овчинникова «Биоорганическая химия», вышедшая в 1987 году. В этой монографии биоорганическая химия определяется как дисциплина, «которая изучает строение и биологические функции важнейших компонентов живой материи, в первую очередь, биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, уделяя главное внимание выяснению закономерностей взаимосвязи между структурой и биологическим действием». Монография на период ее написания исчерпывающим образом осветила состояние этой области науки. Однако за прошедший период времени произошло много важных событий, связанных как с существенным развитием экспериментальных методов и методологии исследований, так и с бурным ростом возможностей вычислительной техники.

Так, на рубеже XX и XXI веков было закончено установление полной структуры генома человека и успешно развиваются подходы к быстрому и достаточно экономичному установлению этой структуры для отдельных индивидуумов. Возможность установления полного геномного паспорта любого человека открывает огромные возможности для диагностики и терапии, а также для криминалистики. Среди новых методологий особенно эффектив-

ными оказались селекционные подходы, такие как молекулярная селекция нуклеиновых кислот и фаговый дисплей. Впечатляющие успехи в развитии компьютерной техники позволили с достаточной степенью точности рассчитывать пространственные структуры биополимеров, их комплексов и динамику их взаимодействий.

Поэтому остро назрела необходимость в создании пособия, отражающего не только основные вехи становления биоорганической химии в период, предшествующий написанию указанной монографии, но и ее последующие достижения.

Следует подчеркнуть, что не всегда какую-либо биологическую проблему однозначно можно отнести к биоорганической химии, поскольку разные аспекты одной и той же проблемы могут касаться разных дисциплин, составляющих физико-химическую биологию. Поэтому при написании данного учебного пособия авторы не задавались целью ограничиться рассмотрением вопросов, относящихся строго к биоорганической химии, а сделали акцент на те проблемы физико-химической биологии, при решении которых необходимо обращаться к органической химии.

Поскольку большое число задач, решаемых биоорганической химией, направлено на выяснение структурных основ функционирования биологически значимых органических соединений, в особенности биополимеров, авторы сочли целесообразным вкратце рассмотреть их основные функции.

Большую признательность авторы выражают сотрудникам институтов ИХБФМ и ИЦГ Сибирского отделения РАН, с которыми авторы неоднократно обсуждали многие вопросы представляемого материала. Ряд вопросов химии рибонуклеиновых кислот были конструктивно обсуждены с А. Г. Веньяминовой. Ценные рекомендации, касающиеся секвенирования нуклеиновых кислот, были даны И. В. Морозовым. В описании MS/MS секвенирования белков большую помощь оказала бывшая сотрудница института Ю. В. Герасимова. Не будучи специалистами в области биоинформатики, авторы попросили написать краткую главу по применению этой области знаний в биоорганической химии сотрудника Института цитологии и генетики СО РАН Д. А. Афонникова.

Особую благодарность авторы выражают сотруднице ИХБФМ СО РАН Надежде Свищевой за огромную работу при написании и окончательной подготовке рукописи к изданию, в том числе многочисленных рисунков и химических формул.

Введение

Жизнь прежде всего предполагает размножение, т. е. производство потомства, полностью или в основном копирующего своих предков. Поскольку любой живой организм устроен чрезвычайно сложно, то он должен содержать информацию о своем строении, и основная часть этой информации обязательно передается из поколения в поколение и реализуется на определенных этапах его жизнедеятельности. Носителем информации являются нуклеиновые кислоты – обязательные компоненты всех существующих на земном шаре живых организмов. Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) служат хранилищем этой информации. Рибонуклеиновые кислоты (РНК) участвуют в ее реализации.

Использование этой информации для построения, функционирования и развития живого организма предполагает многочисленные химические процессы. Для этого нужны специальные катализаторы (ферменты или энзимы), которые обеспечивают протекание этих процессов с высокой направленностью и достаточно большой скоростью при температуре живых организмов. В подавляющем большинстве случаев ферментами являются белки или их комплексы со специальными органическими молекулами (кофакторами) или ионами металлов. Поэтому белки – второй класс соединений, обязательный для всех живых организмов. Наряду с формированием энзимов белки выполняют такие важные специфические функции, как регуляция биохимических процессов и перенос веществ в организмах.

Белки и нуклеиновые кислоты являются полимерами. Однако, в отличие от многочисленных широко производимых в промышленности и используемых в практической деятельности полимеров, а также таких природных полимеров, как целлюлоза, крахмал, хитин, они построены из нескольких типов мономеров с нерегулярным и строго определенным чередованием в полимерной цепи. Поэтому их часто рассматривают как особый тип полимеров и обозначают как *биополимеры*.

Исключительно важную роль в обмене веществ, в том числе такого основополагающего для существования жизни на земле процесса, как фотосинтез (восстановление углекислого газа до органических соединений под действием солнечного света), играют углеводы, в первую очередь глюкоза. Название углеводы происходит от того, что по своему химическому составу они могут быть представлены как продукт соединения некоторого числа атомов углерода и молекул воды. Глюкоза, а также некоторые ее изомеры и их димеры обладают сладким вкусом. Поэтому соединения этого класса часто называют сахарами, а мономерные сахара – моносахаридами. В природе небольшие (содержащие 5 или 6 атомов углерода) молекулы углеводов часто присутст-

вуют в виде полимеров (полисахаридов), одни из которых играют роль запасных веществ для производства энергии, а другие обеспечивают механическую прочность (целлюлоза у деревьев, хитин у насекомых). Важные биологические функции выполняют также ковалентные аддукты углеводов и белков (гликопротеиды, протеогликаны).

Одной из наиболее фундаментальных теорий биологии является клеточная теория, согласно которой все живые организмы – от простейших до человека – построены из клеток. Все бесчисленные биохимические процессы, включая процессы умножения и реализации наследственной информации, происходят в некотором изолированном пространстве, ограниченном от окружающей среды, а в случае многоклеточных организмов – также и от структур того же организма. Роль этого ограничителя играют клеточные мембраны, обязательным компонентом которых являются липиды. Следовательно, последние – неотъемлемый компонент всех живых систем.

Помимо мономеров, которые объединяются в соответствующие биополимеры, в живых организмах синтезируются и самостоятельно функционируют многочисленные другие классы низкомолекулярных соединений. Некоторые из них возникают и проявляют свои биологические функции преимущественно на более высоких уровнях организации живых систем. В первую очередь это относится к гормонам, которые образуются в специальных органах и действуют на определенные ткани у многоклеточных организмов. Ферменты часто представляют собой комплексы белков с некоторыми особыми органическими соединениями (их часто называют лигандами). Они синтезируются из специальных предшественников, которые у одноклеточных организмов получаются в результате определенных биохимических процессов, а многоклеточные организмы часто получают их из продуктов питания. Такие предшественники в этом случае называются витаминами. Без описания гормонов и витаминов изложение материала, касающегося перечисленных выше важнейших функций организмов, было бы неполным.

Большое практическое значение имеет еще один класс низкомолекулярных соединений – антибиотики. Они являются веществами, производимыми некоторыми специальными видами бактерий подавляющими развитие конкурирующих микроорганизмов. Антибиотики эффективны против многих бактериальных заболеваний и часто используются как противоопухолевые средства.

В данном учебном пособии систематически рассматривается биоорганическая химия всех перечисленных классов соединений. Первые пять глав посвящены рассмотрению нуклеиновых кислот, линейных полимеров, построенных из четырех типов сложных органических молекул – нуклеотидов. В первой главе описываются общая схема строения и основные функции нуклеиновых кислот. Во второй главе – важнейшие физические и химические свойства нуклеотидов. Информационное содержание нуклеиновых кислот определяется тем, в каком порядке располагаются в цепи эти мономеры. Поэтому важной задачей биоорганической химии является установление порядка расположения нуклеотидов в нуклеиновых кислотах (первичная структу-

ра). Чрезвычайно важной для хранения, реализации и размножения информации является пространственная структура нуклеиновых кислот. Поэтому при изложении биоорганической химии нуклеиновых кислот в отдельные главы выделены вопросы об их первичной (гл. 3) и пространственной (гл. 4) структуре. Глава 5 описывает химический синтез нуклеиновых кислот.

Последующие пять глав посвящены белкам, которые представляют собой линейные полимеры, построенные из набора 21 аминокислоты. Их рассмотрение проводится по той же схеме, что и для нуклеиновых кислот. Глава 6 описывает основные принципы строения и важнейшие функции белков; гл. 7 – основные физические и химические свойства белков и составляющих их аминокислот; гл. 8 – первичную структуру белков; гл. 9 – их пространственную структуру; гл. 10 – химический синтез.

Набор белков, присутствующих в клетке или в живом организме в целом, является их важнейшей характеристикой, этот набор принято называть *протеомой* клетки или организма. Область биологии, занимающаяся изучением этого набора и принципов его функционирования в норме и при различных патологиях, получила название протеомики.

Как белки, так и нуклеиновые кислоты имеют многообразные практические применения в научных исследованиях и в решении ряда прикладных задач. При этом часто необходимы не сами биополимеры, а их производные. В связи с этим в гл. 11 дается описание методов и задач получения производных (дериватизации) белков и нуклеиновых кислот.

Важной особенностью обеих перечисленных групп соединений является наличие у некоторых их представителей способности к высокоселективным взаимодействиям между собой и с определенными высоко- и низкомолекулярными веществами (сродства или аффинности к молекулам этих веществ). Описанию типов этих взаимодействий и некоторым их приложениям посвящена гл. 12 учебного пособия. В связи с высокой значимостью для понимания механизма ряда важнейших биологических процессов взаимодействий белков с нуклеиновыми кислотами эти взаимодействия также нашли отражение в гл. 12.

Биоорганической химии двух других важных классов соединений – углеводов и липидов – посвящены соответственно гл. 13 и 14.

Среди большого числа важных биологических структур и процессов биоорганическая химия особенно глубоко проникла в понимание на химическом уровне функционирования ферментов и биологических мембран. В связи с этим принципы строения и основные функции биологических мембран рассматриваются самостоятельно (гл. 15). В отдельную главу (гл. 16) выделен вопрос о химии ферментов с основным акцентом на химические аспекты функционирования как отдельных белковых компонентов, так и входящих в состав ферментов кофакторов.

Рассмотрение гормонов проводится в гл. 17, а витаминов – в гл. 18.

Описанию структуры важнейших антибиотиков и механизма их действия посвящена гл. 19.

Сегодня биоорганическая химия оперирует с огромными массивами информации, что невозможно без использования высокопроизводительных компьютеров. В связи с этим сформировалась новая область биологии – биоинформатика. Некоторые из многочисленных возможностей, открываемых биоинформатикой для решения задач биоорганической химии, излагаются в главе 20.

Одной из важнейших задач физико-химической биологии и ее приложений является синтез нуклеиновых кислот, в значительной мере – синтез генов. Этот синтез осуществляется поэтапно. Сначала получают фрагменты нуклеиновых кислот – олигонуклеотиды. Затем их соединяют в полные молекулы нуклеиновых кислот. Для реализации информации, заложенной в полученных генах, их вводят в живые системы. Первый этап осуществляется химическим путем и, следовательно, определенно является предметом биоорганической химии. Второй этап – сборка олигонуклеотидов в биологически значимые генетические структуры – в настоящее время в основном используется ферментативное соединение олигонуклеотидов с помощью фермента ДНК-лигазы, что, строго говоря, является биохимическим, а не биоорганическим подходом. Полученные гены обычно встраивают в специальные конструкции, плазмиды, чтобы в составе живой клетки они могли осуществлять синтез белка или белков, программируемых созданным геном. Это уже относится к молекулярной биологии или, точнее, к ее разделу, называемому генетической инженерией. Отсутствие некоторых сведений об основных представлениях и методах биологической химии и генетической инженерии сделало бы изложение вопроса о синтезе нуклеиновых кислот неполным. Поэтому там, где это необходимо для полноты представления об обсуждаемом вопросе, авторы описывают подходы смежных областей физико-химической биологии.

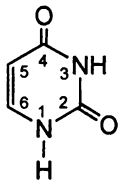
Данное учебное пособие написано для студентов и аспирантов, хорошо знакомых с основами органической и физической химии. Авторы надеются, что оно также окажется полезным и для специалистов других областей науки, желающих получить представление о сегодняшнем состоянии и возможностях биоорганической химии, которая является химическим фундаментом современной биологии.

Глава 1. Нуклеиновые кислоты. Строение и главные функции

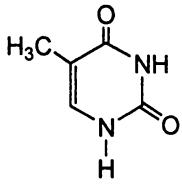
§ 1.1. Мономеры, формирующие нуклеиновые кислоты

Для образования в живом организме (биосинтезе) набора белков, характерных для этого организма, должна существовать некоторая управляющая система, которая содержит информацию о том, какие именно последовательности аминокислот нужно собирать в данном организме. Эта управляющая система образована *нуклеиновыми кислотами*. Первичным материальным носителем такой информации является *дезоксирибонуклеиновая кислота*, сокращенно *ДНК*. Промежуточным переносчиком информации от ДНК, которая является местом хранения этой информации, к месту сборки новых полипептидных цепей является *рибонуклеиновая кислота* (*РНК*). Следует сразу отметить, что роль РНК этим не ограничивается, позднее будут приведены и другие ее функции.

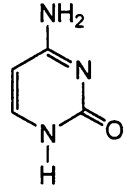
Нуклеиновые кислоты являются линейными полимерами, построенными из нуклеотидов в качестве мономеров. *Нуклеотиды* представляют собой вещества, молекулы которых состоят из трех основных фрагментов: содержащего азот гетероцикла определенной структуры, сахара пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты. Основные гетероциклы, входящие в состав нуклеиновых кислот, – это *урацил, тимин, цитозин, аденин* и *гуанин*. Часто эти гетероциклы называют *гетероциклическими основаниями*. Три последних входят в состав как ДНК, так и РНК. Нуклеотиды, содержащие урацил, в основном входят в состав РНК, а содержащие тимин – в ДНК. Три первых гетероцикла являются производными 2-оксо-1,2-дигидропиримидина. Остальные два имеют в своей основе пурин, который представляет собой сочлененные пиримидин и имидазол. В соответствии с этим гетероциклы, а также соответствующие нуклеотиды, называют *пиримидиновыми* или *пуриновыми*. Ниже приведены структуры этих гетероциклов, нумерация, принятая для их атомов, а также их трехбуквенные сокращения, которые в основном используются для изображения гетероциклов в составе нуклеиновых кислот и их компонентов.



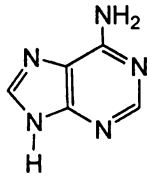
Урацил
Ura



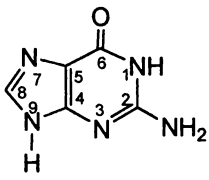
Тимин
Thy



Цитозин
Cyt

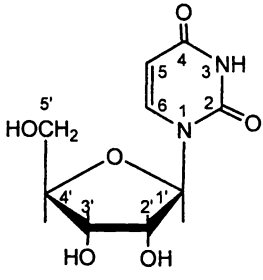


Аденин
Ade

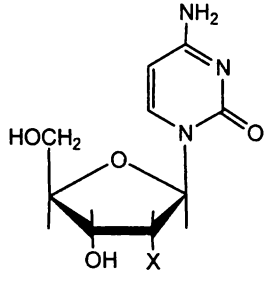


Гуанин
Gua

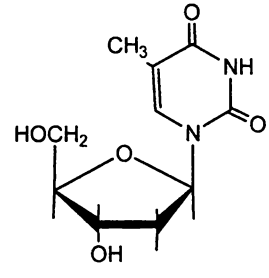
Соединения, состоящие из одного из этих гетероциклов, гликозилированного циклической формой рибозы или дезоксирибозы (§ 13.1), называют *нуклеозидами*. Если углеводным фрагментом является рибоза, то обычно эти производные называют *рибонуклеозидами*. Если же углеводным фрагментом является 2'-дезоксирибоза, используется термин дезоксинуклеозид, или *дезоксирибонуклеозид*. Для атомов пентозы в составе нуклеозидов принята нумерация атомов, соответствующая принятой в химии углеводов, но в составе нуклеозидов эти номера снабжены штрихами. У подавляющего большинства нуклеозидов гликозидная связь образуется атомом C-1' пентозы и атомом N1 пиримидинового или атомом N9 пуринового гетероцикла. Ниже приведены структуры нуклеозидов, образованных перечисленными выше гетероциклами, и принятые для них трехбуквенные и однобуквенные сокращения, а также нумерация атомов углерода пентозного гетероцикла (на примере уридина).



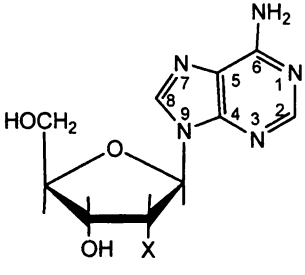
Уридин
Urd, U



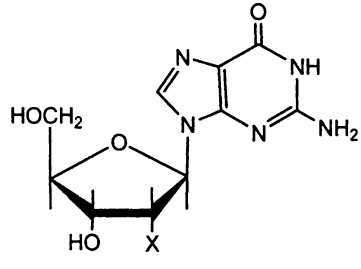
Цитидин X = OH
C, Cyd
Дезоксицитидин X = H
dC, dCyd



Тимидин
dT, dThd



Аденозин X = OH
A, Ado
Дезоксиаденозин X = H
dA, dAdo



Гуанозин X = OH
G, Guo
Дезоксигуанозин X = H
dG, dGuo

Нуклеотиды представляют собой производные нуклеозидов, у которых одна или несколько OH-групп связаны с остатком ортофосфорной кислоты. В названии нуклеотида указывается, какая или какие OH-группы нуклеозидного фрагмента фосфорилированы. Для нуклеотидов используется та же

сокращенная символика, но при изображении свободных нуклеотидов, а часто и для их изображения в составе нуклеиновых кислот, добавляется символ «р» для остатка фосфорной кислоты в случае однобуквенной нуклеозидной символики либо Р в случае трехбуквенной нуклеозидной символики. Например, аденозин-5'-монофосфат обозначают как рА либо как P-Ado. При этом принято символы фосфорной кислоты записывать слева от символов нуклеозидов, если фосфорная кислота связана с 5'-ОН-группой пентозы. Если символ помещен справа, то подразумевается, что остаток фосфорной кислоты присоединен к 3'-ОН-группе. Часто при использовании сокращенной символики перед символом дезоксирибонуклеозидов ставится префикс «d» для того, чтобы отличить их от рибонуклеотидов, из которых построены молекулы РНК. Перед дезоксириботимидином этот префикс, как правило, опускают, поскольку указанный нуклеозид входит исключительно в состав ДНК.

§ 1.2. Фосфодиэфирные связи. Первичная структура нуклеиновых кислот. Образование межнуклеотидных связей

Мономерными звеньями нуклеиновых кислот являются *нуклеозид-5'-монофосфаты*. В составе нуклеиновых кислот 5'-фосфат каждого мономерного звена, за исключением находящегося на конце полимерной цепи, связан фосфоэфирной связью с 3'-ОН-группой соседнего звена. Чередующиеся остатки фосфорной кислоты и углевода (дезоксирибозы в случае ДНК и рибозы в случае РНК) образуют регулярную цепь (остов), в которой отдельные звенья связаны *фосфодиэфирными связями*. Нерегулярность структуры нуклеиновой кислоты обусловлена тем, что ко всем С-1' атомам регулярно повторяющихся остатков рибозы и дезоксирибозы нерегулярно, но со специфичной для каждой нуклеиновой кислоты последовательностью, присоединено одно из четырех гетероциклических оснований. Таким образом, нерегулярно расположены в цепи и остатки нуклеотидов. Порядок, в котором расположены в нуклеиновой кислоте остатки нуклеотидов, называют *первичной структурой нуклеиновой кислоты*. Пример структуры фрагмента нуклеиновой кислоты приведен на рис. 1.

Из схематичной структуры на рисунке видно, что на одном из концов имеется остаток нуклеозид-5'-фосфата. Этот конец полинуклеотидной цепи обозначают как 5'-конец. В некоторых специальных случаях фосфат на 5'-конце может отсутствовать. На другом конце полинуклеотида находится остаток пентозы со свободной 3'-ОН-группой в случае ДНК и *цис*-диольной группой в случае РНК. Этот конец полинуклеотидной цепи обозначают как 3'-конец.

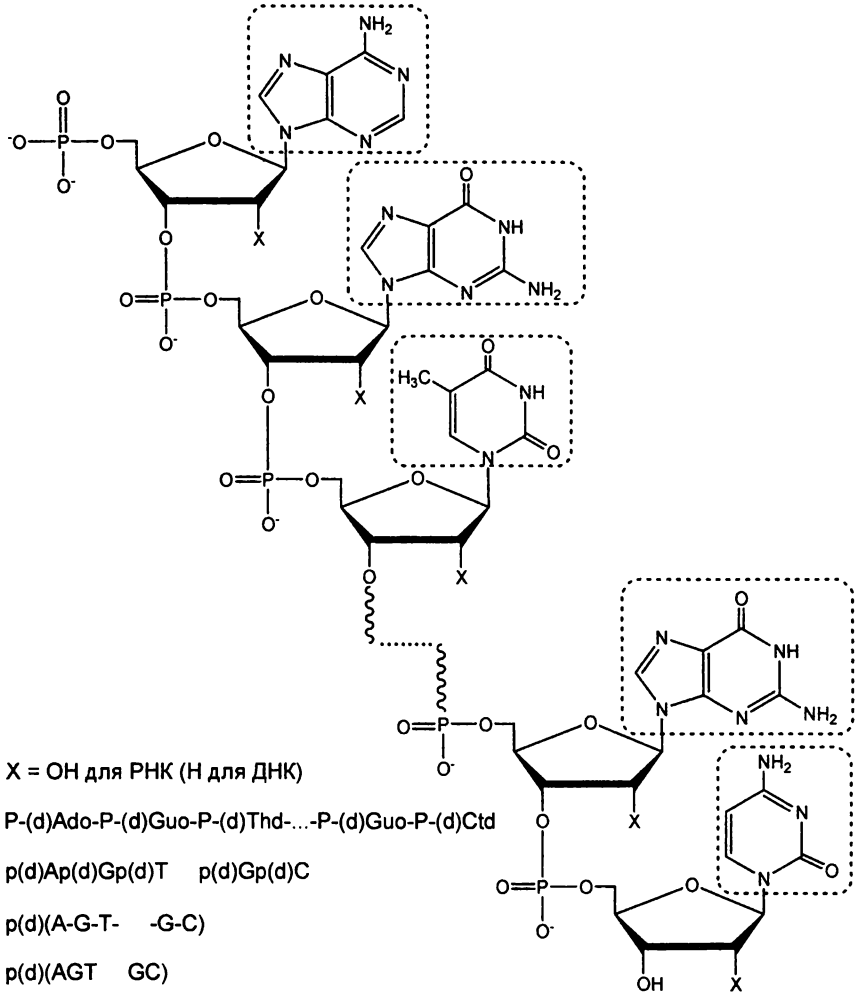
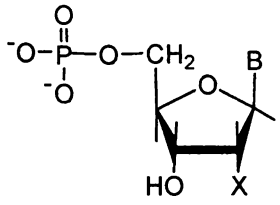
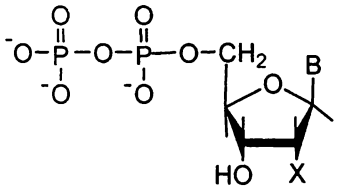


Рис. 1. Пример структуры нуклеиновой кислоты. Она же в сокращенных символах. Пунктиром обведены гетероциклические основания

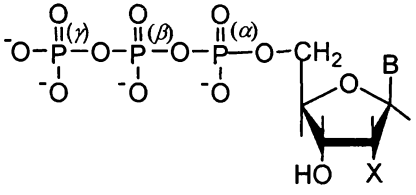
Хотя структурной единицей нуклеиновых кислот являются нуклеозид-5'-фосфаты, непосредственное образование из них полинуклеотидных цепей невозможно, поскольку для такого процесса изменение свободной энергии Гиббса $\Delta G^{0'}$ положительно, т. е. процесс термодинамически невыгоден. Мономерами при биосинтезе нуклеиновых кислот являются производные, у которых нуклеозид в 5'-положении содержит три связанных между собой ангидридными связями остатка фосфорной кислоты – *нуклеозид-5'-трифосфаты*. Ниже приведены их структурные формулы, а также формулы *нуклеозид-5'-дифосфатов*, которые являются промежуточными соединениями при биосинтезе трифосфатов.



X=H дезоксинуклеозид-5'-монофосфат
X=OH нуклеозид-5'-монофосфат



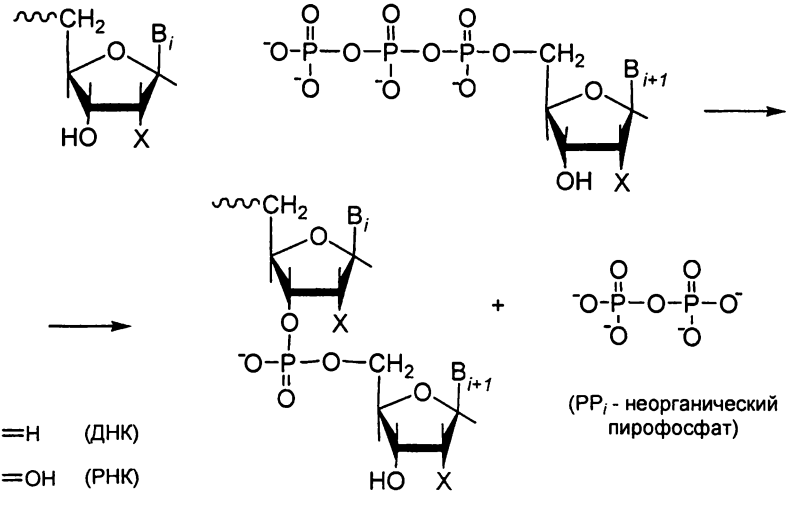
X=H дезоксинуклеозид-5'-дифосфат
X=OH нуклеозид-5'-дифосфат



X=H дезоксинуклеозид-5'-трифосфат
X=OH нуклеозид-5'-трифосфат

B - любой из приведенных выше гетероциклов

Образование нового звена при удлинении полинуклеотидной цепи происходит путем атаки нуклеозид-5'-трифосфата на 3'-концевую OH-группу с отщеплением пирофосфорной кислоты, т. е. при биосинтезе нуклеиновых кислот полинуклеотидная цепь растет от 5'-конца к 3'-концу.



X=H (ДНК)
X=OH (РНК)

(PP_i - неорганический пирофосфат)

В тексте для нуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатов часто используют сокращенные наименования NMP, NDP, NTP для рибонуклеотидов

и соответственно dNMP, dNDP, dNTP для дезоксирибонуклеотидов. В случае конкретных нуклеотидов буква N заменяется однобуквенным символом соответствующего нуклеозида. Например, *аденозин-5'-трифосфат* обозначают как ATP. Для мононуклеотидов также используют упрощенные наименования. Например, аденозин-5'-трифосфат называют аденилатом, а соответствующую кислоту – адениловой кислотой. При дальнейшем изложении авторы по-возможности будут избегать использования таких наименований.

В зависимости от числа мономерных звеньев, формирующих полимерную цепь, принято называть такие полимеры либо полинуклеотидами, либо *олигонуклеотидами*. Обычно олигонуклеотидами считают полинуклеотиды, состоящие из небольшого числа десятков или менее десяти остатков нуклеотидов. Если олигонуклеотиды имеют определенное число нуклеотидных остатков, то их называют соответственно ди-, три-, тетрануклеотидами и т. д.

§ 1.3. Комплементарные последовательности нуклеотидов

Главным свойством живых организмов является размножение, т. е. воспроизведение себе подобных. У одноклеточных организмов – бактерий, дрожжей, инфузорий и др. – размножение происходит путем деления клеток. Чтобы из одной родительской клетки образовалось две одинаковых дочерних, в основном идентичных родительской, делению должно предшествовать удвоение всех основных компонентов клетки, в том числе ее белков и нуклеиновых кислот. В первую очередь должна удвоиться ДНК, чтобы в обеих дочерних клетках оказались программы для образования всех свойственных родительской клетке белков и нуклеиновых кислот. Способность ДНК к самоудвоению обеспечивается ее строением. У всех живых организмов ДНК находится в виде двух, нековалентно связанных между собой полинуклеотидных цепей. При этом информация, содержащаяся в одной из цепей, полностью дублирована во второй цепи. Это обеспечивается замечательным свойством нуклеотидов – способностью в составе ДНК к высокоселективным взаимодействиям между гетероциклическими основаниями: dA обладает способностью избирательно связываться с dT, а dG – с dC. Физико-химические основы этой избирательности рассматриваются в § 4.1. Любая последовательность нуклеотидов имеет определенное направление, а следовательно вся полимерная цепь имеет два различных конца. В соответствии с деталями химического строения нуклеотидов один из концов обозначают как 5'-конец, а противоположный – как 3'-конец. В дальнейшем направление цепи либо будет указываться, либо просто будет подразумеваться, что слева находится 5'-конец, а справа – 3'-конец. В соответствии со сказанным могут существовать протяженные последовательности, которые располагаются так, что против каждого нуклеотида одной последовательности окажется селективно взаимодействующий с ним нуклеотид другой последовательности. Такие последовательности называются *комплементарными*.

При этом для подобного взаимодействия направления цепей должны быть противоположными (антипараллельными). Пары нуклеотидов, образующие комплементарные структуры, можно обозначить как dA·dT, dG·dC. Комплекс, образованный двумя комплементарными цепями ДНК или ее фрагментами – олигонуклеотидами, называют *дуплексом*. Принцип комплементарности был сформулирован и обоснован в 1953 году Нобелевскими лауреатами американским ученым Джеймсом Уотсоном и английским ученым Френсисом Криком. Комплементарность обеспечивает дублирование информации о последовательности нуклеотидов одной цепи в другой комплементарной цепи, поскольку между последовательностями нуклеотидов в комплементарных цепях существует взаимнооднозначное соответствие. Поэтому если две цепи исходного (родительского) дуплекса разошлись, то каждая из них способна управлять построением из мономеров комплементарной (дочерней) цепи, что в итоге приведет к воссозданию двух дуплексов, идентичных исходному. Процесс удвоения молекул ДНК может быть представлен в виде схемы (рис. 2).

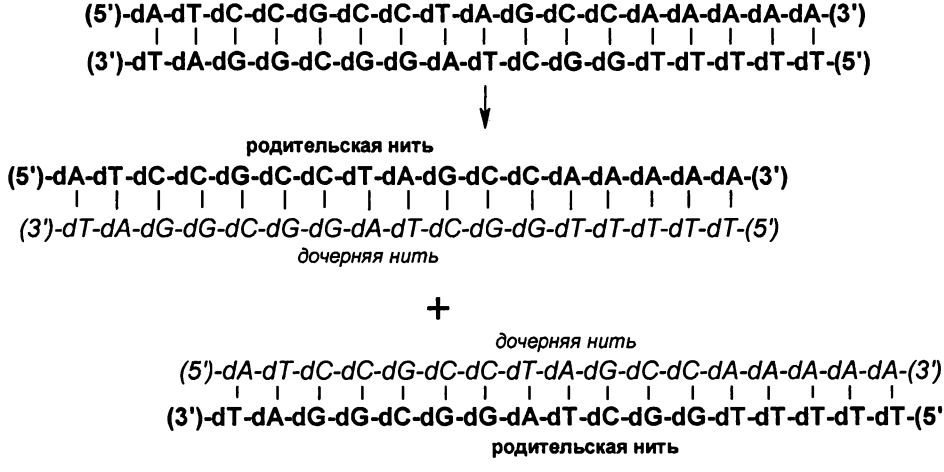


Рис. 2. Схема удвоения ДНК. Вертикальными черточками обозначены водородные связи, скрепляющие комплементарные пары нуклеотидов (§ 4.1); жирным шрифтом – родительские нити; курсивом – дочерние нити

В соответствующих условиях может произойти разделение нитей, образующих дуплекс, и каждая из образовавшихся нитей может исполнять роль матрицы для синтеза с помощью ДНК-полимеразы новых комплементарных полинуклеотидных цепей. Таким образом, может начаться практически неограниченное размножение дуплексов, и это размножение лежит в основе воспроизводства простейших одноклеточных организмов.

§ 1.4. Прокариоты и эукариоты. Хромосомы и хроматин

Все живые организмы разделяют на две основные группы – прокариоты и эукариоты. У первой ДНК представлена одной двунитевой структурой, как правило, кольцевой, которая практически не обособлена от остальной части клетки. К прокариотам относятся разнообразные бактерии. Эукариотами являются многие более сложно организованные одноклеточные организмы, такие как дрожжи и инфузории, и все без исключения многоклеточные вплоть до человека. Клетки эукариот содержат четко оформленное клеточное ядро, в котором сосредоточена подавляющая часть ДНК. При этом ДНК распределена по нескольким структурам, число которых зависит от природы живого организма и которые называют *хромосомами*.

ДНК в составе хромосом не находится в свободном состоянии. Она существует в виде комплекса с набором белков небольшого размера, богатых остатками лизина и аргинина – *гистонов*, которые обозначают буквой H, снабженной цифрами. Комплексы определенных относительно небольших участков ДНК с набором гистонов H1, H2A, H2B, H3 и H4 называются *нуклеосомами*. Последние вместе с некоторыми другими белками, не входящими в состав нуклеосом, образуют основное вещество хромосом – *хроматин*. Большинство клеток содержит двойной набор хромосом (*диплоидные клетки*). Например, клетки человека содержат набор из 23 пар хромосом. Одинарный набор характерен для половых клеток – сперматозоидов и яйцеклеток (*гаплоидные клетки*), и эти наборы сливаются при оплодотворении. После этого все развитие организма идет с сохранением двойного набора и исключением является лишь последний этап созревания половых клеток, когда двойной набор распределяется пополам по двум созревшим сперматозоидам или яйцеклеткам. По-видимому, в пределах каждой хромосомы ДНК представлена одним непрерывным дуплексом гигантского размера – каждая из цепей может содержать сотни миллионов нуклеотидов. Всего же на 23 хромосомы одинарного набора у человека приходится около 3 миллиардов пар нуклеотидов. Помимо основной молекулы ДНК у прокариот и распределенных по хромосомам ДНК у эукариот, клетки могут содержать дополнительные ДНК, программирующие одну или несколько функций. Такие ДНК называют *плазмидами*.

Взаимодействия, формирующие комплементарные комплексы, характерны и для рибонуклеиновых кислот. Если обозначить рибонуклеотиды буквами, соответствующими названиям гетероциклов, т. е. A, G, C и U, то пары, образуемые рибонуклеотидами между собой, можно изобразить как A•U и G•C. Такие же взаимодействия могут иметь место между одним рибо- и одним дезоксирибонуклеотидом: A•dT, dA•U, G•dC или dG•C. Поэтому в случае комплементарных последовательностей возможно образование дуплексов между двумя молекулами РНК или ее фрагментами и образование смешанных дуплексов, одна нить которых является молекулой или фрагментом ДНК, а другая соответственно РНК.

§ 1.5. Матричные ферменты. Репликация ДНК

Поскольку присоединение каждой следующей молекулы мономера к растущей дочерней цепи представляет собой химическую реакцию, то процесс требует участия специального фермента, который известен как *ДНК-полимераза.* Этот фермент относится к категории наиболее сложных так называемых *матричных ферментов.* ДНК-полимераза не только способна катализировать образование новой фосфодиэфирной связи между нуклеотидом и растущей полинуклеотидной цепью, но на каждом шаге выбирает из четырех мономеров такой, который комплементарен очередному нуклеотиду управляющей ДНК. Процесс синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК на одной из родительских цепей называют *репликацией.* Термин «матричный» остался по наследству от первых наивных представлений, когда сборку новой копии ДНК представляли по аналогии с печатанием на бумаге текстов, набранных на типографских матрицах. На самом деле ДНК, управляющая синтезом новой, комплементарной ей цепи, протягивается через ДНК-полимеразу, и систему скорее следует уподобить магнитофону, который протягивает через себя магнитофонную ленту, превращая информацию, записанную на ленте, в звуковые сигналы.

Перед началом собственно репликации должно произойти расплетение двунитевой структуры. Участок, где происходит расплетение нитей родительской ДНК, называется *вилкой репликации.* На каждой из разошедшихся нитей с помощью ДНК-полимеразы происходит синтез новой (дочерней) комплементарной цепи. Поскольку разошедшиеся нити антипараллельны, а синтез новых дочерних цепей всегда идет от 5'-конца к 3'-концу, то рост одной из новых цепей происходит по направлению к вилке репликации, а рост другой – в противоположном направлении. Первая может беспрепятственно удлиняться по мере расплетения родительской ДНК. Вторая дочерняя нить должна начать образовываться в какой-то части уже расплетенной ДНК, и ее синтез будет идти в направлении от вилки репликации. Только после того, как в результате расхождения цепей родительской ДНК на этой нити освободится достаточно протяженный однонитевой участок, может начаться синтез нового фрагмента дочерней цепи, который будет проходить до тех пор, пока не достигнет 5'-конца ранее синтезированного фрагмента. В итоге дочерняя нить, синтезирующаяся в направлении от вилки репликации, хотя и будет образовывать полный дуплекс с родительской нитью, но будет состоять из отдельных цепочек (*фрагменты Оказаки*), которые не соединены фосфодиэфирной связью. Чтобы завершить синтез полноценного дуплекса, необходимо образовать недостающие связи – соединить (сшить) между собой отдельные фрагменты Оказаки. Это осуществляется с помощью специального фермента – *ДНК-лигазы,* механизм действия которой описывается в § 16.2. Схема процессов в районе вилки репликации представлена на рис. 3.

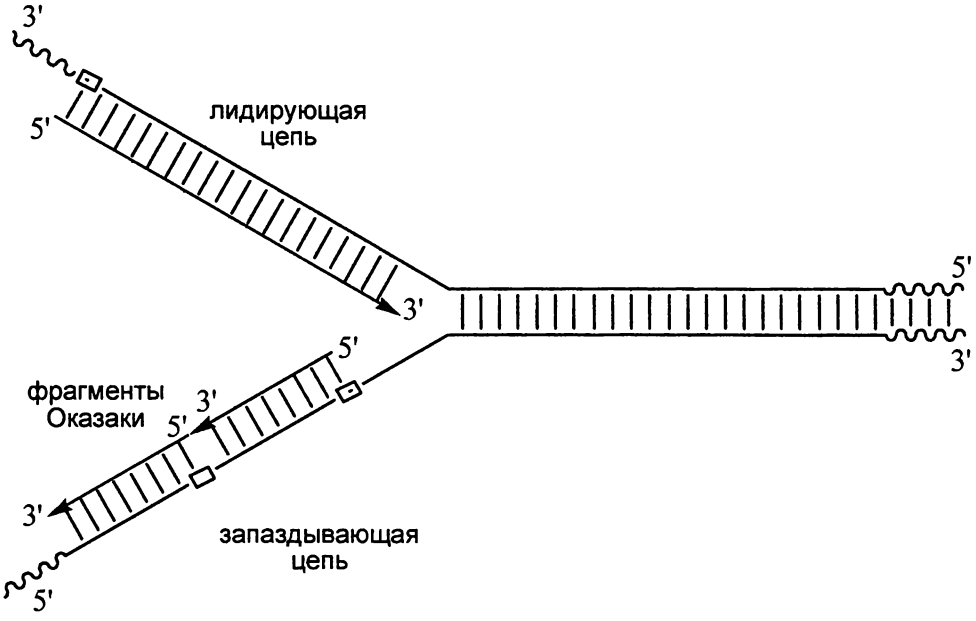


Рис. 3. Схема биосинтеза ДНК в области вилки репликации. Прямоугольниками на реплицируемых нитях изображены сайты инициации репликации, стрелками отмечены 3'-концы синтезируемых фрагментов

Разделение двух цепей ДНК требует определенных энергетических затрат и катализируется специальными ферментами геликазами, которые могут перемещаться вдоль двунитевой ДНК, причем каждое перемещение сопровождается гидролизом одной пирофосфатной связи в молекуле АТР.

§ 1.6. РНК-полимеразы. Транскрипция

Как уже говорилось, ДНК является носителем информации о структуре всего набора белков, характерных для определенного вида живого организма, т. е. в ней закодирована информация обо всех аминокислотных последовательностях белков данного организма. Но сборкой белков из аминокислот ДНК непосредственно не управляет. Для этого существуют посредники в виде молекул РНК, которые синтезируются при непосредственном участии ДНК. Эти РНК принято обозначать как *мессенджер РНК*, сокращенно *мРНК* (messenger – посыльный). Такие молекулы комплементарны определенному участку одной из нитей ДНК, несущему информацию о структуре какого-либо из подлежащих синтезу белков.

Синтез новых молекул РНК осуществляется с помощью специального матричного фермента – *РНК-полимеразы*. Присоединение каждого следующего мономера к растущей полимерной цепи РНК осуществляется с участием

очередного нуклеотида в программирующей ДНК, который обеспечивает отбор комплементарного рибонуклеотида. Нужный кусок ДНК переписывается в виде РНК, в связи с чем процесс получил название *транскрипции* (от англ. transcribe – переписывать). В том участке РНК-полимеразы, который непосредственно участвует в происходящем химическом превращении – ее активном центре, одна из нитей ДНК отстраняется от участия в отборе, происходит временное разделение нитей ДНК и образуется короткий дуплекс, состоящий из кусочка программирующей ДНК и кусочка вновь синтезированной РНК. Та цепь ДНК, которая управляет синтезом РНК, называется *транскрибируемой цепью*. По мере удаления от активного центра синтезированная РНК отделяется от ДНК, а транскрибированный участок ДНК воссоединяется с временно устраненным комплементарным участком (рис. 4).

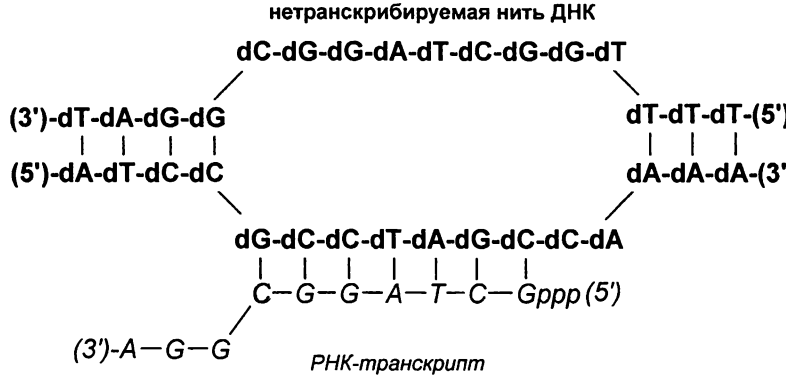


Рис. 4. Схема транскрипции фрагмента двунитевой ДНК (жирным шрифтом обозначена ДНК; курсивом – РНК)

Если пренебречь небольшими химическими различиями между U и dT, C и dC и т. д., то можно сказать, что полученная при транскрипции цепь совпадает по последовательности нуклеотидов с соответствующим участком той цепи ДНК, которая не участвует непосредственно в управлении транскрипцией (*нетранскрибируемая цепь*).

Транскрипция играет важную роль при репликации ДНК. Дело в том, что ДНК-полимераза способна только удлинять уже предобразованную полинуклеотидную цепь (осуществлять *элонгацию*). Для того, чтобы началась элонгация, необходимо наличие связанного с реплицируемой ДНК комплементарными взаимодействиями олиго- или полинуклеотида, который называют *праймером*. Роль праймера при репликации играют рибоолигонуклеотиды, синтезирующиеся с помощью РНК-полимеразы, входят с состав фрагментов Оказаки и на заключительном этапе репликации замещаются на соответствующие дезоксирибоолигонуклеотиды.

§ 1.7. Трансляция и генетический код

Основной универсальной функцией РНК является управление синтезом новых молекул белка. Последовательность рибонуклеотидов в мРНК переводится в последовательность аминокислот создаваемой белковой молекулы. Этот процесс называется *трансляцией* (от англ. translation). Существует специальный код, приводящий в соответствие последовательности нуклеотидов в РНК в аминокислотные последовательности. Из очевидных арифметических соображений ясно, что минимум три нуклеотида РНК должны кодировать одну аминокислоту. Кодирования динуклеотидами недостаточно – из четырех нуклеотидов можно построить всего $4^2 = 16$ упорядоченных комбинаций, что недостаточно для 20 аминокислот. Различных тринуклеотидов можно построить $4^3 = 64$, что создает даже определенную избыточность.

Закон соответствия между тринуклеотидами и аминокислотами называется *генетическим кодом*. Эти тририбонуклеотиды называют *кодонами*. Например, аминокислоте фенилаланин соответствуют кодоны UUU и UUC. В табл. 1 представлена вся структура генетического кода.

Таблица 1

Генетический код

Аминокислоты и стоп-кодоны	**Кодоны**	**Аминокислоты**	**Кодоны**
Фенилаланин	UUU UUC	Изолейцин	AUU AUC
Лейцин	UUA UUG	Метионин	AUG
Серин	UCU UCC	Треонин	ACU ACC
Тирозин	UAU UAC	Аспарагин	AAU AAC
Стоп-кодон	UAA UAG	Лизин	AAA AAG
Цистеин	UGU UGC	Серин	AGU AGC
Стоп-кодон	UGA	Аргинин	AGA AGG
Триптофан	UGG	–	–
Лейцин	CUU CUC CUA CUG	Валин	GUU GUC GUA GUG

Окончание табл. 1

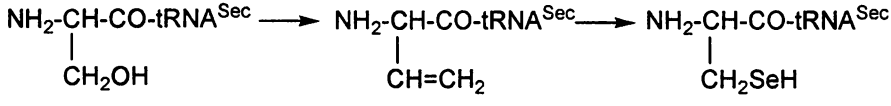
Пролин	CCU CCC CCA CCG	Аланин	GCU GCC GCA GCG
Гистидин	CAU CAC	Аспартат	GAU GAC
Глутамин	CAA CAG	Глутамат	GAA GAG
Аргинин	CGU CGC CGA CGG	Глицин	GGU GGC GGA GGG

Из 64 возможных кодонов 61 соответствует разным аминокислотам, причем число кодонов, приходящихся на одну аминокислоту, варьирует от 1 до 6. Три кодона – UAA, UAG и UGA – никаким аминокислотам не соответствуют и являются сигналами для прекращения дальнейшего роста (терминации) полипептидной цепи. Их называют *кодонами-терминаторами* или стоп-кодонами.

Новые молекулы белка собираются на чрезвычайно сложно устроенных частицах, называемых *рибосомами.* Они состоят из нескольких молекул РНК и нескольких десятков разных белков, которые соответственно называют *рибосомными РНК* (сокращенно *рРНК*) и *рибосомными белками.* Частицы, состоящие из молекул белка и молекул нуклеиновых кислот, называют *нуклеопротеидами.* Интересно и очень важно для работы рибосом, что их компоненты сгруппированы в две легко отделяемые друг от друга частицы (*рибосомные субчастицы*) разного размера, которые соответственно называют большой и малой субчастицами. Их принято характеризовать значениями (округленными) соответствующих констант седиментации, выраженных в единицах Сведберга (S), характеризующих скорость, с которой частица перемещается в центробежном поле, создаваемым ультрацентрифугой. У прокариот, в частности у наиболее детально исследованных рибосом кишечной палочки *Escherichia coli*, субчастицы обозначаются соответственно 50S и 30S. У эукариот эти субчастицы существенно больше и обозначаются как 60S и 40S. Что делает в рибосоме огромное количество разных белков, еще далеко не полностью установлено, и их чаще всего просто обозначают номерами, снабженными буквой S (small), если они находятся в малой, и буквой L (large), если они принадлежат большой субчастице. Каждая из субчастиц содержит по одной большой молекуле РНК, которые с использованием тех же единиц обозначаются соответственно 23S и 16S для рРНК прокариот и 28S и 18S для рРНК эукариот. Эти РНК, в отличие от мРНК, не кодируют каких-либо аминокислотных последовательностей. Большие субчастицы прокариот кроме того содержат одну молекулу небольшой 5S РНК, а большие субчастицы эукариот – 5S и 5.8S РНК.

В биосинтезе белка на рибосомах участвуют не сами аминокислоты, а соответствующие *аминоацил-тРНК* – продукты их присоединения к сравнительно небольшим специальным молекулам, транспортным РНК (тРНК). При этом каждой из двадцати аминокислот соответствует своя тРНК, а иногда и несколько разных тРНК. мРНК на рибосоме на каждой стадии удлинения создаваемой белковой цепи непосредственно отбирает не аминокислоту, а ту тРНК, к которой она присоединилась перед поступлением на рибосому. Это присоединение происходит с помощью специальных ферментов – *аминоацил-тРНК-синтетаз*, которые узнают одну определенную аминокислоту и одну или несколько соответствующих этой аминокислоте тРНК.

В отличие от остальных аминоацильных фрагментов, селеноцистеинил-тРНК образуется не из свободной аминокислоты, а из специфической серил-тРНК, которой соответствует кодон UGA, являющийся в первую очередь кодоном-терминатором. После образования серил-тРНК остаток серина при действии специальных ферментов превращается в остаток селеноцистеина.



Сама трансляция происходит в результате взаимодействия кодонов с полностью или частично комплементарными тринуклеотидами, находящимися в определенном участке тРНК, которые называют *антикодонами*. Например, тРНК, связывающая аминокислоту фенилаланин, имеет антикодон (3')AAG(5'), полностью комплементарный кодону UUC и частично комплементарный кодону UUU.

Из сказанного выше ясно, что помимо мРНК живым организмам необходимы и другие молекулы РНК, прежде всего рибосомные и транспортные. Они также получаются путем транскрипции с помощью РНК-полимераз. При этом у эукариот имеется три разных РНК-полимеразы, одна из которых катализирует синтез рибосомных РНК (РНК-полимераза I), вторая – синтез мРНК (РНК-полимераза II), а третья (РНК-полимераза III) – синтез транспортных РНК и ряда других небольших РНК (малые ядерные РНК или small nuclear, snРНК), необходимых для некоторых других процессов. Последовательности этих РНК должны быть запрограммированы в ДНК. Однако содержащаяся в ДНК информация не исчерпывается последовательностями, кодирующими структуры определенных мРНК и структуры рРНК, тРНК и snРНК, принимающих участие в некоторых промежуточных превращениях мРНК. Уже сегодня можно предполагать, что она значительно богаче, а, по-видимому, многое еще вообще не известно.

Для создания определенной РНК необходимо, чтобы транскрипция началась в определенной точке огромной молекулы ДНК. Здесь должна оказаться и расположиться нужным для транскрипции образом РНК-полимераза. Для этого существует специальная область, чаще всего расположенная перед ко-

дирующей последовательностью. Ее роль состоит в том, чтобы связать и ориентировать определенным образом РНК-полимеразу. Эту область, если она расположена вдоль цепи близко от начала старта транскрипции, называют *промотором*. Наряду с промотором в выборе участков ДНК, существенных для начала (*инициации*) транскрипции, часто важную роль играют участки транскрибируемой ДНК, весьма удаленные (на тысячи или даже десятки тысяч остатков нуклеотидов) от стартовой точки транскрипции. Эти участки принято называть *энхансерами*. У эукариот РНК-полимеразы не узнают непосредственно промоторы. Это взаимодействие опосредовано дополнительными белками, известными под общим названием *факторы транскрипции*. Для каждой из трех РНК-полимераз имеется свой набор факторов транскрипции, в связи с чем их обозначают TFI, TFII TFIII с соответствующими большими латинскими буквами (например, TFIIA, TFIIB).

Из сказанного видно, что ДНК как минимум содержит информацию, необходимую для синтеза белков и рибонуклеиновых кислот. Участки ДНК, содержащие эту информацию вместе со всеми вспомогательными участками (промоторами, энхансерами и др.) и ответственными за реализацию этой информации, называют *генами*, а процесс реализации такой информации – *экспрессией* этих генов. При репликации ДНК иногда происходят ошибки, которые могут привести к изменению содержащейся в ДНК информации или к ее потере. Возникновение таких наследуемых изменений называется *мутацией*. Это может привести к различным биологическим последствиям. В отдельных, очень редких, случаях биологический организм получает полезные свойства, и мутации оказываются движущей силой эволюции. Однако в большинстве случаев эти изменения нежелательны или вообще недопустимы. Поэтому у живых организмов имеются специальные системы исправления мутаций (*репарации*).

§ 1.8. Посттранскрипционные и пострепликационные превращения нуклеиновых кислот

Полипептиды и полинуклеотиды, образующиеся при матричном биосинтезе, далеко не всегда готовы к выполнению своих биологических функций. В большинстве случаев для получения биологически активного биополимера они должны подвергнуться химической модификации. Особенно многообразны процессы модификации, которым подвергаются полипептидные цепи, образовавшиеся при трансляции мРНК. Эти процессы получили название посттрансляционной модификации. Они будут рассмотрены в § 7.4.

Нескольким важным процессам модификации подвергаются образовавшиеся при транскрипции полирибонуклеотиды (*посттранскрипционная модификация*). Среди них можно выделить две основные группы процессов. Во-первых, существенному превращению подвергаются полирибонуклеотиды у эукариот при образовании мРНК, рибосомных, транспортных и некоторых

других РНК в связи с тем, что кодирующие их гены имеют мозаичную структуру, т. е. соответствующие последовательности дезоксирибонуклеотидов не являются непрерывными. Они могут содержать некоторые вставочные последовательности, получившие название *интронов*. Кодирующие последовательности, разделенные интронами, в этом случае называют *экзонами*. При транскрипции получаются РНК-предшественники (пре-РНК), содержащие и нужные в конечной (зрелой) молекуле РНК фрагменты, и лишние, которые должны быть удалены (вырезаны) из пре-РНК. Каждое вырезание должно сопровождаться воссоединением концов последовательных экзонов, между которыми находился интрон. Этот процесс получил название *сплайсинг*. При образовании мРНК сплайсинг происходит после образования кэпа и полиаденилирования (см. ниже).

При формировании подготовленной к трансляции мРНК с первичным транскриптом происходит несколько ферментативных превращений (рис. 5). Первым процессом является отщепление от находящегося на 5'-конце транскрипта трифосфатной группы одного остатка фосфорной кислоты, т. е. на 5'-конце образуется дифосфат (*2*). На следующей стадии остаток GMP от GTP (*3*) переносится на концевой дифосфат транскрипта с образованием между ними остатка трифосфата, связанного по двум концам с 5'-OH-группой гуанозина и концевым остатком транскрипта (*4*). Далее происходит метилирование N7 атома гуанина и метилирование одного или нескольких OH-групп, примыкающих к 5'-концу транскрипта. Образование этой конструкции (кэпа, *5*) называют *кэпированием*.

После образования кэпа обычно происходит метилирование одной или нескольких 2'-OH групп нуклеотидных остатков, примыкающих к кэпу.

Для окончательного формирования мРНК требуется еще одна модификация – присоединение к 3'-концевой OH-группе транскрипта нескольких десятков остатков (от 50 до 200) аденозин-5'-монофосфата (*полиаденилирование*). Полиаденилирование, равно как и наличие кэпа, защищает транскрипт от действия внутриклеточных нуклеаз.

Вторая большая группа посттранскрипционных процессов представлена модификацией оснований, а в некоторых случаях также метилированием 2'-OH группы рибозы, происходящей в основном в составе тРНК. Модифицированные гетероциклы, представленные в каждой модифицированной РНК единичными звеньями или небольшим числом, называют *минорными основаниями*. В табл. 2 приведены нуклеозиды, содержащие некоторые наиболее распространенные минорные основания. К их числу относят дигидроурацил, в котором гидрирована связь C5=C6 в урациле; тимин, характерный для ДНК, но изредка присутствующий вместо урацила также и в составе РНК; 4-тиоурацил, придающий чувствительность тРНК к УФ-облучению. Своеобразную структуру имеет широко представленный в различных тРНК нуклеозид псевдоуридин, в котором урацил связан с рибозой не C-N, а C-C гликозидной связью с атомом C6. Присутствие инозина в антикодоне тРНК влияет на специфичность взаимодействия тРНК и мРНК. Очень распространенной

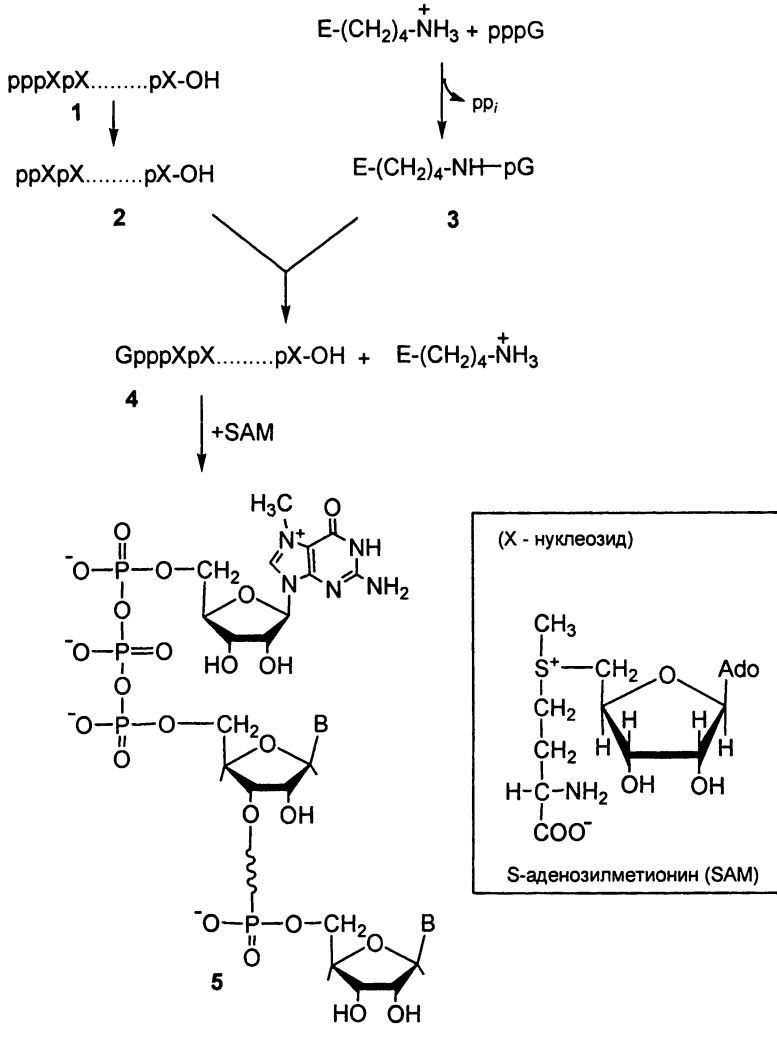
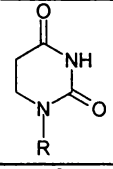
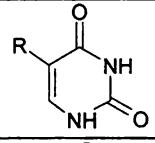
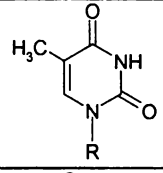
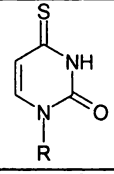
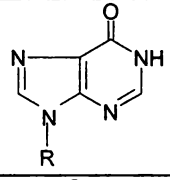
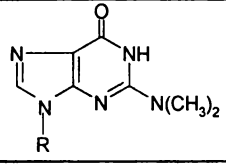


Рис. 5. Образование кэпа на мРНК: *1* – мРНК с концевым трифосфатом; *2* – мРНК с дифосфатом на конце; *3* – образование фермент-связанного GMP; *4* – перенос GMP на концевой дифосфат с высвобождением фермента; *5* – окончательный вид кэпа, метилированного по N7 гуанина

модификацией оснований является метилирование различных атомов азота. В качестве одного из многочисленных примеров в табл. 2 приведен 2,2-диметилгуанозин.

Таблица 2

Некоторые наиболее распространенные модифицированные нуклеозиды в составе тРНК

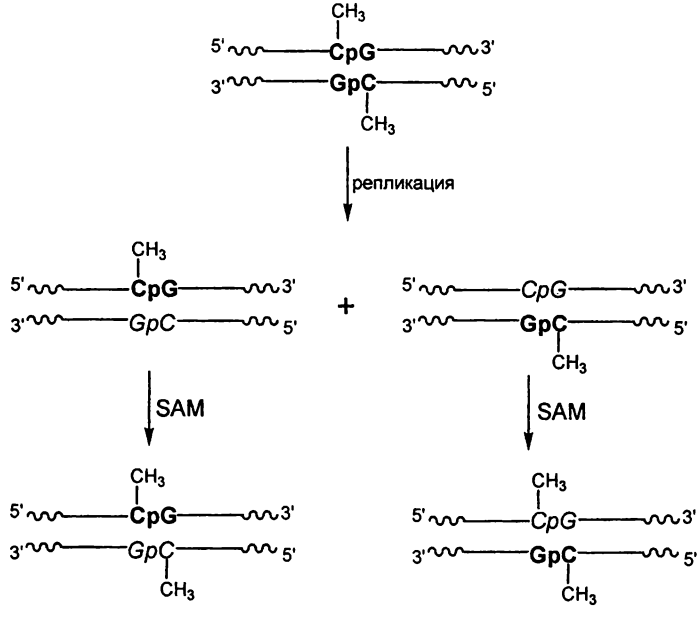
Название	Структурная формула*	Сокращенный символ
Дигидроуридин		hU
Псевдоуридин		Ψ
Риботимидин		rT
4-тиоуридин		s4U
Инозин		I
2,2-диметилгуанозин		$m^2 2G$

* R – остаток рибозы.

В настоящее время выявлено более 80 различных минорных оснований в составе тРНК из разных живых организмов. Все они естественно являются продуктами посттранскрипционной модификации продуктов транскрипции. Их функциональное значение выявлено лишь в отдельных случаях. Полную информацию о минорах в составе тРНК, их структурах и биологических источниках можно найти на сайте http//rna-mdb.cas.albany.edu/RNAmods.

Единственная функционально значимая модификация у эукариот ДНК (*пострепликационная модификация*) – это метилирование остатков цитозина

по атому C5, которое происходит по самокомплементарным фрагментам CpG. Донором CH_3-группы служит S-аденозилметионин. В ДНК генома встречаются участки, богатые фрагментами CpG (CpG-островки). Транскрипционно активны участки ДНК, у которых CpG не метилированы. Участки, богатые метилированными CpG, как правило, мало или вообще неактивны. У бактерий пострепликативное метилирование может происходить также по экзоциклическим аминогруппам аденина (N6) и цитозина (N4). При репликации метилированные фрагменты расходятся по двум дочерним нитям, и образуется дуплексный фрагмент, в котором один из цитозинов метилирован, а второй нет. Специфичная к таким фрагментам метилаза метилирует второй цитозин, как показано на схеме.



Благодаря специфичности этой метилазы после репликации восстанавливаются метилированные по обоим цитозинам CpG-фрагменты, но не происходит метилирование каких-либо дополнительных оснований, т. е. при размножении сохраняется распределение метилированных цитозинов по ДНК (подобные распределения часто называют *паттернами* (от англ. pattern – выкройка, узор).

§ 1.9. Вирусы и инфекционные нуклеиновые кислоты

Помимо участия в описанных и ряде других процессов, связанных с функционированием клеток, нуклеиновые кислоты являются компонентами многочисленных вирусов. *Вирусы* представляют собой инфекционные частицы, содержащие нуклеиновую кислоту и некоторый набор белков. Таким образом, вирусы являются нуклеопротеидами. Попадая в определенные клетки хозяина, они размножаются, используя весь необходимый для этого биохимический аппарат клетки. Вирусы чрезвычайно многообразны по принципам своего строения и механизму размножения. При этом носителем информации в зависимости от природы вируса могут быть как ДНК, так и РНК, причем существуют вирусы, содержащие однонитевую ДНК, а вирусные РНК вообще в большинстве случаев являются однонитевыми. Однако для их размножения, которое может происходить только по принципу комплементарности, необходимо промежуточное образование комплементарной нуклеиновой кислоты, программирующей синтез нуклеиновых кислот для новых вирусных частиц. В этом случае вирусную нуклеиновую кислоту квалифицируют как «плюс», а комплементарную ей промежуточную – как «минус» НК.

Кроме того, в состав зрелых вирусных частиц входят и белки, прежде всего белки оболочки вируса и белки-ферменты, необходимые для репликации вирусной нуклеиновой кислоты. Попадая в клетку, вирусы вносят в нее новую информацию и переключают значительную часть внутриклеточного метаболизма на воспроизводство новых молекул вирусной нуклеиновой кислоты и на биосинтез белков, необходимых для формирования новых вирусных частиц (*структурные белки*) и промежуточных стадий этих процессов (*неструктурные белки*). Например, в вирусе клещевого энцефалита носителем генетической информации является однонитевая вирусная РНК. При попадании в инфицированную клетку эта РНК, работая первоначально как мРНК, программирует синтез неструктурного белка NS5, который далее катализирует синтез большого числа РНК-копий, комплементарных РНК вируса («минус-РНК»). Эта же РНК программирует синтез еще одного неструктурного белка NS3, который, используя информацию, содержащуюся в «минус-РНК», катализирует биосинтез большого числа молекул РНК, комплементарных «минус-РНК», т. е. идентичных исходной РНК («плюс-РНК»). Вместе с синтезируемыми параллельно структурными белками вируса они формируют внутри зараженной клетки большое число новых вирусных частиц, разрушающих в итоге клетку и способствующих распространению инфекции по организму.

Большое внимание исследователей привлекает, в частности, изучение *вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1*, который является носителем неизлечимой на данный момент болезни СПИД (синдром приобретенного иммунодефицита человека). Этот вирус относится к группе *ретровирусов*. В состав вирусной частицы в качестве носителя информации входит вирусная РНК. Кроме того, помимо белков, формирующих вирусную частицу, в нее входит

молекула фермента *обратной транскриптазы*. Это фермент катализирует на первой стадии инфекции синтез молекул ДНК – комплементарных копий вирусной РНК (*кДНК*, применительно к вирусам их обычно называют «минус» ДНК). После этого образовавшиеся «минус» ДНК кодируют синтез (при помощи того же фермента) комплементарных ей «плюс» ДНК, в результате чего образуются двунитевые ДНК, содержащие последовательности, воспроизводящие последовательность нуклеотидов вирусной РНК, но построенные из дезоксирибонуклеотидов. С помощью специального, кодируемого вирусной РНК белка *интегразы* двунитевые ДНК встраиваются в геном человека и далее, используя аппарат транскрипции и трансляции клетки, воспроизводят большое число молекул вирусной РНК и структурных белков вируса, создавая условия для формирования в зараженной клетке большого числа новых вирусных частиц.

Значительное число вирусов размножаются в бактериях. В этом случае их называют *бактериофагами*, или просто *фагами*. Среди них наиболее детально изучаются и используются фаги Т4 и Т7. У самого большого из фагов этой группы, Т4, содержащего более сотни генов, запрограммирован синтез ряда ферментов, значение которых для жизнедеятельности самого фага не вполне понятно. Некоторые его ферменты нашли широкое применение в качестве инструмента биохимических исследований, например, программируемый ДНК фага Т4 фермент *полинуклеотидкиназа*, который катализирует присоединение фосфата к 5'-концу полинуклеотидов. Донором фосфата в этом случае служит γ-фосфат молекулы АТР. Если последняя содержит высокомеченый γ-фосфат, то тем самым появляется возможность ввести радиоактивную метку в 5'-конец полинуклеотида, что широко используется при установлении первичной структуры и химической модификации нуклеиновых кислот. Бактериофаг Т7 содержит программу для синтеза специальной РНК-полимеразы, которая обладает высокой эффективностью в синтезе РНК, причем при наличии в составе ДНК, содержащей интересующий исследователя ген, позволяет получать на каждую транскрибируемую нить такой ДНК многие сотни РНК-транскриптов. В то же время среди вирусов встречаются и такие, у которых наследственная программа представлена однонитевой ДНК.

В природе существуют также инфекционные частицы, состоящие только из однонитевых молекул РНК – *вироиды* и *вирусоиды*. Первые обладают способностью размножаться внутри клетки, т. е. инфекционны сами по себе, вторые размножаются лишь в присутствии специальных вирусов-помощников. В обоих случаях сами инфекционные частицы представляют собой «плюс» РНК, а комплементарные им промежуточные, необходимые для их репликации, – «минус» РНК.

Глава 2. Биоорганическая химия нуклеотидов и нуклеиновых кислот

§ 2.1. Нуклеотиды

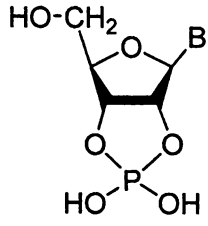
2.1.1. Негенетические нуклеозид-5'-трифосфаты. Нуклеозидциклофосфаты

В § 1.1 введено понятие о нуклеотидах как нуклеозид-5'-фосфатах, являющихся структурными единицами нуклеиновых кислот. Было также сказано, что при биосинтезе нуклеиновых кислот мономерами являются не монофосфаты нуклеозидов, а нуклеозид-5'-трифосфаты, у которых с 5'-OH группой пентозы связано три остатка фосфорной кислоты.

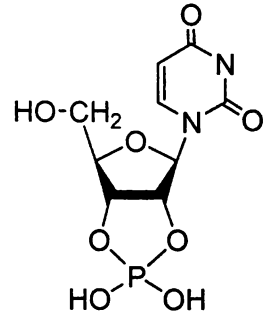
Помимо участия в качестве мономеров, в биосинтезе нуклеиновых кислот NTP выполняют другие важные биохимические функции. Так, UTP и GTP являются участниками биосинтеза олиго- и полисахаридов, а CTP участвует в биосинтезе фосфолипидов.

Важнейшим участником огромного числа биохимических процессов является ATP – основной аккумулятор энергии в живой природе. Подавляющее число биохимических процессов, идущих с повышением свободной энергии Гиббса ΔG, протекает сопряженно с гидролизом одной из пирофосфатных связей в ATP. Гидролиз пирофосфатной связи между α- и β-фосфатами происходит с $\Delta G^{0\prime} = -31{,}8$ кДж/моль, а между β- и γ-фосфатами с $\Delta G^{0\prime} = -31{,}0$ кДж/моль. Кроме того, ATP является донором фосфата в многочисленных биохимических реакциях фосфорилирования. Например, превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат имеет $\Delta G^{0\prime} = -13{,}8$ кДж/моль, т. е. реакция фосфорилирования глюкозы с помощью ATP характеризуется значением $\Delta G^{0\prime} = -18{,}0$ кДж/моль. Систематически эти процессы рассматриваются в курсах биологической химии.

Остаток фосфорной кислоты может быть связан одновременно с двумя OH-группами. Такие нуклеотиды называют *нуклеозидциклофосфатами*. Например, при действии ряда химических реагентов, способствующих образованию фосфоэфирных связей, на нуклеозид-3'-фосфаты легко получается связь с соседней 2'-OH группой с образованием нуклеозид-2',3'-циклофосфатов. В этом случае используют обозначение циклофосфатного фрагмента в виде символа >. Например, уридин-2',3'-циклофосфат обозначают как U > p.

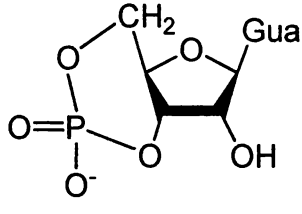


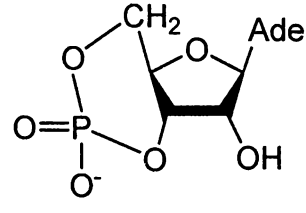
нуклеозид-2',3'-циклофосфат



U>p

Гуанозин-3',5'-циклофосфат и *аденозин-3',5'-циклофосфат* участвуют в регуляции большого числа биохимических процессов (§ 17.1).





2.1.2. Конформация полинуклеотидной цепи. Взаимная ориентация пентозного гетероцикла в нуклеиновых кислотах

Биологическое функционирование белков и нуклеиновых кислот неразрывно связано с их пространственной структурой. Геометрия любой молекулы определяется тремя группами геометрических характеристик ее химических связей – длинами всех ковалентных связей, углами между связями, образуемыми каждым из атомов молекулы, и торсионными углами между связями, примыкающими к соседним атомам. Первые две группы характеристик для атомов лежат в достаточно узких пределах и сравнительно мало влияют на геометрию молекулы в целом. Поэтому геометрия макромолекулы в основном определяется торсионными углами между атомами остова молекулы. Эти углы определяют взаимное расположение в пространстве четырех соседних атомов A, B, C и D. Схема определения понятия торсионного угла приведена в приложении.

При описании истинной конформации нуклеиновых кислот и их компонентов в свободном виде и в составе нуклеиновых кислот возникает три главных вопроса. Первый – это конформация рибозофосфатного остова (*конформация полинуклеотидной цепи*), состоящего из периодически повторяющихся атомов P, O-5', C-5', C-4', C-3', O-3' Она описывается шестью торсионными углами – α, β, γ, δ, ε, η, характеризующими повороты вокруг шести

повторяющихся связей: P – O-5', O-5' – C-5', C-5' – C-4', C-4' – C-3', C-3' – O-3' и O-3' – P (рис. 6).

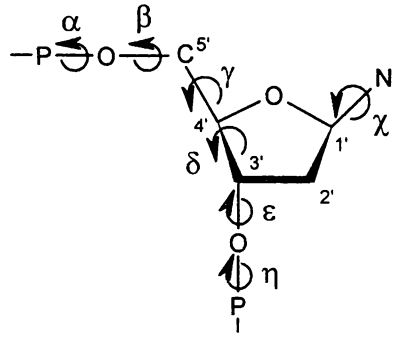


Рис. 6. Торсионные углы в полинуклеотидной цепи

Именно эти углы определяют общий ход полинуклеотидной цепи. Сама по себе полинуклеотидная цепь не имеет какой-либо резко предпочтительной конформации, и последняя в основном определяется взаимодействиями между гетероциклическими основаниями. Эти взаимодействия и вытекающие последствия для пространственной структуры нуклеиновых кислот рассматриваются в гл. 5.

Два других вопроса – это конформация нуклеотидов и нуклеотидных звеньев в составе нуклеиновых кислот. Это, во-первых, конформация углеводного фрагмента. Он является общим для нуклеотидов и углеводов и поэтому рассматривается в гл. 13, посвященной биоорганической химии углеводов. Во-вторых, это взаимная ориентация углеводного звена и гетероциклического основания.

Взаимная ориентация фуранозного цикла и гетероциклического основания определяется торсионным углом, описывающим поворот гетероцикла вокруг гликозидной связи (*конформация по гликозидной связи*).

Этот угол, обозначаемый χ, определяется как угол для системы атомов O-4' – C-1' – N1 – C2 у пиримидиновых и O-4' – C-1' – N9 – C4 у пуриновых нуклеотидов. Для качественного рассмотрения можно в грубом приближении представить себе, что средняя плоскость фуранозного цикла и плоскость гетероцикла взаимно перпендикулярны. Торсионный угол χ определяет, какая часть гетероцикла оказывается над плоскостью фуранозного кольца, а какая соответственно повернута в сторону от кольца. Две стороны гетероциклов, как в случае пуринов, так и в случае пиримидинов, неэквивалентны. Наиболее близкими к плоскости, характеризующей расположение фуранозного цикла в случае пиримидиновых гетероциклов тимина, урацила и цитозина, являются группа C6-H6. Группа C2-O2 существенно более объемная и к тому же полярная. В случае пуриновых гетероциклов – аденина и гуанина – бли-

жайшими к той же плоскости оказываются группа C8-H8 и существенно более объемистый фрагмент C4-N3-C2 (рис. 7).

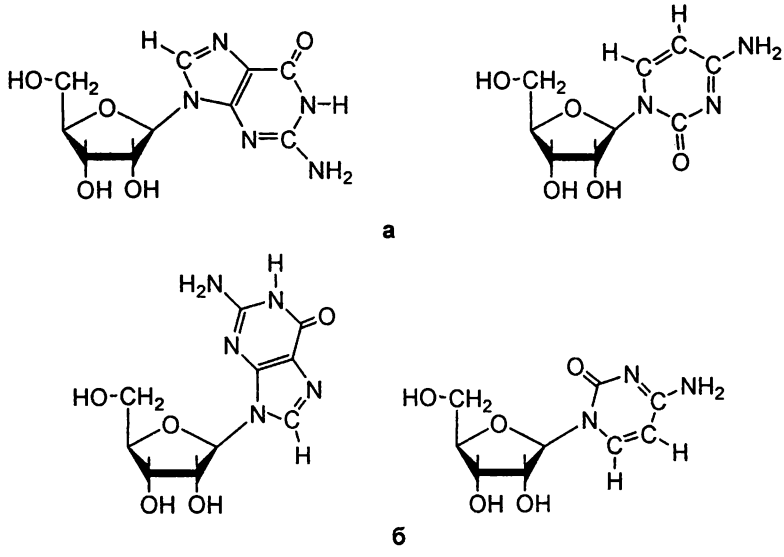


Рис. 7. Ориентация гетероцикла относительно фуранозного цикла: *а* – *анти*-конформация; *б* – *син*-конформация

Конформации, при которых более объемистый фрагмент повернут в направлении от фуранозного кольца, называют *анти-конформациями*. В большинстве случаев в составе нуклеиновых кислот *анти*-конформации являются предпочтительными. В противоположной ситуации, когда над фуранозным кольцом располагается фрагмент C2-O2 пиримидина или шестичленный цикл пуриновой системы, конформации называются *син-конформациями*.

Предпочтительность *анти*-конформации не является абсолютной. В следующей главе будут описаны случаи, когда в нуклеиновых кислотах гуанозин находится в *син*-конформации. Кроме того, последняя оказывается предпочтительной у модифицированных оснований, если в положение 6 пиримидина или положение 8 пурина вводятся объёмистые заместители, например, метильная группа или атом брома.

2.1.3. Спектральные характеристики нуклеозидов и нуклеотидов

Гетероциклические основания, а также нуклеиновые кислоты и их компоненты обладают характерными спектрами поглощения в ближней ультрафиолетовой области спектра. Каждый нуклеозид и нуклеотид в зависимости от входящего в его структуру основания имеет характерный спектр в области 220–280 нм. В табл. 3 приведены длины волн в максимуме и минимуме по-

глощения для нуклеозидов и нуклеотидов при pH 7 и молярные коэффициенты экстинкции при этих длинах волн.

Таблица 3

Спектральные характеристики основных нуклеозидов и нуклеотидов при pH 7

Соединение	λ_{max},	ε_{260}	λ_{min},	ε_{min}
Аденозин (при pH 6)	260	14,9	227	14,9
2'-дезоксиаденозин	260	14,9	225	15,2
Аденозин-5'-фосфат	259	15,3	227	15,4
Гуанозин (при pH 6)	253	13,6	223	–
2'-дезоксигуанозин	253	11,8	223	13,0
Гуанозин-5'-фосфат	252	11,4	227	13,4
Уридин	262	10,0	230	10,1
уридин-5'-фосфат	262	9,9	230	10,0
Тимидин	267	9,3	–	9,65
Тимидин-5'-фосфат	267	9,3	–	9,6
Цитидин	229,5	7,55	226	8,3
2'-дезоксицитидин	271	7,4	250	9,0
Цитидин-5'-фосфат	271	7,4	249	9,1

Приведенные величины молярных коэффициентов экстинкции (ε) нельзя непосредственно использовать для получения этих величин для олиго- и полинуклеотидов. Даже в однонитевых полинуклеотидах, т. е. в отсутствие вторичной структуры, гетероциклы в соседних звеньях цепи достаточно сильно влияют на величины экстинкций. Так, коэффициент экстинкции для мононуклеотида pA равен 15 400, а для ApA в расчете на один остаток A – 13 700 $M^{-1}см^{-1}$. Более правильно для таких оценок использовать величины ε для динуклеотидов, приведенные для 260 нм в табл. 4.

Таблица 4

Величины экстинкции для четырех основных мононуклеотидов и всевозможных динуклеотидов

РНК	ε_{260}	ДНК	ε_{260}	РНК	ε_{260}	ДНК	ε_{260}
pA	15,4	pdA	15,4	CpG	8,9	dCpdG	9,0
pC	7,2	pdC	7,4	CpU	8,1	dCpdT	7,6
pG	11,5	pdG	11,5	GpA	12,6	dGpdA	12,6
pU	9,9	pdT	8,7	GpC	8,7	dGpdC	8,8
ApA	13,7	dApdA	13,7	GpG	10,8	dGpdG	10,8
ApC	10,5	dApdC	10,6	GpU	10,6	dGpdT	10,0
ApG	12,5	dApdG	12,5	UpA	12,3	dTpdA	11,7
ApU	12,0	dApdT	11,4	UpC	8,6	dTpdC	8,1
CpA	10,5	dCpdA	10,6	UpG	10,0	dTpdG	9,5
CpC	7,1	dCpdC	7,3	UpU	9,8	dTpdT	8,4

Одним из центральных вопросов биоорганической химии нуклеиновых кислот, а в равной степени и других биополимеров, является изучение и применение их химических превращений. Они широко используются при установлении первичной структуры, в первую очередь, для селективного расщепления огромных молекул на фрагменты, доступные современным методам секвенирования. Реакционная способность нуклеотидных остатков молекул нуклеиновых кислот существенно зависит от их расположения в пространственной структуре нуклеиновых кислот и особенно в составе нуклеопротеидов. Поэтому исследование реакций определенных остатков этих структур дает информацию об их пространственной организации. В этом случае химические реакции становятся инструментом исследования. Химические реакции широко используются для получения различных производных нуклеиновых кислот (дериватизации), например, несущих радиоактивные или флуоресцентные метки, которые находят многочисленное применение при изучении живых организмов. Наконец, химические методы лежат в основе искусственного синтеза нуклеиновых кислот, в том числе генов, поэтому в последующих параграфах (§ 2.2–2.4) рассматриваются химические превращения нуклеиновых кислот и их компонентов.

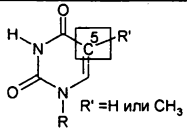
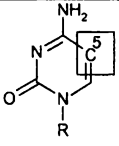
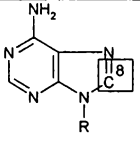
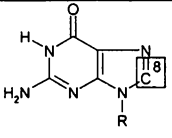
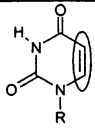
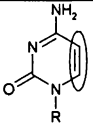
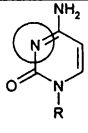
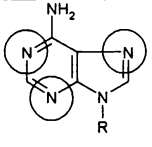
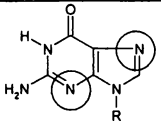
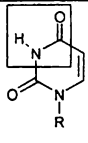
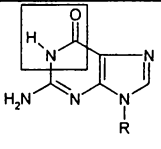
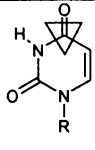
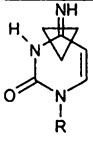
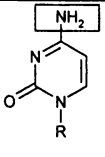
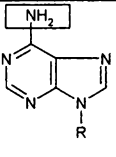
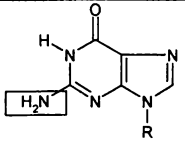
§ 2.2. Реакции по гетероциклическим основаниям

2.2.1. Реакционные центры в гетероциклических основаниях

Гетероциклические основания, входящие в состав нуклеиновых кислот и их фрагментов, содержат несколько различных *реакционных центров* как на атомах углерода, так и на атомах азота самих циклов и в составе экзоциклических аминогрупп. Некоторые реакции проходят по нуклеофильным атомам кислорода карбонильных групп. В табл. 5 приведены основные реакционные центры гетероциклических оснований в нуклеиновых кислотах и их компонентах. В этих соединениях гетероциклы связаны атомами азота N1 пиримидиновых или N9 пуриновых оснований с атомами C-1' остатков рибозы или дезоксирибозы, причем R означает остаток рибозы в случае нуклеозидов, остаток рибозилфосфата в случае нуклеотидов и олиго- или полинуклеотид в случае олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Таблица 5

Реакционные центры гетероциклов в составе нуклеотидов и нуклеиновых кислот

Тип реакции	Тимин (урацил)	Цитозин	Аденин	Гуанин
I			–	–
II	–	–		
III			–	–
IV		–		
V		–	–	
VI			–	–
VII	–			

Примечание. Типы реакций: **I** – электрофильное присоединение по двойным связям; **II** – электрофильное замещение; **III** – нуклеофильное присоединение по двойной связи C5-C6; **IV** – реакции по атомам пиридинового типа; **V** – по группе NH-C=O; **VI** – по атому C4 пиримидиновых оснований; **VII** – по экзоциклической аминогруппе; R – фрагмент пентозы, ее фосфата или остаток олиго- и полинуклеотида.

Для гетероциклических оснований характерны реакции присоединения по двойным связям. Наиболее широко используются реакции по связи C5=C6 пиримидиновых оснований. В табл. 5 эти два атома C обведены овалами. Центрами, для которых характерно взаимодействие с электрофильными реагентами, являются атомы C5 пиримидиновых и C8 пуриновых оснований. В этой таблице данные атомы обведены квадратами. По атому C6 пиримидиновых оснований присоединяются нуклеофилы. Атака нуклеофильными реагентами может также происходить по атомам C4 урацила, тимина и таутомерной формы цитозина. В табл. 5 эти атомы обведены треугольниками.

В состав всех гетероциклов нуклеиновых кислот и их компонентов входят атомы азота. Три из четырех основных гетероциклов содержат атомы -N=. У них неподеленная пара электронов находится на одной из sp^2-гибридных орбиталей, причем эта орбиталь лежит в плоскости гетероцикла. Такими атомами являются N3 цитозина, атомы N1, N3 и N7 аденина и атомы N3 и N7 гуанина. Их часто называют атомами пиридинового типа. В таблице они обведены кружками. Кроме того, атом N входит в некоторые гетероциклы (урацил, тимин, гуанин, гипоксантин) в виде фрагмента NH-CO, у которого неподеленная пара электронов атома N сопряжена с π-связью C=O группы. Эти группировки в табл. 5 обведены прерывистыми квадратами. Атомы азота также входят в состав экзоциклических аминогрупп, которые присутствуют в трех из четырех главных гетероциклов – аденине, цитозине и гуанине. В таблице они обведены прямоугольниками. В соответствии со сказанным можно привести несколько групп превращений по гетероциклам.

Описываемые в этом разделе превращения могут в соответствующих условиях происходить как с мономерами, так и в составе нуклеиновых кислот. Однако в последнем случае превращения будут затруднены по чисто пространственным причинам и особенно в результате участия гетероциклов в специфических взаимодействиях, таких как образование между ними водородных связей, играющих важную роль в формировании пространственной структуры нуклеиновых кислот (§ 4.1) и их связей с белками при образовании нуклеопротеидов (§ 12.4).

2.2.2. Таутомерные превращения и кислотно-основные свойства нуклеозидов и нуклеотидов

Гетероциклические основания могут претерпевать таутомерные превращения. Ниже приведены возможные таутомерные формы четырех основных гетероциклов. Эти формы отличаются по своим спектральным характеристикам, реакционным центрам и способности к нековалентным взаимодействиям (рис. 8).

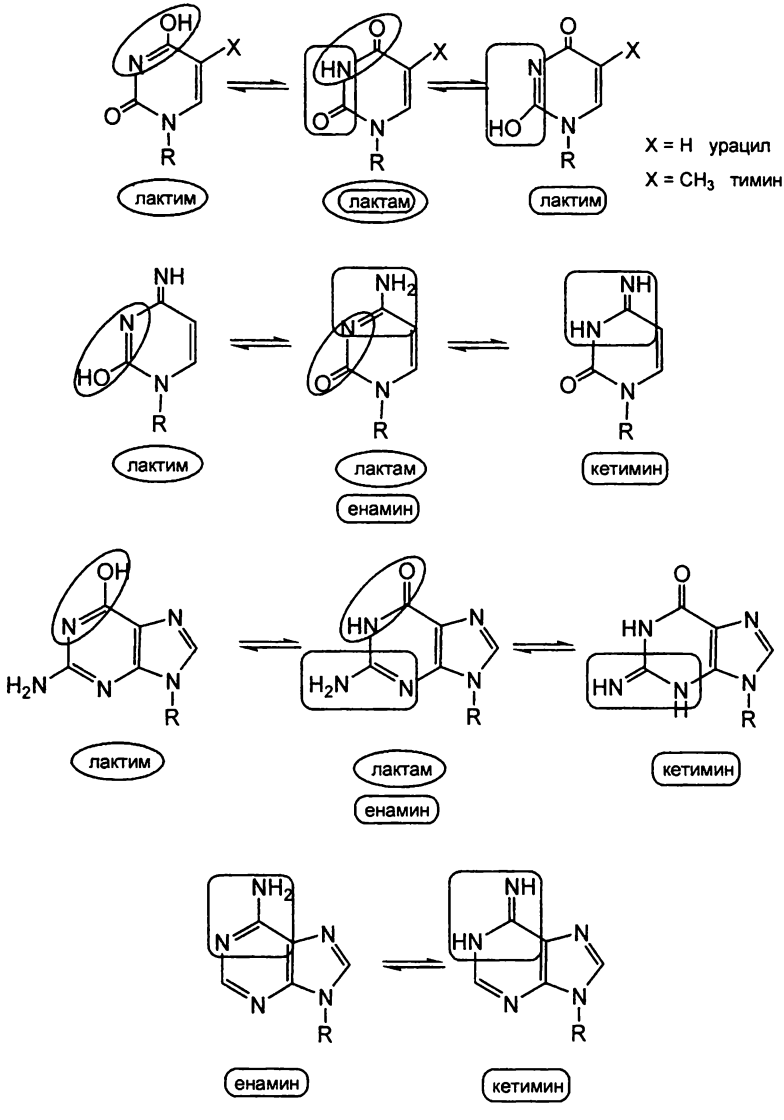


Рис. 8. Таутомерные формы основных нуклеозидов

Некоторые реакционные центры гетероциклических оснований могут протонироваться, приобретая положительный заряд, а NH-группы, сопряженные с C=O группами в урациле, тимине и гуанине, могут ионизоваться. На рис. 9 представлены схемы образования протонированных и ионизованных форм оснований в составе нуклеозидов.

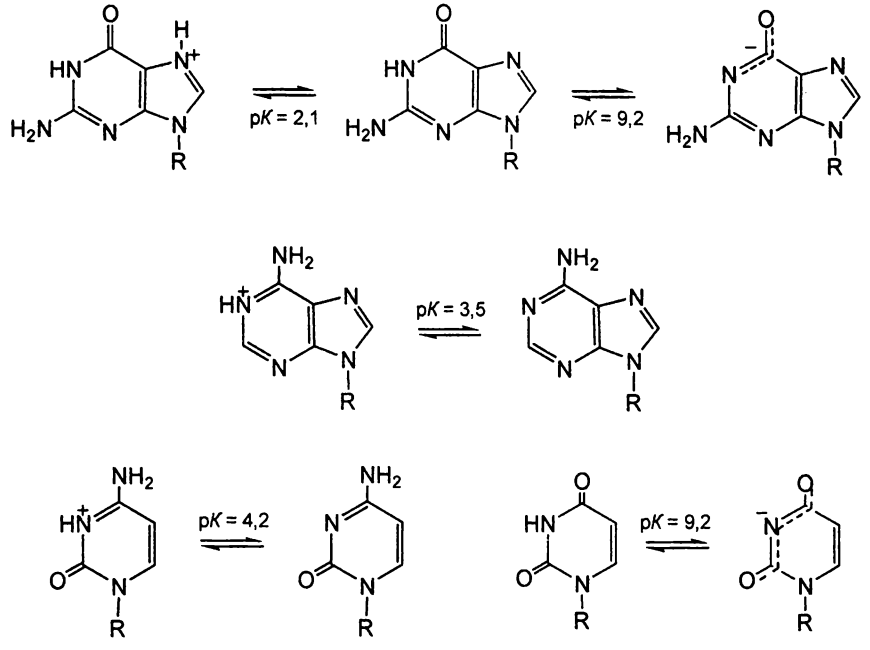


Рис. 9. Кислотно-основные превращения оснований в составе нуклеиновых кислот и их компонентов

Полные данные о значениях pK_a для нуклеозидов и нуклеотидов представлены в табл. 6.

Таблица 6

Кислотно-основные свойства нуклеозидов и нуклеотидов

Соединение	Значение pK_a			
	Основание	Пентоза	Фосфатная группа	
			pK_1	pK_2
Уридин	9,25	12,59	–	–
дезоксиуридин	9,3	–	–	–
уридин-5'-фосфат	9,5	–	1,0	6,4
уридин-2' и 3'-фосфаты (смесь)	9,96	–	1,0	5,9
дезокситимидин	9,8	12,85	–	–
дезокситимидин-5'-фосфат	10,0	–	1,6	6,5
Цитидин	4,1	12,24	–	–
дезоксицитидин	4,25	–	–	–
цитидин-5'-фосфат	4,5	–	0,8	6,3
цитидин-2'-фосфат	4,3	–	0,8	6,19
цитидин-3'-фосфат	4,16	–	0,8	6,04

Окончание табл. 6

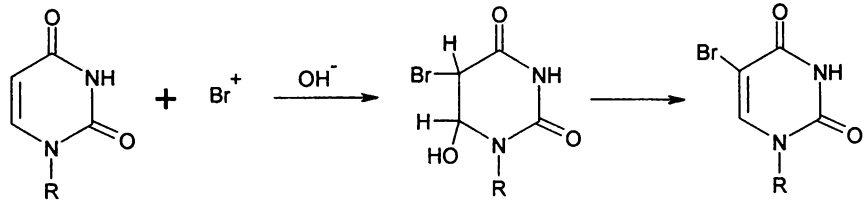
Аденозин	3,63	12,35	–	–
дезоксиаденозин	3,8	–	–	–
Аденозин-5'-фосфат	3,74	13,06	0,9	6,05
Аденозин-2' и 3'-фосфаты (смесь)	3,7	–	0,9	6,1
Гуанозин	2,1; 9,33	12,3	–	–
дезоксигуанозин	2,4; 9,33	–	–	–
Гуанозин-5'-фосфат	2,9; 9,6	–	0,7	6,3
Гуанозин-2' и 3'-фосфаты (смесь)	2,4; 9,8	–	0,7	6,0

Как видно из приведенных данных, различие в кислотно-основных свойствах оснований между нуклеозидами и нуклеотидами незначительно. Более существенно влияет на значения pK_a оснований и пентозы присоединение остатка фосфорной кислоты. Кислотно-основные превращения оснований существенно влияют на их спектральные характеристики, способности к нековалентным взаимодействиям и ко многим химическим превращениям. Ионизация ОН-групп пентозного и фосфатного фрагментов оказывает существенное влияние на реакционную способность этих групп.

2.2.3. Реакции с электрофильными реагентами

Квантовохимические расчеты показывают, что на атомах С5 пиримидиновых оснований имеется избыточный отрицательный, а на атомах С6 – избыточный положительный заряд, поэтому по атому С5 проходят реакции с электрофильными реагентами. Это могут быть либо реакции электрофильного замещения или реакции присоединения-отщепления по двойной связи. Реакции электрофильного замещения проходят также по атому С8 пуриновых оснований, у которых какой-либо избыточный заряд практически отсутствует.

В качестве примера реакции по С5 можно привести реакцию бромирования уридина в водном растворе, которая начинается присоединением катиона Br^+ с последующей атакой OH^- по С6. Образующийся 5-бром-6-гидрокси-5,6-дигидроуридин, отщепляя молекулу воды, дает 5-бромуридин:



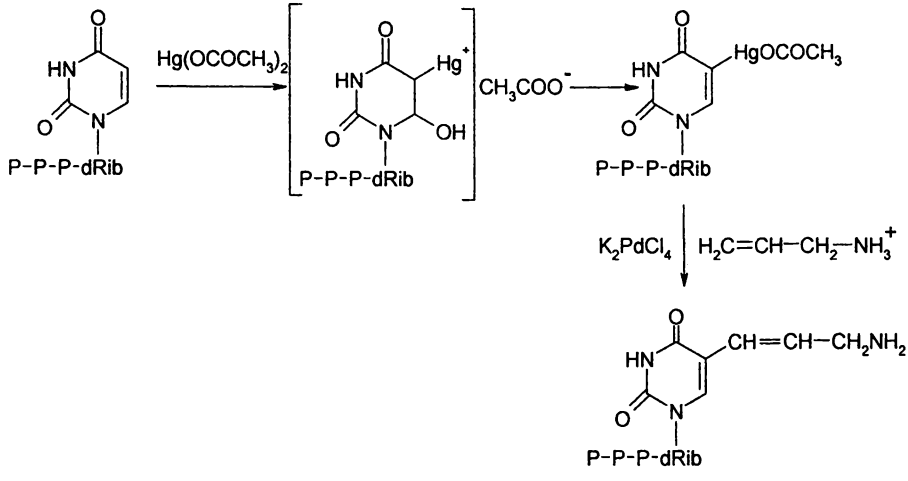
Использование в аналогичных условиях ICl приводит к образованию 5-иодуридина. Эта реакция представляет интерес как удобный метод введе-

ния в нуклеиновые кислоты радиоактивных изотопов иода. Атом F в пятое положение уридина можно ввести с помощью трифторгипофторита.

Как в составе нуклеозида, так и более крупных фрагментов нуклеиновой кислоты атом брома способен к различным реакциям замещения, что позволяет вводить в нуклеиновые кислоты различные, например, флуоресцирующие, группы.

Галогенирование пиримидиновых оснований в составе нуклеозидов существенно облегчается в присутствии аммоний-церий нитрата (гексанитратоцерат (IV) аммония). Выходы иод-, бром- и хлорпроизводных при этом превышают 90 %. Однако атомы фтора таким способом не вводятся.

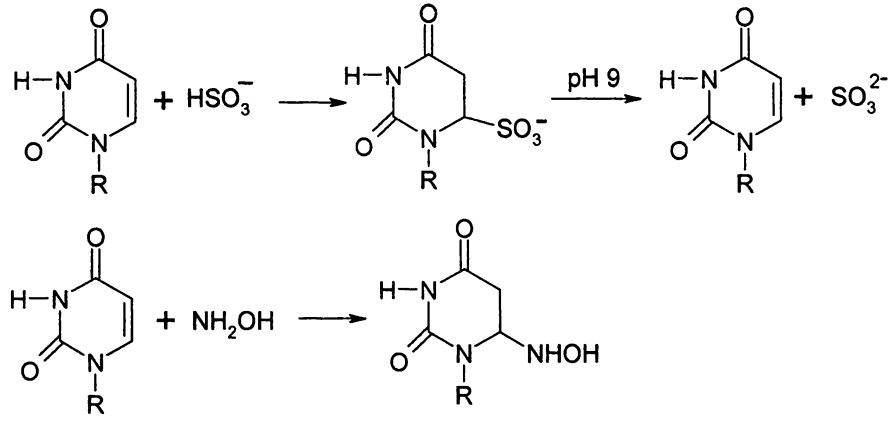
Легко проходит в водном растворе *меркурирование* атома C5 ацетатом ртути. Эта реакция позволяет вводить атомы ртути непосредственно в нуклеиновые кислоты. Меркурирование, как и введение брома, открывает дорогу к получению многочисленных производных. Например, в присутствии в качестве катализатора K_2PdCl_4 в меркурированные производные можно ввести непредельный углеводородный остаток. Поскольку в итоге образуется нульвалентный палладий, то процесс может происходить в каталитическом режиме, если в системе присутствует окислитель (например, $CuCl_2$), способный регенерировать двухвалентный палладий. Условия реакции настолько мягкие, что позволяют проводить процесс с уридин-5'-трифосфатом, т. е. с сохранением достаточно лабильного трифосфатного фрагмента.



Этот нуклеозидтрифосфат, как и ряд других, содержащих модифицированный в пятом положении остаток пиримидинового основания, сохраняет субстратные свойства по отношению к полимеразам нуклеиновых кислот, что позволяет вводить модифицированные остатки в олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты.

2.2.4. Присоединение нуклеофильных реагентов по атомам С6 и С4 пиримидиновых оснований

Избыточный положительный заряд на атоме С6 способствует присоединению по этому атому нуклеофильных реагентов, таких как бисульфит, гидроксиламин и его алкильные производные. *Присоединение бисульфита* происходит в слабокислой и нейтральной среде. В щелочной среде продукт неустойчив и регенерирует с отщеплением сульфит-аниона.



Из реакций с нуклеофилами наибольшее применение нашла *реакция с гидразином*, которая приводит к отщеплению от нуклеиновых кислот пиримидиновых гетероциклов. Первая стадия этой реакции представляет собой нуклеофильное присоединение гидразина по С6 и сопровождается внутримолекулярной атакой NH_2-группы гидразидного радикала на атом С4, завершающейся выщеплением пиразолинона-5 (в случае урацила) или 1-метилпиразолинона-5 (в случае тимина) и превращением уридина или тимидина в 1-β-D-рибозил- или в 1-β-D-дезоксирибозилмочевину.

Аналогичная реакция проходит и по остатку цитозина, который, скорее всего, реагирует в форме кетимина с отщеплением 5-аминопиразола. В обоих случаях 1-β-D-рибозил- или 1-β-D-дезоксирибозилмочевина реагируют с избытком гидразина с выделением мочевины и образованием соответствующего гидразида (рис. 10).

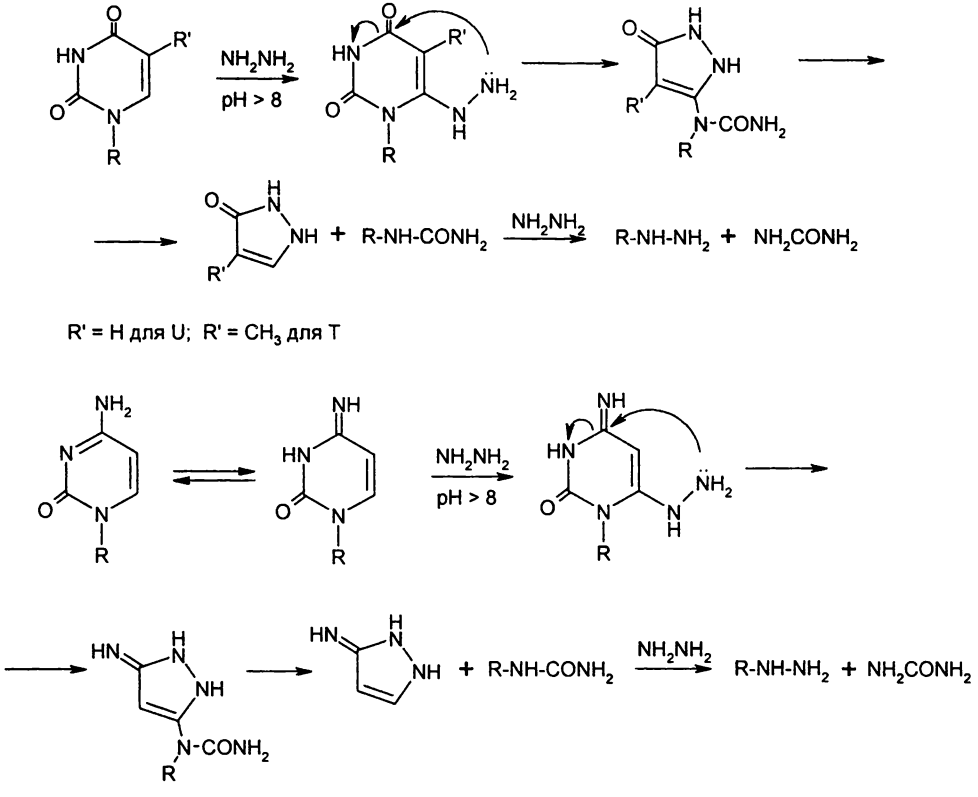
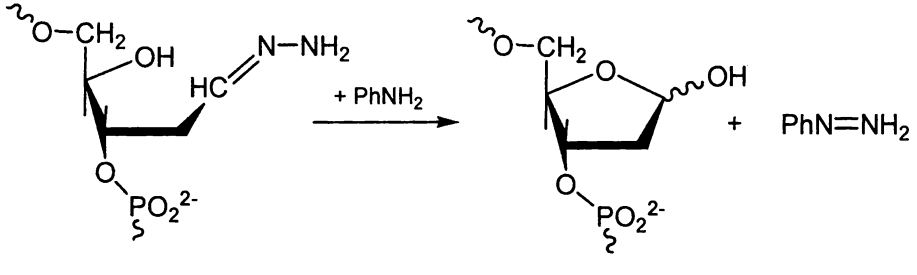


Рис. 10. Превращения пиримидиновых гетероциклов при действии гидразина

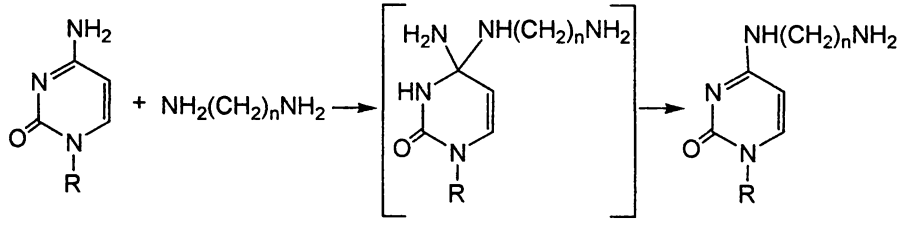
Гидразид реагирует с избытком гидразина с замещением остатка мочевины на остаток гидразина, который легко изомеризуется в гидразон открытой (нециклической) формы пентозного фрагмента.



Обработка альдегидом (например, бензальдегидом) приводит к превращению этого фрагмента в остаток дезоксирибозы, лишенный гетероциклического основания, апиримидиновый фрагмент или *апиримидиновый сайт* (от англ. site – место). Если обработку нуклеотида, ДНК или ее фрагмента гидразином проводить в 0,1 н КОН, то реакция проходит с высокой степенью се-

лективности по остаткам цитозина, почти не затрагивая остатки тимина. Это позволяет получать производное, в котором на месте всех остатков цитозина находится апиримидиновый сайт. В общем случае фрагменты ДНК, лишенные гетероциклического основания, называют апуриновыми/апиримидиновыми сайтами, или сокращенно *АП-сайтами.*

Избыточный положительный заряд на атоме С4 цитозина способствует замещению аминогруппы на различные нуклеофилы – амины (реакция переаминирования) и на анион OH^- (дезаминирование). Так, в частности, можно заместить С4 аминогруппу цитозина на радикал $-NH(CH_2)_nNH_2$.



Таким образом, можно ввести в положение С4 цитозина алифатическую аминогруппу, которая может быть проацилирована производными, несущими различные функциональные группы – реакционноспособные, флуоресцирующие и т. п. Реакции с аминами требуют участия последних в непротонированной форме, чему благоприятствуют щелочные условия. Эти же условия приводят к увеличению дезаминирования цитозина. Следовательно, при введении радикалов, содержащих алифатическую аминогруппу, дезаминирование и переаминирование являются конкурентными процессами. В первом случае происходит превращение цитозина в урацил. При переаминировании образуются различные производные по остатку цитозина. Эти реакции особенно эффективно протекают, если по атому С6 введен остаток сульфита, который по окончании реакции может быть удален в щелочной среде. Существенно, что при переаминировании один атом Н при азоте N4 сохраняется, и тем самым сохраняется способность к Уотсон-Криковскому взаимодействию с комплементарным остатком G. Поэтому такие модифицированные остатки цитозина могут служить компонентами двунитевой структуры нуклеиновой кислоты, а соответствующие нуклеозидтрифосфаты – субстратами при репликации и транскрипции. Замещение аминогруппы может быть особенно мягко проведено, если заменить 4-аминогруппу на остаток 1,2,4-триазола, связанного с атомом N4-цитозина по атому N4 триазола.

2.2.5. Реакции по атомам N пиридинового типа. Метилирование гетероциклов

Избыточный отрицательный заряд имеется также на атомах N пиридинового типа, поэтому они легко реагируют с электрофильными алкилирующими реагентами. Наиболее широкое применение для *алкилирования* по этим атомам азота нашел в настоящее время диметилсульфат. Алкилирование, в частности метилирование, приводит к появлению на гетероцикле положительного заряда. Это существенно ослабляет гликозидную связь между гетероциклом и С-1'-атомом дезоксирибозы, в результате чего она легко гидролизуется с отщеплением соответствующего метилированного гетероцикла. Если гидролиз гликозидной связи происходит в составе ДНК, то образуется вмонтированный в полинуклеотидную цепь фрагмент дезоксирибозы, не связанный с каким-либо гетероциклом (апуриновый сайт). В щелочной среде реакция с диметилсульфатом приводит к расщеплению гетероцикла по его имидазольному фрагменту (рис. 11).

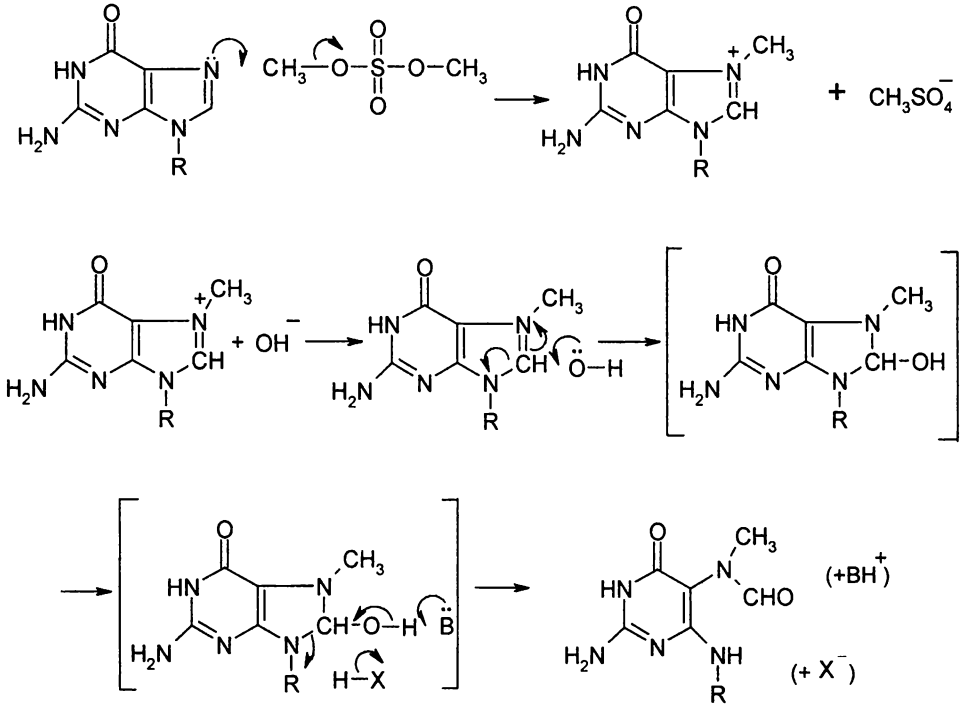


Рис. 11. Схема превращений остатка гуанина при алкилировании диметилсульфатом в щелочной среде

Хорошим алкилирующим реагентом является также диазометан, который при присоединении протона становится донором карбкатионов CH_3^+ На

рис. 12 приведена схема реакции с остатком урацила в качестве донора протона. В этом случае на имеющем кислый характер атоме N3 возникает отрицательный заряд, и по этому атому происходит метилирование. Аналогично проходит алкилирование по атому N3 остатка гуанина. В водных условиях донором H^+ становятся молекулы воды, и точками алкилирования становятся атомы пиридинового типа, например, N3 цитозина и N7 гуанина.

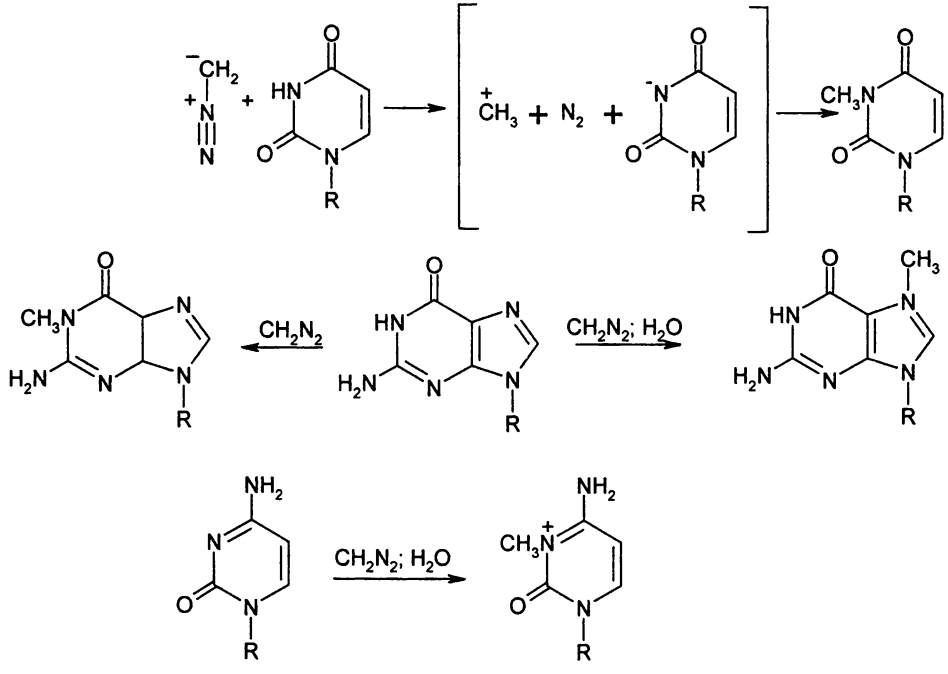
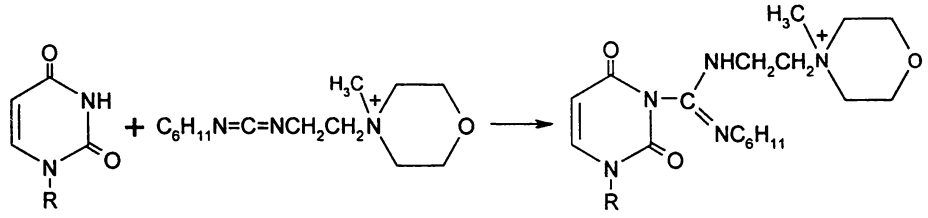


Рис. 12. Схема метилирования гетероциклов диазометаном

При *реакции с пероксидами* (смесь H_2O_2 с кислотой или надкислоты) атомы N пиридинового типа могут превращаться в N-оксиды.

2.2.6. Реакции по NH-C=O группам

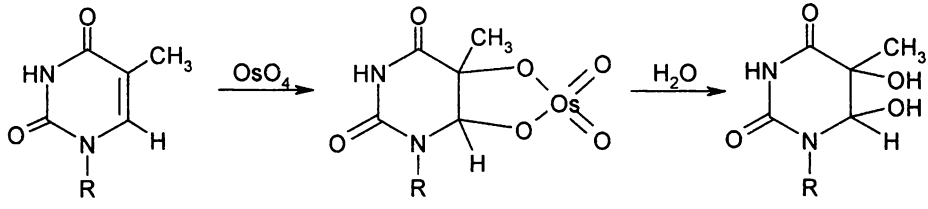
В гетероциклы уридина, тимидина, гуанозина и некоторых минорных компонентов (инозин, псевдоуридин) входят атомы азота в виде -NH-CO-групп. Такие атомы азота в силу сопряжения с C=O группой не обладают основными свойствами. Однако в слабощелочной среде группа N-H ионизуется с образованием нуклеофильного аниона, который может реагировать с электрофильным атомом C карбодиимидов с образованием продукта *присоединения карбодиимида* по этому атому N.



Реакция проходит по атомам, которые при образовании дуплексных структур не участвуют в Уотсон-Криковских взаимодействиях, поэтому приведенная реакция не проходит по остаткам гуанина и урацила в двуспиральных фрагментах нуклеиновых кислот, что делает ее полезной для выявления таких фрагментов в нуклеиновых кислотах. Реакция с UMP проходит в несколько раз быстрее, чем с GMP. С наибольшей скоростью реакция проходит по остаткам инозина и псевдоуридина.

2.2.7. Окисление по двойной связи C5=C6

По связи C5=C6 пиримидиновых оснований могут проходить различные реакции окисления с образованием 5,6,-дигидроксипиримидиновых оснований. Такие производные, в частности, получаются при окислении $KMnO_4$, однако подобные основания неустойчивы, и происходит деградация гетероцикла. Достаточно устойчивы дигидроксипроизводные, получаемые при использовании в качестве окислителя тетроксида осмия. Первой стадией реакции является *циклоприсоединение* OsO_4 с последующим гидролизом, приводящим к отщеплению $OsO_2(OH)_2$.

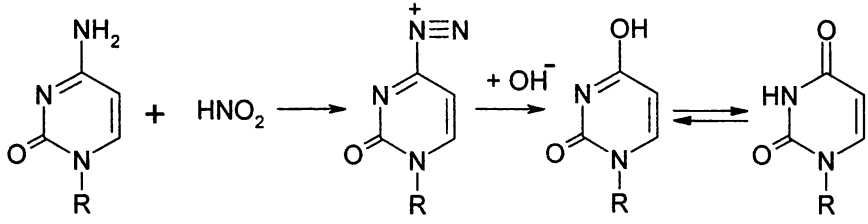


2.2.8. Реакции по экзоциклическим аминогруппам

Среди реакций по экзоциклическим аминогруппам в первую очередь следует отметить реакции *ацилирования*, используемые для введения защит в целях последующего использования N-ацилнуклеозидов в качестве мономеров в химическом синтезе олигонуклеотидов (гл. 5). Ацилирование проводится с помощью соответствующих хлорангидридов в пиридине.

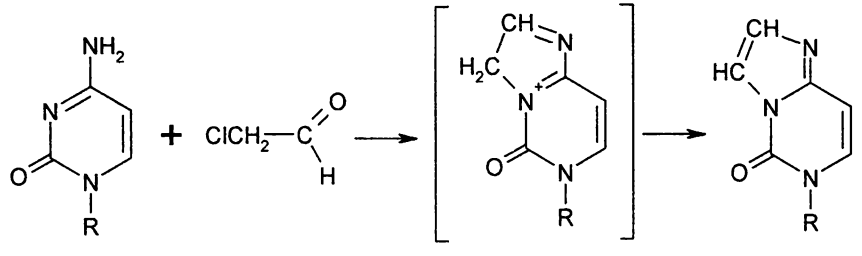
Вторая важная реакция по экзоциклическим аминогруппам – *дезаминирование* под действием азотистой кислоты. Оно происходит через промежуточное образование диазония, который легко гидролизуется с образованием OH-

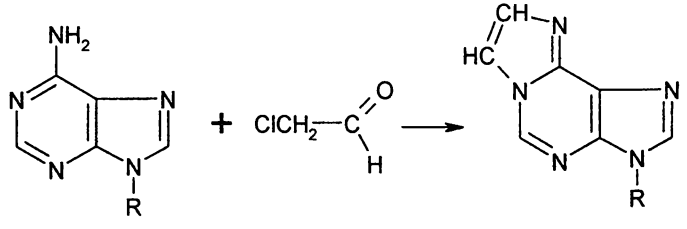
производного, находящегося в таутомерном равновесии с кетоформой. Эта реакция приводит к превращению цитозина в урацил, аденина в гипоксантин и гуанина в ксантин. Реакция может протекать в природных условиях под действием HNO_2, образующейся при грозовых разрядах. Как будет видно при рассмотрении вторичной структуры нуклеиновых кислот, в случае ДНК это изменяет смысл генетической информации, т. е. приводит к мутациям.



2.2.9. Реакции с бифункциональными реагентами

Среди бифункциональных реагентов нашли широкое применение реакции с галогенальдегидами и диальдегидами. При pH 4–5 происходят реакции с участием экзоциклических аминогрупп, реакции с хлорацет- и бромацетальдегидами, приводящие к образованию интенсивно флуоресцирующих *этенопроизводных*.





Механизм реакции полностью не установлен, но можно предполагать, что он происходит ступенчато: одной из стадий является алкилирование атомов N1 аденина или N3 цитозина $ClCH_2$-фрагментом реагента, а другой – реакция

альдегидной группы с экзоциклической аминогруппой. В результате происходит формирование пятичленного гетероцикла.

2.2.10. Фотохимические реакции пиримидиновых гетероциклов

Широкое применение нашли фотохимические реакции присоединения по двойной связи CH=CH. Детально изучена реакция *циклодимеризации* тиминов, происходящая между соседними остатками тимидина в составе ДНК и являющаяся одним из главных источников повреждения ДНК ультрафиолетовым светом. В результате реакции может образоваться четыре изомера (рис. 13).

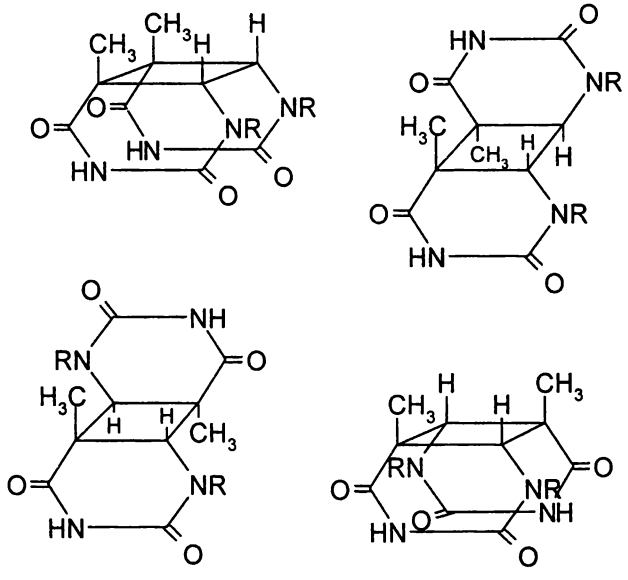


Рис. 13. Структура изомерных продуктов фотохимической циклодимеризации остатков тимина

Если на комплементарных цепях в благоприятном взаимном расположении находятся два остатка тимина, то легко проходит *циклоприсоединение* в составе ДНК к *псоралену* и его производным. Особенностью этого реагента является его бифункциональность – фотохимическая реакция может происходить как по пироновому, так и по фурановому циклу псоралена. При этом циклоприсоединение по фурановому циклу не лишает способности производного псоралена участвовать в циклоприсоединении к тимину по пироновому циклу. Наибольшее применение нашел 4,5',8-триметилпсорален. На рис. 14 представлена схема последовательного взаимодействия этого производного с двумя остатками тимина.

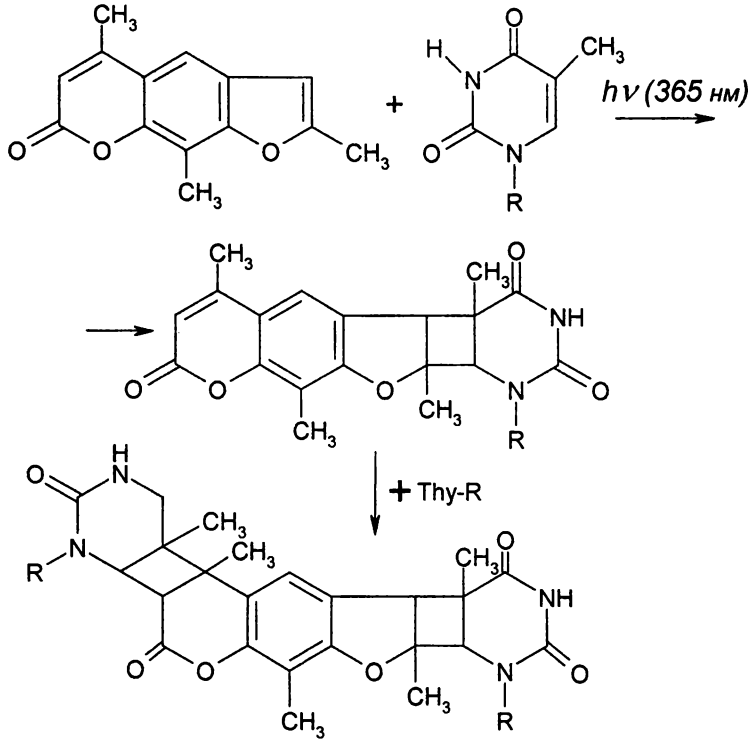
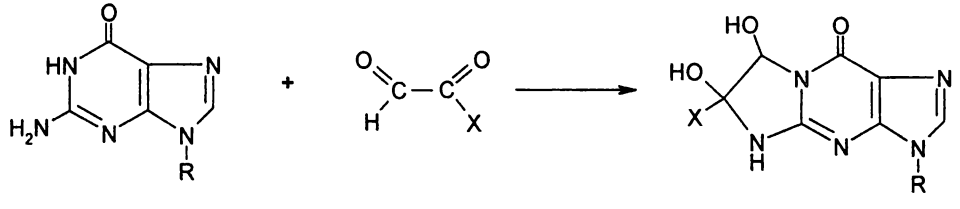


Рис. 14. Схема последовательного взаимодействия двух остатков тимина с 4,5',8-триметилпсораленом

Фотохимически активными являются также некоторые производные пиримидиновых нуклеозидов – 5-бромуридин, 5-иодуридин, 4-тиоуридин, 5-бромцитидин и 5-иодцитидин.

Еще одной группой бифункциональных реагентов, специфично модифицирующих остатки гуанина в составе нуклеиновых кислот, являются *глиоксаль* и его производные (чаще всего фенилглиоксаль). Альдегидные группы реагируют с атомом N1 и экзоциклической аминогруппой.



R - нуклеотид или полинуклеотид

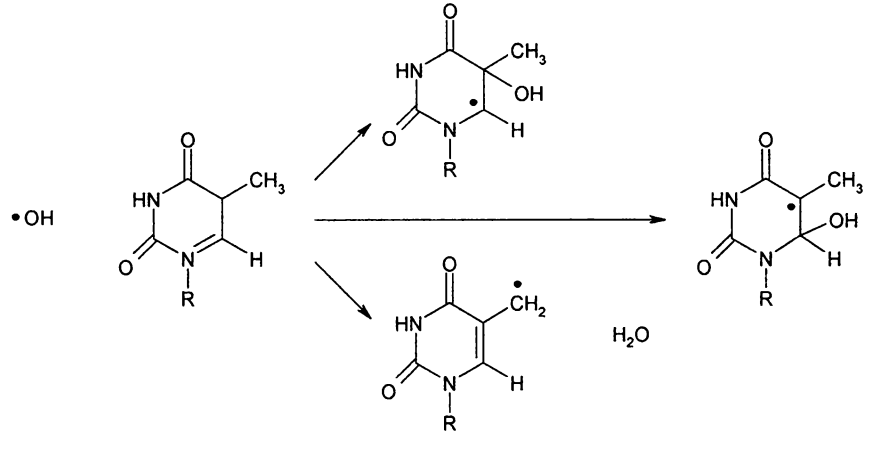
X=H глиоксаль

X=C_6H_5 фенилглиоксаль

Среди многочисленных производных нуклеозидов и нуклеотидов широкое применение нашли производные, несущие фотоактивные группы. Они могут быть легко введены в исходные производные, если в них предварительно введена алифатическая аминогруппа, которая затем может быть проацилирована N-гидроксисукцинимидными эфирами фотоактивных производных. Аминогруппа может быть введена в положения 4 или 5. При связывании фотоактивной группы с атомом C5 остатка урацила реакция проходит по атому, который не участвует в Уотсон-Криковских взаимодействиях.

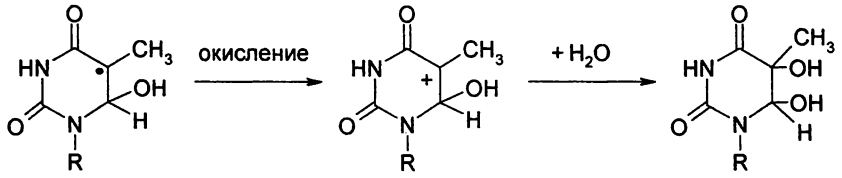
2.2.11. Реакции гетероциклических оснований со свободными радикалами

Рассмотренные превращения являются гетеролитическими и характеризуются высокой специфичностью. В отличие от них гомолитические превращения оснований, происходящие при действии на них свободных радикалов, значительно менее специфичны и, следовательно, многообразны. Эти превращения особенно интенсивно изучались в связи с исследованием механизма воздействия проникающей радиации. Главным источником свободных радикалов в биологических системах при радиолизе является образование из воды свободных гидроксилов •OH. Для радикалов •OH характерны *реакции отрыва атомов H* и реакции присоединения по двойной связи. Ниже приводятся эти реакции по остаткам тимина.

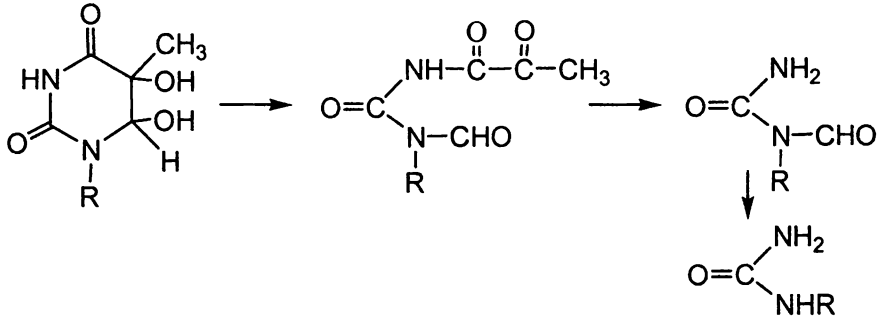


Аналогично проходят реакции по гетероциклам в случае урацила и цитозина.

Образовавшиеся свободные радикалы либо рекомбинируют друг с другом с образованием соответствующих димеров, либо при наличии в среде окислителя (донора электронов) превращаются в высокореакционноспособный карбокатион. Последний, в частности, может реагировать с водой с образованием соответствующих дигидроксипроизводных. Ниже эти превращения представлены для тимина в случае, если OH-радикал присоединился к атому C6.



Образующиеся дигидроксипроизводные могут претерпевать последующую окислительную деградацию. Так, остаток 5,6-дигидрокситимина может превращаться в остаток ^{1}N-формил-^{2}N-пирувилмочевины и далее в остаток N-формилмочевины и затем мочевины.



Если процесс происходит в присутствии кислорода, то в первую очередь присоединяется молекула O_2 с образованием пероксирадикала, который может претерпевать разнообразные превращения, в частности, образование неустойчивого тетроксида. Последний может далее превращаться несколькими путями с регенерацией O_2, образованием H_2O_2 или радикалов •OH. В ряде случаев эти реакции сопровождаются расщеплением гетероцикла.

§ 2.3. Реакции по углеводным остаткам

OH-группы углеводных фрагментов являются реакционноспособными группами. У свободных дезоксирибонуклеозидов таких групп две, а у рибонуклеозидов – три. В последнем случае две OH-группы находятся в цис-положении относительно друг друга (т. е. являются соседними), в связи с чем часто этот фрагмент называют *цис-диольной группой.* В нуклеотидах некоторые из OH-групп соединены с остатком фосфорной кислоты. Если в состав нуклеотида входит один такой остаток, то в нуклеотиде остается одна (дезоксинуклеотиды) или две (рибонуклеотиды) свободных OH-группы. В последнем случае если фосфат присоединен к 5'-OH-группе, то в нуклеотиде сохраняется цис-диольный фрагмент. В полинуклеотидах, за исключением концевой группы в случае ДНК, OH-группа сохраняется в единственном числе на нефосфорилированном конце. В РНК OH-группа присутствует

в каждом мономерном звене, а если на ее 3'-конце остатки фосфорной кислоты отсутствуют, то на этом конце сохраняется цис-диольный фрагмент.

Широкое применение нашли *реакции по цис-диольной группе*, которая легко окисляется периодатом с разрывом С-С связи и образованием диальдегидного производного. По альдегидным группам могут быть проведены различные превращения, например, реакции с аминами. При этом образуются легко гидролизуемые основания Шиффа, однако они могут быть стабилизированы обработкой боргидридом натрия с превращением оснований Шиффа в амины. На рис. 15 в качестве примера приведены соответствующие превращения АТР.

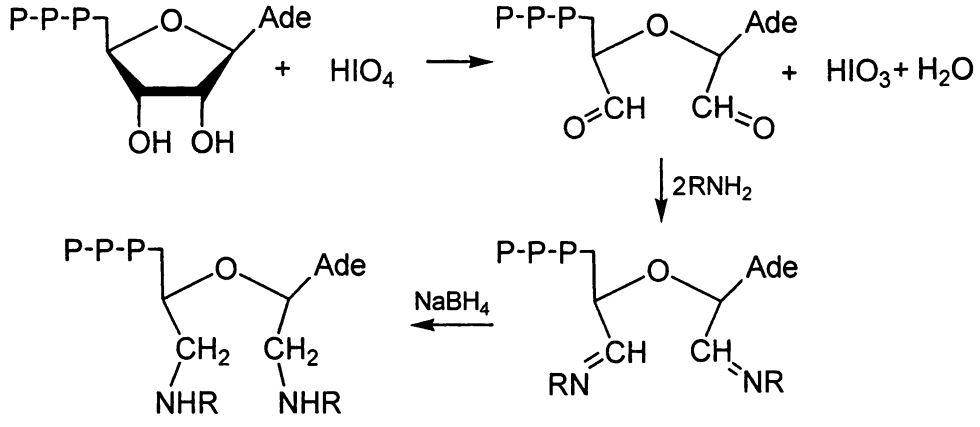


Рис. 15. Превращения рибозного фрагмента в АТР

Такие же превращения могут происходить с 3'-концевыми цис-диольными группами олигорибонуклеотидов и молекул РНК.

По ОН-группам в водном растворе может быть проведено *ацилирование*. Поэтому обработкой уксусным ангидридом можно получить полимерную молекулу РНК, ацетилированную по ОН-группе каждого звена. Наличие ОН-групп в углеводном фрагменте создает определенные затруднения при введении ацильных защит по экзоциклическим аминогруппам, поскольку оно сопровождается ацилированием ОН-групп пентозного фрагмента. Однако это затруднение легко преодолевается, поскольку сложноэфирные связи можно гидролизовать в щелочной среде в условиях, не затрагивающих ациламидные связи. Более мягкой процедурой является предварительная обработка нуклеозида триметилхлорсиланом, приводящая к введению по ОН-группам $(CH_3)_3Si$-остатка. После ацилирования аминогрупп гетероциклов триметилсилильные группы легко удаляются мягкой щелочной обработкой.

Пентозные фрагменты могут реагировать со свободными радикалами, в частности с •ОН, образующимися при радиолизе. Взаимодействие представляет собой отрыв атомов Н. Реакционная способность радикалов •ОН по отношению к С-Н-связям остатков пентоз в несколько раз ниже, чем по от-

ношению к основаниям. Константы скорости отрыва атомов H не сильно отличаются для различных положений: отщепление от атомов C-1' и C-2' составляет приблизительно по 25 %, от атомов C-3' и C-4' – по 20 %, а от атома C-5' – 10 % от общей константы. Схема превращений остатка дезоксирибозы при отрыве атома H от различных положений рибозы в анаэробных условиях и в присутствии O_2 приведена на рис. 16.

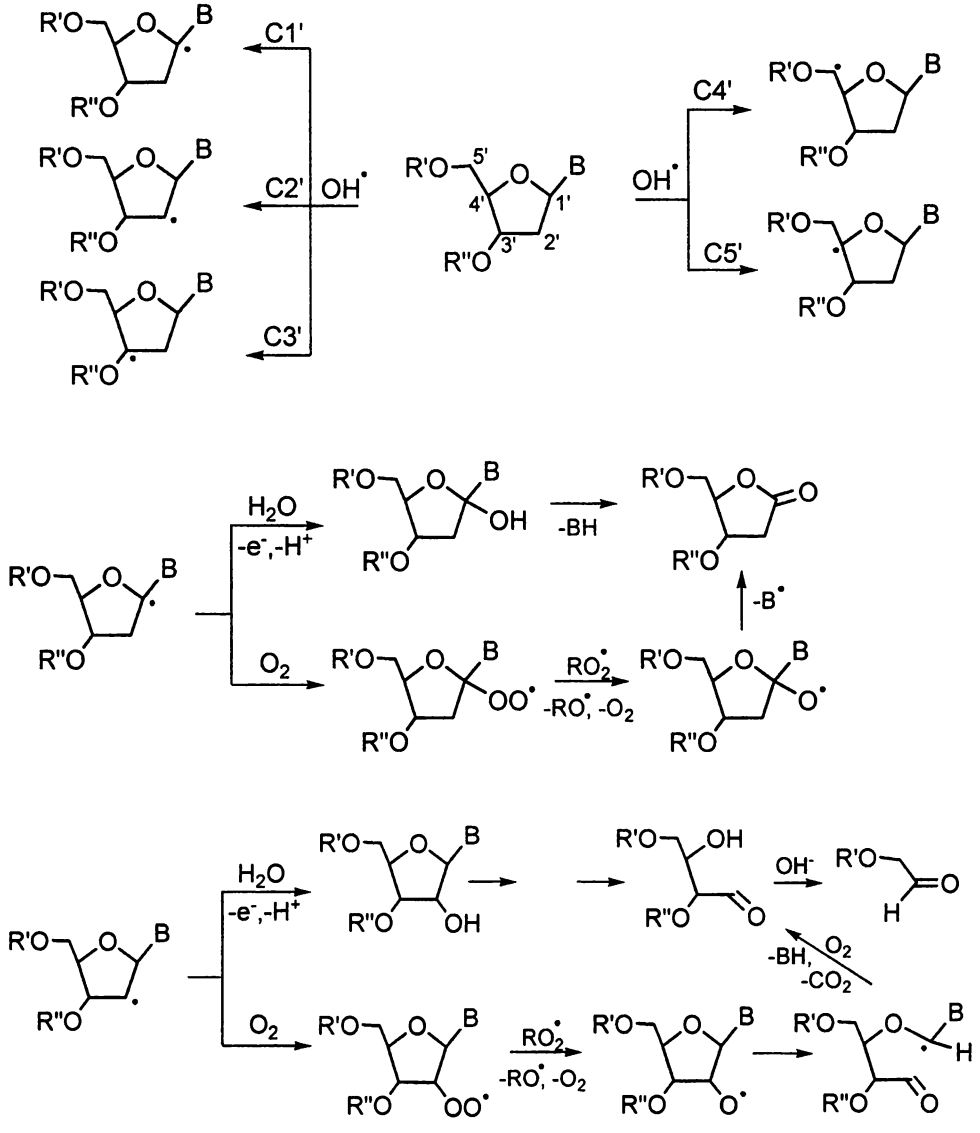
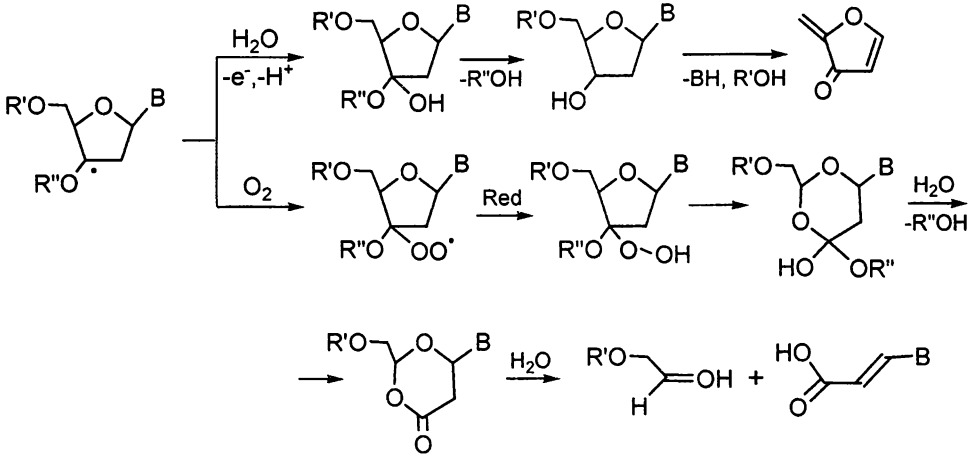
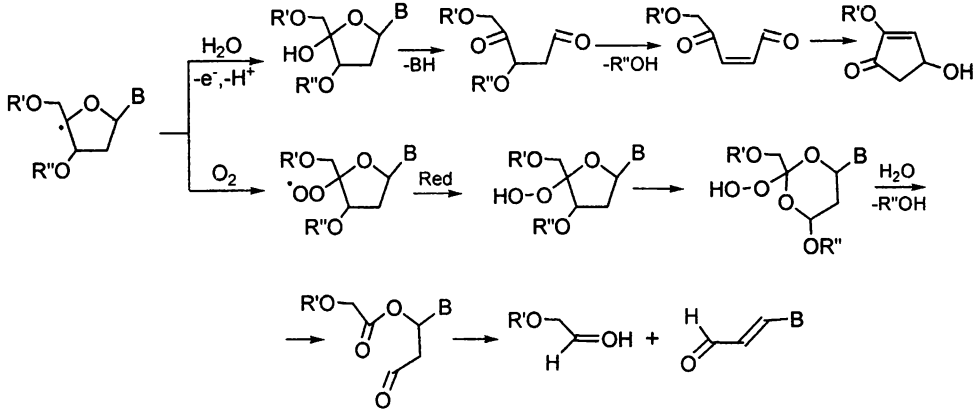


Рис. 16. Схема превращений дезоксирибозного фрагмента в молекуле ДНК при действии радикалов ·OH в отсутствие и в присутствии O_2: *B* – гетероциклическое основание, *R' R"* – полирибонуклеотидные цепи с 5' и 3'-конца атакуемого остатка дезоксирибозы, *Red* – восстановитель. (Продолжение на стр. 61-62)


R'O
B
R"O
H2O
-e-,-H+
R"O
OH
-R"OH
HO
-BH, R'OH
O
O2
OO•
Red
OH
HO
OR"
H2O
-R"OH
H2O
OH
H
+


R'O
B
R"O
H2O
-e-,-H+
HO
-BH
-R"OH
OH
O2
OO
Red
HO-O
OR"
H2O
-R"OH
OH
H
+

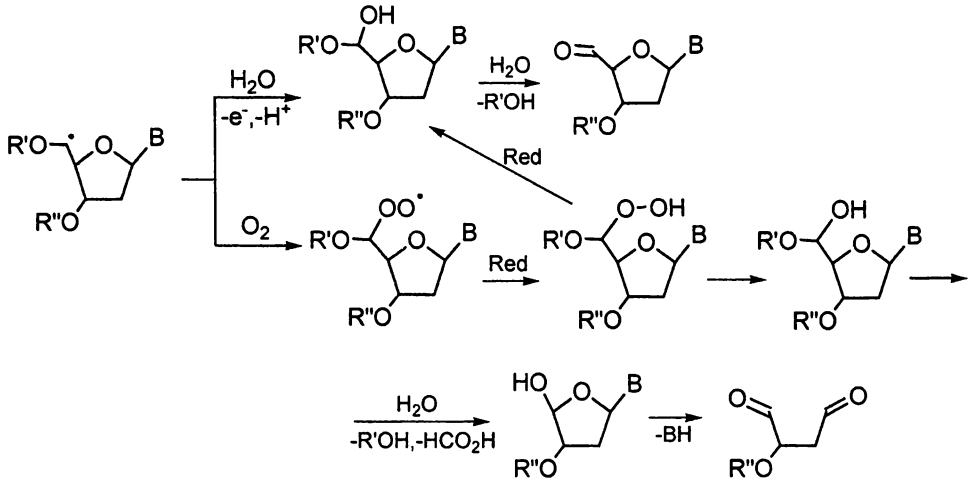


Рис. 16. Окончание

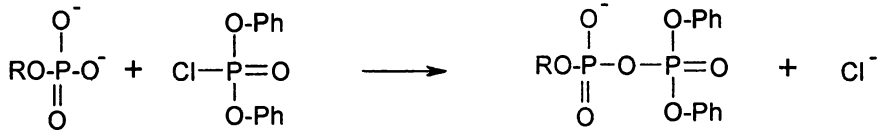
Образовавшиеся свободные радикалы претерпевают различные превращения в зависимости от положения атома H и наличия или отсутствия кислорода. В некоторых случаях у полинуклеотидов процесс сопровождается разрывом межнуклеотидных связей.

§ 2.4. Реакции по остаткам фосфорной кислоты

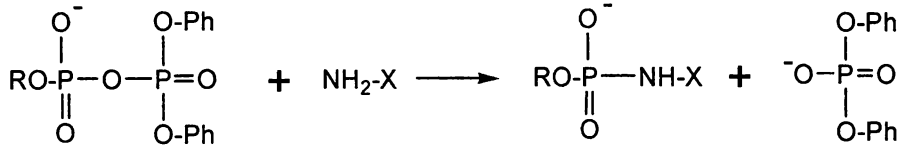
Большое число задач биоорганической химии требует проведения реакций по фосфоэфирным связям и остаткам фосфорной кислоты. Среди них можно выделить три основные группы. Во-первых, в ряде случаев представляют интерес различные производные и аналоги нуклеотидов и нуклеиновых кислот по остаткам фосфорной кислоты. Во-вторых, реакции по остаткам фосфорной кислоты являются неотъемлемым элементом при образовании новых межнуклеотидных связей при химическом синтезе олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот. Эти реакции будут рассмотрены в главе 5, посвященной химическому синтезу олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот. В-третьих, существует широкий спектр задач, требующих расщепления фосфодиэфирных связей. Этот вопрос будет рассмотрен в следующем разделе данной главы.

Разнообразные применения находят фосфамидные производные моно- и олигонуклеотидов. Число способов получения фосфамидов довольно велико, и здесь будут изложены лишь отдельные наиболее широко используемые подходы. Фактически все они основаны на превращении остатка фосфорной кислоты в реакционноспособное производное, которое реагирует с амином с уменьшением свободной энергии. Такое превращение, как правило, квали-

фицируют как *активацию фосфатного остатка.* Один из первых успешных методов основан на активации фосфатного остатка *дифенилфосфохлоридом.* При этом образуется тризамещенный пирофосфат:



В соответствии с известной для смешанных ангидридов закономерностью, согласно которой реакции проходят так, чтобы уходящей группой был анион более сильной кислоты, образовавшиеся пирофосфаты при реакции с нуклеофилами дают производные монозамещенного фосфата.



Образование фосфамида в этом случае сопровождается превращением связи P-Cl дифенилфосфохлорида в фосфоангидридную связь тризамещенного пирофосфата, которое и обуславливает сопряжение двух процессов.

Значительное число работ по фосфорилированию выполнено с использованием соответствующих фосфоимидазолидов, у которых остаток имидазола способен протонироваться в слабокислой среде, что существенно повышает электрофильность атома P. Наиболее удобным способом введения остатка имидазола по фосфорильной группе является применение для этой цели карбодиимидов. Механизм их действия будет детально рассмотрен в § 10.3.

Удобным для образования фосфамидов оказалось использование для активации фосфата реакции последнего с хлорангидридом 2,4,6-триметилбензойной кислоты (*мезитоилхлоридом* MsCl). В случае олигодезоксирибонуклеотида в реакцию с MsCl вступают не только концевая фосфатная группа, но и межнуклеотидные фосфаты, однако образуемые ими смешанные ангидриды неустойчивы в воде и практически мгновенно гидролизуются, поэтому при действии на образовавшийся продукт аминов получаются амиды только по концевому фосфату.

Но при действии того же мезитоилхлорида на олигорибонуклеотиды образующиеся смешанные ангидриды по межнуклеотидным фосфатам могут атаковать близко расположенную 2'-OH-группу с образованием циклофосфатной группы. Последняя при действии воды может дальше гидролизоваться по любой из трех фосфоэфирных связей (рис. 17).

Гидролиз по связям, формирующим циклическую структуру, приводит либо к регенерации исходной 3'-5'-фосфодиэфирной связи, либо к образова-

нию 2',5'-изомера. Гидролиз связи между атомом фосфора циклической структуры и 5'-атомом О соседнего нуклеотидного остатка приводит к разрыву полинуклеотидной цепи. В связи с этим для получения производных олигорибонуклеотидов данный метод неприемлем.

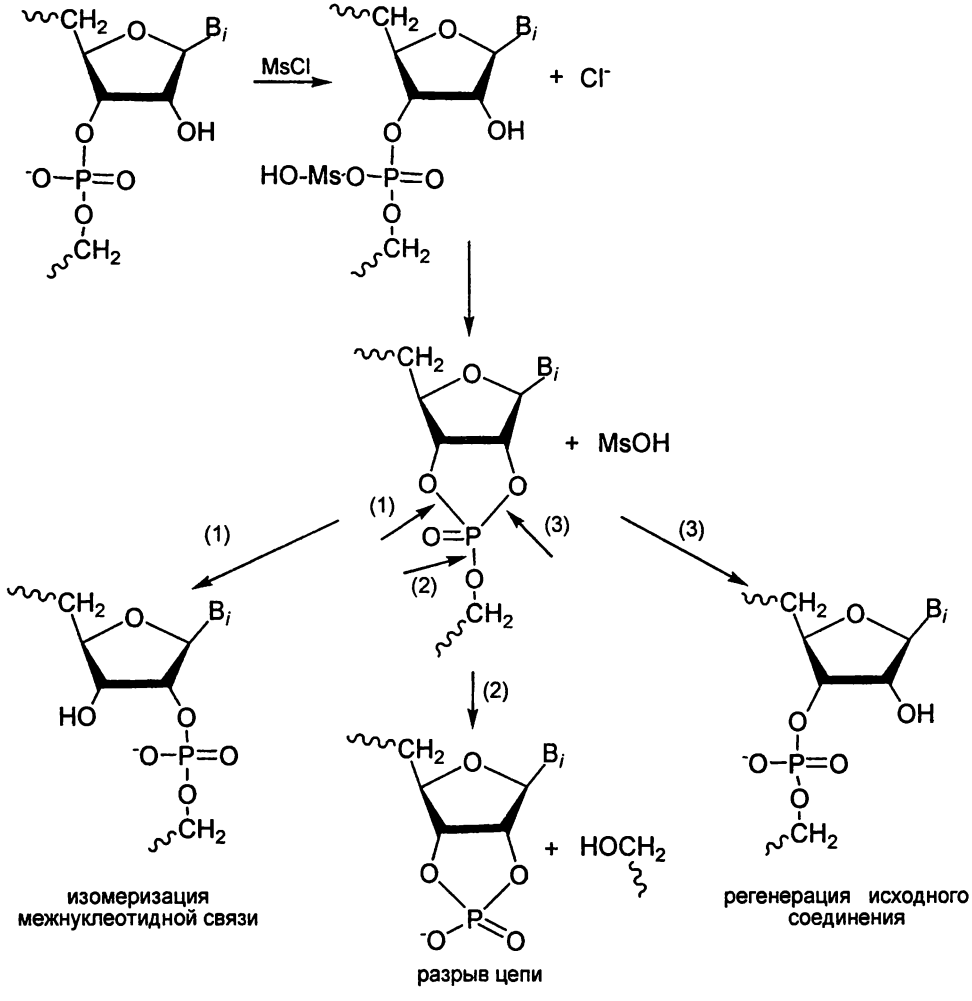


Рис. 17. Действие мезитоилхлорида на фосфоэфирную связь, образованную 3'-нуклеотидным остатком. Ms – 2,4,6-триизопропилфенил

Реакции по межнуклеотидным фосфатам можно избежать при использовании метода окислительно-восстановительного *фосфорилирования*, который был предложен *Мукаяма*. Согласно этому методу образование активного фосфорилирующего производного проводится сопряженно с окислением трифенилфосфина дипиридилдисульфидом. Предполагается, что реакция протекает по схеме, представленной на рис. 18.

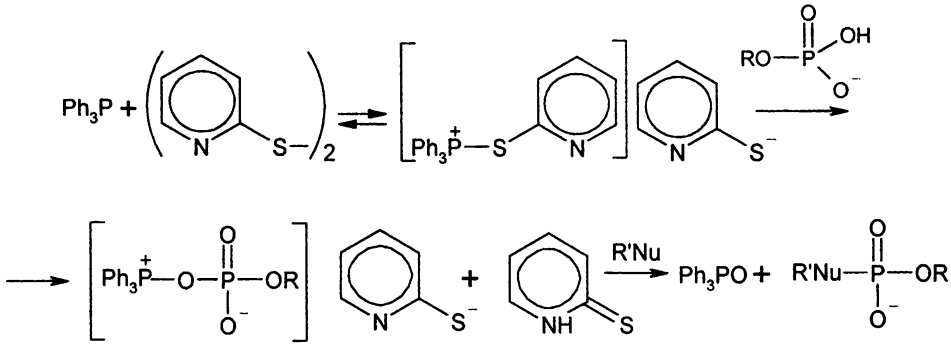
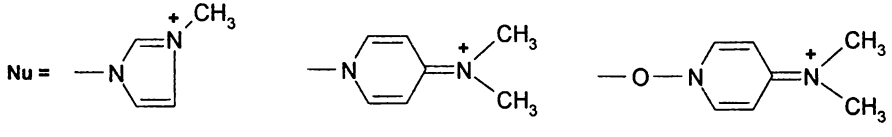


Рис. 18. Окислительно-восстановительное фосфорилирование по Мукаяма. Nu – нуклеофил

Использование этой системы позволило получать эффективные фосфорилирующие производные, в которых с атомом P связаны остаток N-метилимидазола (а), N,N-диметиламинопиридина (б) или N-окси-*п*-диметиламинопиридина (в):



а б в

Несмотря на высокую фосфорилирующую активность, соответствующие производные олигонуклеотидов достаточно устойчивы в водных растворах и могут использоваться в качестве реагентов для фосфорилирования в водной среде.

Важной особенностью этого метода активации фосфата является неспособность в присутствии сильных аминов реагировать со вторичными фосфатами, т. е. возможность получать монозамещенную концевую фосфатную группу в присутствии таких аминов. Это, в частности, открывает возможность получать производные по концевому остатку фосфорной кислоты в случае рибоолигонуклеотидов. В отсутствие сильных аминов, по-видимому, может происходить фосфорилирование межнуклеотидных фосфатов олигорибонуклеотидов, что неизбежно будет сопровождаться теми же побочными

процессами, которые уже были рассмотрены выше на примере реакций олигорибонуклеотидов с хлорангидридом мезитиленкарбоновой кислоты.

Относительно недавно В. С. Богачевым был предложен эффективный метод активации концевого фосфата с помощью трифторуксусного ангидрида. В реакции с тимидинмонофосфатом образуется смешанный ангидрид между остатком фосфорной кислоты и трифторацетильным остатком

$$\text{P-Thd} + (CF_3CO)_2O \rightarrow CF_3COOP\text{-Thd},$$

который легко реагирует с нуклеофильными агентами. В настоящее время наиболее широкое использование нашла реакция этого смешанного ангидрида с неорганическим пирофосфатом, приводящая к образованию нуклеозид-5'-трифосфата.

§ 2.5. Расщепление фосфодиэфирных связей в нуклеиновых кислотах

Для расщепления полинуклеотидных цепей используются как ферментативные, так и химические методы.

Ферменты, катализирующие гидролиз межнуклеотидных связей, называются нуклеазами. Если они катализируют гидролиз связей внутри полинуклеотидной цепи, то их называют *эндонуклеазами.* Ферменты, катализирующие отщепление концевых мононуклеотидов, называют *экзонуклеазами.* Эндонуклеазы, способные гидролизовать межнуклеотидные связи только в полидезоксирибоолигонуклеотидах, называются ДНКазами. Среди них наиболее детально изучена панкреатическая дезоксирибонуклеаза (*ДНКаза*), выделяемая из поджелудочной железы. Она катализирует разрыв связей с образованием 3'-ОН-группы на одном из образовавшихся фрагментов и 5'-фосфата на другом.

Широко представлены в природе эндонуклеазы, специфичные к РНК (*РНКазы*). Для РНКаз характерна специфичность к природе оснований у нуклеотида при расщепляемой связи. Например, наиболее детально изученная панкреатическая РНКаза специфично расщепляет 3'-ОН-связи, образуемые пиримидиновыми нуклеотидами.

Экзонуклеазы обычно способны отщеплять мононуклеотиды как от полирибо-, так и полидезоксирибонуклеотидов. Среди этих экзонуклеаз широко используется *фосфодиэстераза змеиного яда*, катализирующая отщепление 5'-нуклеотидов с 3'-конца цепи, и *фосфодиэстераза селезенки*, катализирующая отщепление 3'-нуклеотидов от 5'-конца.

Перечисленные ферментативные методы неспецифичны к нуклеотидной последовательности в области расщепляемой связи. Наряду с этим были обнаружены и нашли широкое применение ферменты, катализирующие специфическое расщепление ДНК при определенных нуклеотидных последовательностях и получившие название эндонуклеаз рестрикции. В связи с ог-

ромной ролью, которую сыграли эти ферменты при решении проблемы секвенирования ДНК, они будут рассмотрены в гл. 4, посвященной установлению первичной структуры нуклеиновых кислот.

Межнуклеотидные связи в полидезоксирибонуклеотидах довольно прочны, и химические реакции, непосредственно приводящие к их разрушению, сопровождаются превращениями нуклеозидного фрагмента, в первую очередь расщеплением гликозидных связей. В то же время возможно селективное расщепление этих связей по точкам, содержащим АП-сайты. Такие сайты могут также образовываться при действии специальных ферментов, гликозидаз, катализирующих гидролиз гликозидных связей и играющих важную роль при ликвидации повреждений в ДНК (ферменты репарации). В § 2.2 показано, что такие сайты образуются при протонировании пуриновых нуклеотидов, при их алкилировании и при действии гидразина на пиримидиновые нуклеотиды. Схема *расщепления* полидезоксирибонуклеотидной цепи *по АП-сайтам* приведена на рис. 19.

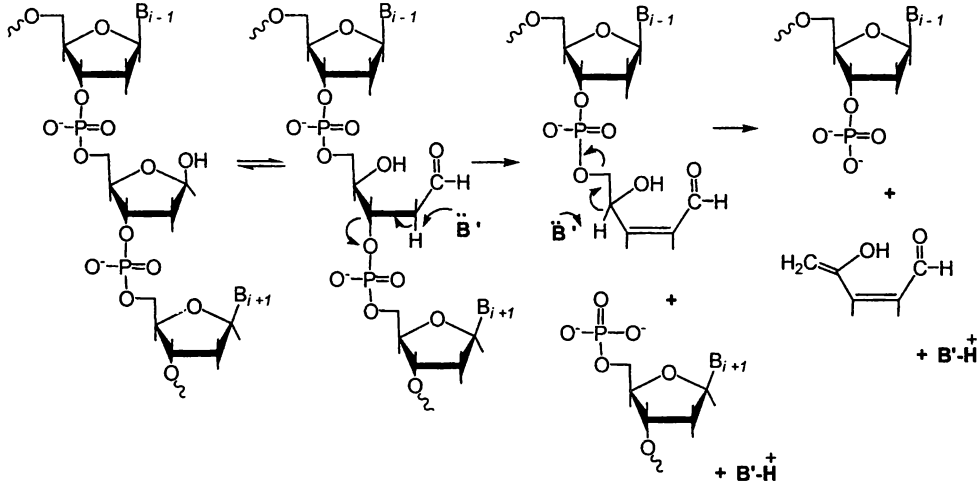


Рис. 19. Схема расщепления полидезоксирибонуклеотидной цепи по АП-сайту

В отличие от ДНК, непосредственное химическое расщепление РНК и полирибонуклеотидов происходит в достаточно мягких щелочных условиях в результате внутримолекулярного фосфорилирования 2'-ОН-группы с образованием циклического 2',3'-фосфата на 3'-конце. Аналогичное расщепление может происходить и при некоторых других химических воздействиях на фосфодиэфирную связь в полирибонуклеотидах. Интересные приложения нашло *расщепление* межрибонуклеотидных связей *алкилированием* N-нитрозоалкилмочевиной. Реакция идет, по-видимому, через промежуточное образование диазопроизводного, которое, как описано в § 2.2 для *диазометана*, является алкилирующим реагентом (рис. 20).

Основными точками алкилирования являются межнуклеотидные фосфаты. Это приводит к образованию соответствующих фосфотриэфиров. Последние существенно менее устойчивы к действию щелочей, чем фосфодиэфиры, и при обработке их щелочью происходит гидролиз по одной из связей Р-О. Частично это приводит к регенерации фосфодиэфирной группы, а частично – к расщеплению в этой точке межнуклеотидной связи, как показано на приведенной схеме рис. 20.

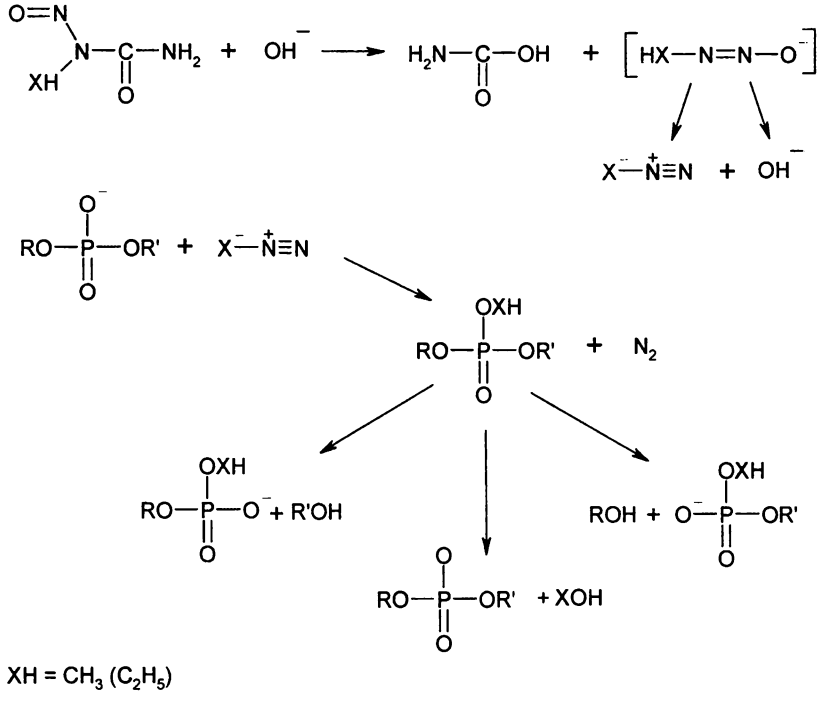


Рис. 20. Расщепление межнуклеотидных связей алкилированием

Расщепление по межнуклеотидным связям необходимо при решении широкого спектра задач. Использование эндо- и экзонуклеаз является основным промышленным методом получения мономеров – нуклеотидов и нуклеозидов из природных нуклеиновых кислот. Получение их путем органического синтеза, в принципе возможного, было бы громоздким многостадийным процессом. Расщепление нуклеиновых кислот по определенным точкам специфичными нуклеазами является необходимым этапом в разнообразных исследованиях нуклеиновых кислот, в частности, при некоторых методах установления первичной структуры нуклеиновых кислот.

Глава 3. Первичная структура нуклеиновых кислот

§ 3.1. Общие принципы установления первичной структуры биополимеров

Нуклеиновые кислоты и белки являются нерегулярными линейными полимерами, построенными в случае нуклеиновых кислот из четырех, а в случае белков – из 21 типа мономеров, причем порядок чередования мономеров в цепи существенно определяет биологическую значимость полимера. Поэтому установление первичной структуры (*секвенирование* от англ. sequence – последовательность) биополимеров является одной из важнейших задач биоорганической химии биополимеров. Очевидно, что идеальный вариант установления первичной структуры состоял бы в последовательном отщеплении от одного из концов полимера по одному остатку мономера с идентификацией каждого отщепленного остатка. Подходы к такому определению последовательности нуклеотидов в ДНК находятся в стадии интенсивной разработки. Предполагается, что закрепленная на определенном носителе молекула нуклеиновой кислоты подвергается действию экзонуклеазы, а каждый последовательно отщепляемый нуклеотид идентифицируется по спектру, поскольку спектры различных мономеров различаются. Как правило, для идентификации планируется использование спектров флуоресценции, что обеспечивает наиболее высокую чувствительность.

Едва ли среди проблем, стоявших перед биоорганической химией, можно назвать такую, которая по скорости и масштабам взлета могла бы быть соизмерима с проблемой установления первичной структуры нуклеиновых кислот. Действительно, крупным успехом середины 60-х годов было установление первичных структур нескольких транспортных РНК размером менее сотни нуклеотидов. А в 2003 году успешно завершилось установление первой полной структуры генома человека. Это было достигнуто работой большой группы ученых, и стоимость работы составила один миллиард долларов. В настоящее время уже активно разворачивается работа по созданию методов, которые дали бы возможность устанавливать структуру генома определенного человека за считанные недели с затратами в несколько тысяч долларов. Фактически речь идет о возможности получения «геномного паспорта» для любого индивидуума.

Поскольку представленный выше идеальный вариант определения первичной структуры пока еще отсутствует, неизбежным этапом определения первичной структуры биополимеров является их расщепление на фрагменты, которые могут быть секвенированы доступными на сегодня методами. Вторым этапом является само секвенирование каждого из полученных фрагмен-

тов. И на заключительном этапе следует установить, в каком порядке все эти фрагменты были расположены в исходном полимере.

В связи со стремительным развитием проблемы некоторые из методов, сыгравшие решающую роль в начальный период становления проблемы, стали вытесняться новыми подходами. Но большая часть тех методов, которые перестали использоваться для решения таких масштабных задач, как установление полной структуры геномов живых организмов, остаются полезными для решения ряда менее глобальных задач. Поэтому эти методы будут рассмотрены в настоящей главе наравне с теми, которые сегодня являются основой полного секвенирования геномов.

Как уже говорилось, секвенирование нуклеиновых кислот началось с установления первичной структуры нескольких транспортных РНК, но подходы, использованные в этих работах, в силу их трудоемкости и низкой эффективности, не открывали разумной перспективы для молекул большего размера, таких, например, как молекулы основных рибосомных РНК. С появлением первых же методов секвенирования ДНК и доступных ферментов для обратной транскрипции все работы в РНК стали проводиться путем обратной транскрипции, секвенирования полученных кДНК и вывода структуры РНК из структуры кДНК на основе принципа комплементарности.

§ 3.2. Фрагментация ДНК

ДНК может быть расщеплена на довольно большие фрагменты с помощью ферментов, имеющих общее названия *эндонуклеазы рестрикции.* Эти ферменты присутствуют у ряда микроорганизмов и катализируют расщепление двунитевых ДНК по определенным последовательностям, состоящим, в зависимости от природы фермента, из четырех-восьми нуклеотидов. Например, в *Escherichia coli* присутствует фермент, который специфично узнает последовательность d(GAATTC) и катализирует ее расщепление между G и A. Расщепление этими ферментами проходит с образованием фрагмента с 3'-концевой OH-группой и фрагмента с 5'-концевым фосфатом. Последовательности обычно самокомплементарны, и их расщепление проходит по обеим нитям. У бактерии *Haemophilus influenzae* имеется фермент, узнающий последовательность d(AAGCTT) и катализирующий в обеих нитях расщепление между двумя остатками A. Ферменты рестрикции обычно называют сокращенными символами, отражающими название биологического источника, в котором они присутствуют и из которых их соответственно получают. Например, первый из упомянутых ферментов называют *EcoRI*, а второй – *Hind III.* Римские цифры при названиях отражают наличие в одном и том же биологическом источнике нескольких различных ферментов рестрикции. На рис. 21 представлена схема расщепления ДНК с помощью эндонуклеазы *EcoRI.*

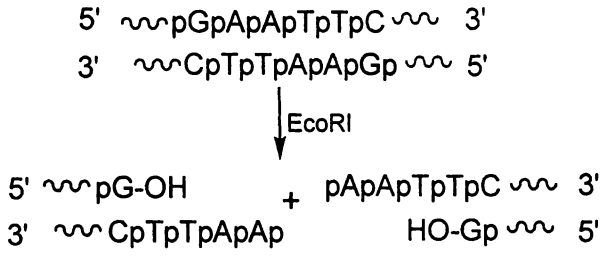


Рис. 21. Схема расщепления ДНК по специфичному фрагменту эндонуклеазой *EcoRI*

Как видно из данных по расщеплению двунитевых ДНК рестриктазами, полученные фрагменты на своих концах содержат однонитевые фрагменты. Например, на 5'-концах двунитевых фрагментов, полученных расщеплением ДНК рестриктазой EcoRI, будут находиться однонитевые участки pApApTpT, способные взаимодействовать с олиго- и полинуклеотидами, содержащими на 5'-конце последовательность pApApTpT, т. е. «прилипнуть» к ним. В связи с этим такие участки называют *липкими концами*.

В табл. 7 приведены несколько ферментов рестрикции, нашедших широкое применение, сайты их узнавания и стрелками указаны, какие именно связи в этом сайте подвергаются расщеплению.

Таблица 7

Некоторые эндонуклеазы рестрикции

Микроорганизм	Сокращение	Последовательность
Bacillus aminoliquefaciens	BamHI	(5')GpGpApTpCpC (3') (3')CpCpTpApGpG (5')
Escherichia coli RY13	EcoRI	GpApApTpTpC CpTpTpApApG
Haemophilus aegyptius	HaeII	PupGpCpGpCpPy PypCpGpCpGpPu
Haemophilus aegyptius	HaeIII	GpGpCpC CpCpGpG
Haemophilus influenzae Rd	HindIII	ApApGpCpTpT TpTpCpGpApA
Haemophilus parainfluenzae	HpaI	GpTpTpApApC CpApApTpTpG

Окончание табл. 7

Nocardia otitidis caviarum	NotI	GpCpGpGpCpCpGpC CpGpCpCpGpGpCpG
Providencia stuartii	PstI	CpTpGpCpApG GpApCpGpTpC
Pseudomonas mendocina	PmeI	GpTpTpTpApApApC CpApApApTpTpTpG
Streptomyces albus	SaLI	GpTpCpGpApC CpApGpCpTpG

Примечание. Указаны микроорганизмы-продуценты и сайты, расщепляемые этими ферментами. Стрелками показаны расщепляемые ими связи, Pu – остатки пуриновых, а Py – остатки пиримидиновых нуклеотидов

Из изложенного ясно, что средние размеры получающихся фрагментов достаточно велики. Если сайт рестрикции состоит из шести нуклеотидов, то вероятность нахождения такого фрагмента в ДНК составляет $1/4^6$, т. е. 1/4096, и следовательно средняя длина фрагментов, получающихся при расщеплении ДНК этим ферментом, должна быть 4096 нуклеотидов. Поскольку специфические последовательности распределены в цепи исследуемой ДНК неравномерно, то среди полученного набора фрагментов могут присутствовать и существенно более короткие, и существенно более длинные. Для разделения полученных фрагментов чаще всего используют электрофорез.

В наиболее развитых подходах к секвенированию геномов для фрагментации анализируемой ДНК стали использовать расщепление с помощью ультразвука или применять какое-либо механическое воздействие. В отличие от метода с использованием рестриктаз в этом случае разрывы происходят по случайным точкам, и в исследуемой пробе получается смесь значительно большего числа фрагментов. В этом случае проводится поштучное разделение фрагментов, например, смесь фрагментов подвергается эмульгированию, так, чтобы в каждой капле эмульсии оказывался в среднем один фрагмент. Для достижения достаточной чувствительности проводится размножение фрагментов, каждого в своей капле, с помощью полимеразной цепной реакции, описанной в § 5.5.

§ 3.3. Прямое секвенирование полидезоксирибонуклеотидов

В 1977 году на Гордоновской конференции были обнародованы два эффективных метода прямого секвенирования ДНК. По имени авторов, их разработавших, они вошли в научную литературу как *метод Максама – Гилберта* (A. Maxam, W. Gilbert) и *метод Сэнгера* (F. Sanger). За разработку этих методов Гилберту и Сэнгеру в 1980 году была присуждена Нобелевская премия. У Сэнгера это уже была вторая премия. Первую он получил в 1958 году за расшифровку первичной структуру инсулина.

В основу обоих методов положена общая стратегия, суть которой состоит в определении для каждого из четырех типов оснований расстояний до определенной точки (определенного нуклеотидного остатка) анализируемой ДНК. Под расстоянием в этом контексте понимается число нуклеотидных звеньев. В обоих методах информация получается одновременно для всего набора однотипных нуклеотидов, что достигается путем использования статистических подходов.

В методе Максама – Гилберта анализируется ДНК (обычно достаточно протяженный фрагмент), на 5'-конце которой находится высокорадиоактивный фосфат, введенный с помощью полинуклеотидкиназы (см. § 1.9). Анализируемая ДНК по одному из типов оснований подвергается модификации, позволяющей элиминировать модифицируемые основания, т. е. получить на их месте АП-сайты. Такие реакции модификации описаны в § 2.2. Обработка гидразином в щелочной среде приводит к образованию АП-сайта по остаткам цитозина, а в нейтральной среде – по обоим пиримидинам. Алкилирование с последующим гидролизом гликозидной связи приводит к образованию АП-сайтов по всем остаткам гуанина, а обработка 60 %-й муравьиной кислотой – по всем сайтам, лишенным гуанина и аденина. Как показано в § 2.5, по образовавшимся АП-сайтам возможно селективное расщепление полинуклеотидной цепи.

Проводя в отдельной пробе каждую из этих модификаций и последующее расщепление в таких условиях, чтобы в среднем в каждом образце произошел один разрыв, получают в каждой пробе набор фрагментов, оканчивающихся на определенный тип оснований или на определенную пару оснований. Полученный набор разделяют гель-электрофорезом и по наличию радиоактивности выделяют все полосы, соответствующие разделенным фрагментам. На радиоавтографе проявляются только фрагменты, содержащие меченый 5'-конец анализируемого полинуклеотида, а на 3'-конце – лишенный гетероцикла остаток нуклеотида. Положение каждого из таких остатков, т. е. его расстояние до 5'-конца, определяется длиной меченого фрагмента. Таким образом находится положение всех цитозинов, сумма положений цитозинов и тиминов, всех гуанинов и сумма всех аденинов и гуанинов, т. е. полная структура образца.

На рис. 22 схематично представлено расположение всех четырех полос на участке радиоавтографа, взятого с полного радиоавтографа, полученного ме-

тодом Максама и Гилберта для некоторого полидезоксирибонуклеотидного фрагмента. Справа выписана та последовательность, которая однозначно вытекает из расположения полос.

G	A+G	T+C	C	
	—			A
	—			A
—	—			G
	—			A
	—			A
—	—			G
—	—			G
		—	—	C
		—	—	C
		—		T
		—	—	C
		—		T
—	—			G
—	—			G
	—			A
—	—			G
		—	—	C

Рис. 22. Рисунок электрофореграммы, полученной для олигонуклеотида d(AAGAAGGCCTCTGGAAGC)

В основе метода Сэнгера лежит анализ структуры не самой нуклеиновой кислоты, а продукта, получаемого в ходе ее репликации с помощью ДНК-полимеразы. По этому методу в реакционную смесь вместе со смесью всех четырех природных dNTP вводят один из 2',3'-дидезоксирибонуклеозид трифосфатов (ddNTP). В связи с тем, что ДНК-полимеразы неспособны инициировать репликацию, в систему вводится праймер, позволяющий начать репликацию в определенном участке анализируемой ДНК. Структура этого небольшого участка должна быть заранее определена каким-либо другим методом. В такой системе начинается удлинение праймера, т. е. синтез ДНК, комплементарной анализируемому фрагменту. ddNTP являются близкими структурными аналогами соответствующих природных субстратов ДНК, опознаются ферментом и могут включаться в строящуюся полинуклеотидную цепь. В результате в некоторых статистически разбросанных участках происходит включение остатка ddNTP. При этом полностью сохраняется принцип комплементарности. Например, ddTTP включается только в те места, где должен был бы включиться dTTP, т. е. напротив того участка анализируемой матрицы, где находится остаток dAMP. В случае включения ddNTP синтез компле-

ментарной цепи обрывается, поскольку у остатка ddNTP отсутствует необходимая для продолжения синтеза 3'-OH-группа. Таким образом, ddNTP являются *терминаторами репликации*. Их включение проходит статистически, и получается набор укороченных фрагментов, причем их длины определяются расстоянием от 3'-конца праймера до замещенного нуклеотидного остатка. Например, если в смесь введен ddTTP, то получается набор фрагментов, каждый из которых имеет длину, равную расстоянию от начала праймера до точки расположения одного из остатков тимидина. Эти фрагменты далее разделяются электрофорезом, что позволяет по их положению на электрофореграмме определить положение всех остатков тимидина и, таким образом, положение остатков dAMP на анализируемой ДНК. Схема установления расположения тимидина для небольшого фрагмента исследуемой ДНК приведена на рис. 23.

(3') $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$XXX A XX A XXXX A A X A (I)

(5')$Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$YYYddT

(5')$Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$YYY T YYddT

(5')$Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$YYY T YY T YYYY ddT

(5')$Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$YYY T YY T YYYY TddT

(5')$Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5Y_6$YYY T YY T YYYY T T YddT

Рис. 23. Установление положения остатков дезоксиаденозина (A) в олигонуклеотиде (I) методом Сэнгера при репликации в присутствии дидезокситимидин-5'-трифосфата. X – остатки нуклеотидов, A, Y – остатки комплементарных им нуклеотидов

Аналогичным образом, используя другие ddNTP, можно определить положение всех четырех нуклеотидов. Тем самым определяется полная последовательность синтезированной ДНК и, следовательно, последовательность анализируемой ДНК, которая комплементарна полученному продукту репликации.

В своем оригинальном варианте Сэнгер в качестве субстратов использовал [α-^{32}P]dNTP и получал терминированные продукты репликации, меченые по всем межнуклеотидным фосфатам. Поэтому все укороченные фрагменты на электрофореграмме легко регистрировались радиоавтографически. Однако этот метод регистрации плохо поддается автоматизации, поэтому в настоящее время, особенно в связи с созданием автоматических секвенаторов (*секвенаторов нуклеиновых кислот)*, анализ последовательностей в основном переведен на флуоресцентные методы регистрации. Разработаны специальные красители, которые могут быть присоединены к праймеру или к терминаторам и при облучении светом дают характерную флуоресценцию.

Если краситель присоединен к праймеру, то с таким праймером в четырех различных реакторах, как правило, капиллярах, проводятся те же основные процессы, что и при радиохимической детекции: элонгация праймера в присутствии одного из ddNTP и электрофорез. На выходе из капилляров проводится облучение лазерами возбуждающим светом и регистрация флуоресценции. По порядку выхода из капилляра определяется весь набор терминированных в присутствии определенного ddNTP полинуклеотидов и, тем самым, положение соответствующих нуклеотидов в синтезированной цепи.

Если красители присоединяются к терминатору, то можно использовать четыре красителя, флуоресцирующие при четырех различных длинах волн, связанные с четырьмя различными терминаторами. В этом случае электрофорез продуктов репликации можно проводить в одном капилляре, однако регистрировать не только сам факт флуоресценции, но и спектр каждого выходящего из капилляра продукта терминации, что позволяет идентифицировать последовательно каждый входящий в продукт репликации терминирующий дидезоксинуклеотид. В этом варианте секвенирования нужно использовать такие флуоресцирующие производные терминаторов, которые, несмотря на присоединение к основанию объёмистого радикала, сохраняют субстратные свойства. На рис. 24 приводятся четыре терминатора – производные всех четырех dNTP, которые возбуждаются при 488 нм, но дают четыре разных спектра флуоресценции. Это позволяет по мере выхода разделяемой реакционной смеси регистрировать спектры испускания и идентифицировать каждый нуклеотид, выходящий из капилляра, в котором проводится электрофорез.

В связи с возможностью автоматизации этот метод за короткий срок вытеснил метод Максама – Гилберта. Однако и он уступил место новым методам, среди которых прежде всего следует сказать о методе *пиросеквенирования*, в настоящее время достаточно широко используеющемся в схемах для скоростного секвенирования геномов.

Метод имеет в своей основе использование ДНК-полимераз. Как и в случае метода Сэнгера, речь идет о синтезе новой молекулы ДНК на анализируемой матрице. Существенно, что ДНК-матрица может быть закреплена на носителе, причем найдены системы, в которых ДНК-полимераза нормально функционирует на такой закрепленной матрице. Присоединение нуклеозид-5'-трифосфата, как уже ранее указывалось, сопровождается отщеплением остатка пирофосфата, т. е. каждый акт присоединения очередного мономера сопровождается появлением новой молекулы пирофосфата. Таким образом, факт удлинения растущей цепи может быть зарегистрирован по появлению новой молекулы пирофосфата. Естественно, что при добавлении dNTP, не соответствующего считываемому на данном шаге нуклеотиду ДНК-матрицы, пирофосфат не образуется. Образование пирофосфата может быть зарегистрировано многочисленными методами, однако наиболее перспективным оказался метод, основанный на превращении пирофосфата в молекулу ATP, ко-

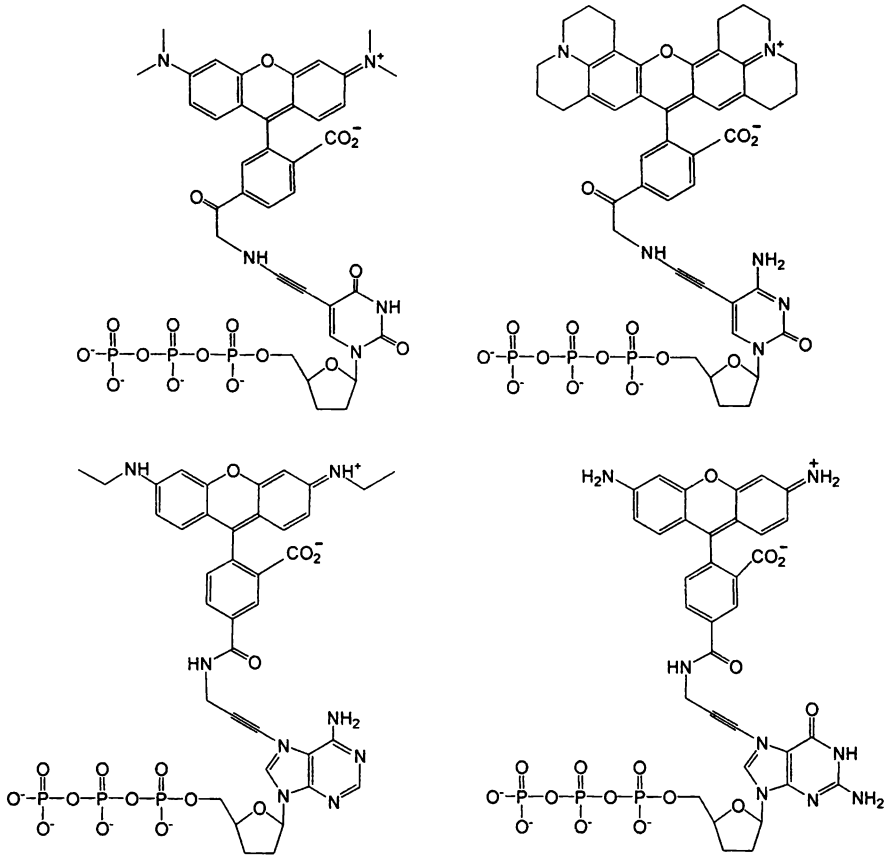


Рис. 24. Формулы флуоресцирующих производных четырех ddNTP, используемых в качестве терминаторов для секвенирования ДНК методом Сэнгера

торое осуществляется ферментативно, например, с помощью фермента сульфорилазы, катализирующего реакцию:

аденилилсульфат + пирофосфат → ATP + сульфат.

Образование ATP может с высокой чувствительностью быть зарегистрировано по его взаимодействию с люцеферином, который по реакции с ATP превращается в люцефериладенилат, способный при участии специального фермента – люцеферазы – взаимодействовать с молекулярным кислородом с испусканием кванта света. Таким образом, по возникновению свечения в системе, содержащей люцеферин и люцеферазу, при добавлении соответствующего считываемому нуклеотиду матрицы определяется природа очередного нуклеотида секвенируемой ДНК.

§ 3.4. Сборка полной структуры полидезоксирибонуклеотида (генома)

Установление последовательности отдельных нуклеотидных фрагментов еще не означает установления первичной структуры нуклеиновой кислоты в целом. После установления последовательности нуклеотидов в каждом из фрагментов необходимо установить, в каком порядке эти фрагменты были расположены в исходной нуклеиновой кислоте. Аналогичная задача стоит и при секвенировании полипептидных цепей и первоначально была разработана для определения первичной структуры белков, получив название *метода перекрывающихся блоков*. В этом методе для каждого фрагмента (блока мономеров) нужно определить, с какими именно фрагментами он соседствовал. Общий подход к решению данной задачи основан на использовании двух (или больше) различных способов фрагментации анализируемого биополимера. Условно можно назвать их блоками первого и второго типа. Для каждой пары соседних фрагментов первого типа А и В среди фрагментов второго типа найдется блок С, содержащий конец блока А и начало блока В, т. е. частично их перекрывающий (рис. 25). Таким образом, в основе метода лежит проведение фрагментации анализируемого биополимера двумя способами, отличающимися точками расщепления, и секвенирование всех полученных обоими способами фрагментов.

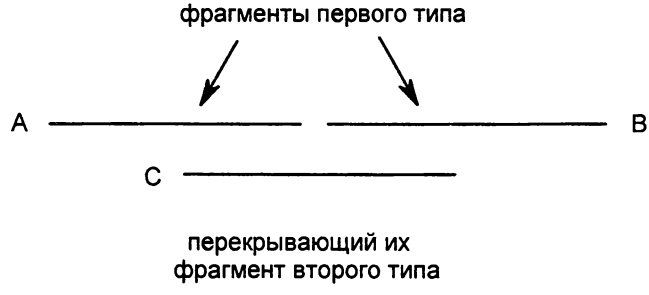


Рис. 25. Схема метода перекрывающихся блоков: А и В – два соседних в исследуемой структуре фрагмента, полученных при первом способе фрагментации. С – фрагмент, полученный при втором способе фрагментации, содержащий конец фрагмента А и начало фрагмента В

В приборах для скоростного секвенирования проводится неспецифическая фрагментация анализируемой ДНК. Анализу естественно подвергается образец, содержащий большое число одинаковых молекул ДНК, но в силу статистического характера процедуры разные молекулы фрагментируются по-разному. Поэтому для каждого секвенированного фрагмента скорее всего найдется фрагмент, частично его перекрывающий, но содержащий некоторую избыточную часть, соответствующую соседнему фрагменту, что позволяет их

состыковать. Так как речь идет о массовом поиске перекрывающихся фрагментов, то практически это можно сделать только с помощью ЭВМ, используя специальные алгоритмы. В последние годы начался выпуск нескольких вариантов быстродействующих секвенаторов. Такие установки называют ДНК-секвенаторами следующего поколения.

§ 3.5. Банки данных для последовательностей нуклеотидов в нуклеиновых кислотах

Информация об экспериментально определенных последовательностях хранится в специальных *банках нуклеотидных последовательностей*. Любая занесенная в этот банк последовательность может быть вызвана на персональный компьютер, подключенный к международной сети Internet. Выход на банк данных будет ниже рассмотрен на примере банка Genbank.

Эта база данных разрабатывается и поддерживается Национальным центром биотехнологической информации (National Center of Biotechnolical Information, NCBI) Национального института здоровья (National Institute of Health, NIH) США и является открытой для свободного доступа. По состоянию на август 2009 года в базе содержались десятки миллионов последовательностей, а их общая длина составила десятки миллиардов остатков нуклеотидов. Вызов нужной последовательности на рабочий компьютер начинается с выхода в Genbank, адрес которого в системе Internet http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank. При этом открывается вкладка «Search» с двумя окнами. В левом окне находится вкладка с записью «entrez» (фр. «войдите»). При нажатии на эту вкладку раскрывается список поисковых баз, из которого выбирается база «nucleotide». После входа в эту базу в свободное правое окно заносится название объекта, последовательность нуклеотидов которого нужно вызвать на персональный компьютер. Ниже приводится два примера вызова нуклеотидных последовательностей.

Для вывода последовательности валин-специфичной тРНК из пекарских дрожжей в правое окно заносится запись valine tRNA baker's yeast и для получения ответа нажимается кнопка «go». Между названием вызываемой последовательности и организма, к которому относится вызываемая последовательность, вводится оператор AND и слово «organism» в квадратных скобках. Последовательность, представленная на рис. 26, приводится в однобуквенном коде, причем для унификации записей в банке уридиновые остатки обозначаются буквой t, т. е. не делается различий между урацилом и тимином. При линейной записи последовательности минорные компоненты не отмечаются.

DEFINITION Yeast (S.cerevisiae, baker's) Val-tRNA-1.
TITLE The corrected nucleotide sequence of valine tRNA baker's yeast

/note="codon recognized: GUC; Val-tRNA-1

modified_base	9	/mod_base=m1g	(N1-метилгуанин)
modified_base	13	/mod_base=p	(псевдоуридин)
modified_base	16	/mod_base=d	(дигидроуридин)
modified_base	20	/mod_base=d	(дигидроуридин)
modified_base	21	/mod_base=d	(дигидроуридин)
modified_base	28	/mod_base=p	(псевдоуридин)
modified_base	33	/mod_base=p	(псевдоуридин)
modified_base	35	/mod_base=I	(инозин)
modified_base	47	/mod_base=m7g	(N7-метилгуанин)
modified_base	48	/mod_base=d	(дигидроуридин)
modified_base	50	/mod_base=m5c	(N5-метилцитидин)
modified_base	55	/mod_base=t	(риботимидин)
modified_base	56	/mod_base=p	(псевдоуридин)
modified_base	59	/mod_base=m1a	(N5-метиладенозин)

ggtttcgtgg tctagtcggt tatggcatct gcttgacacg cagaacgtcc ccagttcgat cctgggcgaaatcacca//

Рис. 26. Последовательность нуклеотидов, положение и природа миноров для валиновой тРНК-1 из пекарских дрожжей РНК (по данным Genbank)

В качестве еще одного примера на рис. 27 приводится запись для мРНК, кодирующей человеческую панкреатическую рибонуклеазу. В случае мРНК наряду с ее нуклеотидной последовательностью приводится кодируемая последовательность аминокислот (продукт трансляции).

LOCUS NM_002935 716 bp mRNA linear
DEFINITION Homo sapiens ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein) (RNASE3), mRNA.

/translation="
MVPKLFTSQI CLLLLLGLMG VEGSLHARPP QFTRAQWFAI
QHISLNPPRC TIAMRAINNY RWRCKNQNTF LRTTFANVVN
VCGNQSIRCP HNRTLNNCHR SRFRVPLLHC DLINPGAQNI
SNCTYADRPG RRFYVVACDN RDPRDSPRYP VVPVHLDTTI"

ORIGIN
```
  1 gaacaaccag ctggatcagt tctcacagga gccacagctc agagactggg aaacatggtt
 61 ccaaaactgt tcacttccca aatttgtctg cttcttctgt tggggcttat gggtgtggag
121 ggctcactcc atgccagacc cccacagttt acgagggctc agtggtttgc catccagcac
181 atcagtctga acccccctcg atgcaccatt gcaatgcggg caattaacaa ttatcgatgg
241 cgttgcaaaa accaaaatac ttttcttcgt acaacttttg ctaatgtagt taatgtttgt
301 ggtaaccaaa gtatacgctg ccctcataac agaactctca acaattgtca tcggagtaga
361 ttccgggtgc ctttactcca ctgtgacctc ataaatccag gtgcacagaa tatttcaaac
421 tgcacgtatg cagacagacc aggaaggagg ttctatgtag ttgcatgtga caacagagat
481 ccacgggatt ctccacggta tcctgtggtt ccagttcacc tggataccac catctaagct
541 cctgtatcag cagtcctcat catcactcat ctgccaagct cctcaatcat agccaagatc
601 ccatccctcc atgtactctg ggtatcagca actgtcctca tcagtctcca tacccttca
661 gctttcctga gctgaagtcc cttgtgaacc ctgcaataaa ctgctttgca aattca
```

Рис. 27. Последовательность нуклеотидов в мРНК, кодирующей панкреатическую рибонуклеазу

Помимо выведенной на экран компьютера последовательности выдается и различная дополнительная информация (гл. 20).

Глава 4. Пространственная структура нуклеиновых кислот. Ее значение для функционирования нуклеиновых кислот

§ 4.1. Двуспиральные нуклеиновые кислоты. A-, B- и Z-формы нуклеиновых кислот. Суперспирализация

4.1.1. Уотсон-криковские взаимодействия

Существуют две основные биологически значимые пространственные структуры нуклеиновых кислот. ДНК, как уже говорилось в § 1.3, находится преимущественно в двунитевой форме. Это касается не только ДНК основного генома прокариот и эукариот, но и ДНК в составе митохондрий и хлоропластов, в плазмидах, а также ДНК многих вирусов, таких как бактериофаги T2, T4, T7. В то же время среди вирусов встречаются и такие, у которых наследственная программа представлена однонитевой ДНК. Эта ДНК не может обеспечить размножение вирусных частиц – синтез новых однонитевых молекул вирусной ДНК может происходить только при участии комплементарной ДНК. Поэтому в клетке, инфицированной вирусом, содержащим однонитевую ДНК, первоначально с использованием вирусной ДНК в качестве матрицы происходит синтез такой комплементарной ДНК. При этом формируется двунитевая *репликативная форма* ДНК, состоящая из вирусной и комплементарной цепей. Последняя в дальнейшем служит матрицей для многократной репликации с образованием необходимого числа копий вирусной ДНК.

В противоположность ДНК для большинства видов РНК характерна однонитевая структура. Это относится ко всем трем перечисленным в § 1.3 главным видам рибонуклеиновой кислоты, мРНК, рРНК и тРНК, образующимся в живых организмах путем транскрипции соответствующих генов. Однонитевые РНК являются носителями генетической информации многих вирусов животных, растений и микроорганизмов, в частности, ряда вирусов, вызывающих опасные заболевания человека – клещевой энцефалит, бешенство и ряд других. Из растительных вирусов наиболее детально изучен вирус табачной мозаики, содержащий в качестве наследственной программы молекулу РНК. Однонитевые РНК входят в состав ряда бактериофагов, таких как R17, Qβ. У всех этих вирусов механизм размножения основан на том же принципе, что и механизм размножения вирусов, содержащих однонитевую ДНК: сначала под действием специального фермента образуется молекула РНК, комплементарная вирусной РНК, а затем образовавшиеся двунитевые РНК функционируют в качестве матриц для производства множества молекул вирусной РНК, которые формируют новые вирусные частицы. Однони-

тевые РНК входят также в состав ретровирусов (см. § 1.9), которые начинают свой цикл размножения с обратной транскрипции с помощью входящей в состав этих вирусов обратной транскриптазы, создающей копию ДНК.

Известно некоторое число вирусов, у которых в составе вирусных частиц уже содержатся двунитевые РНК.

Определяющее значение для конформации полинуклеотидной цепи имеют взаимодействия гетероциклических фрагментов. Они могут быть весьма многообразны, однако для структуры ДНК по своей значимости резко выделяются *Уотсон – Криковские взаимодействия*, которые получили название по имени установивших их авторов (James Watson, Francis Crick) – это взаимодействия между тимином или урацилом и аденином и между гуанином и цитозином. В результате таких взаимодействий ДНК существует в виде двунитевой структуры, о чем уже вкратце говорилось в § 1.3. Уотсон – Криковские взаимодействия реализуются, если две полинуклеотидные цепи или два фрагмента одной цепи антипараллельны, причем рибозофосфатные остовы образуют правую спираль.

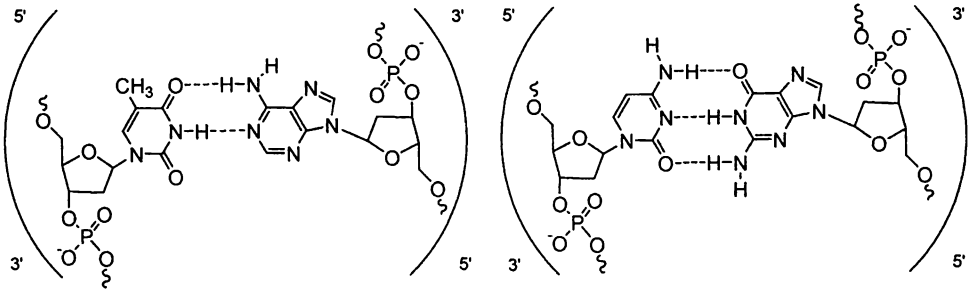


Рис. 28. Структура Уотсон – Криковских пар

Специфичность взаимодействия обеспечивается образованием водородных связей. Между аденином и тимином или урацилом образуется две водородные связи, между гуанином и цитозином – три. Важным свойством именно этих пар гетероциклов и именно в приведенной их взаимной ориентации является близость размеров этих пар и их ориентации относительно связанных с ними атомов С-1', а тем самым и относительно всей периодической части остова. При такой геометрии цитозин не может образовать двух водородных связей с аденином и также не могут взаимодействовать между собой два пиримидиновых гетероцикла. Не вписываются в такую геометрию и два взаимодействующих пуриновых гетероцикла. Взаимодействие гуанина с урацилом и тимином возможно лишь с участием двух водородных связей и существенно менее эффективно, чем взаимодействие гуанина с цитозином.

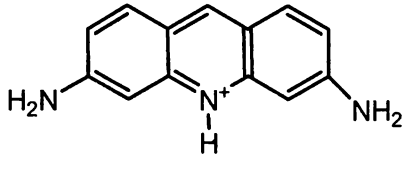
Последовательность чередования гетероциклов, т. е. последовательность нуклеотидов в одной из цепей или в одном из взаимодействующих фрагментов цепи, может быть произвольной. Вторая же комплементарная последова-

тельность однозначно ей соответствует. Наличие метильной группы в пиримидиновом гетероцикле у тимина при этом не играет существенной роли. Урацил, лишенный этой группы, образует комплементарную пару с аденином аналогично тимину. Однако наличие урацила в составе ДНК нехарактерно. Урацил преимущественно появляется в результате дезаминирования остатков цитозина. Этот процесс, хотя и с малой вероятностью, происходит в природе.

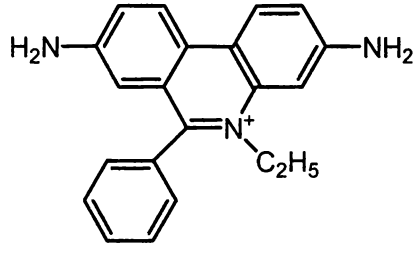
4.1.2. Стекинг-взаимодействия. Интеркаляция. Плавление дуплексов. Гибридизация

Специфичность образования комплементарных пар обеспечивается образованием водородных связей. Однако в энергетику образования таких пар столь же весомый вклад вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия между соседними парами гетероциклов, при которых две плоские ароматические системы располагаются приблизительно параллельно друг другу. Несколько (или множество) таких параллельных пар образуют стопку (stack), и поэтому этот тип ван-дер-ваальсовых взаимодействий называют *стекинг-взаимодействием*.

По аналогичному же механизму в двойную спираль могут встраиваться различные плоские ароматические системы. Такое встраивание получило название *интеркаляции*. В двунитевую ДНК, в частности, могут встраиваться профлавин и этидий.



профлавин



этидий

На рис. 29 схематично представлен фрагмент ДНК с интеркалированным этидием.

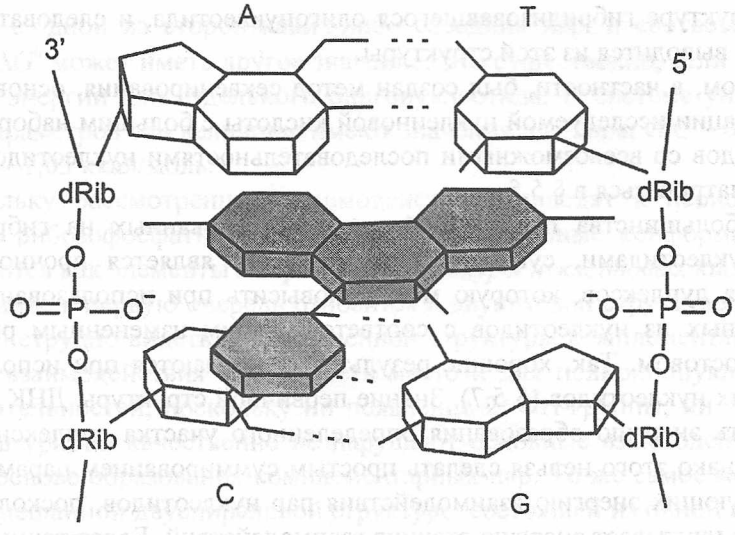


Рис. 29. Фрагмент ДНК с интеркалированным этидием (выделен серым цветом)

Участие гетероциклов двунитевой ДНК в стекинг-взаимодействиях очень четко проявляется в электронных спектрах поглощения – величина экстинкции в расчете на один гетероцикл при его участии в стекинге существенно ниже, чем у свободных нуклеотидов (порядка 40 % при 260 нм). Это обстоятельство широко используется для изучения прочности двунитевых структур нуклеиновых кислот. При нагревании происходит разрушение взаимодействий между нитями, т. е. разрушение стекинга, и усиление поглощения света. Этот процесс является кооперативным, и по аналогии с переходом веществ из твердого в жидкое состояние его называют плавлением. Зависимость поглощения от температуры называют *кривой плавления дуплекса*. Температура, соответствующая половине максимального изменения оптической плотности при плавлении, называется *температурой плавления дуплекса* и может рассматриваться в качестве количественной характеристики его прочности.

При понижении температуры может происходить воссоединение, т. е. *гибридизация комплементарных последовательностей*. В случае двух протяженных комплементарных полинуклеотидных цепей гибридизация протекает медленно или не происходит вообще, поскольку существует вероятность взаимодействия случайных, но достаточно протяженных комплементарных участков, без разрушения которых процесс полной гибридизации завершиться не может.

В этом отношении значительно эффективнее происходит гибридизация нуклеиновой кислоты с олигонуклеотидами, комплементарными некоторому участку полимерной цепи. Наличие такой гибридизации дает информацию о структуре этого участка нуклеиновой кислоты, поскольку она комплемен-

тарна структуре гибридизовавшегося олигонуклеотида, и следовательно однозначно выводится из этой структуры.

На этом, в частности, был создан метод секвенирования, основанный на гибридизации исследуемой нуклеиновой кислоты с большим набором олигонуклеотидов со всевозможными последовательностями нуклеотидов. Он будет рассматриваться в § 5.5.

Для большинства приложений методов, основанных на гибридизации с олигонуклеотидами, существенным фактором является прочность образующихся дуплексов, которую можно повысить при использовании цепей, построенных из нуклеотидов с соответствующим измененным рибозофосфатным остовом. Так, хорошие результаты получаются при использовании замкнутых нуклеотидов (§ 5.7). Знание первичной структуры ДНК позволяет рассчитать энергию образования определенного участка дуплексной структуры. Однако этого нельзя сделать простым суммированием параметров, характеризующих энергию взаимодействия пар нуклеотидов, поскольку такой расчет не учитывает энергию стекинг-взаимодействий. Более точным является учет взаимодействия соседних пар нуклеотидов. Оценки соответствующих энергий делались рядом авторов, причем имеются определенные расхождения между полученными данными. Поэтому созданы соответствующие *унифицированные параметры*, приводящиеся для всех мыслимых соседних пар. Эти параметры приведены в табл. 8.

Таблица 8

Унифицированные параметры для энергии взаимодействия между Уотсон – Криковскими парами в составе полидезоксирибонуклеотидной цепи

Последовательность пар	**ΔH^o, ккал/моль**	**ΔG^o, ккал/моль**
AA/TT	–7,6	–1,00
AT/TA	–7,2	–0,88
TA/AT	–7,2	–0,58
CA/GT	–8,5	–1,45
GT/CA	–8,4	–1,44
CT/GA	–7,8	–1,28
GA/CT	–8,2	–1,30
CG/GC	–10,6	–2,17
GC/CG	–9,8	–2,24
GG/CC	–8,0	–1,84

Представленные данные относятся к системе, в которой речь идет о взаимодействии двух пар нуклеотидов, находящихся внутри двунитевой ДНК. Для полного расчета необходимо учесть, что крайние пары нуклеотидов, например, получающиеся при инициации образования двунитевой структуры,

не имеют с одной из сторон каких-либо соседних пар, и соответствующее значение ΔG^0 может иметь другое значение. Это существенно, если речь идет о расчете энергии для отдельного олигонуклеотида. В системе унифицированных параметров эти величины имеют значения для пары G·C – 0,98, а для пары A·T – 1,03 ккал/моль.

Поскольку рассмотренные взаимодействия приводят к периодической структуре рибозофосфатного остова, то двуспиральные конформации рассматриваются как элементы *вторичной структуры нуклеиновых кислот.*

Сказанное в первую очередь относится к двунитевой структуре ДНК. Однако, как нетрудно видеть из приведенной структуры комплементарных пар, такие же взаимодействия могут иметь место и для полирибонуклеотидных последовательностей, поскольку ни появление 2'-ОН-группы, ни замена тимидина на уридин качественно не нарушают основные взаимодействия, лежащие в основе образования комплементарных пар. То же самое можно сказать и о смешанной двуспиральной структуре, состоящей из одной цепи ДНК и одной цепи РНК, которые образуются при инициации биосинтеза новых молекул ДНК и при синтезе ДНК на РНК-матрице, который имеет место при обратной транскрипции для первой стадии функционирования ретровирусов.

Хотя принцип образования двунитевых структур является общим, это не означает идентичность строения дуплексов ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Имеются четкие геометрические различия между этими дуплексами. Нуклеотидные пары не строго перпендикулярны осям спирали, их плоскости образуют некоторый угол с направлением оси. Ближе всего к перпендикулярному расположению относительно оси находятся пары гетероциклов в структуре, которую называют *В-ДНК*. Она представляет собой правую спираль, на каждый шаг которой приходится одна пара комплементарных нуклеотидов. Такая структура обладает винтовой осью, причем в биологических системах полный оборот спирали соответствует приблизительно 10,5 парам нуклеотидов. Расстояние между соседними парами вдоль оси составляет примерно 0,33 нм, а полный виток спирали соответственно имеет шаг 3,32 нм (рис. 30). Угол наклона плоскости, в которой располагается пара нуклеотидов, по отношению к оси спирали близок к нулю ($-1{,}2^0$). Для В-ДНК характерно наличие 2'-эндо-конформации у фуранозного фрагмента.

Если представить себе цилиндр, опоясывающий В-ДНК, то видно, что в его пределах остается достаточно свободного пространства. Это приводит к образованию вокруг двойной спирали двух бороздок. Они достаточно сильно различаются по своим размерам, и их называют соответственно большой и малой *бороздками* (см. рис. 30). При этом атомы гетероциклов, не участвующие в Уотсон – Криковских взаимодействиях, оказываются экспонированными, что очень существенно для их реакционной способности и для способности к нековалентным взаимодействиям с белками и другими лигандами. Особенно существенна способность экспонированных атомов и групп к образованию водородных связей в качестве доноров или акцепторов протона.

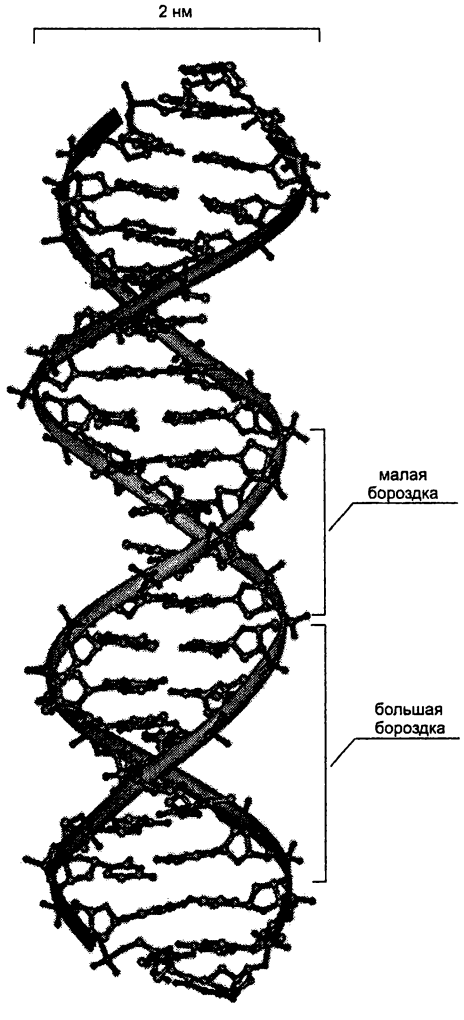


Рис. 30. Фрагмент двойной спирали ДНК в В-форме

В большую бороздку экспонированы атомы N7 остатков гуанина и аденина, атомы O6 остатков гуанина и атомы O4 остатков тимина (акцепторы протона), экзоциклические аминогруппы остатков аденина 6-NH_2 и цитозина 4-NH_2 (доноры протона). В малую бороздку экспонированы атомы N3 остатков гуанина и аденина, атомы O2 остатков тимина и цитозина (акцепторы протона) и экзоциклическая аминогруппа гуанина (2- NH_2, донор протона).

4.1.3. Искажения структуры дуплекса. Суперспирализация

В-ДНК с приведенными выше структурными параметрами является термодинамически наиболее устойчивой, и ее рассматривают как релаксирован-

ную форму В-ДНК. Однако под действием ряда разнообразных факторов в В-ДНК могут образоваться области, в которых число пар нуклеотидов на один виток спирали может оказаться меньше или больше, чем 10,5 (двойная спираль не полностью закручена или, наоборот, имеет повышенную закрученность), что может иметь место в целом ряде случаев. Наиболее наглядно это проявляется на кольцевых ДНК. Таковыми являются ДНК многих вирусов, плазмид и бактерий. Хотя не исключено, что ДНК этих частиц обладают совершенной В-конформацей, однако часто при этом у определенных фрагментов структура В-ДНК может быть искажена, и термодинамически более благоприятным становится превращение ДНК в структуру, у которой ось В-ДНК оказывается частично закрученной. Такая структура получила название *суперспирали* (рис. 31).

Приведенный пример является наиболее наглядным, но далеко не единственным. Например, при репликации ДНК важным элементом процесса является раскручивание двойной спирали родительской ДНК, которое в вилке репликации осуществляется с помощью специальных ферментов – геликаз, одна из которых функционирует в сторону вилки репликации, а другая – в направлении от вилки репликации. Это сказывается на состоянии ДНК, еще не вступившей в процесс репликации, и такая часть ДНК оказывается перекрученной, т. е. ее структура оказывается напряженной. Для возвращения ее в релаксированную форму в репликации участвует специальный фермент – *топоизомераза*, возвращающая примыкающую к вилке репликации ДНК в релаксированную форму.

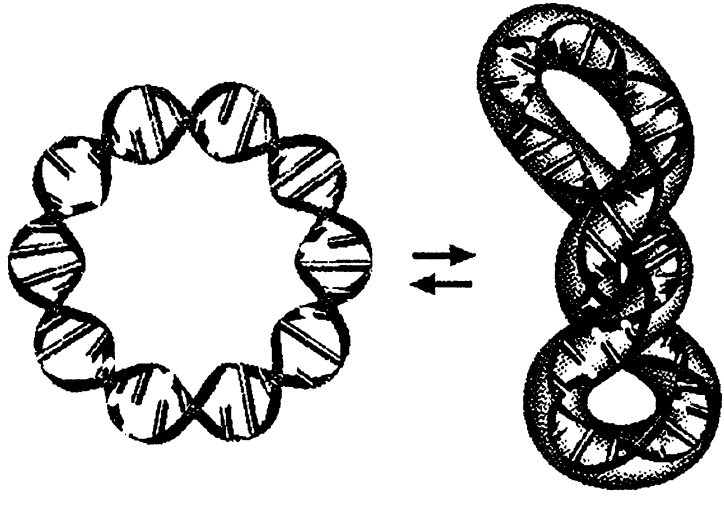


Рис. 31. Переход напряженной кольцевой ДНК в релаксированную суперскрученную

Суперскручивание ДНК имеет большое значение для структуры хроматина, но изложение этого вопроса выходит за рамки данного курса.

В-ДНК является основной формой существования ДНК в клетках. Однако это не означает, что В-ДНК не претерпевает различных изменений в зависимости от ее функционирования и некоторых деталей ее структуры. Прежде всего следует упомянуть некоторые структурные изменения. Установлено, например, что при наличии в одной из нитей ДНК нескольких фрагментов dAMP подряд двойная спираль претерпевает определенный изгиб. При расположении подряд до шести остатков аденина этот изгиб достигает 18^0

Важным структурным элементом ДНК являются так называемые *палиндромные последовательности*. Это означает, что при наличии некоторой нуклеотидной последовательности на одной из нитей такая же последовательность присутствует на небольшом расстоянии на второй нити. Это автоматически означает, что на противоположных нитях присутствуют комплементарные последовательности. В ненарушенной структуре В-ДНК подобные участки образуют дуплексные структуры, в которых участвуют обе нити ДНК.

Однако, как можно видеть из приведенного на рис. 32 примера, в рассматриваемом случае комплементарные взаимодействия могут произойти и в пределах каждой отдельной нити с образованием на каждой из них шпилечной структуры (двуспиральный стебель с небольшой петлей), выступающей за пределы основного дуплекса. Формируется *крестообразная структура* с нарушением на этом участке В-формы.

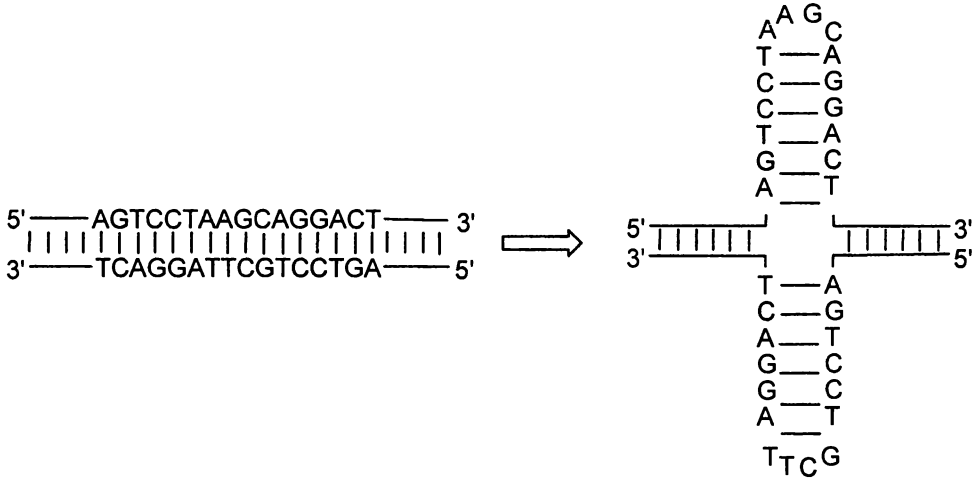


Рис. 32. Крестообразная структура ДНК

Структура В-ДНК также искажается при многих процессах взаимодействия с белками.

Двунитевые структуры наиболее характерны для ДНК. Однако известны отдельные вирусы, в основе которых лежит двунитевая РНК, структура которой достаточно сильно отличается от структуры В-ДНК. Эту структуру называют *А-РНК*. Двойная А-спираль также является правой, но наклон плоскости комплементарных гетероциклов по отношению к оси спирали существенно выше, чем в случае В-ДНК, и составляет около 20^0 Благодаря этому расстояние между плоскостями пар гетероциклов меньше, чем в случае В-ДНК, и составляет около 2,5 нм. Структуры А и В отличаются по конформации пентозы. У В-ДНК дезоксирибоза имеет конформацию С-2'-эндо, а рибоза в составе А-РНК – 3'-эндо-конформацию. Число пар нуклеотидов на один виток – около 11. Однако такие структуры в РНК образуются в основном в составе однонитевых РНК, которые рассматриваются в следующем разделе.

Для двунитевых ДНК имеется еще одна специфическая особенность. При наличии в составе ДНК фрагментов, в которых чередуются пуриновые или пиримидиновые нуклеотиды, например, $d(GC)_n$, при достаточно высокой ионной силе наблюдается переход этого фрагмента в левоспиральную конформацию, причем повторяющимся фрагментом в этом случае оказывается динуклеотид d(pGpC) (рис. 33).

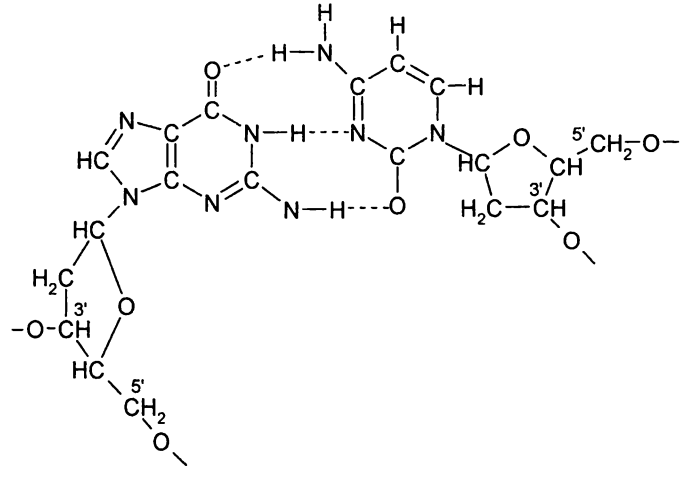


Рис. 33. Структура G·C пары в составе Z-ДНК

Линия, соединяющая между собой фосфаты, не является винтовой, а имеет зигзагообразную форму, в связи с этим образующаяся пространственная структура называется *Z-ДНК*. В составе этой структуры G имеет *син*-конформацию, а С – *анти*-конформацию. Фактически полному обороту спирали соответствует 6 динуклеотидов d(pGpC), т. е. на полный оборот спирали приходится 12 пар нуклеотидов. Фрагмент дезоксирибозы для С имеет

2'-эндо-, а для G – 2'-экзо-конформацию. На рис. 33 приведена структура одной G·C пары в составе Z-ДНК.

4.1.4. Трех- и четырехнитевые структуры

В большой бороздке ДНК может располагаться еще одна полинуклеотидная цепь. Однако достаточно прочная структура образуется лишь в уникальном случае, если в одной из нитей двойной спирали присутствуют только пуриновые, а в другой – только пиримидиновые нуклеотиды. В простейшем случае, если речь идет о полиадениловой последовательности и комплементарной ей полиуридиловой или политимидиловой последовательности, может образоваться *трехнитевая структура (триплекс)* с участием еще одной полипиримидиновой последовательности, которая ориентирована параллельно полиадениловой последовательности. На рис. 34 приведено взаимное расположение трех гетероциклов в плоскости, перпендикулярной трехнитевой структуре. Такая же структура может получиться на основе двойной спирали, образованной полигуаниловой и полицитидиловой последовательностями, но одна из полицитидиловых последовательностей триплекса должна содержать протонированные остатки цитозина и может образовываться лишь в слабокислой среде.

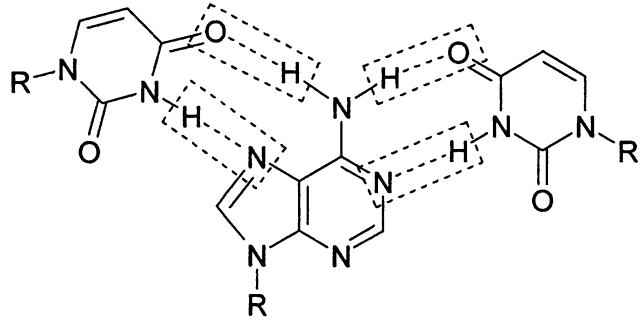


Рис. 34. Взаимное расположение взаимодействующих между собой гетероциклов в трехнитевой структуре нуклеиновых кислот в плоскости, перпендикулярной оси спирали

Примером структуры еще более высокого порядка может быть представленная на рис. 35 *четырехнитевая структура*, образуемая в результате взаимодействия в одной плоскости четырех остатков гуанина.

Такая структура может реализоваться либо при взаимодействии четырех параллельно ориентированных цепей, либо при антипараллельной взаимной ориентации каждой пары соседних нитей.

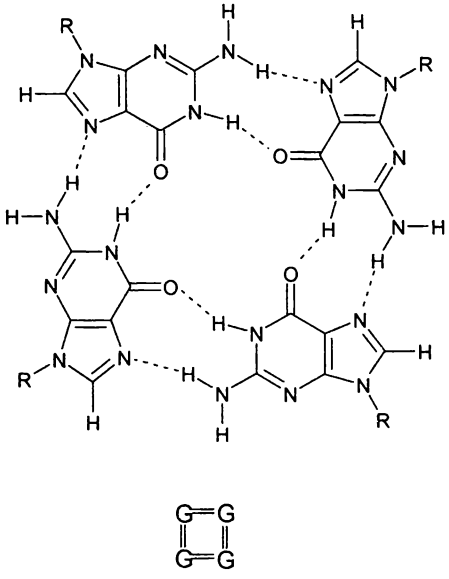


Рис. 35. Взаимное расположение остатков гуанина в плоскости, перпендикулярной оси нуклеиновой кислоты в четырехнитевой полигуаниловой кислоте

§ 4.2. Однонитевые нуклеиновые кислоты. Шпилечные структуры. Псевдоузлы

Комплементарные последовательности могут встречаться и в однонитевых структурах. Если эти последовательности антипараллельны, то это может привести к образованию так называемых «*шпилек*», состоящих из *двуспирального стебля*, образованного этими последовательностями, и соединяющей их *петли* из нескольких нуклеотидных остатков. Шпилечные структуры наиболее характерны для рибонуклеиновых кислот, поскольку ДНК преимущественно существует в виде комплекса, образованного двумя комплементарными, не связанными между собой ковалентно полинуклеотидными цепями.

Кроме того, большое значение для пространственной структуры РНК имеют *псевдоузлы*. Петли РНК могут в ряде случаев оказаться комплементарными некоторым, достаточно близко расположенным однонитевым фрагментам. Если между ними образуются водородные связи, то возникает специфический элемент пространственной структуры, называемый псевдоузлом.

До последнего времени пространственные структуры были в основном установлены для транспортных РНК, многие из которых в силу небольшого размера удалось закристаллизовать и провести их рентгеноструктурный анализ.

Таким образом, пространственная структура РНК определяется в первую очередь шпильками и псевдоузлами. При этом следует отметить, что у стеблей, формирующих элементы вторичной структуры РНК, довольно часто имеются пары G·U вместо пар G·C.

Стебли в молекулах РНК не всегда являются совершенными. В них присутствуют дополнительные нуклеотиды, как бы выступающие из стебля, что уменьшает его стабильность.

Вопрос о *пространственной структуре* одноцепочечных рибонуклеиновых кислот наиболее подробно изучен для транспортных рибонуклеиновых кислот – *тРНК*. Установление первичной структуры большого числа транспортных РНК показало, что все они построены таким образом, что у них имеется три пары комплементарных фрагментов, разделенных каждая участком в несколько нуклеотидных остатков, не имеющих партнеров для образования сколь-нибудь протяженных комплементарных участков. В результате в пространственной структуре тРНК имеются три шпильки: D-шпилька, в которой обычно располагается минорный нуклеозид дигидроуридин; антикодоновая шпилька – в ее петлевой части находится тринуклеотид, называемый антикодоном, который в ходе биосинтеза белка на рибосомах непосредственно взаимодействует с кодоном мРНК, подлежащим трансляции; Т-шпилька – в ней в подавляющем большинстве тРНК находится метилированный в положении 5 остаток уридина, т. е. рибоаналог тимидина.

Кроме того, начало полинуклеотидной цепи (5'-концевая часть) комплементарно последовательности, непосредственно примыкающей к противоположному концу цепи, на котором находится универсальный для всех тРНК тринуклеотид pCpCpA, к одной из его концевых OH-групп присоединяется карбоксильная группа аминокислоты. Это дало основание приписать всем тРНК вторичную структуру, получившую название *клеверного листа* (рис. 36).

Размеры каждого из стеблей и каждой из петель практически универсальны для всех тРНК, независимо от того, каким аминокислотам они соответствуют и из каких биологических источников они выделены, хотя известны и отдельные исключения.

Следует отметить, что, как видно из структуры *акцепторного стебля*, комплементарные последовательности, образующие стебель, совсем не обязательно должны быть на коротком расстоянии друг от друга вдоль цепи. В этом случае стебель образован 5'- и 3'-концевыми последовательностями молекулы тРНК, которые вдоль полинуклеотидной цепи разделены последовательностями десятков нуклеотидов. Основываясь на этих соображениях, предположительно можно найти элементы вторичной структуры и в больших молекулах РНК, например, в рибосомных РНК. При поиске возможных комплементарных последовательностей в таких молекулах РНК, состоящих из тысяч нуклеотидных остатков, приходится прибегать к компьютерному поиску (поиску структур, обладающих минимальной энергией), в результате которого обычно получается несколько вариантов вторичной структуры, все

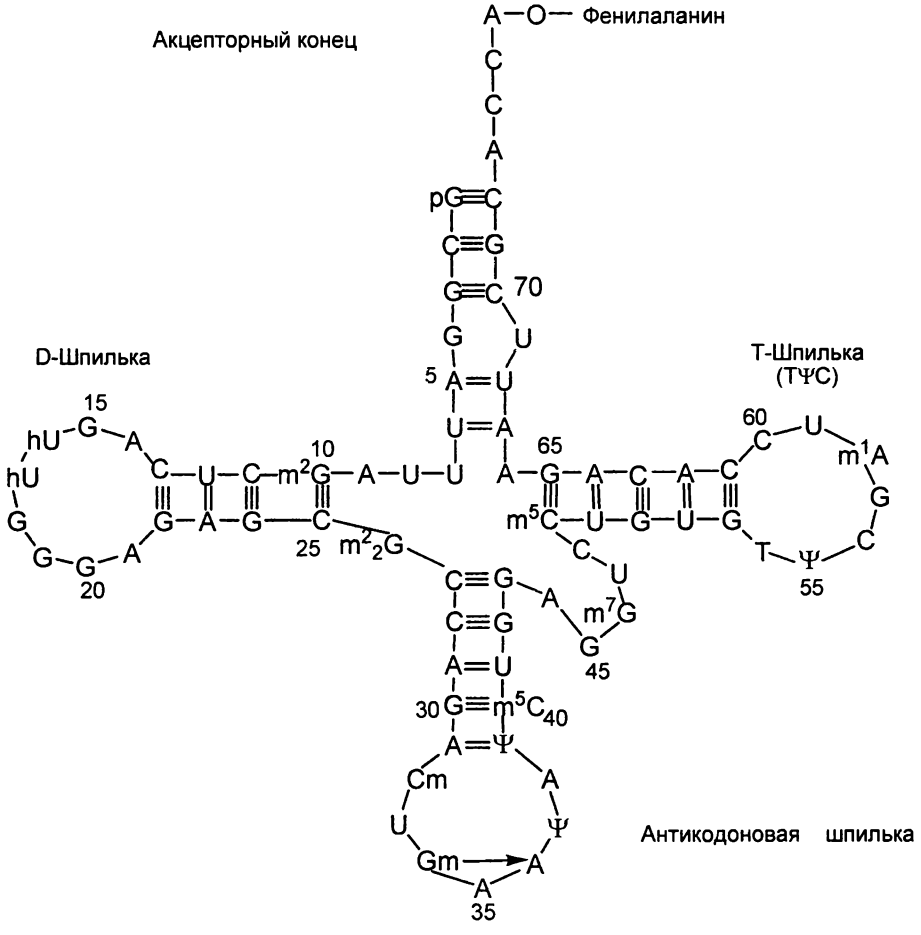


Рис. 36. Структура тРНК фенилаланина в форме клеверного листа

они носят гипотетический характер. Пример такой структуры, полученной с использованием биоинформатики, приведен в гл. 20.

Дополнительную информацию можно получать, применяя некоторые другие методы. Одним из них является использование бифункциональных реагентов, несущих на своих концах реакционноспособные группы. Если реакция исследуемой РНК проходит по случайному остатку, то вторая реакционноспособная группа оказывается расположенной вблизи соседнего с первым участком РНК. Проведя гидролиз РНК до фрагментов небольшой длины и выделив из полученной реакционной смеси модифицированные олигонуклеотиды, нетрудно установить, в каких участках первичной структуры РНК они находятся, и, таким образом, получить информацию о взаимном расположении этих участков в структуре РНК, т. е. выявить один из элементов ее пространственной структуры. Что касается полной пространственной струк-

туры (третичной), то пока удалось установить эти структуры только для нескольких тРНК и рибосомной РНК из *Escherichia coli*.

Рентгеноструктурный анализ, проведенный двумя группами ученых в США (Рич) и Англии (Клуг) для специфичной к фенилаланину тРНК из дрожжей, полностью подтвердил существование описанных выше шпилек и стеблей, но одновременно показал, что благодаря некоторым дополнительным взаимодействиям *трехмерная структура тРНК* имеет L-образную форму (рис. 37).

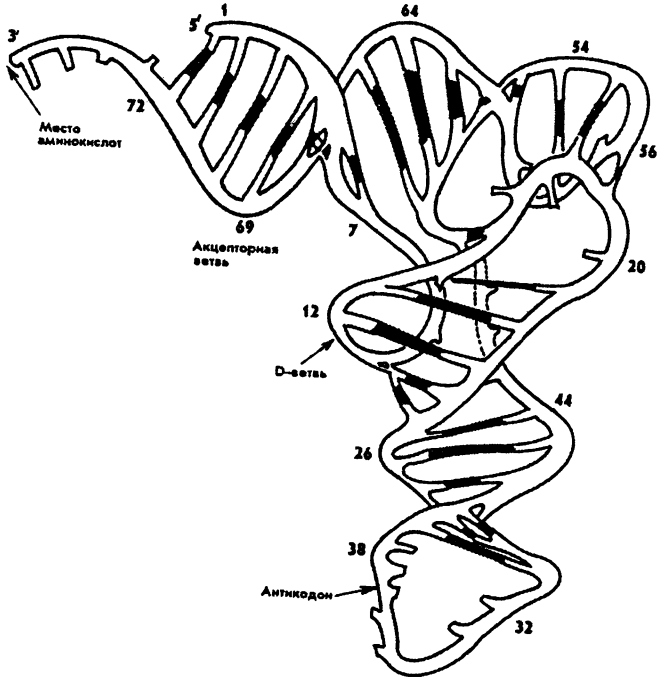


Рис. 37. Пространственная структура тРНК

Сходная пространственная структура была позднее найдена для нескольких тРНК. Многочисленные данные указывают, что в своих общих чертах такая структура является универсальной для всех тРНК. Важнейшим среди взаимодействий, стабилизирующих третичную структуру тРНК, является, в первую очередь, стекинг соответствующих пар оснований в акцепторном и Т-стеблях и в антикодоновом и D-стеблях, в результате чего четыре коротких двуспиральных фрагмента складываются в два более протяженных, каждый из которых имеет в одной из цепей разрыв. Кроме того, имеется существенное взаимодействие между гетероциклами Т- и D-шпилек, а именно между гуанином в положении 15 D-петли и цитозином 48 в основании Т-стебля,

гуанином 18 D-петли и урацилом псевдоуридина 55 T-петли и гуанином 19 D-петли и цитозином 56 T-петли. Схема взаимодействия приведена на рис. 38.

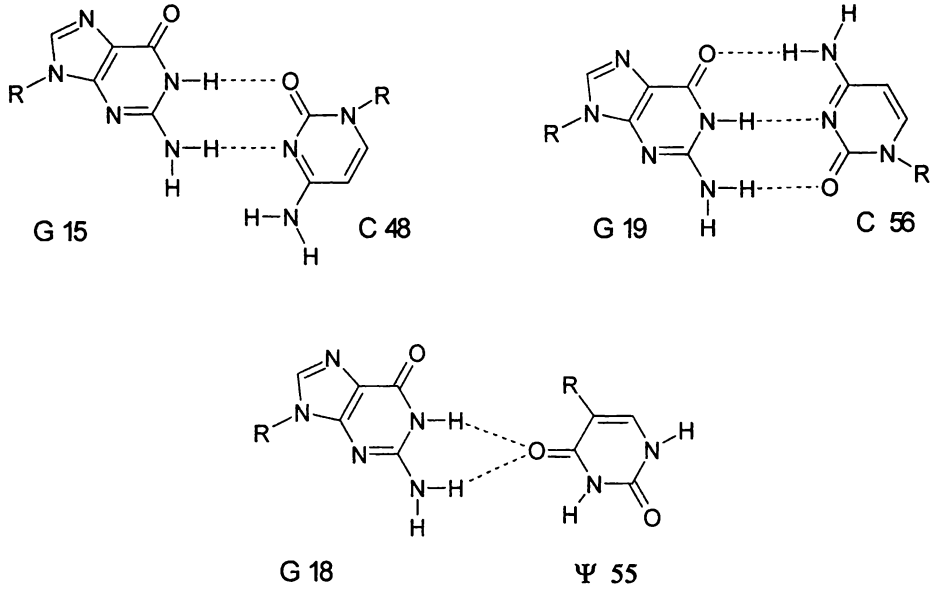


Рис. 38. Взаимодействия, стабилизирующие третичную структуру тРНК

Видно, что только последнее из перечисленных трех взаимодействий является Уотсон – Криковским. Для образования третичной структуры этот тип взаимодействий между гетероциклами никаких явных преимуществ по сравнению с другими мыслимыми взаимодействиями не имеет, так как для формирования третичной структуры тРНК не требуется образования периодической структуры остова.

§ 4.3. Применение химической модификации для изучения пространственной структуры нуклеиновых кислот

Реакционные способности однотипных нуклеотидных остатков по отношению к определенному реагенту могут существенно различаться в зависимости от их расположения в пространственной структуре и участия во взаимодействии с белками. Поэтому химическая модификация нуклеиновых кислот по гетероциклам широко используется для изучения пространственной структуры нуклеиновых кислот и их комплексов с белками. Как уже говорилось во введении, химическая реакция становится в этом случае инструментом исследования.

Наибольшее применение нашли химические реакции с нуклеиновыми кислотами для выявления участков, образующих двуспиральные фрагменты. На таких участках реакционная способность гетероциклов оказывается во много раз ниже, чем у тех же гетероциклов в неспирализованных фрагментах. Это позволяет выявлять элементы вторичной структуры для больших молекул РНК, в частности рибосомных РНК. В качестве иллюстрации на рис. 39 представлена вторичная структура одного из доменов 28S РНК мыши, установленная с помощью модификации ее диметилсульфатом и водорастворимым карбодиимидом.

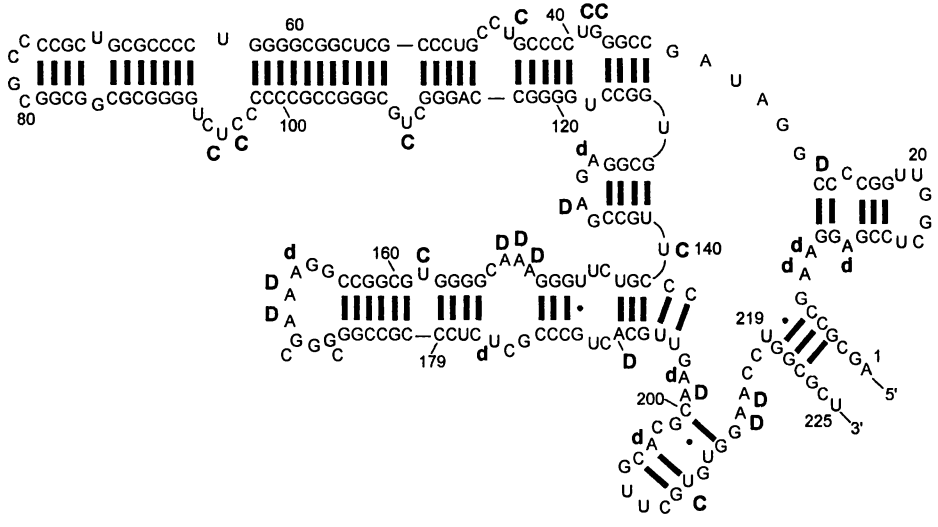


Рис. 39. Вторичная структура одного из доменов 28S РНК мыши. Участки, модифицируемые диметилсульфатом и водорастворимым карбодиимидом, отмечены соответственно буквами D и C

В качестве еще одного примера представлены двунитевые и расплетенные участки ДНК и находящиеся в комплексе с последней молекулы РНК (косые символы), полученные при транскрипции 11 и 20 нуклеотидов (рис. 40).

Транскрипция инициировалась с помощью рибонуклеотида pAUC, комплементарного первым трем нуклеотидам транскрибируемого фрагмента, считая от 3'-конца матрицы. На протяжении 8 нуклеотидных остатков от конца праймера на транскрибируемой нити находятся только пиримидиновые нуклеотиды. Поэтому при использовании в качестве субстратов транскрипции только GTP и ATP процесс останавливается после включения 11-го нуклеотида из-за отсутствия CTP. Выделение остановленного транскрипционного комплекса и продолжение элонгации в присутствии CTP и ATP позволяет удлинить транскрипт еще на три нуклеотида. В новом выделенном комплексе с транскриптом длиной 14 нуклеотидов может быть осуществлена

элонгация до получения 20-звенного транскрипта с использованием в качестве субстратов CTP, ATP и GTP. Положение развернутого участка ДНК (вздутия) определялось с использованием трех реагентов, специфичных каждый к одному типу гетероциклов: OsO_4 к тимину; диэтилпирокарбоната к аденину; диметилсульфата с последующей обработкой гидразином к цитозину. Схема найденного таким образом вздутия для фрагментов ДНК после образования транскриптов длиной 11 и 20 нуклеотидов, приведена на рис. 40.

```
                ATCGAGAGGGACA
        TACAGGC                          CGGCGAATAGCCATCCCAATCGA
а       |||||||                          |||||||||||||||||||||||||
        ATGTCGG                          GCCGCTTATCGGTAGGGTTAGCT
                TAGCTCTCCCTGT
                 |||||||||
                 CGAGAGGGA
                AU

                        ACACGGCGAATA
        TACAGGCATCGAGAGGG                GCCATCCCAATCGA
б       ||||||||||||||||||               |||||||||||||||
        ATGTCGGTAGCTCTCCC                CGGTAGGGTTAGCT
                        TGTGCCGCTTAT
                         ||||||||||
                         CACGGCGAA
                AUCGAGAGGGA
```

Рис. 40. Структура расплетенного фрагмента ДНК (прямые символы) и находящейся с ним в комплексе молекулы РНК (косые символы), полученные при транскрипции 11 (*а*) и 20 (*б*) нуклеотидов. РНК-полимераза, присутствующая в комплексе, не изображена. Подчеркнуты и выделены жирным шрифтом участки ДНК, находящиеся в контакте с РНК-полимеразой по данным футпринтинга ОН-радикалами (§ 12.4). Вертикальными черточками обозначены водородные связи между комплементарными гетероциклами

Реакционная способность остатков нуклеотидов в ДНК и РНК, в первую очередь остатков гетероциклов, существенно изменяется – как правило, уменьшается при их участии в образовании комплексов с белками и другими соединениями. Поэтому химическая модификация широко используется для выявления фрагментов нуклеиновой кислоты, участвующих в комплексообразовании. Этот вопрос рассматривается в § 12.4.

Глава 5. Химико-ферментативный синтез нуклеиновых кислот

§ 5.1. Общая стратегия синтеза нуклеиновых кислот. Защитные группы

Синтетические олигонуклеотиды, их аналоги и производные стали одной из важнейших групп соединений, используемых в биохимических и молекулярно-биологических исследованиях, важным инструментом при решении ряда задач медицинской диагностики, широко исследуются как потенциальные терапевтические средства для лечения многих заболеваний, связанных с нарушением работы генетического аппарата организма или появлением чужеродных генетических структур. Олигонуклеотиды заданного строения необходимы в качестве праймеров при многочисленных применениях ДНК-полимераз. В частности, синтетические олигонуклеотиды позволяют с использованием генно-инженерных подходов изменять определенные нуклеотидные остатки в функционально значимых генах, т. е. направленно создавать мутации. Экспрессия таких генов позволяет получать мутантные белки. Благодаря способности к высокоселективной гибридизации с нуклеиновыми кислотами они позволяют выявлять изменения в их первичной структуре, в том числе мутации в патогенах, в частности в патогенных вирусах. Поэтому *химический синтез олигонуклеотидов* на протяжении многих лет был одной из центральных задач биоорганической химии.

Синтез олигонуклеотидов проводится исходя из готовых мономеров – нуклеозидов или нуклеотидов. Последние в настоящее время являются коммерчески доступными продуктами, которые получают путем химического или ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот, выделенных из живых организмов – бактерий, дрожжей, растений и животных, с последующим разделением образующейся смеси нуклеозидов или нуклеотидов на индивидуальные вещества. При использовании для синтеза нуклеозидов предусматривается стадия введения в них остатка фосфорной кислоты или ее предшественника.

Главным процессом при синтезе олиго- и полинуклеотидов является образование новых связей между нуклеотидными звеньями (*межнуклеотидных связей*). Химический синтез является доминирующим при синтезе относительно коротких олигонуклеотидов. Для получения достаточно длинных полинуклеотидов используется ферментативное соединение полученных химическим путем олигонуклеотидов. Способность полинуклеотидов к репликации открыло возможность «размножать» полученные полимеры, т. е. получать необходимое количество продукта из очень незначительного изначаль-

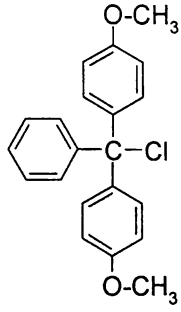
ного количества. Такое «размножение» является ферментативным процессом, поскольку основано на использовании ДНК-полимераз.

Для получения олиго- или полинуклеотида, состоящего из *n* мономерных звеньев, должно быть образовано *n-1* межнуклеотидных связей. При образовании каждой такой связи один из компонентов является донором ОН-группы (О-компонент), а другой – донором атома Р для образуемой связи (Р-компонент). Образование связи между ОН-группой О-компонента и остатком фосфорной кислоты Р-компонента, как уже указывалось в § 3.1, термодинамически невыгодно. Поэтому при образовании каждой новой межнуклеотидной связи используется реакционноспособное производное Р-компонента. Пути получения таких производных рассматриваются в § 5.3.

Общую стратегию синтеза можно представить в двух вариантах. Один из них – синтез коротких олигонуклеотидов с их последующим соединением в более длинную структуру – *блочный синтез*. Он был преобладающим в начальный период работ по химическому синтезу нуклеиновых кислот. Второй вариант – это ступенчатое удлинение растущей цепи путем последовательного присоединения нуклеотидных звеньев с одного конца. Такой вариант в настоящее время является доминирующим, а при автоматизированном синтезе – единственным.

При соединении Р- и О-компонентов в синтезе олигонуклеотидов с определенной последовательностью Р-компонент не должен содержать ОН-группы, способной к образованию связи с атомом Р. В противном случае возможна внутримолекулярная реакция образования Р-О-связи. Поэтому в Р-компоненте ОН-группа должна быть закрыта. Следовательно, она будет закрыта и в образовавшемся продукте, и для продолжения наращивания полинуклеотидной цепи ее следует деблокировать. Это достигается предварительным введением в Р-компонент специальной *защитной группы*. Она должна присутствовать на стадии образования межнуклеотидной связи и удаляться перед образованием следующей межнуклеотидной связи. Важнейшим свойством защитной группы является возможность ее удаления в условиях, не приводящих к разрушению ранее образованных межнуклеотидных связей. Такие защитные группы, вводимые перед каждой стадией образования новой связи и удаляемые перед следующей, рассматриваются как *временные*. Наряду с этим необходимо предотвратить реакции Р-компонента с межнуклеотидными фосфатами и экзоциклическими аминогруппами. Это также достигается введением защитных групп, но, в отличие от временных, они должны присутствовать на протяжении всего синтеза олигонуклеотида и удаляться после завершения синтеза всей олигонуклеотидной цепи. Такие защиты квалифицируются как *постоянные*.

В современных методах синтеза временной защиты требуется в основном 5'-концевая ОН-группа наращиваемой цепи, для чего в основном используют *диметокситритильную группу* (DMTr), которая вводится в Р-компонент взаимодействием с диметокситритилхлоридом $(MeO)_2TrCl$.



В силу большого объема заместителя реакция проходит достаточно селективно по 5'-OH-группе нуклеотида. DMTr-группа легко удаляется мягкой обработкой кислотой.

Наиболее широко в качестве постоянных *защитных групп* для *межнуклеотидных фосфатов* в настоящее время используются O-метильные и O-цианэтильные защитные остатки. Они, как правило, вводятся в синтоны (синтонами обычно называют производные мономеров, непосредственно используемые для образования новой связи между мономерами) до введения их в синтез полинуклеотидной цепи. В наличии *защитных групп* на протяжении всего синтеза нуждаются также *экзоциклические аминогруппы* остатков цитозина, аденина и гуанина. С этой целью данные аминогруппы ацилируются с помощью соответствующих ацилхлоридов. В настоящее время наиболее широко используются бензоильные производные цитозина и аденина и изобутирильные производные гуанина. Получать их исследователям не приходится, поскольку они являются коммерческими продуктами, которые поставляются фирмами, обеспечивающими работы по синтезу олигонуклеотидов.

Таким образом, в синтонах при всех методах олигонуклеотидного синтеза в качестве гетероциклов участвуют тимин, N6-бензоиладенин, N4-бензоилцитозин или N2-изобутирилгуанин. Деблокирование экзоциклических аминогрупп проводится по завершении синтеза олигонуклеотидной цепи обработкой аммиаком одновременно с удалением защитных групп с межнуклеотидных фосфатов.

§ 5.2. Методы образования межнуклеотидных связей

Пионером химического синтеза олигонуклеотидов был Гобинд Корана (H. G. Khorana, лауреат Нобелевской премии 1968 года). В 1970 году он осуществил первый синтез гена. Подходы, использовавшиеся в этих работах, были основаны на взаимодействии фосфатной группы нуклеотида или олигонуклеотида в качестве P-компонента с OH-группой O-компонента в присутствии конденсирующего агента, который служил для активации фосфат-

ных групп. В качестве последнего наилучшим образом зарекомендовал себя триизопропилбензолсульфохлорид. Данный метод приводил непосредственно к образованию межнуклеотидных связей в виде фосфодиэфиров. Этот подход, получивший название *фосфодиэфирного метода*, хотя и привел к первому синтезу гена, но требовал для получения каждого из олигонуклеотидов, из которых собирался ген, многие месяцы усилий высококвалифицированных исследователей. Поскольку наличие фосфодиэфирных групп, способных реагировать с Р-компонентом, приводило к серьезным осложнениям, одним из первых усовершенствований в синтезе олигонуклеотидов было введение эфирных групп по фосфату синтонов, в результате чего при конденсации их с ОН-группой О-компонента образовывались фосфотриэфиры. В связи с этим такие подходы получили название *фосфотриэфирного метода*. Они позволили сократить время синтеза олигонуклеотидов до нескольких дней.

Кардинальным улучшением синтеза был переход к образованию Р-О-связей существенно более реакционноспособных фосфитов и Н-фосфонатов. В обоих случаях синтоны получаются исходя из PCl_3.

Схема, основанная на использовании фосфитов, представлена на рис. 41. Синтоны получаются введением по 3'-ОН-группе нуклеозида производного PCl_3, в котором атомы Cl замещены на нуклеозид, защитную группу X (CH_3 или $C_2H_4C{\equiv}N$) и триизпропиламин [$N(iPr)_3$]. Для атаки по ОН-группе требуется активация, для которой наилучшим реагентом оказался тетразол.

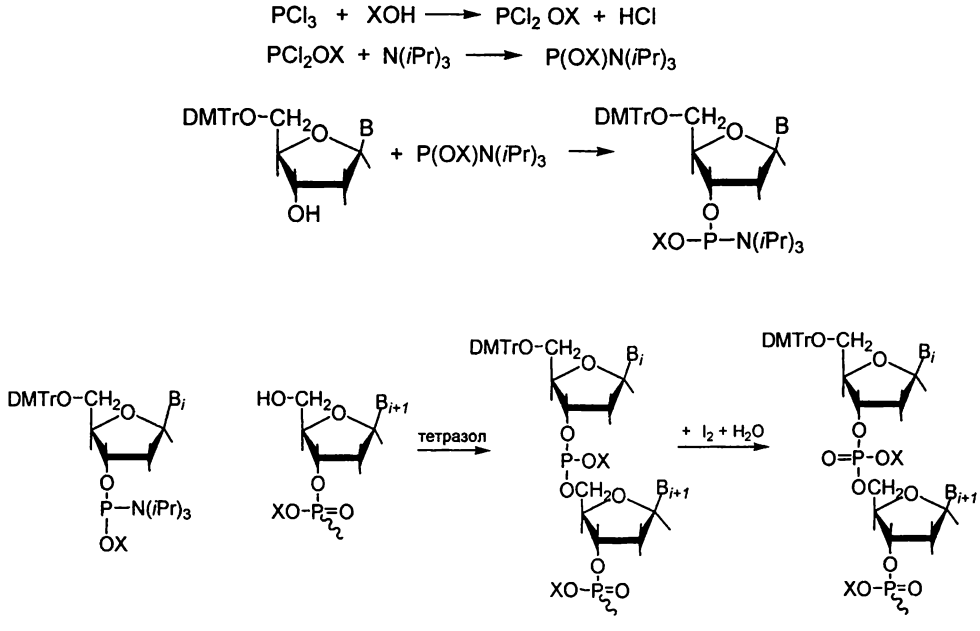
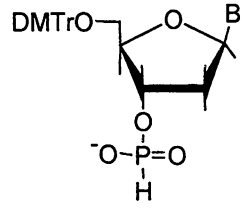


Рис. 41. Схема получения синтона и образования межнуклеотидной связи фосфитамидным методом

По этому методу после образования каждой P-O-связи остаток фосфита окисляется до фосфата водным раствора йода. После завершения сборки полной полинуклеотидной цепи метильные или цианоэтильные остатки, а также ацильные остатки, защищающие экзоциклические NH_2-группы гетероциклов, удаляют обработкой аммиаком.

Другой метод, основанный на использовании в качестве исходного соединения PCl_3, обычно называется *H-фосфонатным методом синтеза.* В этом методе используются H-фосфонатные синтоны



Для получения синтона исходят из нуклеозида и салицилхлорфосфита, который получают обработкой салициловой кислоты PCl_3. В целом реакция получения H-фосфонатного синтона может быть записана в виде, представленном на рис. 42.

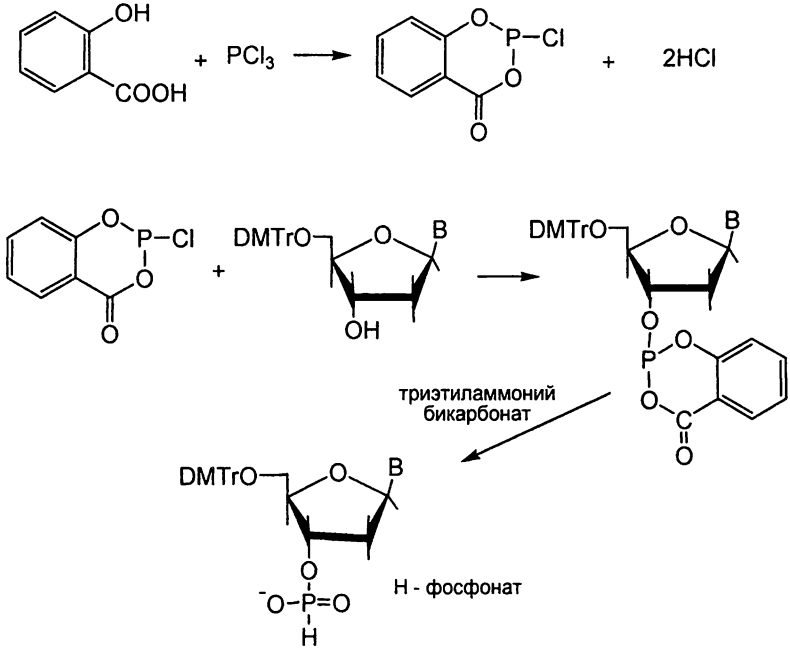
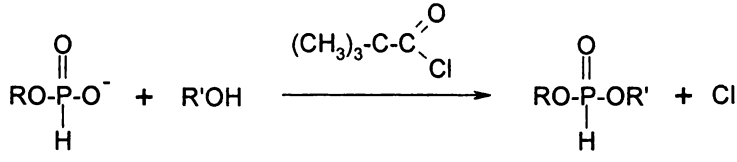


Рис. 42. Схема получения H-фосфоната нуклеозида

Удлинение олигонуклеотида в Н-фосфонатном методе проводится по той же схеме, что и при фосфитамидном – ранее синтезированный олигонуклеотид содержит на 5'-конце защищенную диметокситритилом ОН-группу.

Защитная группа удаляется перед каждой последующей конденсацией, после чего присоединяется следующий Н-фосфонат. Н-фосфонаты активируют обработкой пивалоилхлоридом $(CH_3)_3C\text{-}C(O)Cl$. Межнуклеозидные Н-фосфонатные связи достаточно стабильны и могут подвергаться окислению до фосфата не постадийно, как в фосфитамидном методе, а после завершения образования полинуклеотидной цепи. Конденсация приводит к образованию Н-фосфонатдиэфирной связи согласно реакции:



Метод чаще всего используют для постадийного наращивания цепи, растущей в направлении 5'-конца. В этом случае здесь R – нуклеозид, а R' – удлиняемый олигонуклеотид с деблокированной 5'-концевой ОН-группой. Как и в фосфитамидном методе, каждая стадия конденсации проходит за минуты.

§ 5.3. Синтез олигорибонуклеотидов

Образование новых фосфоэфирных связей между рибонуклеотидами и многие защитные группы, используемые при синтезе рибонуклеотидов, чаще всего не отличаются от используемых при синтезе дезоксирибонуклеотидов. Основным отличием при синтезе рибоолигонуклеотидов является наличие 2'-ОН-группы, и задача состоит во введении постоянной защиты по этой группе. К ней относятся все требования, предъявляемые к уже рассмотренным защитным группам – она должна быть достаточно стабильна, чтобы выдерживать все промежуточные стадии сборки олигонуклеотидной цепи, и удаляться в конце сборки в условиях, не разрушающих межнуклеотидные связи. Первая задача, которая встает при введении такой группы, – это селективное введение защитной группы именно по 2'-положению, чтобы при этом 3'-ОН-группа не затрагивалась. Очевидным и нередко используемым приемом является проведение неселективной реакции, приводящей к смеси двух изомеров, и их последующее разделение для выделения нужного изомера. Подобной широко используемой группой является третбутилдиметилсилильная (TBDMSi-). Она вводится по ОН-группам обработкой соответствующим хлоридом, и образующиеся два изомера, а также продукт силилирования по обеим ОН-группам достаточно легко разделяются. Нуклеозиды с селективно

защищенной 2'-OH-группой далее превращаются в синтоны для фосфитамидного или H-фосфонатного олигонуклеотидного синтеза. Защитная группа удаляется после завершения синтеза всей цепи обработкой тетрабутиламмоний фторидом.

Второй подход основан на использовании *реагента Маркевича* – 1,3-дихлор-1,1,3,3-тетраизопропилдисилоксана, с помощью которого можно просилилировать одновременно 5'- и 3'-OH-группы нуклеозида (рис. 43).

Дальнейшая обработка продукта третбутилдиметилсилилхлоридом приводит к селективному введению защиты по 2'-OH-группе. Остаток, образовавшийся при действии реагента Маркевича, удаляется обработкой триэтиламмоний фторидом, что приводит к синтону с селективно блокированной 2'-OH-группой. Эта группа выдерживает все последующие операции по олигонуклеотидному синтезу и удаляется обработкой 0,01 н HCl после завершения формирования полимерной цепи с образованием требуемого олигорибонуклеотида.

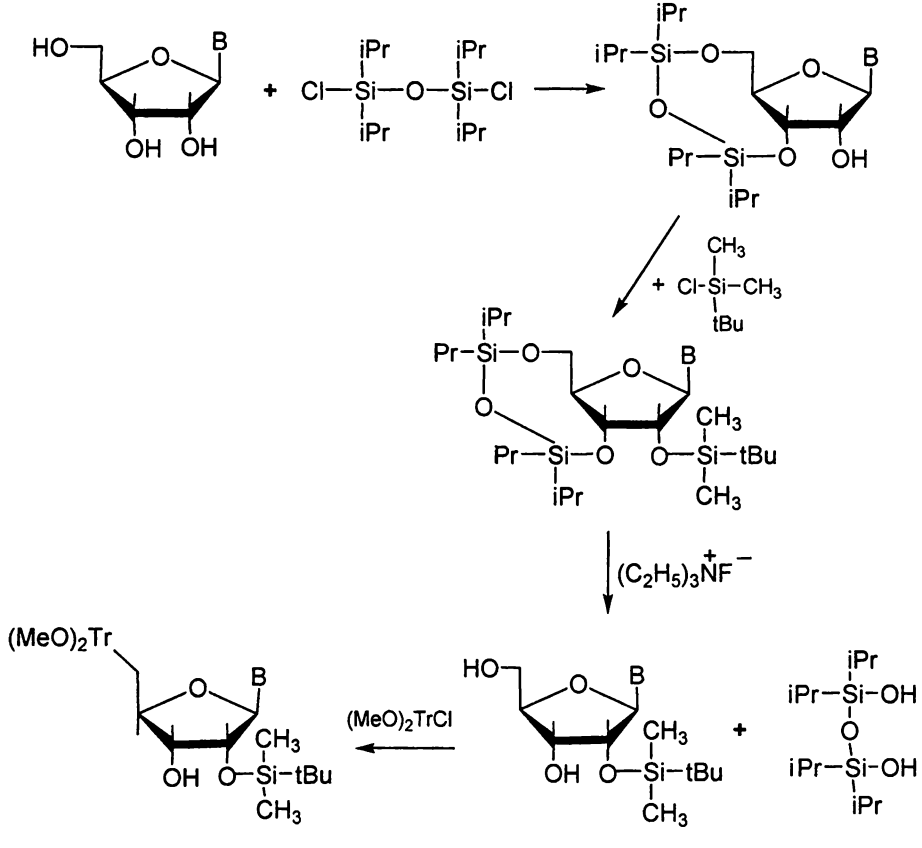


Рис. 43. Получение защищенного по 2'-OH-группе нуклеозида с помощью реагента Маркевича

§ 5.4. Твердофазный метод синтеза олиго- и полинуклеотидов. Автоматические методы в олигонуклеотидном синтезе

5.4.1. Твердофазный синтез олигонуклеотидов

Специфической особенностью синтеза олиго- и полинуклеотидов является огромное число идентичных по типу реакции стадий, которые необходимо проводить на каждом этапе удлинения цепи. Образование каждой межнуклеотидной связи требует проведения самой конденсации и удаления временных защитных групп перед проведением последующей стадии. Кроме того, при фосфитамидном синтезе после каждой стадии образования новой Р-О-связи необходимо провести окисление фосфитэфирного остатка до фосфоэфирного. Основная трудность классического синтеза состоит в том, что на каждой его стадии для гарантии чистоты полученных молекул олигомера необходимо тщательно отделять их от избытка исходных синтонов, продуктов их превращения, побочных продуктов реакции и вспомогательных реагентов. Для этого на каждой стадии необходимо подбирать условия такой очистки: кристаллизация, переосаждение, хроматография и др. Кроме того, на каждой стадии очистки неизбежны некоторые механические потери синтезируемого материала. В то же время для синтеза олигомера, состоящего из n остатков мономера, нужно не менее 2n раз (а то и значительно больше!) очищать продукты реакции. Таким образом, синтез в классическом варианте сопряжен со значительными затратами труда, времени и материала.

В 1963 году американский химик-биоорганик Роберт Меррифилд (R. B. Merrifield) предложил новый принцип проведения последовательных стадий удлинения растущей полимерной цепи, позволяющий в значительной мере избежать перечисленных осложнений. Было предложено осуществлять синтез нерегулярного биополимера путем пошагового удлинения полимерной цепи, ковалентно связанной с нерастворимым полимерным носителем, с поочередным добавлением раствора синтона или раствора для деблокирования временной защитной группы. После проведения каждой стадии процесса нетрудно осуществить отделение связанного с нерастворимым носителем продукта реакции от находящихся в растворе компонентов, например, простым фильтрованием. Но более технологичным является помещение носителя в колонку, через которую в нужном порядке пропускаются растворы синтонов, растворы деблокирующих и других вспомогательных реагентов и промывающие растворители. Все эти процессы, а также присоединение первого звена создаваемого полимера к носителю и удаление синтезированного продукта являются гетерогенными процессами, происходящими с участием твердой фазы. Поэтому процесс называют *твердофазным синтезом биополимеров*.

В таком варианте процесс легко поддается автоматизации. Прибор для автоматического синтеза (*ген-синтезатор*) состоит из колонки-реактора, в которой находится нерастворимый носитель с синтезируемым биополимером, набора сосудов для синтонов, вспомогательных реагентов, промывающих растворителей и программирующего устройства, задающего порядок подачи синтонов и других компонентов.

Для удлинения могут использоваться все реакции, разработанные для обычного гомогенного синтеза, хотя специфика метода налагает свои требования к этим реакциям. Дополнительными процессами, отсутствующими при гомогенном синтезе, являются присоединение начального мономера к носителю и отщепление синтезированного продукта конденсации от носителя. Последний процесс должен быть проведен таким образом, чтобы исключалось повреждение продукта.

Первоначально метод был предложен Меррифидом для пептидного синтеза, но в дальнейшем нашел столь же широкое применение для синтеза олиго- и полинуклеотидов, а также стал использоваться для получения полимерных углеводов. За создание этого общего подхода к синтезу биополимеров нерегулярного строения Меррифилд в 1984 году был удостоен Нобелевской премии.

В случае *твердофазного синтеза олигонуклеотидов* синтез проводят, начиная с 3'-конца синтезируемой цепи, для чего на нерастворимом носителе закрепляют будущий 3'-концевой нуклеозид. Наиболее принятый вариант состоит в использовании нерастворимого носителя на основе производных SiO_2 – силикагеля или контролируемого пористого стекла (CPG – controlled pored glass), к которым присоединен остаток пропиламина, связанный через углеродный атом с атомом кремния носителя. Первый нуклеозид (в синтезированном олигонуклеотиде он будет 3'-концевым, т. е. последним) соединяют с аминогруппой носителя через спейсер, который разрушается при завершающей синтез обработке аммиаком. Широко применяют для этой цели спейсер, образованный остатком янтарной кислоты, который одной из своих карбоксильных групп связан с 3'-OH-группой закрепляемого нуклеозида, содержащего защищенную диметокситритильным остатком 5'-OH-группу, а второй карбоксильной группой связан с аминогруппой носителя. После деблокирования 5'-OH-группы начинается собственно синтез, который в этом случае состоит в ступенчатом удлинении в направлении 5'-конца синтезируемого олигонуклеотида. Используются уже описанные процедуры: удаление диметокситритильной группы мягкой кислотной обработкой и присоединение очередного мономера. Такая схема применима как для синтеза дезоксиолигорибонуклеотидов, так и рибоолигонуклеотидов, причем и в фосфитамидном, и в H-фосфонатном варианте.

Отсутствие промежуточных очисток растущего на растворимом носителе олигонуклеотида приводит к накоплению ошибок, неизбежно возникающих на каждой стадии. Это естественно происходит и при синтезе на твердой фа-

зе других полимеров нерегулярного строения. Самая неприятная ошибка – это неполное проведение реакции конденсации с каждым очередным синтоном, что неизбежно приводит к получению олигонуклеотидов с укороченной последовательностью и пропусками. Поэтому каждую стадию конденсации проводят, используя достаточно большие избытки синтонов. Чтобы избежать по возможности пропусков, после обработки растущей цепи очередным синтоном проводят обработку уксусным ангидридом. Эта небольшая, по сравнению с синтоном, молекула может дотянуться до тех 5'-ОН-групп, которые по стерическим причинам не вступили в реакцию с синтоном. Ацетилирование ОН-групп делает их недоступными для реакции с последующими синтонами. Данная стадия получила название *кэпирования (при синтезе)*. Она является обязательным звеном при синтезе на полимерном носителе.

Так как каждое звено цикла предполагает проведение деблокирования 5'-ОН-группы и последующую конденсацию с очередным синтоном, стадию кэпирования, а в случае фосфитамидного метода также стадию окисления, то между этими реакциями нужна промывка полимера от растворителя, используемого на предыдущей стадии, и от избытка используемого на этой стадии реагента. Указанные элементы схемы существенны при любом методе синтеза – фосфотриэфирном (в автоматическом варианте он в настоящее время практически не применяется), фосфитамидном и Н-фосфонатном. В случае фосфитамидного метода после образования очередной связи необходимо провести окисление фосфитной связи до фосфатной. На заключительной стадии, помимо деблокирования защитных групп, проводится отщепление образовавшегося олигонуклеотида от носителя. Выделенный олиго-(поли-)нуклеотид далее подвергается очистке, поскольку даже при очень высоких выходах на стадиях конденсации не удается полностью избежать некоторой примеси более коротких олигонуклеотидов. Окончательная очистка, как правило, проводится с помощью анионообменной хроматографии или гель-электрофореза, которые разделяют смесь полученных продуктов по длине.

Схема автоматического синтеза приведена на рис. 44 на примере фосфитамидного синтеза.

В настоящее время автоматические синтезаторы олигонуклеотидов, которые часто называются ген-синтезаторами, выпускаются серийно рядом фирм и стали рутинными приборами во многих молекулярно-биологических лабораториях. Существует и отечественное производство таких синтезаторов.

Сама работа с надежно функционирующими синтезаторами является достаточно простой. Но, учитывая отсутствие промежуточных очисток, необходимо иметь максимально очищенные используемые вещества и в первую очередь высокоочищенные синтоны. При этом условии в настоящее время удается синтезировать полимеры длиной порядка сотни нуклеотидов. Однако чтобы добиться на каждой стадии конденсации максимального выхода при каждом удлинении, приходится использовать значительные избытки синтонов, что при отсутствии эффективных методов регенерации непрореагиро-

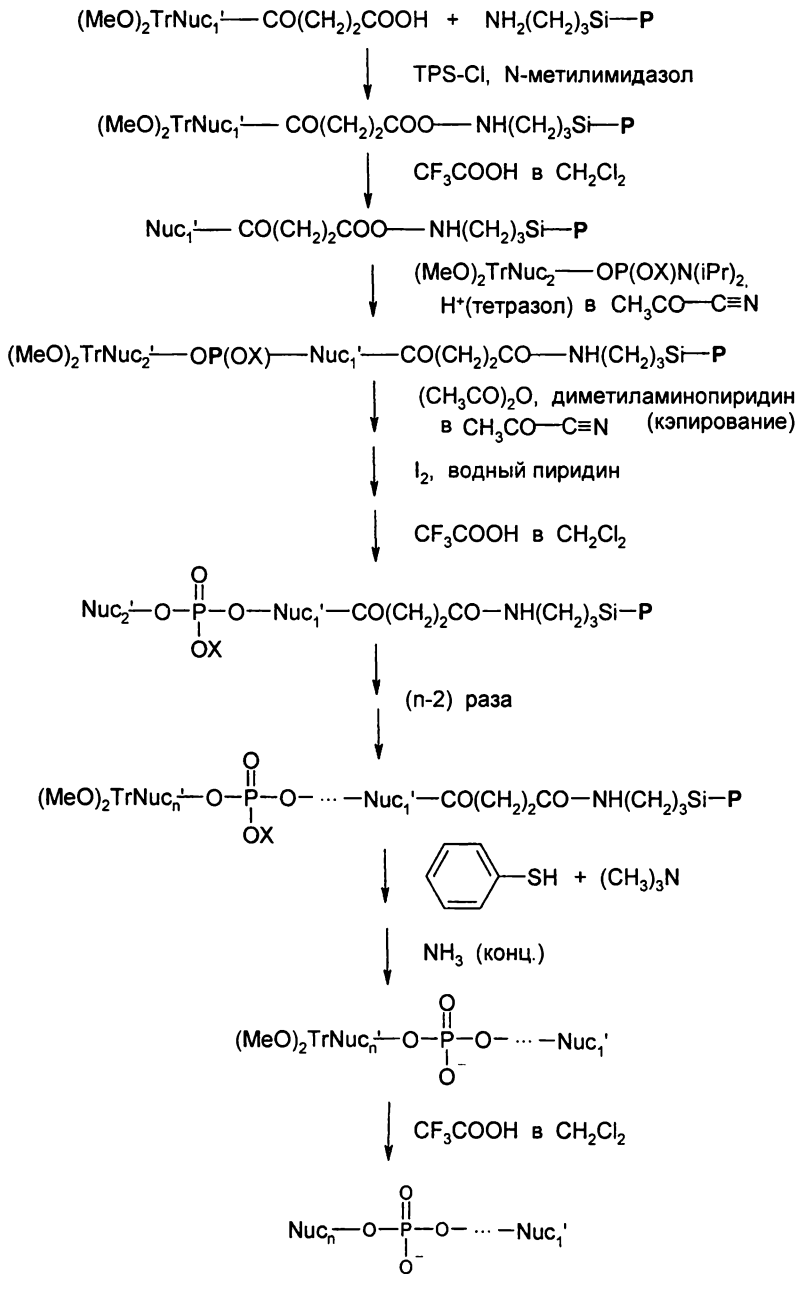


Рис. 44. Схема твердофазного фосфитамидного синтеза олигонуклеотида: Nuc_i – остатки нуклеозида; Nuc'_i – остатки нуклеозидов с защищенной экзоциклической аминогруппой; P – нерастворимый носитель

вавших избытков существенно удорожает синтез. Это не играет большой роли, когда нужно получить за короткое время небольшие (микрограммовые) количества разнообразных олигонуклеотидов. Однако если речь идет о получении продукта в значительных количествах для дальнейших исследований, возрастание избытка синтона на каждой стадии делает синтез малоэкономичным. Поэтому проблема получения путем автоматического синтеза препаративных количеств продукта требует улучшения стадии конденсации, и в этом направлении еще предстоит серьезная работа.

5.4.2. Олигонуклеотидные микрочипы

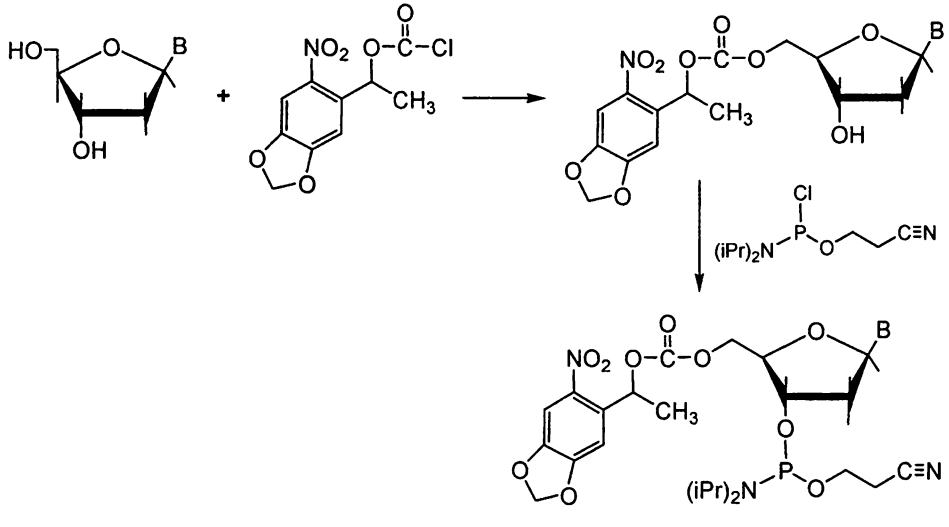
В последние годы стали все чаще возникать задачи, требующие одновременного синтеза очень большого числа различных иммобилизованных на подложке олигонуклеотидов. Это находит особенно широкое применение для создания так называемых *микрочипов*, которые требуются для проведения гибридизационного анализа с участием одновременно большого числа участвующих в гибридизации олигонуклеотидов. Первоначально подход разрабатывался для создания нового метода секвенирования нуклеиновых кислот. На подложку можно нанести в виде отдельных пятен, например, 4096 (8^4) октануклеотидов, представляющих собой все мыслимые последовательности из восьми нуклеотидов. Каждая последовательность занимает определенное место на подложке (микрочипе). Поэтому по положению сигнала, полученного от какой-либо точки на микрочипе, однозначно определяется, с каким олигонуклеотидом связано наличие этого сигнала. Например, гибридизация находящихся на чипе олигонуклеотидов с фрагментом ДНК, несущим флуоресцентную метку, позволяет по положению флуоресцирующих пятен определить, с какими октануклеотидами гибридизуется фрагмент и, следовательно, какие нуклеотидные последовательности присутствуют в этом фрагменте. По этим данным можно, как правило, установить полную последовательность нуклеотидов в этом фрагменте. Такой подход оказался весьма эффективным для выявления наличия мутаций в исследуемом образце, например, вирусной нуклеиновой кислоты, причем, естественно, он годится и для исследования вирусных РНК.

Подход, основанный на синтезе большого набора однотипных соединений, сканирование этого набора и выявление тех, которые несут интересующее исследователя свойство (в рассмотренном случае – способность гибридизоваться с исследуемой нуклеиновой кислотой), относят к основной задаче *комбинаторной химии*.

Естественно, что создать такие чипы можно, проведя химический синтез всех необходимых для анализа олигонуклеотидов и затем нанося их с помощью специального механического устройства на подложку с целью иммобилизации. Однако более перспективной представляется возможность осуществить одновременный синтез всего набора олигонуклеотидов непосредственно

на пластинке. Для этого нужно изменить некоторые химические стадии синтеза. Одним из заманчивых методов является использование вместо диметокситритильной такой защитной группы для 5'-OH нуклеозида, которая удаляется фотохимически (*фотолитография*). Тогда перед очередной конденсацией, например, с производным dA, можно, наложив на пластинку специальную «маску», закрыть все участки, по которым на данном этапе присоединения dA не требуется, фотохимически удалить защитную группу только с тех 5'-концов, по которым должен реагировать dA, и далее провести следующую стадию конденсации на самом чипе в нужных местах. Конечно, при этом для каждого следующего шага нужна своя заранее спроектированная «маска». Уже на первой стадии иммобилизации какого-либо вспомогательного спейсера, несущего такую группу, можно, используя заранее спроектированную маску, провести присоединение только того нуклеозида, который будет фигурировать как первый в синтезируемой серии. Такую процедуру можно повторить со всеми четырьмя синтонами и получить пластинку, на которой в нужных местах находятся первые нуклеозиды. Аналогично можно проводить и все последующие стадии конденсации.

В качестве такой *группы, удаляемой фотохимически*, предложена 1-(2-нитро-4,5-метилендиоксифенил)этил-1-оксикарбонильная группа. Ниже приведена структура этой группы и ее введение в фосфоамидит.



Группа вводится с помощью соответствующего хлорформиата и может быть удалена фотохимически облучением при 365 нм.

§ 5.5. Полимеразная цепная реакция

Возможность практически неограниченного размножения дуплексов, описанная в § 1.3, лежит в основе нашедшего широчайшее применение в практике процесса, получившего название *полимеразная цепная реакция* (*ПЦР*), или *амплификация*. Существует несколько различных вариантов использования ПЦР, но для того, чтобы понять принцип процесса, в качестве примера можно ограничиться описанием процесса получения большого числа копий некоторого двунитевого фрагмента ДНК. При этом предполагается, что нуклеотидная последовательность фрагмента известна. Схема процесса представлена на рис. 45.

На стадии ($а_1$) исходная двунитевая ДНК **1** частично или полностью денатурируется, чтобы подлежащие амплификации участки превратились в однонитевые и могли образовывать комплексы с соответствующими праймерами. Это достигается нагреванием образца до температуры, существенно превышающей температуру плавления дуплекса (см. § 5.1). Если нуклеотидные последовательности достаточно протяженных участков 3'-концов амплифицируемых фрагментов известны, тогда праймеры получают синтетически. При быстром охлаждении и достаточном избытке праймеров разделенные участки на стадии ($б_1$) образуют комплексы (**1'**) и (**1''**) с праймерами, и в присутствии ДНК-полимеразы и четырех dNTP на стадии ($в_1$) происходит синтез цепи (**2'** и **2''**), комплементарной амплифицируемому фрагменту и фланкирующей его 5'-конец полинуклеотидной цепи. Совокупность стадий (а), (б) и (в) обычно квалифицируется как цикл амплификации. Дальнейшая процедура состоит в последовательном чередовании аналогичных циклов – нагревания для денатурации дуплексов, охлаждения для комплексообразования с праймерами и репликации с помощью ДНК-полимеразы.

ПЦР проводится без каких-либо промежуточных разделений смеси, и исходная ДНК присутствует на всех последующих стадиях амплификации, но по мере умножения количества полинуклеотидного материала ее доля прогрессивно уменьшается и становится исчезающе малой. В каждом последующем цикле амплификации на ней, как на матрице, производятся новые полинуклеотиды **2'** и **2''**, причем их содержание возрастает линейно. В то же время они ведут себя как матрицы, на них образуются полинуклеотиды **3'** и **3''**, полностью воспроизводящие обе нити амлифицируемого фрагмента, но, в отличие от **2'** и **2''**, не содержащие каких-либо дополнительных цепей. Эти полинуклеотиды в последующих циклах служат матрицами для самовоспроизводства, т. е. в каждом последующем цикле их количество удваивается и, следовательно, растет экспоненциально. Так, повторение процесса n раз теоретически приводит к увеличению числа дуплексов в 2^{n-2} раза, например, за 20 циклов амплификации число дуплексов может увеличиться более чем

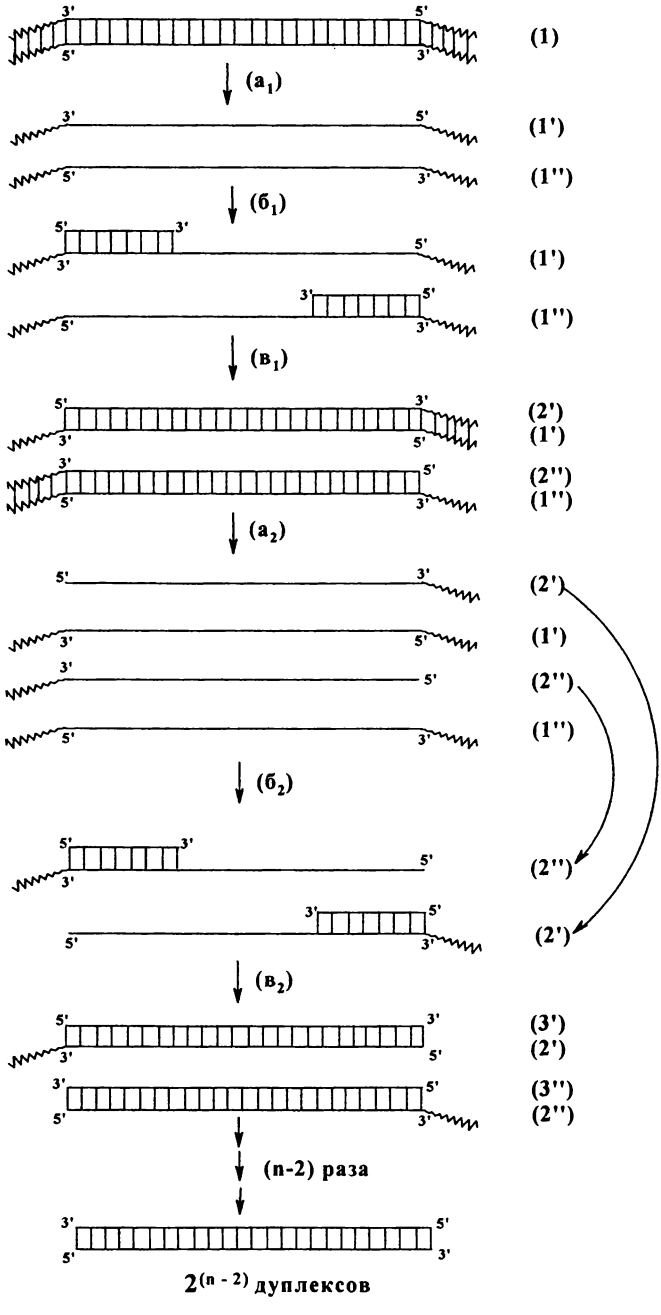


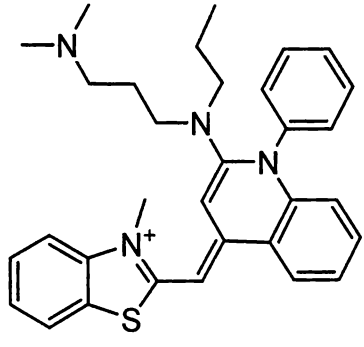
Рис. 45. Схема амплификации фрагмента ДНК. Горизонтальными линиями обозначены полинуклеотидные цепи и праймеры, вертикальными – водородные связи, соединяющие комплементарные фрагменты между собой или с праймерами

в 10^5 раз. Поэтому в конце амплификации доля полинуклеотидов **2'** и **2''** ничтожна.

Чтобы избежать повторного добавления фермента при повторении стадий амплификации, используют ферменты из термофильных организмов, которые сохраняют свою активность при повышении температуры на стадии плавления дуплекса. Чаще всего используют фермент из бактерий *thermus aquaticus* (*Taq*-полимераза).

Определить полученное количество амплифицированных дуплексов, т. е. эффективность амплификации, можно, проанализировав полученный продукт путем электрофореза конечной реакционной смеси.

Практически при проведении ПЦР результат амплификации может не достигать приведенного выше масштаба (неполная денатурация на стадии плавления, неполное образование дуплексов с праймерами, инактивация фермента). Поэтому развито несколько методов количественного наблюдения за ходом процесса (*ПЦР в реальном времени*). Все они основаны на использовании регистрации флуоресценции по ходу процесса. Одним из подходов является определение в процессе ПЦР количества дуплексов, которое можно регистрировать с помощью специальных красителей, обладающих флуоресценцией, резко возрастающей при интеркаляции в полинуклеотидную двойную спираль. К числу таких интеркаляторов относится, в частности, широко используемый в практике ПЦР краситель SYBR green I (λ_{max} возбуждения 498 нм, λ_{max} испускания 522 нм).



Амплификация может быть использована и для получения некоторых производных олигонуклеотидов и фрагментов ДНК. Можно в качестве праймеров использовать олигонуклеотиды, имеющие на 5'-конце группу, которую желательно ввести в продукт амплификации, например, биотин. Последний, в силу своего исключительно высокого сродства к белкам авидину и стрептавидину, позволяет избирательно сорбировать продукты амплификации на соответствующем иммобилизованном белке. Кроме того, при репликации можно вводить некоторые производные dNTP, у которых к гетероциклу присоединена какая-либо группа, например, фотореакционноспособная, если она не препятствует участию такого производного dNTP в реакции элонгации.

Полимеразная цепная реакция нашла многочисленные практические применения в тех случаях, когда в распоряжении исследователя имеется недостаточное количество биологического материала. В первую очередь с этой проблемой сталкиваются при пренатальной диагностике, позволяющей выявить нежелательные генетические отклонения на ранних стадиях развития плода. С необходимостью увеличить количество генетического материала приходится иметь дело при изучении генетического материала ископаемых биологических объектов. С этой же проблемой сталкиваются в судебной практике для установления личности преступника по оставленным им следам и для установления отцовства. В силу большой практической значимости ПЦР и необходимости проводить многократно повторяющиеся операции в настоящее время выпускаются специальные приборы – амплификаторы.

§ 5.6. Соединение олигонуклеотидов, расположенных стык в стык на комплементарной матрице

Длина природных генов слишком велика, чтобы можно было осуществить их синтез в виде одного, пусть и многостадийного, процесса. Это было тем более немыслимо в период синтеза первого гена. Поэтому Корана предложил синтезировать сравнительно короткие олигонуклеотиды, способные организовать дуплексную структуру с разрывами, которые можно соединить между собой подобно тому, как это делается в природе при репликации ДНК с воссоединением фрагментов Оказаки (см. § 1.3). Суть этого процесса состоит в *соединении* олигонуклеотидов *на комплементарной матрице*. На рис. 46 представлена схема процесса на примере сборки такой структуры из пяти олигонуклеотидов.

Для соединения олигонуклеотидов I и II используется вспомогательный олигонуклеотид III, 5'-конец которого комплементарен 5'-концу олигонуклеотида I, а 3'-конец – 3'-концу олигонуклеотида II. В присутствии ДНК-лигазы и донора фосфата (ATP или NAD+) происходят последовательно перенос фосфата от донора к 5'-концевому фосфату олигонуклеотида I и образование межнуклеотидной связи между концами соединяемых олигонуклеотидов с отщеплением ортофосфата. При этом на обоих концах дуплекса, образованного соединенным олигонуклеотидом I-II и олигонуклеотидом III, образуются выступающие однонитевые концы, которые могут быть использованы для присоединения аналогичным образом двух олигонуклеотидов IV и V. Если при этом образуются новые выступающие однонитевые концы, то процедура может быть продолжена. Соединение двух олигонуклеотидов, ориентированных относительно друг друга за счет их взаимодействия со вспомогательной комплементарной нуклеиновой кислотой, принято называть *лигированием*.

При синтезе гена, предназначенного для встраивания в какую-либо несущую конструкцию (геном или плазмиду), на его концах оставляют выступаю-

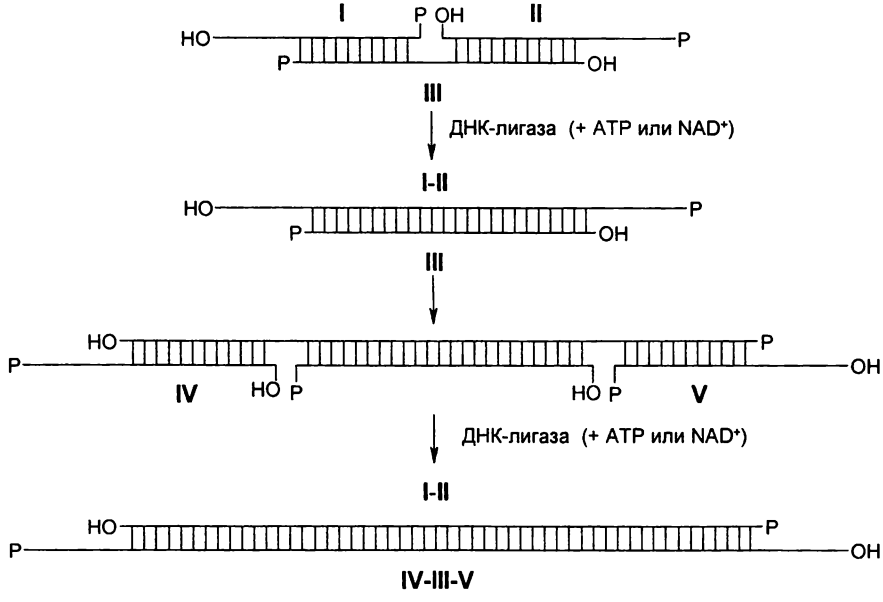


Рис. 46. Схема ступенчатой сборки фрагмента двуспиральной ДНК из олигодезоксирибонуклеотидов I, II, III, IV, V путем ферментативного соединения 5'-концевого фосфата одного и 3'-концевой ОН-группы другого олигонуклеотида, собранных стык в стык на комплементарной матрице. Обозначения те же, что на рис. 45

щие концы, комплементарные однонитевым концам, образовавшимся при разрезании несущей конструкции какой-либо рестриктазой. Затем при обработке раствора, содержащего синтезированный ген и разрезанную несущую конструкцию, ДНК-лигазой и донором фосфата образуется нужная структура. Схема *встраивания гена* в плазмиду путем лигирования приведена на рис. 47.

Использование схемы ступенчатой сборки полинуклеотидов открыло путь к синтезу длинных полинуклеотидных цепей из химически синтезированных олигонуклеотидов. В ее классическом виде она содержит как химическую, так и ферментативную стадию, и эта стратегия известна как химико-ферментативный синтез. Наряду с этим в Московском государственном университете З. А. Шабаровой был предложен и разработан чисто химический метод, основанный на химическом соединении олигонуклеотидных фрагментов в дуплексах, т. е. на химическом лигировании. Удобным реагентом для этой цели оказался бромциан, с помощью которого химическое лигирование протекает за минуты. Важной особенностью этого подхода является возможность получать дуплексы, а тем самым и олигонуклеотиды, содержащие неприродные типы связей, и нуклеотиды, содержащие вместо рибозы другие углеводы. Например, при лигировании двух олигонуклеотидов, один из кото-

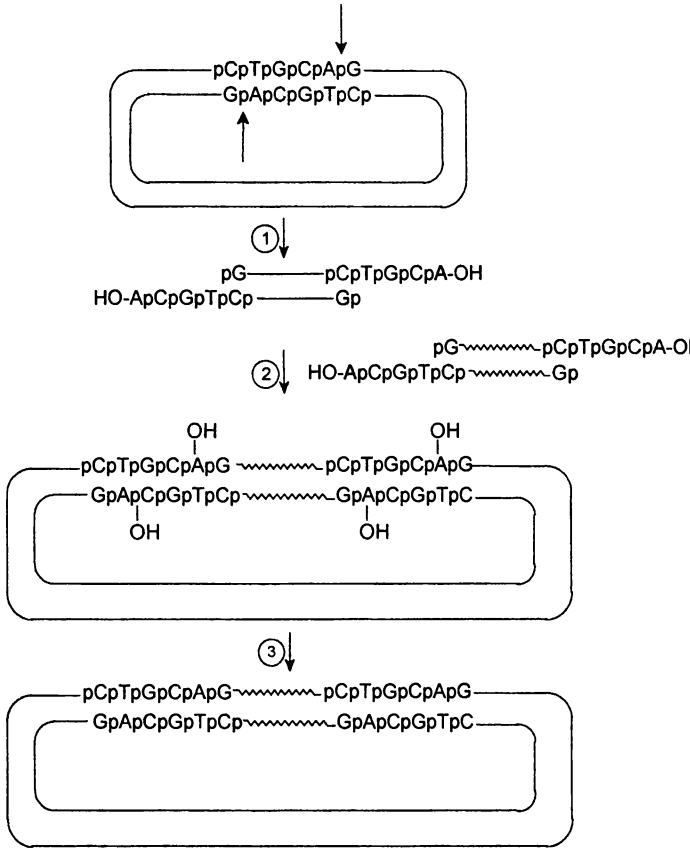


Рис. 47. Схема встраивания синтезированного гена в плазмиду: *1* – расщепление плазмиды по сайту узнавания; *2* – добавление к разрезанной плазмиде встраиваемого гена с липкими концами; *3* – сшивание конструкции с помощью ДНК-лигазы

рых на стыкующемся конце имеет 3'-, а другой – 5'-фосфат, получается олигонуклеотид, в котором два остатка нуклеозида связаны пирофосфатной группой.

Сближение двух способных реагировать между собой групп, связанных с олигонуклеотидами, с помощью вспомогательной комплементарной нуклеиновой кислоты (матрицы) моделирует один из основных факторов, действующих при ферментативном катализе. Однако такой процесс не является каталитическим, поскольку речь идет об одноактном процессе. В то же время такое сближение и, таким образом, кардинальное ускорение реакции могут быть осуществлены не только для соединения фосфата с ОН-группой или двух фосфатов, но и для других многочисленных, способных взаимодействовать групп.

§ 5.7. Производные и аналоги олигонуклеотидов

Производные и аналоги олигонуклеотидов примененяются как в самой биоорганической химии, так и в ее многочисленных приложениях. Это обусловлено в первую очередь двумя важными свойствами олигонуклеотидов: их способностью к специфичным взаимодействиям с комплементарными последовательностями в составе нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов и способностью олигонуклеотидов с некоторыми уникальными последовательностями специфично взаимодействовать с определенными ферментами, имеющими активные центры, которые узнают такие последовательности.

В § 5.5 уже было описано применение олигонуклеотидов для создания микрочипов для выявления мутаций. Связывание олигонуклеотидов с функционально значимыми фрагментами однонитевых ДНК и мРНК существенно влияет на экспрессию этих нуклеиновых кислот и рассматривается как перспективный подход к значительному ослаблению или полному подавлению такой экспрессии. Указанный подход, получивший название антисмыслового, детально рассматривается в § 12.3.

Производные олигонуклеотидов создаются для придания им некоторых новых свойств. Для детекции флуоресцентными методами широко используется присоединение к олигонуклеотидам соответствующих красителей; для придания им гидрофобности с целью облегчить их прохождение через биологические мембраны их связывают с объемными неполярными радикалами. Несвойственную реакционную способность можно обеспечить путем присоединения к ним соответствующих химически активных групп. Для придания им специфической сорбируемости на твердых носителях к ним присоединяют специальные радикалы, например, биотин для сорбции на носителях, содержащих стрептавидин.

Практически все задачи, связанные с применением производных олигонуклеотидов, предполагают использование их способности к высокоспецифичным взаимодействиям. Поэтому получение производных не должно сопровождаться нарушениями тех элементов структуры, которые обеспечивают такие взаимодействия. В случае, когда предполагается использовать способность олигонуклеотидов к образованию дуплексных структур, в производных должны сохраняться стороны гетероциклов, обеспечивающие специфичные взаимодействия. Однако можно использовать противоположные стороны. У пиримидиновых гетероциклов таковыми являются атомы C5 и C6, у пуринов – имидазольная часть пуриновых циклов. У последних, в частности, можно заменить атом N7 на атом C. Атом C8 можно использовать для присоединения не слишком объемистых остатков, поскольку нужно избегать перехода модифицированного пурина из *анти*- в *син*-конформацию, так как

способность пуриновых гетероциклов участвовать в комплементарных взаимодействиях свойственна именно для *анти*-конформации. Оказалось возможным введение в положение 2 аденина второй экзоциклической аминогруппы. Это широко используется в связи с тем, что остаток 2,6-диаминопурина обеспечивает способность олигонуклеотида к флуоресценции. Возможность использования атомов C5 пиримидиновых и N7 пуриновых гетероциклов для присоединения объемистых флуоресцирующих радикалов с сохранением способности к комплементарным взаимодействиям наглядно видна из приведенных на рис. 24 (см. § 3.3) структур флуоресцирующих дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов в качестве терминаторов при секвенировании ДНК методом Сэнгера.

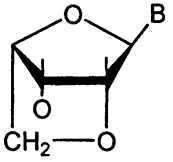
Остатки фосфорной кислоты и углевода в комплементарных взаимодействиях непосредственно не участвуют. Поэтому они могут быть использованы как районы присоединения функциональных групп.

Олигонуклеотиды и их производные находят применение и в качестве веществ с направленным воздействием на биологические процессы в живых организмах. В этих случаях необходимо обеспечить их стабильность в биологических средах, где они подвергаются воздействию нуклеаз. Поэтому встает вопрос о создании таких конструкций, которые при сохранении присущей олигонуклеотидам биологической активности обладали бы повышенной устойчивостью к нуклеазам или вообще не могли служить субстратами данных ферментов. В некоторых случаях этого удается достигнуть путем сравнительно простой модификации. Например, к рибонуклеазам устойчивы олигонуклеотиды, построенные из 2'-О-метилированных нуклеотидов. Такая модификация рибозного фрагмента не лишает нуклеотиды способности к комплементарным взаимодействиям.

Однако более перспективными представляются подходы, основанные на кардинальных изменениях сахарофосфатного остова, несущего гетероциклические основания, являющиеся основными носителями информации. В настоящее время создано несколько вариантов такого остова, которые сохраняют взаимное расположение гетероциклических оснований и тем самым способность к специфическим взаимодействиям с комплементарными нуклеотидными последовательностями в ДНК и РНК.

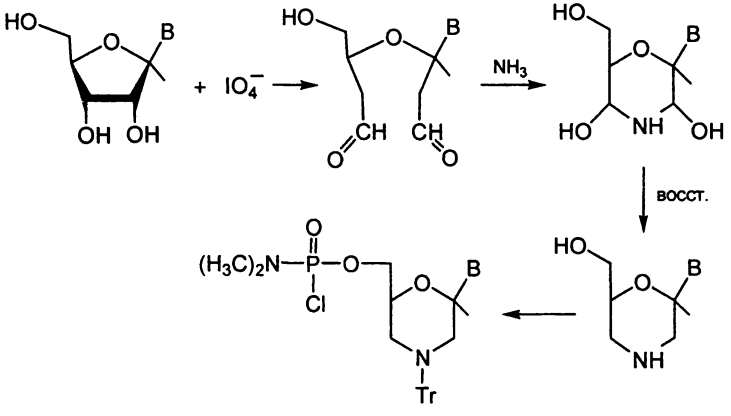
Для повышения термической стабильности дуплексов предложено проводить модификацию углеводного фрагмента, ковалентно закрепляя благоприятную для образования дуплексов конформацию.

Наилучшие на сегодняшний день результаты получены путем образования мостика $-OCH_2-$ между 4' и 2' углеродными атомами дезоксирибозы. Такие нуклеозиды называют *замкнутыми* (locked). В этих производных гетероцикл остается связанным с C-1'-атомом углеводного фрагмента.

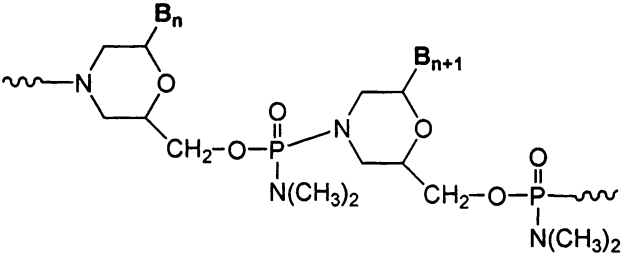


Кроме того, предложены и исследованы способные к комплементарным взаимодействиям структуры с кардинально измененным сахарофосфатным остовом.

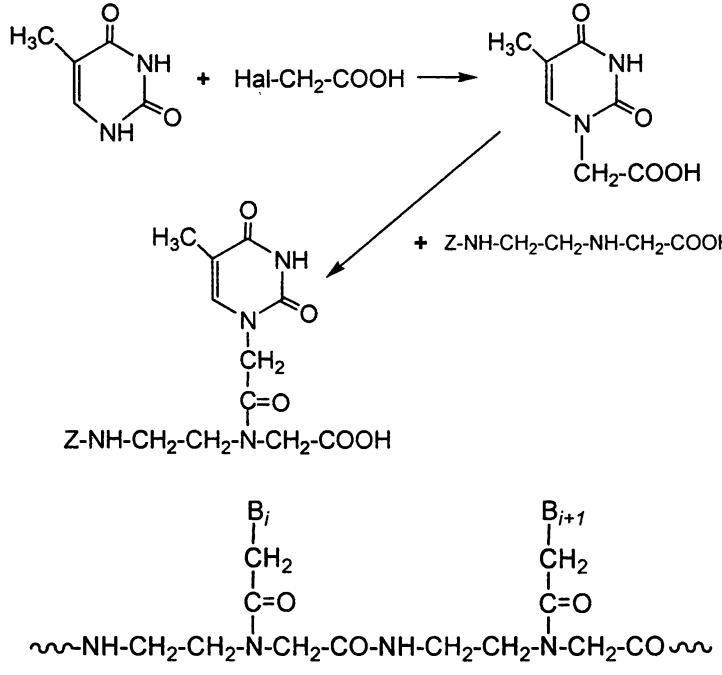
Синтезированы и испытаны аналоги, у которых углеводный фрагмент заменен на кольцо морфолина. Ниже приводится схема синтеза соответствующих мономеров:



Их получают из рибонуклеозидов путем последовательного окисления *цис*-диольной группы периодатом, обработкой аммиаком для замыкания в шестичленный морфолиновый цикл, восстановлением вторичных OH-групп боргидридом и защитой атома N морфолинового цикла тритильной группой. Процесс завершается введением по первичной OH-группе хлордиметиламидофосфорильной группы. Образование связи между мономерными звеньями происходит в результате реакции активного хлора с деблокированным атомом N морфолинового кольца. Структура фрагмента *морфолиниевой полинуклеотидной цепи* имеет вид



Многообещающими аналогами являются полимеры, построенные из мономеров, соединенных пептидными связями. Эти полимеры получили название *пептидных нуклеиновых кислот* (PNA). Мономеры для таких нуклеиновых кислот получают алкилированием гетероциклических оснований галогенуксусной кислотой по атомам N1 пиримидиновых или N9 пуриновых гетероциклов с последующим ацилированием атома N аминоэтилглицина. Атом N аминоэтильного фрагмента блокирован временной защитой, удаляемой перед каждой стадией конденсации. Временные защиты для аминогрупп описаны в § 10.2. Ниже приведена схема получения мономера для синтеза PNA-нуклеиновых кислот на примере аналога тимина и структура фрагмента цепи PNA.



Все три описанные структуры аналогов способны образовывать дуплексные структуры с комплементарными рибо- и дезоксирибонуклеотидными последовательностями, причем образующиеся структуры более стабильны, чем с соответствующими нуклеотидными последовательностями. В полимерах на основе морфолинового кольца связь между мономерами фосфамидная, а не фосфодиэфирная и поэтому не подвергается действию нуклеаз. В PNA-аналогах связь пептидная, значит, более устойчива к действию нуклеаз.

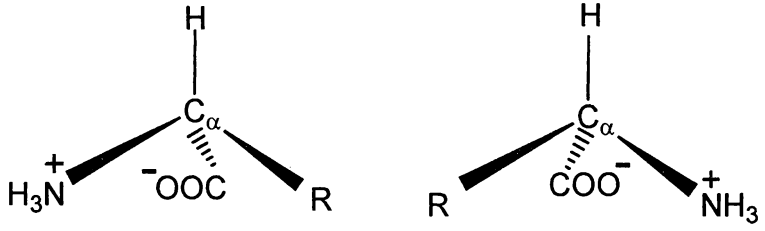
Глава 6. Белки. Основные принципы строения и функции

§ 6.1. Аминокислоты и полипептиды

6.1.1. Аминокислотный состав белков и первичная структура

Белки являются линейными полимерами, построенными из α-аминокислот общего строения NH_2-CHR-COOH, где R – различные боковые радикалы, в том числе атом H, причем при физиологически значимых значениях pH NH_2-группа протонирована, а COOH-группа ионизована.

Во всех случаях, кроме R=H, атом углерода, с которым связан боковой радикал, является асимметрическим (хиральным), т. е. возможно существование двух стереоизомеров. Однако все белки построены из одного стереоизомера – L-α-аминокислот, у которого при наблюдении со стороны атома H группа $\mathbf{COO^-}$, радикал **R** и $\mathbf{NH_3^+}$-группа располагаются по часовой стрелке (правило **CORN**). Второй изомер (D-изомер) в живой природе встречается, но не в составе белков.



L-изомер D-изомер

Каждая карбоксильная группа одной из аминокислот полимерной цепи, кроме последней, образует амидную связь с аминогруппой, следующей за ней, так что две соседние аминокислоты связаны между собой амидной связью и образуют фрагмент -NH-CHR_i-CO-NH-CHR_{i+1}-CO-, где i – порядковый номер остатка аминокислоты в цепи. Амидную связь между соседними остатками аминокислот принято называть *пептидной связью*, а полимеры – *полипептидами*.

Таким образом, практически все аминокислоты входят в состав полимерной цепи в виде фрагментов -NH-CHR_i-CO-. В водных растворах при биологически значимых величинах pH образующие пептидную связь группы NH и C=O не заряжены. При нейтральных значениях pH первый в цепи остаток чаще всего находится в виде фрагмента NH_3^+-CHR_1-CO-, а последний – в виде фрагмента -NH-CHR_n-COO^-, где n – число аминокислотных остатков в цепи.

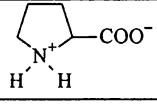
Белки в природе образуются из 20 аминокислот, структура которых представлена в табл. 9. Там же приведены их важнейшие физические и физико-химические характеристики – длины волн и молярные коэффициенты экстинкции в максимумах поглощения для УФ-области спектра выше 200 нм и значения pK_a групп, участвующих в кислотно-основных равновесиях. В силу кислотно-основных превращений аминокислоты могут присутствовать в нескольких формах, и в табл. 9 приведены те формы, которые являются преобладающими в водных растворах при нейтральном значении pH.

При написании структур полипептидных цепей используют сокращенные трехбуквенные и однобуквенные символы для аминоацильных остатков, которые представлены в той же таблице.

В последнее время в некоторых белках обнаружен остаток еще одной аминокислоты – *селеноцистеина*, являющегося аналогом остатка цистеина, в котором вместо атома S находится атом селена. Соответствующий аминоацильный остаток в составе белков образуется не из аминокислоты, а специальным путем, который рассмотрен при описании процесса биосинтеза белков в § 1.3.

Таблица 9

α-Аминокислоты, входящие в состав белков, их трехбуквенные и однобуквенные символы, значения pK_a и спектральные характеристики (ε $M^{-1}см^{-1}$)

Название	Формула	Обозначение		pK_a при 25 °C	Дополнит. сведения
		3-букв.	1-букв.		
Неполярные аминокислоты					
Глицин	$H_3N^+-CH_2-COO^-$	Gly	G	2,34; 9,60	–
Аланин	$H_3N^+-CH(CH_3)-COO^-$	Ala	A	2,35; 9,69	–
Валин	$H_3N^+-CH(CH(CH_3)_2)-COO^-$	Val	V	2,32; 9,62	–
Лейцин	$H_3N^+-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-COO^-$	Leu	L	2,36; 9,60	–
Изолейцин	$H_3N^+-CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)-COO^-$	Ile	I	2,36; 9,68	–
Пролин*		Pro	P	1,99; 10,60	–

Продолжение табл. 9

Метионин	$H_3N^+-CH(CH_2-CH_2-S-CH_3)-COO^-$	Met	M	2,28; 9,21	–
Триптофан	$H_3N^+-CH(CH_2-C_8H_5N)-COO^-$	Trp	W	2,38; 9,39	λ_{max} = 218 нм ε_{218} = 33500 λ_{max} = 278 нм ε_{278} = 5 550 λ_{max} = 287,5 нм $\varepsilon_{287,5}$ = 4 550
Фенилаланин	$H_3N^+-CH(CH_2-C_6H_5)-COO^-$	Phe	F	1,83; 9,13	λ_{max} = 257,5 нм $\varepsilon_{257,5}$ = 195
Полярные аминокислоты					
Аспарагин	$H_3N^+-CH(CH_2-C(=O)-NH_2)-COO^-$	Asn	N	2,02; 8,80	–
Глутамин	$H_3N^+-CH(CH_2-CH_2-C(=O)-NH_2)-COO^-$	Gln	Q	2,17; 9,13	–
Серин	$H_3N^+-CH(CH_2-OH)-COO^-$	Ser	S	2,21; 9,15	–
Тирозин	$H_3N^+-CH(CH_2-C_6H_4-OH)-COO^-$	Tyr	Y	2,20; 9,74; фенольный гидроксил 10,07	λ_{max} = 223 нм ε_{223} = 8 200 λ_{max} = 274,5 нм $\varepsilon_{274,5}$ = 1 340
Треонин	$H_3N^+-CH(CH(OH)-CH_3)-COO^-$	Thr	T	2,63; 10,43	–
Цистеин	$H_3N^+-CH(CH_2-SH)-COO^-$	Cys	C	1,91; 8,37; сульфгидрильная группа 10,70	$2\,SH + HS \rightarrow S-S + 2H^+ + 2\bar{e}$ E0': 0,32 V
Селеноцистеин	$H_3N^+-CH(CH_2-Se-H)-COO^-$	Sec	–	–	–

Окончание табл. 9

Аминокислоты с положительно заряженными R-группами					
Лизин	$H_3N^+—CH(CH_2)_4NH_3^+—COO^-$	Lys	K	2,18; 8,95; ε–амино группа 10,95	–
Гистидин	$H_3N^+—CH(CH_2{-}C_3H_3N_2)—COO^-$	His	H	1,77; 9,18; имидазол 6,10	–
Аргинин	$H_3N^+—CH(CH_2)_3NH—C(=NH_2^+)NH_2—COO^-$	Arg	R	2,17; 9,04; ион гуанидиния 12,48	–
Аминокислоты с отрицательно заряженными R-группами					
Аспартат	$H_3N^+—CH(CH_2COO^-)—COO^-$	Asp	D	2,09; 9,82; β–карбоксильная 3,86	–
Глутамат	$H_3N^+—CH(CH_2CH_2COO^-)—COO^-$	Glu	E	2,19; 9,67; γ–карбоксильная 4,25	–

Примечание. Пролин является иминокислотой. Жирным шрифтом отмечены незаменимые аминокислоты.

Двадцать аминокислот, из которых на рибосомах формируются новые полипептидные цепи, т. е. создается весь набор свойственных данному живому организму белков, являются важнейшими компонентами всех живых организмов и должны поставляться в значительных количествах. Растения и большая часть микроорганизмов способны производить весь набор аминокислот и, следовательно, располагают набором всех ферментов, необходимых для их биосинтеза. У животных, аналогично тому, как это имеет место в случае коферментов и кофакторов, часть ферментов, необходимых для биосинтеза аминокислот из простых и доступных предшественников, отсутствует, в связи с чем некоторые аминокислоты должны быть получены ими с пищей. Такие аминокислоты называют *незаменимыми*. К их числу относят триптофан, фенилаланин, валин, изолейцин, лейцин, метионин, лизин, аргинин, гистидин и треонин. Строго говоря, к этой же категории следовало бы отнести

цистеин и тирозин, поскольку пути их биосинтеза у этих организмов из доступных предшественников отсутствуют. Однако в продуктах питания их присутствие не столь обязательно, так как цистеин может легко образовываться из незаменимого метионина, а тирозин – из незаменимого фенилаланина. Аргинин является незаменимой аминокислотой лишь в период интенсивного роста организмов, когда он необходим в особенно больших количествах. Умеренные потребности в аргинине у животных могут обеспечиваться за счет функционирования цикла мочевины.

Основополагающее значение для строения и функционирования белков имеют способности боковых радикалов к нековалентным взаимодействиям. В связи с этим аминокислоты классифицируют по типам нековалентных взаимодействий, характерных для их боковых радикалов. Если они представляют собой алифатические или ароматические радикалы без каких-либо заместителей, то они являются неполярными (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, триптофан). К неполярным относят также боковой радикал метионина, поскольку атом S не придает алифатической группе существенной полярности. В соответствии с природой боковых радикалов аминоацильные остатки этих аминокислот квалифицируют как гидрофобные. Следует подчеркнуть, что гидрофобными являются только боковые радикалы, а не сами аминокислоты, которые, кроме гидрофобного бокового радикала, имеют способную к протонированию аминогруппу и склонную к ионизации карбоксильную. Наличие групп OH (серин, треонин, тирозин), амидных групп $CO\text{-}NH_2$ (аспарагин, глутамин), SH-группы (цистеин), способных к образованию водородных связей, делает боковые радикалы полярными. Протонируемые аминогруппы лизина, гуанидиновая группа аргинина и имидазольное кольцо гистидина и ионизуемые карбоксильные группы аспартата и глутамата при соответствующих значениях pH вносят в боковые радикалы положительный или отрицательный заряд, что делает их способными к электростатическим взаимодействиям. В соответствии с этим аминокислоты в табл. 9 сгруппированы по свойствам боковых радикалов как неполярные, полярные, положительно и отрицательно заряженные. Следует отметить также очень существенную для структуры белков способность достаточно близко расположенных друг к другу в пространстве SH-групп остатков цистеина образовывать связи S-S (*дисульфидные мостики*). При использовании однобуквенной символики такие связи изображаются прямыми или ломаными линиями, соединяющими символы цистеина (см., например, формулу инсулина, приведенную в § 7.4, рис. 54).

Свойства белка зависят не только от природы и количества образующих его аминокислот, но и от последовательности, в которой аминокислоты входят в полипептидную цепь. Эту последовательность называют *первичной структурой белка*. В связи с этим число мыслимых полипептидов необозримо велико. Оно составляет для структур, содержащих *n* аминокислотных остатков, 20^n. Уже для сравнительно небольшого полипептида, состоящего из

100 аминокислотных остатков, это число составляет $20^{100}=10^{130}$, т. е. на пятьдесят порядков превосходит число атомов в наблюдаемой части вселенной.

6.1.2. Конформации и пространственная структура

Каждая полипептидная цепь может принимать огромное множество конформаций. В результате взаимодействий фрагментов самой цепи и боковых радикалов некоторые конформации оказываются термодинамически предпочтительными, и белок приобретает определенную *пространственную структуру.* Следует оговориться, что в условиях теплового движения речь не может идти о строго фиксированных координатах атомов в молекуле белка. Однако возможна такая ситуация, что эти координаты в области некоторого энергетического (или термодинамического) минимума варьируют в очень небольших пределах. В этом смысле и говорится, что молекула белка имеет определенную пространственную структуру или конформацию.

Часто полипептидные цепи имеют несколько относительно устойчивых конформаций. Преобладание той или иной из них зависит от внешних условий. При изменении условий может происходить переход от одной устойчивой конформации к другой – *направленный конформационный переход.*

Функционирование белков в живых организмах всегда связано с их специфическим взаимодействием с другими компонентами того же организма, внешней среды, а нередко и других организмов. Это взаимодействие обусловлено наличием у белка набора групп с определенным взаимным расположением, которое приводит к взаимодействию с некоторым набором групп партнера, т. е. *узнавание* этого партнера. Оно обеспечивает образование надмолекулярных структур. При функционировании белка, первичным актом которого является, как правило, некоторый направленный конформационный переход, узнавание какого-либо партнера является сигналом для такого перехода.

Следует подчеркнуть, что способность к узнаванию определенных низкомолекулярных соединений и биополимеров к направленным конформационным переходам не является каким-либо общим магическим свойством полипептидов. Это свойственно лишь некоторым белкам с определенной первичной и пространственной структурой. Скорее всего, большинство мыслимых полипептидов такими свойствами не обладают и, следовательно, не могут рассматриваться как белки.

6.1.3. Кислотно-основные свойства аминокислот и белков. Изоэлектрические точки

Все α-аминокислоты содержат как минимум две группы, участвующие в кислотно-основных превращениях. Карбоксильная группа может в зависимости от pH среды находиться либо в нейтральной форме COOH, либо в ионизованной отрицательно заряженной – COO^- Аминогруппа может существовать в нейтральной форме NH_2 или в положительно заряженной $-NH_3^+$.

Кроме того, у ряда аминокислот в боковых радикалов присутствуют дополнительные ионизуемые COOH (аспартат, глутамат), OH-группы (серин, треонин, тирозин) и SH-группы (цистеин) или способные протонироваться NH_2-группа (лизин), остаток гуанидина (аргинин) и имидазольное кольцо. Значения pK, характеризующие протолитические свойства этих групп, приведены в табл. 9. При образовании пептидной связи способность участвовать в кислотно-основных превращениях при физиологически значимых значениях pH у α-аминогруппы, превращающейся в амидную, полностью исчезает, а карбоксильная превращается в лишенную атома H CO-группу. Но и кислотно-основные свойства боковых групп сильно подвержены влиянию окружения в белковой молекуле и могут вплоть до нескольких единиц p*K* отличаться от такового в составе свободной аминокислоты.

При достаточно низких значениях pH способные к протонированию боковые группы вносят в молекулу белка положительный заряд, а при достаточно высоких значениях pH способные к ионизации боковые группы – отрицательный. Это касается остатков аминокислот лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата, тирозина и цистеина. При достаточно кислых значениях pH первые три остатка вносят в молекулу белка положительный заряд, а остальные при достаточно щелочных значениях вносят отрицательный заряд. Могут вносить некоторый вклад концевые свободные и алкилированные амино- и неэтерифицированные карбоксильные группы.

Из сказанного следует, что при увеличении pH от низких до высоких значений заряд молекулы белка будет изменяться от положительных до отрицательных значений. Значение pH, при котором заряд белка становится равным нулю, называется *изоэлектрической точкой* белка, она обозначается как pI. Значение изоэлектрической точки определяется аминокислотным составом белка. Эти значения для некоторых белков приведены в табл. 10.

Таблица 10

Значения pI некоторых белков

Белок	**pI**	**Белок**	**pI**
Цитохром С	10,6	Коллаген	6,6-6,8
Рибонуклеаза	7,8	Карбоксипептидаза	6,0
Миоглобин	7,0	Каталаза	5,6
Гемоглобин:		Инсулин	5,35
человека	7,07	Родопсин	4,47-4,57
лошади	6,92	Пепсин	1,0
γ-Глобулин	6,4-7,2		

Белок при этом значении pH обладает некоторыми характерными особенностями. Во-первых, его электрофоретическая подвижность становится нулевой, что позволяет в процессах разделения сосредоточить белок в определен-

ной узкой области (*изоэлектрическая фокусировка*). Кроме того, при данном значении pH, как правило, существенно снижается растворимость белка, поскольку исчезает ионная атмосфера вокруг его молекул, предотвращающая их слипание.

6.1.4. Спектральные свойства аминокислот и белков

В близком ультрафиолетовом диапазоне длин волн характерное для амино- или карбоксильных групп поглощение света отсутствует. В этой области УФ-поглощение наблюдается только у аминокислот, имеющих ароматические циклы: фенилаланина, тирозина и триптофана. В табл. 11 приведены длины волн в максимуме поглощения и молярные коэффициенты экстинкции при этих длинах волн. При наличии таких аминокислот в составе белков последние тоже поглощают УФ-излучение в этой же области спектра. Из-за влияния окружающих групп как положение максимума поглощения, так и его интенсивность несколько отличаются от таковых для свободных аминокислот, но эти отличия невелики. Пептидная связь поглощает в области 190-230 нм безотносительно к природе образующих ее аминокислотных остатков.

Важной спектральной характеристикой является способность остатков триптофана к флуоресценции. Свободный триптофан имеет максимум возбуждения (exitation) при λ_{ex} = 295 нм, а максимум испускания (emission) при λ_{em} = 353 нм с квантовым выходом 0,14. Спектральные характеристики флуоресценции остатков триптофана в составе белков чувствительны к их окружению, и измерение флуоресценции белков дает представление об их пространственной структуре. Благодаря высокой чувствительности измерение флуоресценции позволяет регистрировать ее за очень малые промежутки времени и наблюдать за изменением конформации в миллисекундном диапазоне. Довольно интенсивной флуоресценцией обладает тирозин (λ_{ex} = 275 нм, λ_{em} = 304 нм).

§ 6.2. Основные функции белков

6.2.1. Белки как катализаторы (ферменты)

Среди важнейших функций белков в первую очередь следует сказать об их участии в катализе многочисленных химических превращений, происходящих в живых организмах. Практически ни одно химическое превращение, свойственное живым организмам, при биологически значимых температурах и условиях среды не происходит без помощи соответствующего биологического катализатора – фермента (энзима). За редкими исключениями (рибозимы, ДНКзимы, см. § 16.5) ферменты являются либо белками, либо их комплексами или конъюгатами с дополнительными кофакторами – ионами металлов или специальными органическими молекулами. Ковалентно связан-

ные с полипептидным остовом кофакторы называют *простетическими группами*. Если в отсутствие кофактора белок каталитической активностью не обладает, то белковую часть фермента называют *апоферментом*. Последний организует работу кофакторов, располагая их таким образом, чтобы наиболее активно реализовался их каталитический потенциал. Вещества, подвергающиеся превращению – *субстраты*, узнаются ферментом и образуют комплекс, в котором они правильно ориентированы относительно групп белка, участвующих в каталитическом акте, и кофактора. Скорости реакций, катализируемых ферментами, обычно во много раз превосходят скорости аналогичных реакций, катализируемых обычными неорганическими и органическими катализаторами. Например, одна молекула фермента каталазы катализирует разложение за секунду 50 тыс. молекул пероксида водорода. Эту же реакцию можно катализировать ионами железа. В результате, чтобы достичь такой же скорости, какая обеспечивается молекулой каталазы, необходимо участие столько количества катализатора, сколько содержит две тонны железа.

Если реакция проходит между двумя субстратами, то белок способствует их сближению на своей поверхности. В большом числе случаев ферменты дополнительно взаимодействуют с молекулами веществ, которые, индуцируя направленный конформационный переход, либо подавляют каталитическую активность (*ингибиторы*), либо стимулируют ее (*активаторы*).

6.2.2. Регуляторные функции белков. Основные регуляторные системы животных

Огромное число белков участвует в регуляции биохимических процессов. Регуляция необходима уже для достаточно просто устроенных одноклеточных организмов, таких как бактерии. В качестве примера можно привести белки-репрессоры, которые по мере необходимости включают или выключают ферментативные процессы в клетке. Например, для большого числа клеток источником углерода для осуществления синтезов разнообразных соединений и производства энергии являются глюкоза и некоторые димерные сахара, такие как сахароза, состоящая из остатков глюкозы и фруктозы, или мальтоза, построенная из двух остатков глюкозы. Однако в питательной среде в некоторых случаях может оказаться молочный сахар – лактоза, молекула которой состоит из одной молекулы глюкозы и одной молекулы ее изомера – галактозы. Лактоза, попавшая в бактериальную клетку, подвергается под действием фермента β-*галактозидазы* расщеплению на глюкозу и галактозу, которая используется далее для тех же целей, что и глюкоза. Однако производство этого фермента не имеет смысла, если в среде лактоза отсутствует. Поэтому в норме такое производство подавлено с помощью специального белка – *лактозного репрессора* (*lac-репрессор*). Когда в системе появляется лактоза, она образует комплекс с репрессором, и происходит направленный конформационный переход, выключающий функционирование репрессора.

Однако в неизмеримо большей степени регуляция характерна для многоклеточных организмов. В процессе эволюции у высших эукариот сформировались две основные системы регуляции – нервная и эндокринная.

Роль эндокринной системы состоит в наработке специальных химических веществ, называемых гормонами, которые играют роль сигналов, посылаемых в определенных физиологических состояниях организма к соответствующим органам-мишеням. Первичная реакция мишени на присутствие гормона состоит во взаимодействии его со специальным белком – рецептором гормона. Гормонам посвящена глава 17.

Второй регуляторной системой является нервная система. Она присуща всем достаточно высокоразвитым животным, в том числе и человеку.

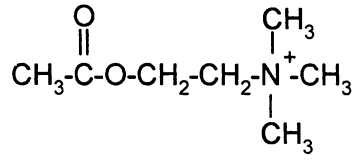
Функционирование нервной системы заключается в проведении электрических сигналов в виде нервных импульсов от головного и спинного мозга по специальным конструкциям – *нейронам* (нервным клеткам). У позвоночных нервные клетки имеют множество отростков – *дендритов*, которые сконцентрированы в мозге и соединены практически со всеми частями организма. Самые длинные отростки – *аксоны* – имеют особое строение, позволяющее передавать по ним сигналы. Аксоны могут достигать нескольких метров в длину и способны передавать электрический сигнал со скоростью нескольких метров в секунду. Возникновение и передача электрического сигнала обеспечивается действием специального фермента – Na^+,K^+-зависимой АТФазы. Фермент функционирует в составе клеточной мембраны и обеспечивает создание и сохранение в течение некоторого времени разности потенциалов между окружающей средой и внутренним содержимым клетки. Этот вопрос будет рассмотрен в главе 15, посвященной структуре и функциям биологических мембран.

В сочетании с органами чувств нервная система получает разнообразную информацию от окружающей среды, превращает ее в сигналы, которые передаются исполнительным органам или хранятся в коре головного мозга для дальнейшего применения по мере необходимости. Детальное описание нервной системы является задачей физиологии, и в данном параграфе представлены лишь наиболее существенные сведения о событиях, обеспечивающих функционирование этой системы.

Нейроны способны генерировать электрические импульсы и передавать информацию на нервные, мышечные и секреторные, т. е. возбудимые клетки. Эта передача происходит в специализированных структурных окончаниях, называемых *синапсами*, образованными соответствующими окончаниями взаимодействующих клеток.

Синапс представляет собой сложную структуру и состоит из пресинаптической части (окончание аксона, передающего сигнал), синаптической щели и постсинаптической части (структуры воспринимающей клетки). Сигнал нервного импульса приводит к секреции особого химического соединения – медиатора, или *нейромедиатора*, который узнается белком-рецептором принимающей сигнал клетки. Так, нервно-мышечный синапс передает возбуж-

дение в одном направлении: от нервного окончания к постсинаптической мембране мышечного волокна. Наиболее детально изученным нейромедиатором в нервно-мышечном синапсе является *ацетилхолин*



В нервно-мышечном синапсе в норме ацетилхолин действует на постсинаптическую мембрану всего в течение 1–2 мс, так как сразу же начинает разрушаться ферментом *ацетилхолинэстеразой*, которая катализирует гидролиз сложноэфирной связи в ацетилхолине. Таким образом, в функционировании нервной системы принимают участие как минимум два фермента.

Важнейшие функции белков связаны с их действием в качестве *рецепторов*. Рецепторами называют белки, вмонтированные в клеточную мембрану и способные специфично связываться с определенными, поступающими извне веществами. Это связывание вызывает конформационный переход, индуцирующий определенный ответ клетки, т. е. включает функционирование клетки. Например, рассмотренный выше ацетилхолин имеет свой рецептор, связывание с которым является первичным событием возбуждения воспринимающей сигнал клетки.

С рецепторами связано функционирование гормонов, которое начинается с образования комплекса гормона с рецептором. На мембране находятся и другие группы рецепторов. Например, рост клеток стимулируется специальными белками – *факторами роста*, каждый из которых имеет свои рецепторы. Факторы роста также относятся к регуляторным белкам. Они были открыты при изучении условий, необходимых для роста и дифференцировки клеток. Так, для образования нервных клеток необходимо участие *фактора роста нервов* (NGF, nerve growth factor). Факторы роста выделяются клетками той же ткани, к которой они принадлежат, взаимодействуют с наружным рецептором клетки и опосредованно влияют на инициацию транскрипции специфических генов. Факторы роста действуют в основном местно на близлежащие клетки. К ним относятся, в частности, *фактор роста эпидермиса* (EGF, epidermal growth factor), *фактор роста тромбоцитов* (PGF, platelet growth factor), различные факторы, необходимые для дифференцировки стволовых клеток костного мозга. Были открыты и другие факторы, имеющие жизненно важное значение для развития клеток определенных типов и поддержания их нормального существования.

Изучение факторов роста в основном связано с интересом к процессам клеточного деления, и особенно с изучением группы белков, программируемых так называемыми *протоонкогенами* и участвующих в регуляции этих процессов. Измененные формы данных генов (*онкогены*) обнаруживаются

в опухолевых клетках. В настоящее время открыто несколько десятков протоонкогенов и соответствующих им онкогенов и показано, что продукты протоонкогенов в здоровых клетках являются участниками передачи сигналов, управляющих митозами.

Событием, противодействующим неограниченному делению клеток, является *апоптоз* – программируемая клеточная смерть. Центральную роль в регуляции и протекании апоптоза играют специальные белки – *каспазы*.

Далеко не все белки должны сохраняться на протяжении жизни организма. У позвоночных существует специальный механизм для деградации «отслуживших» белков. Этот механизм действует также в случае необходимости уничтожить поврежденные белки, для чего в организме вырабатывается специальный небольшой, построенный из 76 аминокислотных остатков белок *убиквитин* (от англ. ubiquitous – вездесущий). Он ковалентно связывается с белками, подлежащими удалению, и служит меткой для действия специальной разрушающей белки системы. Механизм выбора мишеней для убиквитинирования и направления модифицированных белков к разрушающей системе еще далек от установления.

6.2.3. Основные белки иммунной системы

Большую группу представляют белки, связанные с функционированием иммунной системы. Ее задачей является наблюдение за появлением в организме чужеродных биополимеров или клеток и их уничтожение. Иммунная система млекопитающих состоит из тимуса, селезенки и сети лимфатических узлов, соединенной с кровеносной системой. Элементами, которые осуществляют иммунологическое наблюдение за организмом, являются специальные клетки иммунной системы – *лимфоциты*. Иммунная система обладает уникальной способностью отвечать на появление чужеродных частиц выработкой огромного числа лимфоцитов, способных специфически повреждать именно эти частицы. Такими частицами могут быть чужеродные клетки, например, патогенные бактерии; ошибочно измененные клетки организма, включая те, которые вызывают злокачественные новообразования; надмолекулярные частицы, такие как вирусы; макромолекулы, в том числе чужеродные организму белки. Такие частицы и клетки называют *антигенами*. В основе действия лимфоцитов лежит их специфическое взаимодействие с определенными участками чужеродных биополимеров или клеток, которые называют *антигенными детерминантами*.

Различают две основные группы лимфоцитов. Одна из них, так называемые *Т-лимфоциты*, представляет собой популяцию лимфоцитов, производство которых контролируется тимусом. Т-лимфоциты составляют порядка 70–80 % от общего числа лимфоцитов. На поверхности Т-лимфоцитов находятся специальные рецепторы, предназначенные для специфического взаимодействия с чужеродными объектами. Они опознают антигенные детерминанты только с участием еще одной группы белков, образующих так назы-

ваемый *главный комплекс гистосовместимости* (*МНС*, *Major Histocompatibility Complex*). Состав этого комплекса, как правило, различен не только для разных видов живых организмов, но и в пределах одного вида. Это, в частности, является серьезной преградой для пересадки органов, поскольку МНС донора и акцептора пересаживаемого органа, скорее всего, неидентичны, и Т-лимфоциты акцептора отторгают пересаженный орган через то или иное время после пересадки.

Вторая группа лимфоцитов – это *В-лимфоциты,* продуцирующие *антитела* (*иммуноглобулины*) – белки, способные к высокоспецифичным взаимодействиям с чужеродными или собственными компонентами организма. Антитела, как и Т-лимфоциты, узнают не целую молекулу или клетку, а какой-то определенный его участок – антигенную детерминанту. Каждый В-лимфоцит специфичен к одной определенной детерминанте и далее, размножаясь, образует клон одинаковых клеток. Число разнотипных клонов, а следовательно и число разнообразных антител, очень велико. Смесь выделяемых антител называют *поликлональными антителами.* Разделить их на индивидуальные компоненты в общем случае не представляется возможным. Это, в частности, долгое время было непреодолимым препятствием на пути к установлению структуры антител. Важную роль для решения этой задачи сыграло исследование такого заболевания, как *миелома*, при котором происходит неограниченное разрастание одного клона и неограниченное производство одного определенного антитела, которое удается отделить от основной массы антител. Такие антитела получили название *моноклональных антител.* Исследование миеломных белков позволило установить общие принципы структуры антител.

Было установлено, что антитела состоят из четырех полипептидных цепей – двух легких и двух тяжелых. Эти полипептиды связаны между собой дисульфидными мостиками и нековалентными взаимодействиями. При мягком воздействии фермента папаина антитела расщепляются на два идентичных Fab-фрагмента (antibody binding fragments), которые состоят из N-концевой половины тяжелой цепи и легкой цепи. Кроме того, образуется Fc-фрагмент, состоящий из двух идентичных С-концевых фрагментов, связанных дисульфидными мостиками. Каждая из этих полипептидных цепей имеет в составе иммуноглобулина определенную пространственную структуру, которая формируется у легких цепей из двух, а у тяжелых – из четырех достаточно автономных структурных элементов (*доменов*). Оба типа цепей имеют с N-конца по одному домену, обеспечивающему специфическое взаимодействие с антигенной детерминантой. Поскольку разные антитела сформированы для узнавания различных антигенов, их структуры могут существенно различаться, поэтому такие N-концевые участки называются *вариабельными доменами.* Они отличаются большим разнообразием первичной структуры. Общая структура антитела представлена на рис. 48.

Недостатком подхода к изучению структуры антител, основанного на использовании миеломных белков, была практическая невозможность устано-

вить, какой именно детерминанте соответствует клон, выделенный у больного миеломой. Этот недостаток удалось преодолеть благодаря успехам клеточной биологии, которые позволили осуществить слияние миеломной клетки с нормальным В-лимфоцитом, полученным в ответ на введение в организм определенного антигена. Часть таких клеток сохраняет способность миеломного В-лимфоцита к неограниченному размножению и одновременно способность производить иммуноглобулин, специфичный к использованному для иммунизации антигену. Такие слитные клетки сохраняют способность размножаться в живом организме, из которого были взяты миеломные клетки, и при введении их в живой организм производят в большом количестве один тип миеломных клеток определенной специфичности, так как все они представляют один клон. Получаемые таким способом моноклональные антитела являются индивидуальными соединениями. Именно эти антитела стали наиболее тонким инструментом иммунологического метода исследования, в том числе при решении ряда задач биоорганической химии.

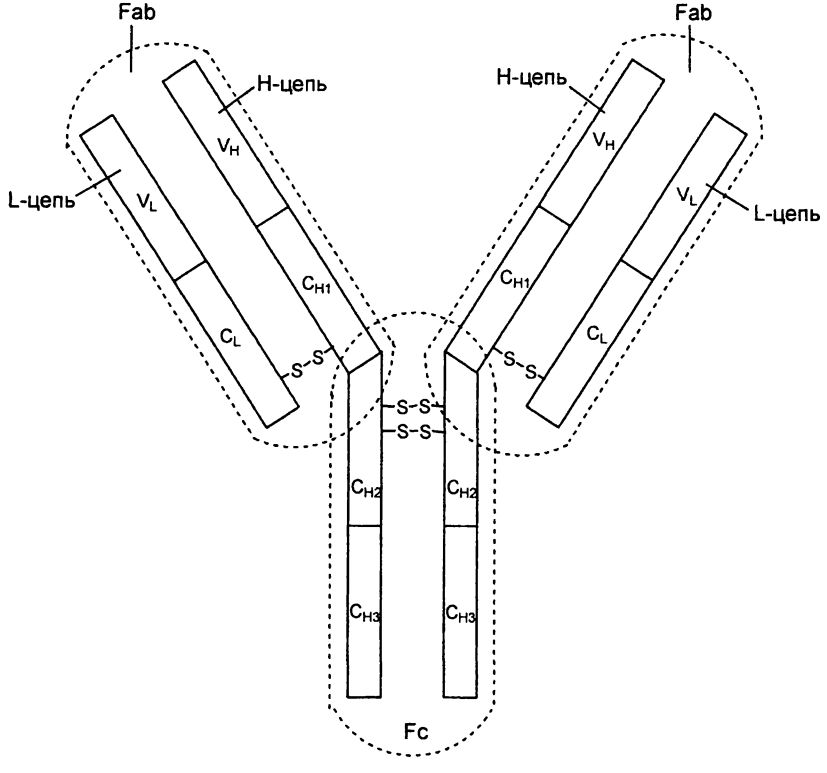


Рис. 48. Схема строения молекулы антитела: *H-цепь* – тяжелая цепь; *L-цепь* – легкая цепь; V_H и V_L – вариабельные домены тяжелой и легкой цепей; C_L, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} – константные участки легкой и тяжелой цепей; *Fab-фрагмент* – фрагмент, получающийся при протеолитическом отщеплении доменов C_{H2}, C_{H3}

Присутствие определенного белка в анализируемой биологической жидкости или локализацию этого белка в клетке можно определить по образованию комплекса антиген-антитело с помощью моноклонального антитела к этому белку.

6.2.4. Белковые факторы транскрипции и трансляции

Большая группа белков сопровождает процессы матричного биосинтеза. Их чаще всего также квалифицируют как факторы.

При репликации, помимо перечисленных в § 1.5 ферментов (ДНК-полимеразы, ДНК лигазы и геликаз), необходимы дополнительные белки, выполняющие некаталитические функции. Поскольку после разделения нитей до присоединения очередного остатка нуклеотида проходит определенный интервал времени, необходимо предотвратить восстановление комплементарных взаимодействий между разделенными фрагментами. Для этого в вилке репликации присутствует специальный белок, связывающийся с однонитевой ДНК (белок SSB, single-strand binding у прокариот и белок RPA, replication protein A у эукариот).

Важной характеристикой полимераз нуклеиновых кислот является *процессивность* их функционирования. После каждого акта присоединения очередного мономера диссоциации комплекса фермент-ДНК не происходит, фермент остается связанным с матрицей, но перемещается относительно нее на одно нуклеотидное звено, которое в результате этого становится управляющим. Процессивность ДНК-полимеразы обеспечивается наличием специального зажима, окаймляющего комплекс фермента и матрицы. У эукариот роль такого зажима играет белок PCNA (proliferation cell nuclear antigen). Посадка зажима на репликативный комплекс осуществляется с помощью специального пятисубъединичного белка RFC (replication factor C)

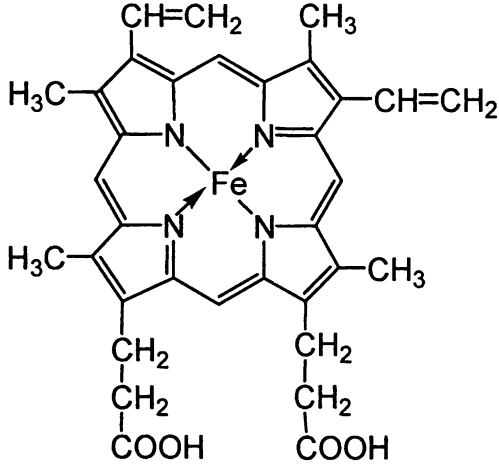
Разнообразную роль играют также факторы транскрипции. У эукариот РНК-полимеразы не узнают непосредственно промоторы, и их взаимодействие с промоторами опосредовано дополнительными белками, известными под общим названием факторов транскрипции. Именно эти факторы определяют, с каких промоторов на данный период функционирования клетки будет проходить транскрипция определенных генов. Для каждой из трех РНК-полимераз имеется свой набор факторов транскрипции, в связи с чем их обозначают TFI, TFII TFIII. Разные факторы, работающие с одной и той же полимеразой, обозначают дополнительно большими латинскими буквами (например, TFIIA, TFIIB, TFIIC и т. д.).

Специальные факторы участвуют в процессах трансляции. У прокариот аминоацил-тРНК перед ее помещением в определенный участок транслирующей рибосомы (А-сайт) аминоацил-тРНК связывается с фактором элонгации EF-1 (у прокариот фактор EF-Tu). С участием GTP образуется тройной комплекс EF-1•GTP•аминоацил-тРНК, в составе которого происходит гидролиз GTP до GDP, сопровождающийся отщеплением фактора от рибосомы. В А-сайте происходит образование новой пептидной связи между

В А-сайте происходит образование новой пептидной связи между растущей полипептидной цепью и внесенной на рибосому аминоацил-тРНК. Для продолжения роста цепи требуется освобождение А-сайта, что достигается перемещением (транслокацией) образовавшейся пептидил-тРНК в Р-сайт, катализируемым фактором EF-2 (у прокариот EF-G). Фактор присоединяется к рибосоме в комплексе с GTP и после транслокации диссоциирует от рибосомы, предварительно осуществив гидролиз GTP до GDP.

6.2.5. Специальные функции белков

Белки являются необходимым компонентом большого спектра биополимеров, выполняющих высокоспециализированные функции. Например, в переносе кислорода от легких к различным тканям, потребляющим кислород, непосредственным переносчиком является *гемоглобин* – комплекс белка глобина с *гемом*.



Гемоглобин в составе специальных клеток – эритроцитов – обратимо присоединяет молекулы O_2 в легких, и далее эритроциты разносятся током крови к самым разнообразным тканям, потребляющим кислород для осуществления окислительных процессов. Важным переносчиком многих биологически значимых соединений, в первую очередь, жирных кислот, является основной белок плазмы крови – *сывороточный альбумин.*

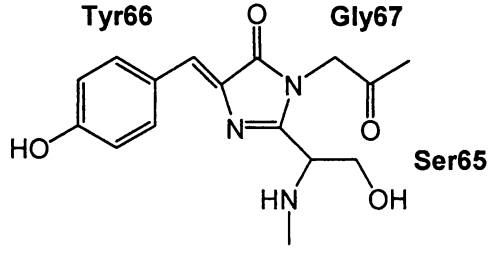
Первичное восприятие электромагнитного излучения (света) в процессе зрения осуществляется с помощью *родопсина*, который представляет собой комплекс белка *опсина* с молекулами низкомолекулярного соединения ретиналя, описаного в § 2.1.

Большая группа белков представлена различными *токсинами*, которые функционируют в качестве ядовитых компонентов многих животных: ядовитых змей, скорпионов, пчел, ос и ряда других животных.

В живых организмах полипептидные цепи синтезируются по единому механизму. В этом процессе важнейшую роль играют нуклеиновые кислоты, данный вопрос рассматривался в § 1.3.

Важную роль играют некоторые белки в качестве структурных компонентов. К ним относятся, например, один из основных белков соединительной ткани *коллаген* или *фиброин* шелка, формирующий оболочку куколки тутового шелкопряда. Цитоскелет, присущий эукариотическим клеткам, формируется такими белками, как *актин* и *тубулин*. Однако рассмотрение этих белков в основном является предметом биологической химии, и его можно найти в курсах по биохимии.

Как было видно на примере моноклональных антител, определенные группы белков стали важными инструментами тонких биологических исследований. В качестве еще одного примера можно привести сравнительно недавно вошедшие в практику биохимических и цитологических исследований цветные флуоресцирующие белки. Первым из них был зеленый флуоресцирующий белок (GFP, green fluoresent protein из медузы *Aequorea victoria*). Главный максимум спектра возбуждения флуоресценции этого белка расположен при 395 нм, а спектр флуоресценции при облучении белка имеет максимум 508 нм. Хромофор (т. е. радикал, обеспечивающий интенсивную окраску) этого белка имеет строение



где цифры обозначают положение аминокислотных остатков в полипептидной цепи, из которых образуется хромофор. Второй детально изученный белок этого класса – белок drFP583, выделенный из кораллов *Discosoma*, обладающий красной флуоресценцией с максимумом при 583 нм. Его хромофор сформирован в результате посттрансляционной модификации белка по остаткам трипептида Gln66-Tyr67-Gly68.

Методы генетической инженерии позволяют сегодня создавать в ряде случаев белки, содержащие одновременно последовательности аминокислот белка GFP и какого-либо функционально значимого белка (например, участвующего в транспорте компонентов живого организма) с сохранением биологической активности последнего и флуоресцентных свойств GFP. Такие конструкции называют *химерными белками*. С их помощью можно следить за локализацией белка и его перемещением в клетке или в организме по положению флуоресцентной метки.

Наряду с белками важное биологическое значение имеют некоторые относительно короткие пептиды. Таковыми является ряд гормонов, например, нейрогормоны *окситоцин*, стимулирующий сокращение матки и лактацию, и *вазопрессин*, стимулирующий повышение артериального кровяного давления, а также некоторые антибиотики и токсины. Пептиды, в отличие от белков, могут наряду с L-аминокислотами содержать в пептидной цепи D-аминокислоты. Например, антибиотик *грамицидин* содержит в своей пептидной цепи D-фенилаланин.

Среди многочисленных пептидов живых организмов следует упомянуть трипептид *глутатион*, γ-глутамил-цистеинил-глицин (γ-Glu-Cys-Gly). Амидная связь между первыми двумя остатками в этом пептиде образована γ-карбоксильной группой глутамата и аминогруппой цистеина. Глутатион присутствует в подавляющем большинстве клеток, где он играет роль окислительно-восстановительного буфера. По-видимому, его основная роль состоит в поддержании в восстановленном состоянии SH-групп белков, а также в поддержании в состоянии Fe^{2+}атома железа в геме. При этом две молекулы глутатиона связываются своими SH-группами с образованием дисульфидного мостика.

Из приведенных, далеко не исчерпывающих сведений видно, что функции белков чрезвычайно разнообразны и значительно шире, чем у других компонентов живой материи.

Глава 7. Биоорганическая химия аминокислот и белков

Белки, как уже говорилось в § 6.1, построены из набора 20 L-α-аминоацильных остатков (без учета изредка входящего в состав некоторых белков селеноцистеина) и продуктов их посттрансляционной модификации. Перечень первично входящих в состав белков аминокислот представлен в табл. 9 (см. § 6.1). Там же представлены важные физические характеристики аминокислот: длины волн и молярные коэффициенты экстинкции в близкой ультрафиолетовой области спектра и константы ионизации.

Присутствие и количественное содержание каждого из аминокислотных остатков в составе белка (*аминокислотный состав*) является одной из важнейших его характеристик. Поэтому систематическое изложение материала по биоорганической химии белков начинается с описания в § 7.1 метода определения аминокислотного состава.

Химические свойства белков и составляющих их аминокислот будут рассмотрены в § 7.2 и 7.3 настоящей главы. Белки, как и нуклеиновые кислоты, являются нерегулярными полимерами. Поэтому биоорганическая химия белков сталкивается с проблемами, сходными с теми, которые рассматривались в главах, посвященных биоорганической химии нуклеиновых кислот.

Прежде всего это вопрос о порядке чередования мономерных звеньев в полипептидных цепях, т. е. о первичной структуре белков. В настоящее время еще не создано методов прямого секвенирования целых молекул белка, и первым этапом секвенирования является специфическое расщепление белка на фрагменты, достаточно короткие для прямого секвенирования. Подходы, используемые для специфической фрагментации белков, рассматриваются в гл. 8.

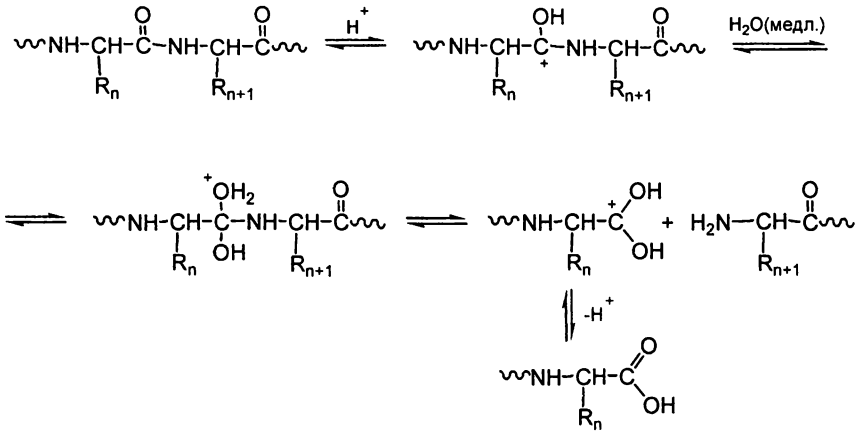
Оба класса биополимеров выполняют в живых системах ряд специальных функций. Способность их выполнения неразрывно связана с пространственной структурой биополимеров. Как и в случае нуклеиновых кислот, прямое формирование конечной структуры является событием маловероятным. В случае белков, как и в случае нуклеиновых кислот, важным элементом формирования окончательной пространственной структуры белка является локальное свертывание определенных участков полимерной цепи в периодические элементы вторичной структуры. Вопрос о пространственной структуре белков рассматривается в гл. 9.

Наконец, важной проблемой является как химический, так и ферментативный синтез обоих классов биополимеров. Используемые для этого химические процессы совершенно различны для белков и нуклеиновых кислот. Однако в обоих случаях речь идет о процессе, представляющем собой много-

кратное повторение одних и тех же стадий. Поэтому для синтеза белков также применим твердофазный синтез по Меррифилду. Более того, как уже говорилось, метод и был первоначально предложен для пептидов. Проблемы химического синтеза полипептидов рассматриваются в гл. 10.

§ 7.1. Пептидная связь. Установление аминокислотного состава пептидов и белков

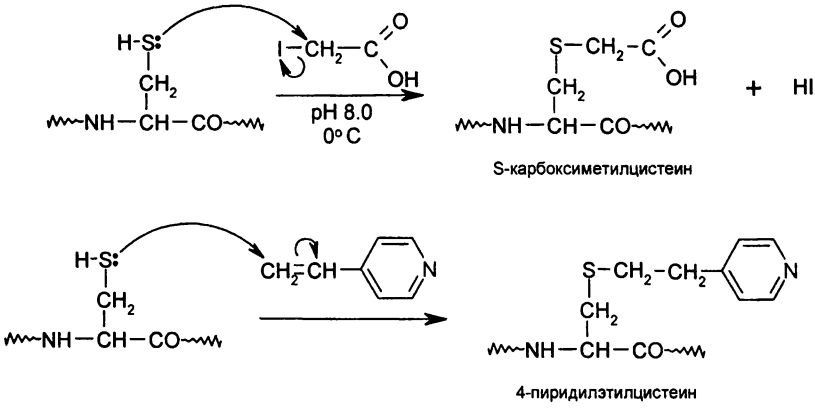
Для установления аминокислотного состава пептидов и белков их подвергают гидролитическому расщеплению (105^0, 6–7 н HCl) до смеси аминокислот. Последовательность превращений при этой реакции представлена ниже:



Лимитирующей стадией процесса является реакция протонированного пептида с молекулой воды. Процесс сопровождается несколькими побочными реакциями. Наиболее существенными из них являются разрушение триптофана и гидролиз аспарагина и глутамина до аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно. Общее содержание амидов, обусловленное наличием аспарагина и глутамина, может быть определено по количеству освобождающегося иона аммония в селективных условиях кислотного гидролиза (10 М HCl, 37 ^{0}C, 10 суток или 2 М HCl, 100 ^{0}C, 2–8 ч).

Содержание триптофана можно определять с помощью метода магнитного кругового дихроизма при 293 нм или спектрофотометрически в 6 М гидрохлориде гуанидина.

Частичному разложению при кислотном гидролизе белков подвергаются также серин, треонин, тирозин, метионин и цистеин. В случае цистеина целесообразно предварительно окислить эти остатки до цистеиновой кислоты или проалкилировать их с помощью иодуксусной кислоты или 4-винилпиридина. Цистеиновая кислота и приведенные продукты алкилирования устойчивы в условиях жесткого кислотного гидролиза.



Полученный гидролизат разделяют на индивидуальные аминокислоты, как правило, используя катионообменную хроматографию. Подавляющее число аминокислот не обладает специфическим электронным спектром, их идентификация проводится по положению в используемой системе хроматографического разделения. Поскольку аминокислоты бесцветны, то после разделения их обрабатывают *нингидрином*, который переводит аминокислоты в интенсивно окрашенные синие соединения.

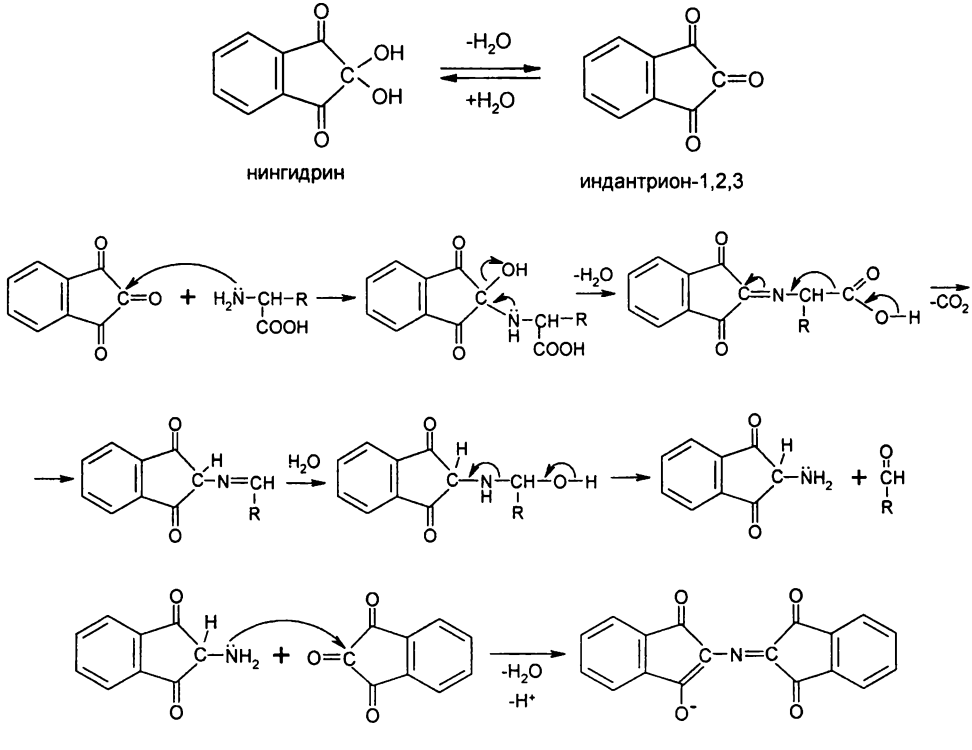
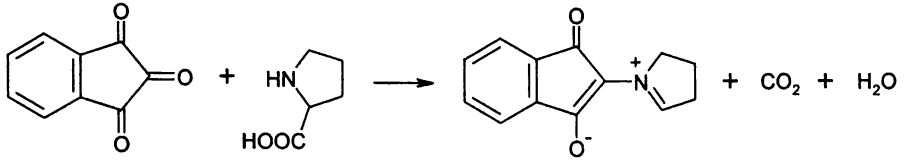


Рис. 49. Реакция аминокислоты с нингидрином

Как видно из приведенной схемы реакции, структура конечного продукта реакции не зависит от природы аминокислоты, т. е. из всех аминокислот получается один и тот же окрашенный продукт. Поэтому окрашивание проводится после разделения аминокислот. По структуре и окраске отличается только продукт взаимодействия с пролином, имеющий желтую окраску.



нингидрин пролин желтый

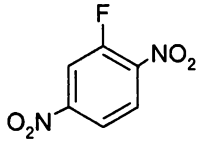
Поскольку при анализе аминокислотного состава приходится иметь дело с большим числом компонентов, то хроматография проводится в несколько этапов. Наиболее часто используемым элюентом является раствор цитрата. На первой ступени используется 0,2 М цитрат с pH 3,25. При этом последовательно с колонки выходят аминокислоты Asp, Thr, Ser, Glu, Pro. На второй ступени элюентом служит 0,2 М цитрат с pH 4,25. При этом с колонки последовательно выходят Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu. На последнем этапе с элюентом с pH 5,28 и концентрации цитрата 0,35 М с колонки элюируются Lys, His, Arg.

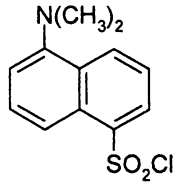
Определение аминокислотного состава в настоящее время является рутинной процедурой. Она необходима не только при исследовании белков, но и при решении прикладных задач, таких как определение пищевой ценности белков и их смесей, особенно содержание в них незаменимых аминокислот, которые у ряда животных организмов, в том числе у человека, не синтезируются и должны обязательно поступать с продуктами питания. Поэтому в настоящее время этот анализ автоматизирован и проводится на специальных аминокислотных анализаторах. Они представляют собой приборы для жидкостной хроматографии, в которых запрограммированы определенная смена элюентов и проведение после хроматографии окрашивания разделенных аминокислот нингидрином.

§ 7.2. Определение концевых амино- и карбоксильных групп

α-Аминогруппа N-концевого аминокислотного остатка полипептида является единственной α-аминогруппой, не участвующей в образовании пептидной связи. У ряда белков эта группа в составе белка блокирована каким-либо электрофильным заместителем. В том случае, когда связь с таким заместителем достаточно прочна и выдерживает условия жесткого кислотного гидролиза белка, N-концевая аминокислота, в отличие от всех остальных

аминокислот гидролизата, будет содержать введенный заместитель и может быть легко идентифицирована, благодаря чему можно определить природу N-концевой аминокислоты. Наиболее широкое применение для этой цели нашли реакции с 2,4-динитрофторбензолом и с ДиметилАминоНафталин-5-СулфонИЛхлоридом (*дансилхлоридом*).

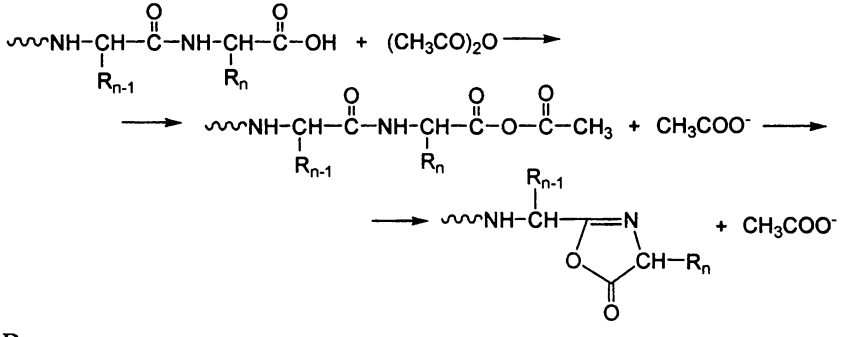




Динитрофенильные производные аминокислот легко отделяются от немодифицированных и имеют интенсивную желтую окраску. Дансилированные аминокислоты обладают интенсивной флуоресценцией (максимум при 365 нм), что существенно облегчает их идентификацию и делает подход высокочувствительным (можно определять несколько десятых долей наномоля).

Классические реакции карбоксильных групп, такие как этерификация и амидирование, не могут быть проведены селективно по С-концевой карбоксильной группе, поскольку свойства последней не сильно отличаются от свойств карбоксильных групп остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот. Поэтому для установления природы С-концевой группы в основном используется ее способность образовывать оксазолон с карбонильной группой предпоследнего аминокислотного остатка.

Связь С-Н в составе оксазолонового цикла, находящаяся между двумя оттягивающими электронные пары фрагментами, относительно легко ионизуется и поэтому способна селективно обменивать атом Н на атом трития, что позволяет избирательно вводить радиоактивную метку в С-концевой остаток.



Возможны и некоторые другие селективные реакции оксазолонового цикла, например алкоголиз.

Еще один подход для определения С-концевой аминокислоты основан на реакции гидразинолиза полипептида. При обработке гидразином происходит

превращение всех аминоацильных остатков пептида, кроме С-концевого, в соответствующие гидразиды:

$$....\text{-NH-CR}_{n-2}\text{-CO-NH-CHR}_{n-1}\text{-CO-NH-CHR}_{n}\text{-COOH} + \text{NH}_2\text{NH}_2 \rightarrow$$

$$....\text{-NH-CR}_{n-2}\text{-CO-NHNH}_2 + \text{NH}_2\text{-CR}_{n-1}\text{-CO-NHNH}_2 + \text{NH}_2\text{-CHR}_{n}\text{-COOH}$$

Не превращается в гидразид только С-концевая аминокислота, которую можно отделить от смеси гидразидов ионообменной хроматографией.

§ 7.3. Химическая модификация функциональных групп белков

7.3.1. Химическая модификация белков

Белки, как объект биоорганической химии, являются сложными соединениями с регулярным линейным остовом, состоящим из чередующихся остатков -NH-CHR-CO-, где R – разнообразные боковые радикалы, перечень которых приведен в табл. 9. Пептидный остов в физиологически значимых (мягких) условиях достаточно прочен и деградирует лишь под действием специальных ферментов – протеиназ, катализирующих гидролитическое расщепление пептидных связей, причем эти ферменты характеризуются высокой специфичностью по отношению к боковым радикалам остатков, при которых находится расщепляемая связь. Например, пищеварительный фермент трипсин катализирует гидролиз пептидных связей, образованных остатками аминокислот, несущих положительный заряд, достаточно удаленный от пептидной связи, т. е. таких как лизин и аргинин. В некоторых достаточно редких случаях наблюдается перестройка пептидного остова, например при образовании белка GFP (см. п. 6.2.5). За исключением таких случаев в многочисленных химических превращениях, как вызванных действиями химических реагентов, так и происходящих с участием специальных ферментов, участвуют только боковые радикалы аминокислотных остатков и концевые амино- и карбоксильные группы.

Подавляющее число аминокислотных остатков белка играет определенную роль либо в поддержании нативной конформации, либо непосредственно в выполнении свойственной белку биологической функции. Для понимания механизмов функционирования белков и их комплексов необходимо идентифицировать функционально значимые аминокислотные остатки, обеспечивающие протекание процесса. Наряду с использованием инструментальных методов, в первую очередь рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, широкое применение для изучения механизма функционирования белков нашел *метод химической модификации.*

В упрощенном виде применение этого метода для изучения механизма можно представить как установление влияния модификации белка по какому-либо типу аминокислотных остатков. Если реакция по определенному аминокислотному остатку лишает или существенно ослабляет функциональную активность белка, то можно считать, что этот остаток играет существенную роль в обеспечении активности. Более адекватное применение химической модификации для функционального исследования белков будет рассмотрено в § 12.2. Химическая модификация белка является не только инструментом исследования механизма его функционирования, но также используется для придания белку новых отсутствующих в его нативном состоянии свойств. Так, для целого ряда исследований в белок вводят флуоресцентные группы, позволяющие следить за трафиком и распределением белка в условиях живого организма. Для ряда задач оказывается существенным связать белок с нерастворимым носителем (иммобилизовать белок), не нарушая его основной функции. Такой процесс по своей сути также является химической модификацией белка и ввиду значимости и многоплановости применения иммобилизации белков будет специально рассмотрен в § 13.1. В настоящее время в распоряжении исследователей имеется широкий спектр реагентов, способных взаимодействовать с определенными типами функциональных групп белков. Реакции ряда боковых радикалов и концевых групп применяются также для введения защитных групп в аминокислоты при химическом синтезе белков. Эти процессы, как правило, проводятся в органических растворителях и будут описаны в § 10.5–10.7. Ряд реакций, используемых для специфического расщепления полипептидных цепей при изучении первичной структуры белка, будет рассмотрен в § 8.3.

Модификация белков, используемая для решения перечисленных и ряда других задач, является важным инструментом многих исследований. Но, что не менее существенно, многие процессы химической модификации белков имеют важное значение при функционировании живых организмов. Такие процессы происходят при участии специальных ферментов, свойственных этим организмам. Практически это означает, что после образования пептидной цепи (трансляции) в клетках может происходить модификация полученной в результате трансляции пептидной цепи (*посттрансляционная модификация*). По большей части химическая суть происходящих процессов при этом сходна или даже аналогична используемой в экспериментах по химической модификации, и процессы будут рассматриваться параллельно. Однако в связи с фундаментальной биологической значимостью некоторые посттрансляционные процессы, особенно широко представленные в живой природе, будут рассмотрены в § 7.4.

7.3.2. Реакции нуклеофильного замещения

Многие боковые радикалы аминокислот обладают нуклеофильными центрами. Такие центры присутствуют в структуре следующих кодируемых аминокислот: лизин ($-NH_2$), цистеин (-SH), метионин ($-SCH_3$), гистидин (остаток имидазола), серин, треонин и тирозин (-OH), аргинин (гуанидиниевая группировка), аспартат и глутамат ($-COO^-$), аспарагин и глутамин (амидная группировка). Протонирование этих центров (в остатках лизина и аргинина) приводит к потере нуклеофильности. Наоборот, ионизация OH-групп (в остатках аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, треонина и тирозина) приводит к существенному повышению нуклеофильности. Поэтому наиболее чувствительными к действию электрофильных реагентов являются карбоксилатные остатки дикарбоновых кислот и ионизованного остатка тирозина. Менее реакционноспособными являются OH-группы остатков серина и треонина и практически инертны атомы O амидных $CO-NH_2$-групп глутамина и аспарагина.

Для нуклеофильных центров белков характерны реакции нуклеофильного замещения, в которых нуклеофильный центр в белке заменяется на другой нуклеофил. Эффективность реакции определяется нуклеофильностью замещающей группы белка и химической природой уходящей группы. Нуклеофильность частично определяется основностью. Соединения, относящиеся к сильным основаниям, обычно быстрее вступают в реакции, чем более слабые основания. Так, алифатическая аминогруппа является бóльшим нуклеофилом, чем $-COO^-$.

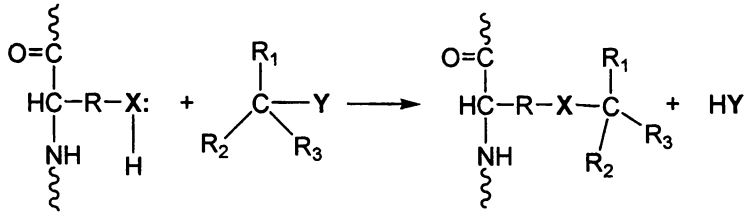
Вторым фактором, влияющим на нуклеофильность, является поляризуемость. Ее увеличению способствует большой атомный радиус и наличие двойных связей в группе. В общем случае чем сильнее поляризована группа, тем с большей скоростью она будет реагировать в реакции нуклеофильного замещения (очевидно, это связано с тем, что поляризуемая группа способна образовывать частичные связи на большем расстоянии, чем неполяризуемая группа). Поляризуемое основание, такое как имидазол (функциональная группа гистидина), часто более реакционноспособно, чем неполяризуемое, такое как, например, $-NH_2$ (функциональная группа лизина). Соединения серы проявляют высокую нуклеофильность, и этим, возможно, объясняется важная роль SH-группы цистеина в биологических процессах.

Химическая природа уходящей группы сильно влияет как на скорость реакции нуклеофильного замещения, так и на положение равновесия. Уходящая группа должна иметь неподеленную пару электронов и нести отрицательный заряд. Существует обратное соотношение между основностью частицы и ее способностью быть уходящей группой. Считается, что лучшей уходящей группой при реакциях нуклеофильного замещения является анион сильной кислоты. В водной среде, например, фосфат-ион – значительно лучшая уходящая группа, чем OH^-. Лучшими уходящими группами являются

пирофосфат и триполифосфат, а самыми хорошими уходящими группами – сульфонаты, обладающие очень слабыми основными свойствами. Иодид-ион является хорошей уходящей группой, а F^- – намного хуже (более чем в 10^4 раз).

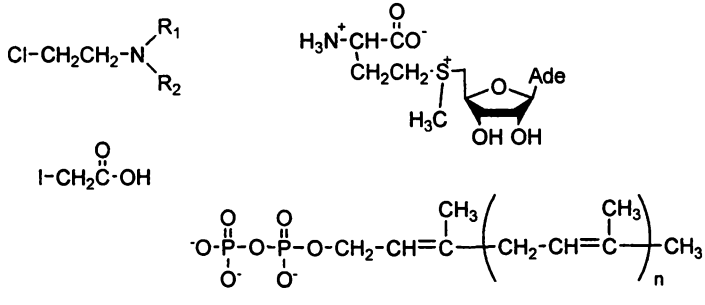
На рис. 50 приведены основные типы и обобщенные схемы реакций нуклеофильного замещения, характерных для функциональных групп белков.

1) Алкилирование

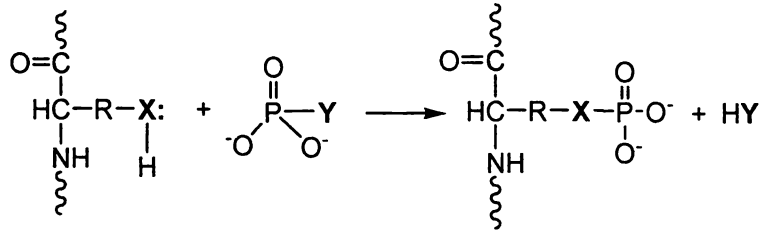


Подвергаются остатки: Cys, Lys, Arg, His, Tyr, Asp, Glu

Реагенты:



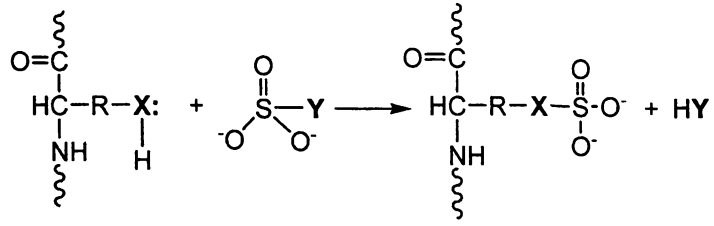
2) Фосфорилирование



Подвергаются остатки: Ser, Thr, His, Tyr, Asp

Реагенты: pppA, pppG

3) Сульфирование



Подвергаются остатки: Tyr

Реагенты:

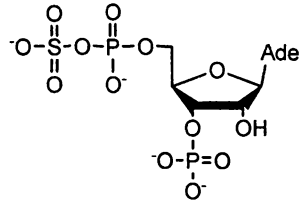
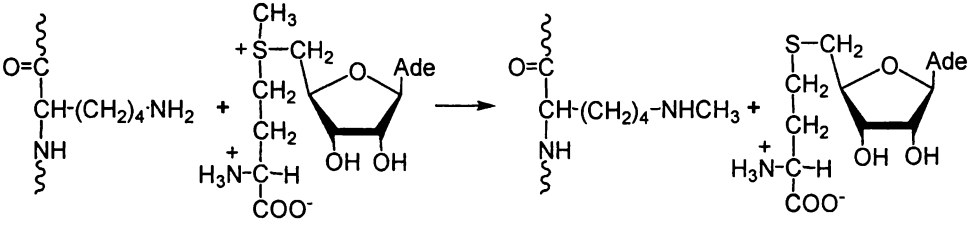


Рис. 50. Типы реакций нуклеофильного замещения: *X* – нуклеофильный атом бокового радикала аминокислотного остатка, *Y* – уходящая группа; *R* – спейсер

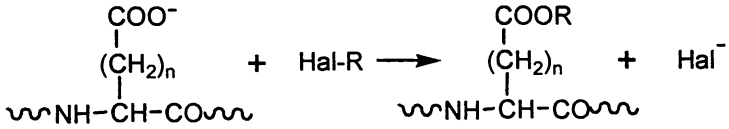
Существует два основных механизма, по которым протекают реакции нуклеофильного замещения: S_N1 и S_N2. S_N1-реакция – мономолекулярное нуклеофильное замещение, протекающее через образование промежуточного соединения (карбокатион). Процесс в этом случае является двухстадийным. S_N2 – бимолекулярное нуклеофильное замещение, т. е. одностадийная реакция, в которой исходное соединение и продукт разделяет только переходное состояние. По механизму S_N2 протекают, например, реакции замещения у сульфоний-иона, приводящие к переносу метильной группы от атома серы к атакующему нуклеофилу.



Следует обратить внимание, что нуклеофильная атака метильной или другой алкильной группы протекает легко только в том случае, если атом углерода присоединен к какому-либо атому, несущему положительный заряд. Реакция замещения у сульфоний-иона, приводящая к переносу метильной группы от атома серы к атакующему нуклеофилу, называется реакцией *трансметилирования*. Трансметилирование – важный метаболический процесс, который катализируется ферментами метилтрансферазами.

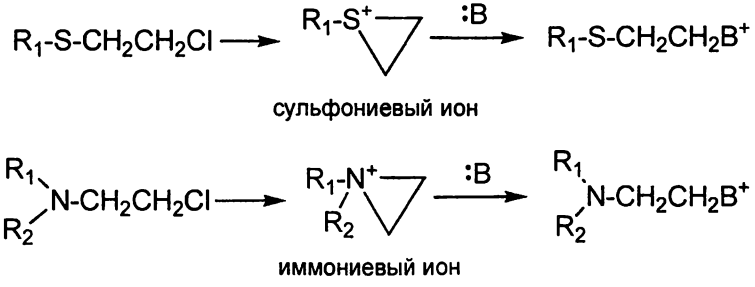
В случае лизина возможно образование моно-, ди-, триметиллизинов, а в случае аргинина – моно- и диметиларгининов. Полученные соединения отличаются размерами модифицированного остатка и степенью гидрофобности.

Карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот могут подвергаться этерификации при действии галоидалкилов, например йодуксусной и броуксусной кислотами.



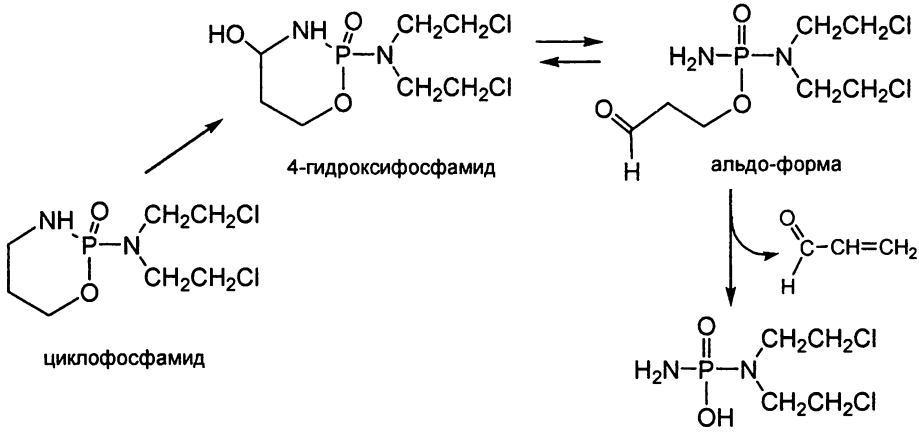
Эти же реагенты могут осуществлять алкилирование ОН-групп остатков гидроксиаминокислот.

Еще один пример S_N2-замещения у насыщенного атома углерода – реакции галогенкарбоновых кислот с боковыми радикалами лизина и цистеина. По другому механизму, т. е. S_N1, могут протекать реакции, при которых возможно образование устойчивого промежуточного катиона. К этому типу реакций относятся также реакции с участием соседней группы. Если в одной и той же молекуле имеется хороший нуклеофил (например, *O*, *S* или *N*) и уходящая группа и они разделены двумя атомами, то может произойти внутримолекулярное замещение уходящей группы. На второй стадии внешний нуклеофил (функциональная группа белка) замещает внутренний нуклеофил у того углеродного атома, с которым он связывается. Реакция соседней группы описанного типа приводит в целом к сохранению конфигурации атома углерода, связанного с уходящей группой. Характерный пример *участия соседней группы* мы находим в реакциях горчичного газа [*бис*-(2-хлорэтил)сульфида или иприта] или его азотистого аналога.

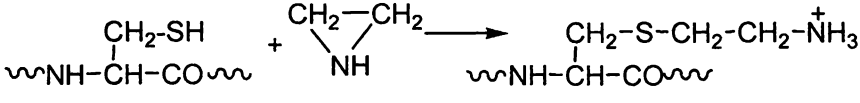


Горчичный газ отличается сильным кожно-нарывным действием и является токсичным при концентрации в воздухе 1 м. д. (миллионная доля). Его высокая реакционная способность и токсичность связаны с эффектом участия соседней группы. Способность к легкому раскрытию кольца при нук-

леофильной атаке делает трехчленные кольца сильнейшими алкилирующими агентами. Это свойство успешно используется в лекарственных препаратах при химиотерапии злокачественных опухолей. Алкилирующие агенты являются одной из самых распространенных групп из всех применяемых в настоящее время противоопухолевых препаратов. Первыми алкилирующими агентами, использовавшимися в терапии злокачественных заболеваний сразу после Второй мировой войны, были иприт и его азотистый аналог. Однако недостаточная избирательность действия лимитировала их использование. В связи с этим были созданы модифицированные, более селективно действующие алкилирующие препараты – соединения латентной активности, к ним относится, например, циклофосфан. Образование активной формы данного препарата происходит в результате действия оксидаз микросом:

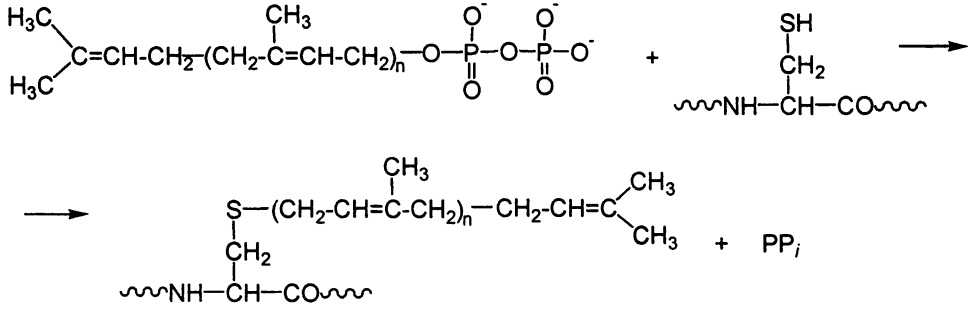


Реакции алкилирования в мягких условиях проходят по атомам серы остатков цистеина и метионина. Они, в частности, используются для защиты остатков цистеина при проведении кислотного гидролиза белков до аминокислот (см. § 7.1) и для расщепления полипептидной цепи по остаткам метионина (§ 8.1). Алкилирование остатков цистеина этиленимином приводит к превращению его в остаток аминоэтилцистеина, являющийся структурным аналогом остатка лизина, в результате чего по этим остаткам происходит специфичное расщепление трипсином:



По механизму S_N1 может протекать также такая посттрансляционная модификация, как изопренилирование белков, при котором происходит перенос остатка изопреноида (фарнезила (n = 2) или геранилгеранила (n = 3)) от пирофосфата на остаток цистеина белка. Возможность протекания реакции по

механизму S_N1 при изопренилировании белков обусловлена тем, что в случае элиминирования хорошей уходящей группы – остатка пирофосфата образуется карбокатион, стабилизированный за счет сопряжения вакантной орбитали с π-связью.



Ферменты, переносящие изопренильные остатки, являются металлоэнзимами, содержащими один ион Zn^{2+} на димерную молекулу фермента. В последовательностях -Cys-Cys-X-X оба цистеиновых остатка могут подвергаться модификации остатками геранилгеранила. Такой белок, обладая большим сродством к липидным мембранам, служит уникальным местом опознавания для некоторых белок-белковых взаимодействий.

По механизму нуклеофильного замещения проходят реакции гликозильных остатков. Это касается в первую очередь таких реакций, как гликозилирование белков, и реакций ADP-рибозилирования. Атакующей частицей в этих процессах являются стабилизированный карбоний ион.

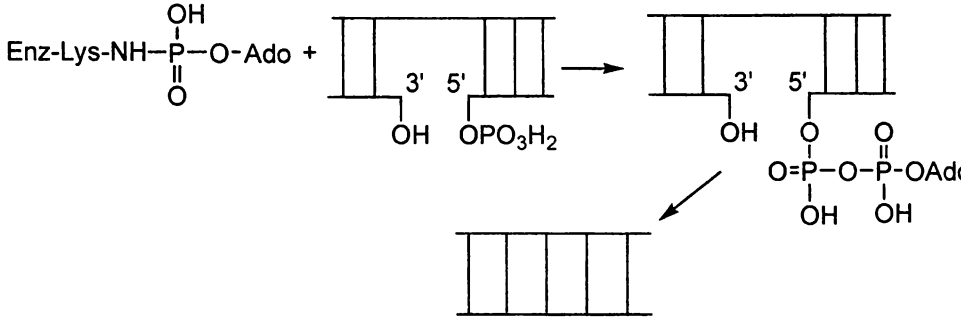
Гликозилирование белков рассматривается в главе 14, посвященной углеводам. ADP-рибозилирование является одним из важных регуляторов процессов репарации ДНК. Донором ADP-рибозильного остатка является NAD^+ Положительно заряженная никотинамидная группа отщепляется под действием ADP-рибозилтрансфераз и образуется рибооксокарбониевый катион, который взаимодействует с различными нуклеофильными группами белков. Посттрансляционной модификации подвергаются функциональные группы таких аминокислот, как гистидин, цистеин, аргинин, аспарагин (рис. 51).

Во многих клеточных процессах, таких, например, как репарация ДНК, апоптоз и др., обратимое моно- и полиADP-рибозилирование используется в качестве важного механизма регуляции процессов. Многие патогенные бактерии секретируют токсины, которые ADP-рибозилируют белки человека, вызывая различные болезни: холеру, дифтерию, коклюш, ботулизм.

Рис. 51. Реакции ADP-рибозилирования функциональных групп белков

Важную роль в процессах модификации белков играет фосфорилирование. Донором фосфата в этих процессах является γ-фосфат ATP, который с участием специфичных протеинкиназ фосфорилирует определенные остатки в белках с образованием эфиров, смешанных ангидридов или амидофосфатов.

Трифосфатные группы ATP и GTP могут также выступать в качестве доноров нуклеотидильного остатка. Перенос аденилильного остатка используется в реакциях ДНК и РНК-лигаз. ДНК-лигаза является ферментом, который катализирует сшивание фрагментов Оказаки на завершающей стадии репликации. В этой реакции фрагмент, являющийся донором фосфата, активируется присоединением остатка AMP, который отщепляется при образовании новой межнуклеотидной связи.



При инкубировании лигазы из бактериофага T4 с ATP получена аденилат-лигаза, у которой адениловый остаток присоединен к ε-аминогруппе белка фосфамидной связью. Амидофосфат далее реагирует с 5'-фосфорильной группой фрагмента ДНК, образуя пирофосфат, который, в свою очередь, расщепляется при участии 3'-OH группы дезоксирибонуклеозида другого фрагмента ДНК с завершением образования межнуклеотидной связи и освобождением AMP. Аналогичный перенос GMP от GTP происходит при кэпировании мРНК (рис. 52).

Для химической модификации бокового радикала лизина с целью получения в активном центре фермента интермедиата E-pA часто используют фосфорилирующие реагенты, например, реакционноспособные амидофосфаты нуклеиновых кислот с цвиттер-ионной группой на 5'- или 3'-конце, несущей остатки *N*-метилимидазола или *N*,*N*-диметиламинопиридина. Отличительной особенностью данных реагентов является достаточная стабильность при физиологических значениях pH при одновременно высокой реакционной способности в реакциях с ε-аминогруппой лизина. Фосфорилирующие реагенты часто используют при исследованиях топографии активных центров ферментов. Однако данный тип реагентов может также реагировать с функциональными группами других аминокислот, например, с имидазольным фрагментом остатка гистидина (см. рис. 52). Различие в химических свойствах продуктов модификации боковых радикалов разных аминокислот позволяет установить природу модифицированного остатка путем исследования кинетики демодификации белка при разных значениях pH.

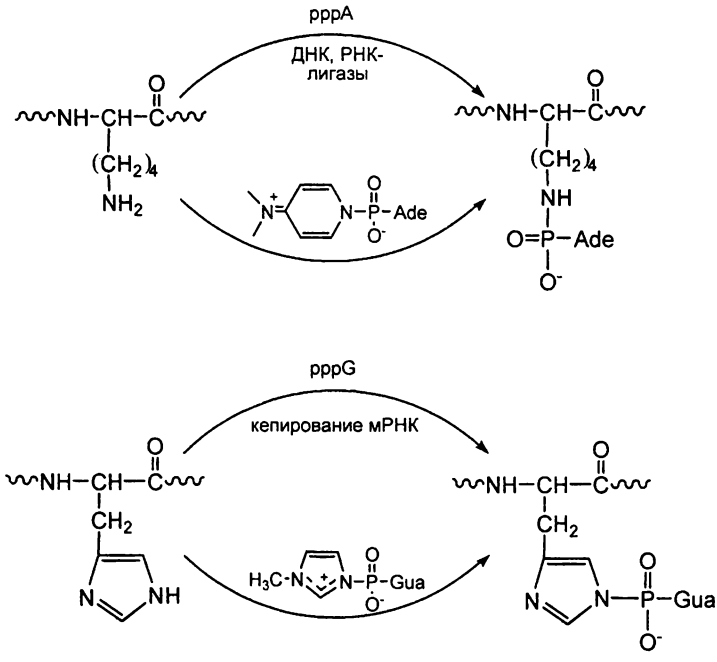
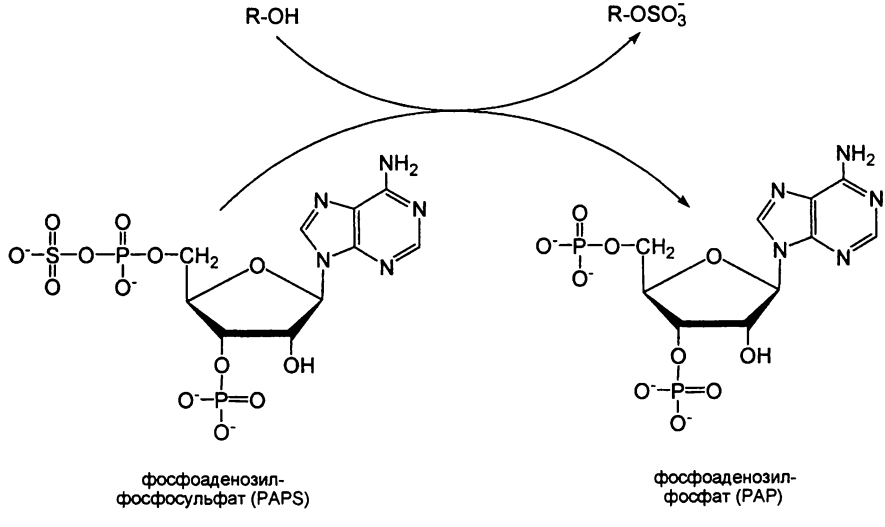


Рис. 52. Схема фосфорилирования боковых остатков основных аминокислот

По механизму S_N2 может протекать еще одна посттрансляционная модификация белков – введение остатка сульфата по ОН-группам тирозина. Донором сульфата при этом процессе является фосфоаденозилфосфосульфат. Реакция катализируется сульфотрансферазой (К.Ф. 2.8.2.20).



Так, в *N*-концевой части мембранного клеточного рецептора хемокина человека (регулятора противовоспалительных иммунных реакций), имеющего большое значение для эмбрионального развития и иммунного ответа, три остатка тирозина Tyr7, Tyr12, Tyr21 подвергаются посттрансляционному сульфированию в аппарате Гольджи, что увеличивает сродство рецептора к своему лиганду – хемокину SDF-1α. Соответственно в лизосомах обнаружены ферменты, катализирующие гидролиз сульфоэфиров – сульфатазы.

7.3.3. Реакции нуклеофильного присоединения-отщепления (элиминирования)

Реакции, которые будут рассмотрены в этом параграфе, формально объединены тем, что все они начинаются с присоединения нуклеофильных групп белков по карбонильной группе. К ним относятся реакции ацилирования и образования оснований Шиффа. Эти реакции проходят через промежуточное образование тетраэдрического интермедиата. Общее направление реакции определяется затем судьбой этого интермедиата. На рис. 53 приведена обобщенная схема реакций ацилирования, характерных для функциональных групп белков. Ацилирующими агентами могут быть тиоэфиры, активированные эфиры (пентфторфениловые, N-оксисукцинимидные эфиры), смешанные ангидриды с фосфорной кислотой и ее эфирами.

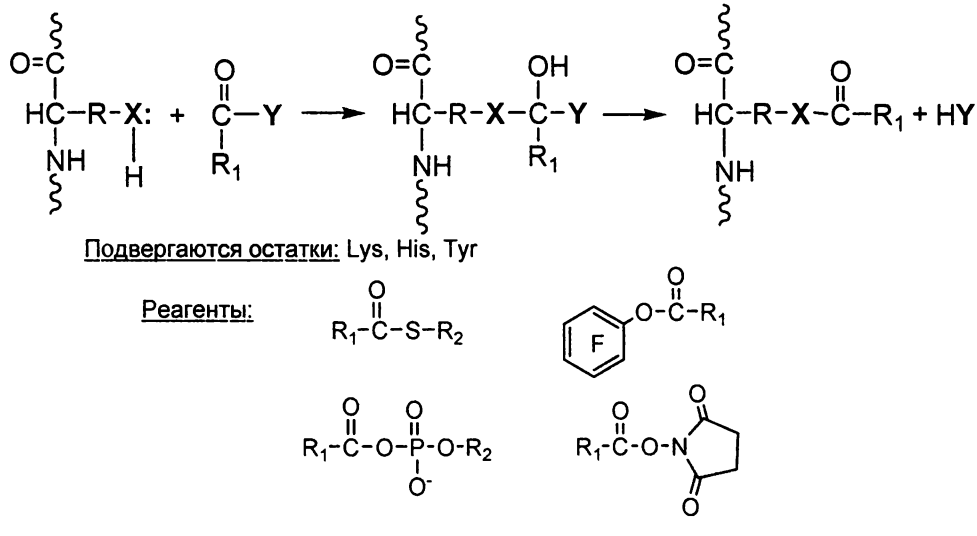
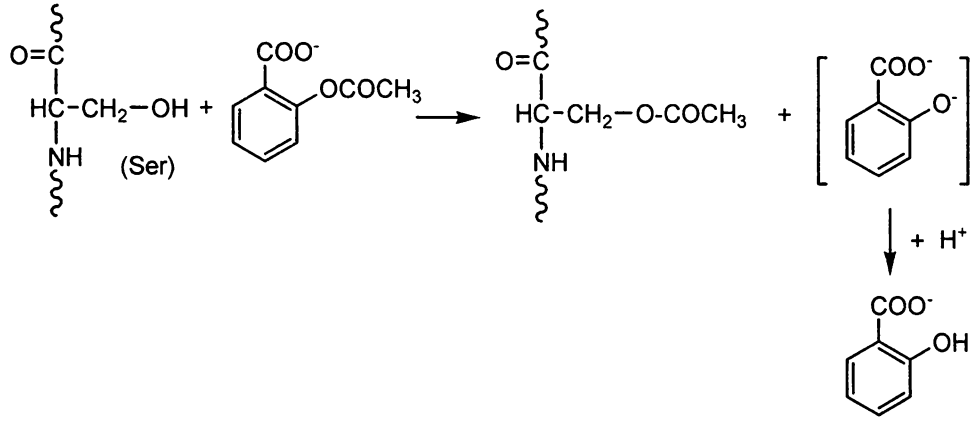


Рис. 53. Реакция нуклеофильного присоединения-отщепления: ***X*** – нуклеофильный атом бокового радикала аминокислотного остатка, ***Y*** – уходящая группа; *R* – спейсер, R_1, R_2 – углеводородные радикалы

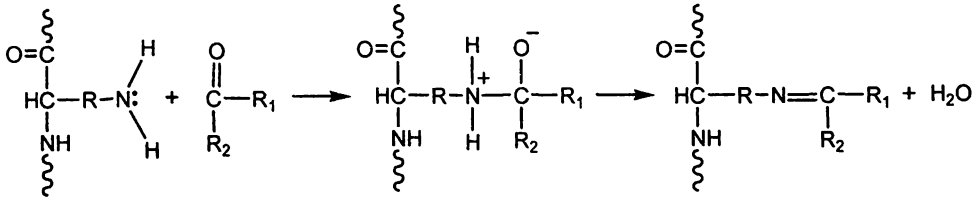
При наличии относительно хорошо уходящих групп, таких как феноляты или кислые спирты (например, этилмеркаптан), медленной стадией является отрыв от биполярного тетраэдрического интермедиата уходящей группы (см. рис. 53). Это имеет место в том случае, если такой группой является фенолят-анион или тиолат. В качестве примера реакции, протекающей по механизму присоединения-отщепления с участием реагента с хорошей уходящей группой, может служить взаимодействие аспирина с ферментом.



Противовоспалительный нестероидный препарат аспирин обеспечивает фармакологическое действие за счет ингибирования фермента циклооксигеназы, катализирующего реакцию образования простагландинов из арахидоновой кислоты. В результате реакции присоединения-отщепления ацетильный остаток аспирина присоединяется к свободной концевой ОН-группе серина (Ser-530) в активном центре циклооксигеназы тромбоцитов человека.

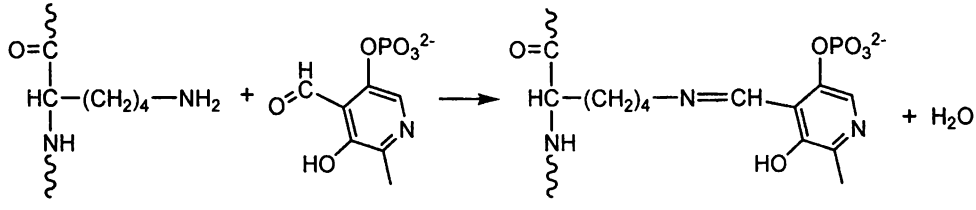
При наличии менее легко уходящей группы распад тетраэдрического интермедиата проходит только после образования анионной частицы. Для таких систем стадией, определяющей скорость реакции, является перенос протона. Взаимодействие алифатической аминогруппы (например, ε-аминогруппы лизина) со сложными эфирами часто обнаруживает влияние общего основного катализа. Депротонирование облегчает распад тетраэдрического интермедиата, так как повышенная электронная плотность на атоме азота благоприятствует отрыву аниона.

По механизму нуклеофильного присоединения-элиминации проходит образование оснований Шиффа. Реакция протекает в две стадии. На первой происходит *нуклеофильное присоединение* аминогруппы к карбонильной группе с образованием карбиноламина, за которым следует *отщепление* воды.



где R_1 и R_2 – углеводородные радикалы, в случае альдегидов вместо одного из радикалов находится атом H.

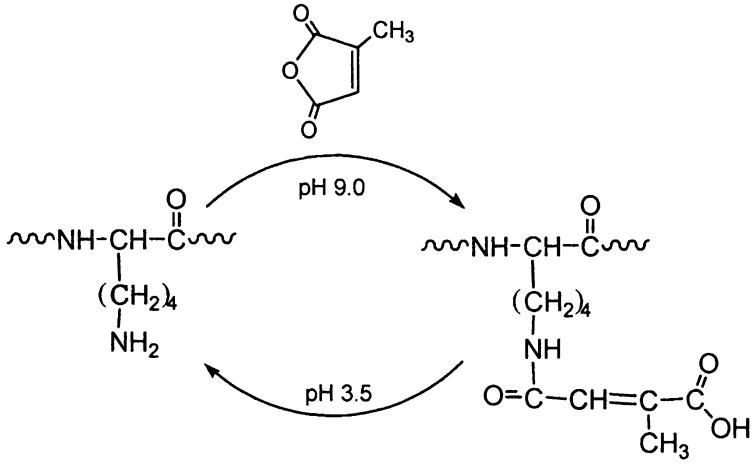
Реакции образования оснований Шиффа между ε-аминогруппами остатков лизина с пиридоксальфосфатом широко используются для установления роли остатков лизина в функционировании ферментов.



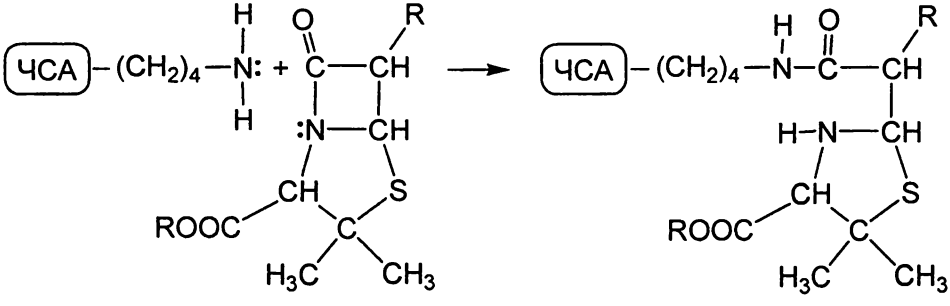
Основания Шиффа образуются быстро (часто в течение долей секунды), но не мгновенно, и для достижения скоростей, характерных для ферментативных реакций, необходимо, чтобы одна или обе стадии реакции протекали с участием катализаторов.

Реакции ацилирования по ε-аминогруппам остатков лизина позволяют блокировать действие специфичных к остаткам основных аминокислот на белки (например, трипсина) на связи, образованные лизином, и дает возможность расщеплять белки избирательно только по остаткам аргинина. Ацилирование ангидридами дикарбоновых кислот приводит к замене положительного заряда остатка лизина на отрицательный заряд полуамида дикарбоновой кислоты. В зависимости от природы используемого реагента модификация остатков лизина может быть как обратимой, так и необратимой. Обратимое блокирование ε-аминогрупп позволяет осуществлять последовательное расщепление белковой молекулы трипсином: вначале только по остаткам аргинина, а затем, после разделения образовавшихся пептидов и удаления защитных групп, и по остаткам лизина. Для обратимой модификации чаще всего используется реакция с малеиновым или цитраконовым ангидридами. Реакция ацилирования проводится при pH 8,5–9,0 и температуре 0–+2 ^{0}C в присутствии 20-кратного избытка реагента. Малеильные производные лизина стабильны при нейтральных и щелочных значениях pH, а в кислой среде (pH 3,5; 40 ^{0}C; 40 ч) гидролизуются, регенерируя свободную ε-аминогруппу. В этих условиях может происходить частичное дезамидирование белков,

а также разрыв некоторых кислотолабильных связей, в частности между остатками аспарагиновой кислоты и пролина. Цитраконильная группа удаляется в более мягких условиях (pH 3,5; 20 ^{0}C; 4 ч), однако ее недостаток – пониженная устойчивость при щелочных значениях pH. Для необратимой модификации остатков лизина наилучшим агентом является янтарный ангидрид.



Своеобразная реакция ацилирования ε-аминогруппы остатков лизина происходит при взаимодействии с лактамными антибиотиками, приводящее к раскрытию их лактамного кольца.



(ЧСА – человеческий сывороточный альбумин)

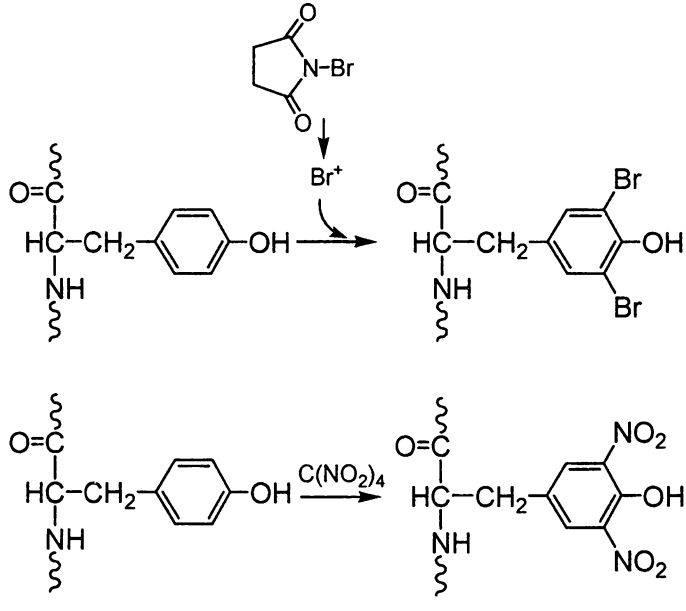
Реакция идет через промежуточный тетраэдрический интермедиат с последующим разрывом C-N-связи в лактамном кольце.

7.3.4. Реакции электрофильного замещения

Реакции электрофильного замещения в белках наиболее характерны для ароматических колец остатков тирозина. В живой природе происходит электрофильное иодирование остатков тирозина, необходимое для образования гормонов щитовидной железы (§ 17.2).

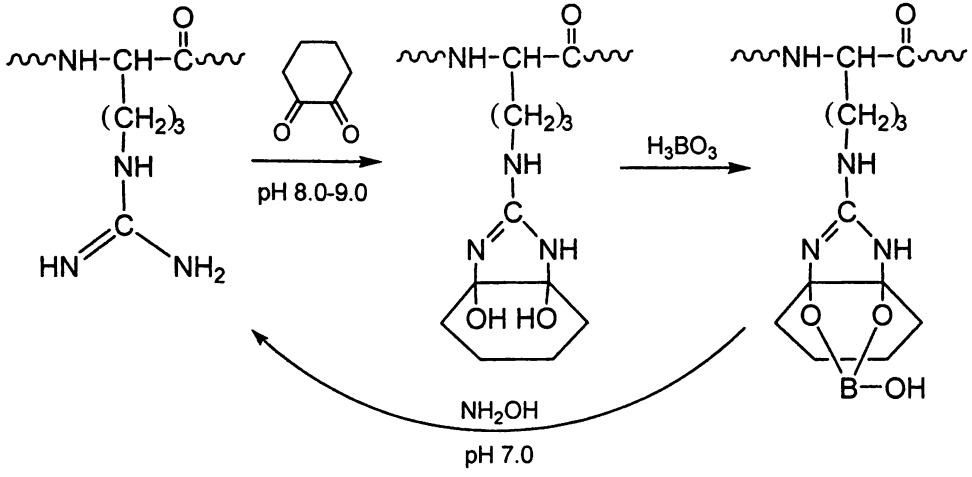
Иодирование используется для введения в белки тяжелой метки для рентгеноструктурного анализа белков методом изоморфного замещения. Иодирование радиолактивными изотопами иода I^{125} и I^{131} позволяет ввести в белок радиоактивную метку.

В исследовании белков используются две неприродные реакции электрофильного замещения – бромирование N-бромсукцинимидом и нитрование тетранитрометаном. N-бромсукцинимид является донором катионов Br^{+}. Бромирование приводит к введению двух атомов брома. Обе реакции проходят селективно по ароматическому кольцу остатков тирозина.



7.3.5. Реакции по гуанидиновой группе аргинина

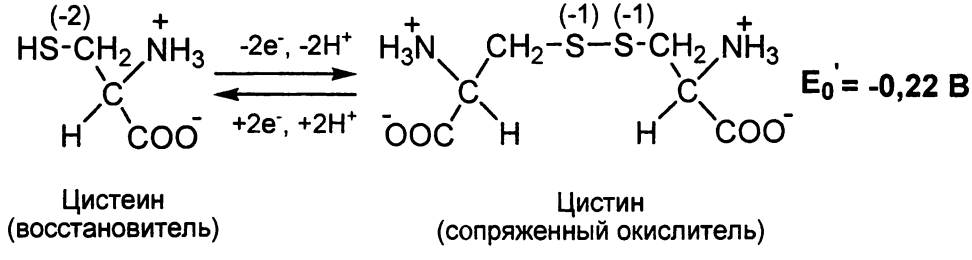
Химические методы модификации остатков аргинина в белках основаны на конденсации гуанидиновой группы с различными дикетонами и диальдегидами, проходящей одновременно по двум атомам азота. Наибольшее применение среди них находит реакция с 1,2-циклогексадионом. Модификация протекает в мягких условиях (pH 8,0–9,0, 25–40 ^{0}C) в натрий-боратном буфере с образованием стабильного комплекса производного аргинина с боратом.



Модифицирующая группировка может быть удалена обработкой 0,5 М гидроксиламином при pH 7,0, 37 ^{0}C, что дает возможность проводить последующее расщепление трипсином по освобождающимся остаткам аргинина. Эта реакция используется для раздельного расщепления полипептидной цепи по остаткам аргинина и лизина.

7.3.6. Окислительно-восстановительные реакции

Цистеин, как все тиолы, выступая восстановителем, легко окисляется, образуя цистин, являющийся дисульфидом цистеина и сопряженным ему окислителем.



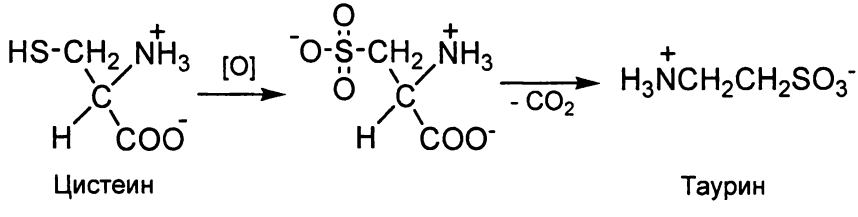
Таким образом, цистеин и цистин составляют сопряженную восстановительно-окислительную пару (вопреки правилам, исторически на первое место поставлена восстановительная форма), для которой характерно тиолдисульфидное равновесие. Отрицательное значение восстановительного потенциала этой пары ($E^{o\prime}$= –0,22 В) свидетельствует, что восстановительные свойства у нее преобладают над окислительными. Поэтому благодаря восстановительным свойствам тиольной группы цистеин является эффективным

антиоксидантом, выполняя защитные функции при воздействии на организм сильных окислителей.

При радиационном воздействии на живые организмы возникают сильные окислители $^{\bullet}OH$, $^{\bullet}HO_2$, H_2O_2, $^{\bullet}O_2$, называемые активными формами кислорода. Наряду с окислителями при этом воздействии в организме возникают другие токсиканты – короткоживущие сильные восстановители: гидратированный электрон ($e^-_{гидр}$) и атомарный водород ·H. Компоненты сопряженной восстановительно-окислительной пары цистеин-цистин активно взаимодействуют и с теми, и с другими агрессивно-токсичными частицами, нейтрализуя их. Большое значение для пространственной структуры белков имеет образование при действии фермента цистеинредуктазы дисульфидных мостиков (превращение двух остатков цистеина в остаток цистина). Эта обратимая реакция, кроме того, играет важную роль в регуляции процессов обмена в живых организмах.

Разнообразные окислительно-восстановительные реакции с участием SH-групп широко используются при изучении белков.

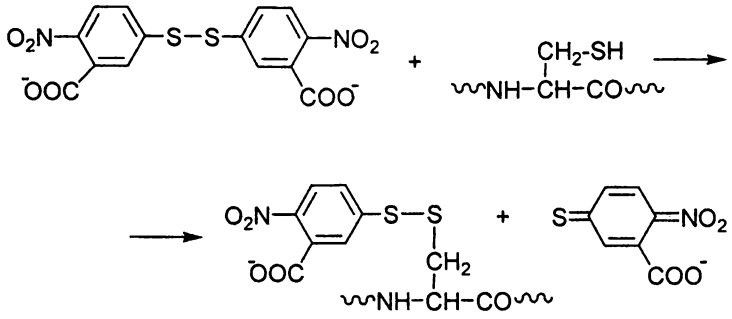
При исчерпывающем окислении тиольной группы цистеина, например, надмуравьиной кислотой, цистеин переходит в цистеиновую кислоту, содержащую сульфогруппу.



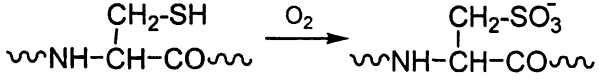
SH-группы остатков цистеина легко вступают в реакции дисульфидного обмена.

$$R_1\text{-S-S-}R_2 + R_3\text{-SH} \leftrightarrow R_1\text{SH} + R_2\text{-S-S-}R_3$$

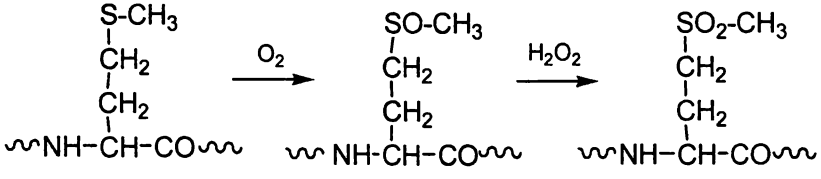
В качестве примера можно привести взаимодействие их с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (*реактив Эллмана*), при которой в хиноидной форме освобождается 2-нитро-5-меркаптобензойная кислота. Образование ее легко регистрируется по появлению характерного поглощения в видимой области спектра (максимум при 412 нм), что позволяет по этой реакции определять количество SH-групп в белках.



Атомы серы остатков этих аминокислот могут в мягких условиях окисляться – остатки цистеина до цистеиновой кислоты,



остатки метионина до остатков метионин сульфоксида, а при использовании сильных окислителей – до метионинсульфона.



§ 7.4. Посттрансляционная модификация белков

Как уже говорилось в § 1.1, после завершения матричного синтеза образовавшиеся биополимеры в большом числе случаев для приобретения основной функциональной активности подвергаются дополнительной модификации. Особенно многочисленны и значимы эти процессы для белков (посттрансляционная модификация). Благодаря указанным модификациям протеома отдельных клеток, тканей и целых организмов значительно превосходит по численности количество генов, кодирующих весь набор белков.

Важную роль играют посттрансляционные протеолитические процессы. Многие белки для их окончательной локализации в определенных органеллах синтезируются в виде полипептидов, снабженных специальными сигнальными последовательностями. После доставки полипептида в нужную органеллу *сигнальный пептид* отщепляется с помощью сигнальной протеазы. Кроме того, многие белки образуются в виде *пробелков*, образование которых обеспечивает формирование необходимой пространственной структуры, пос-

ле чего происходит выщепление излишней части полипептидной цепи. В качестве примера можно привести синтез инсулина. Он образуется в виде препроинсулина в специальных клетках поджелудочной железы (островках Лангерганса), выходит через мембрану эндоплазатического ретикулума с отщеплением сигнальной последовательности в виде *проинсулина* – белка, состоящего из одной цепи длиной 86 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными мостиками. На последней стадии образования активного гормона происходит разрыв полипептидной цепи в двух точках с выщеплением не обладающего какой-либо установленной активностью пептида (С-пептид). В результате образуется активный гормон, состоящий из двух цепей (А и В), связанных двумя дисульфидными мостиками (рис. 54).

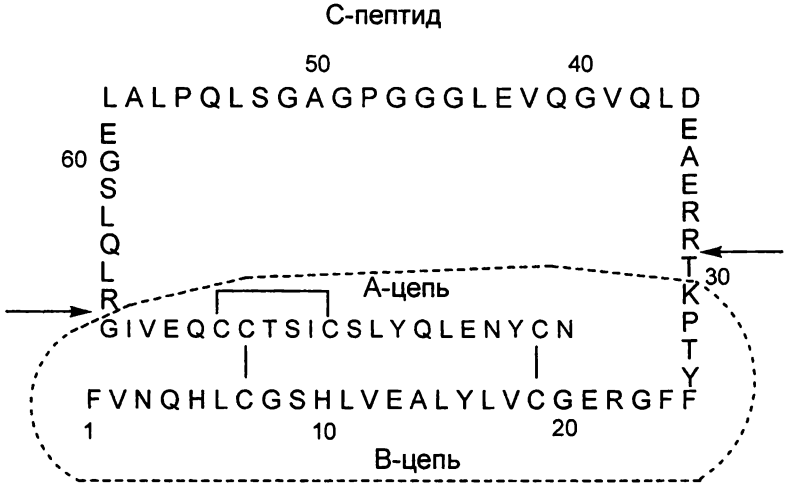


Рис. 54. Структура проинсулина (однобуквенный код). Вертикальные черточки и прямоугольная скобка обозначают дисульфидные мостики между остатками цистеина. Стрелками обозначены пептидные связи, разрываемые при превращении проинсулина в инсулин. Структура инсулина обведена пунктиром

Другая группа процессов посттрансляционной модификации белков представляет собой присоединение к боковым радикалам соединений, придающих полипептиду новые свойства, отсутствующие у полипептидной цепи. Это прежде всего относится к реакциям присоединения к определенному боковому радикалу апофермента кофактора, превращающее апофермент в функционирующий катализатор. Функция ряда кофакторов и точки их присоединения к апоферментам будут рассмотрены в главе 16.

Важную роль модификация белков играет в регуляции их активности. Для этого наиболее широко используются активности ферментов фосфорилирования. Процесс осуществляется специальными протеинкиназами, которые катализируют и осуществляют селективный перенос γ-фосфата от АТР на ОН-группу остатка серина/треонина (серин/треонин киназы, К.Ф. 2.7.11.1)

или остатка тирозина (тирозинкиназы К.Ф. 2.7.10.2). Протеинкиназы, как правило, специфичны к определенному белку-субстрату и модифицируют определенный аминокислотный остаток в этом белке. В связи с узкой специфичностью организму требуется большой набор протеинкиназ. У человека обнаружено до 500 различных протеинкиназ. У бактерий, растений и грибов широко распространены гистидиновые киназы, которые работают как часть двухкомпонентной системы сигнальной трансдукции. Остаток неорганического фосфата, присоединенный к собственному остатку гистидина, затем переносится на остаток аспартата белка-мишени. Фосфорилирование аспартата приводит к дальнейшей передаче сигнала.

Процесс фосфорилирования термодинамически необратим, но в подавляющем большинстве случаев каждой протеинкиназе соответствует определенная фосфатаза, катализирующая гидролиз фосфоэфирной связи, образованной с помощью протеинкиназы. Эти процессы являются одним из основных механизмов регуляции биохимических процессов. Фосфорилирование одного из ферментов либо превращает немодифицирванный белок в каталитически активную форму, либо, наоборот, инактивирует фермент.

В качестве примера можно привести регуляцию фермента гликогенфосфорилазы (К.Ф. 2.4.1.1). Этот фермент катализирует фосфоролиз гликогена – полисахарида, построенного из остатков глюкозы, являющегося у животных организмов основным депо глюкозы (§ 13.5). Гликогенфосфорилаза существует в двух состояниях. В одном из них (фосфорилаза *a*) ее субъединицы фосфорилированы по определенным остаткам серина. В этом состоянии она каталитически активна. Под действием специальной фосфатазы (фосфатаза фосфорилазы *a* (К.Ф. 3.1.3.17)) она дефосфорилируется и переходит в неактивную фосфорилазу *b*.

Фосфорилирование может проходить по множеству сайтов. Этому процессу подвергаются функциональные группы различных остатков аминокислот. Множественное фосфорилирование характерно, например, для РНК-полимеразы II эукариот. *C*-концевой домен большой субъединицы содержит значительное количество (у человека 52 копии, у дрожжей – 26–27 копий) повторяющихся гептапептидных последовательностей состава Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Множественное фосфорилирование этих повторов по остаткам серина и треонина способствует связыванию с ферментом большого числа транскрипционных факторов элонгации и ассоциированных с ними белков, что необходимо для перехода фермента из преинициирующего транскрипционного комплекса в устойчивый элонгирующий комплекс, обеспечивающий движение РНК-полимеразы по ДНК в составе хроматина.

Большое регуляторное значение имеет посттрансляционная модификация гистонов в хроматине. Модификация проходит по остаткам лизина и аргинина (ацетилирование и метилирование), а также по ОН-группам (фосфорилирование). Гистон-метилтрансферазы обладают высокой специфичностью по отношению к природе аминокислотного остатка (гистонлизинметилтрансфе-

разы (К.Ф. 2.1.1.43) и гистон-аргининметилтрансферазы (К.Ф. 2.1.1.125). Распределение точек модификации определяет функциональное состояние гена в отношении процессов репликации и транскрипции. Это распределение обычно рассматривается как элемент «*гистонового кода*».

В качестве примера вариантов распределения точек модификации гистонов можно привести *пострансляционное ацетилирование* белков, которое проходит по ε-аминогруппам остатков лизина. Донором ацетильных групп является ацетилкофермент А. При этом исчезает положительный заряд, что приводит к перераспределению заряда всей белковой молекулы, увеличению гидрофобности и размера боковой цепи модифицированной аминокислоты. Это, в частности, служит сигналом связывания с гистонами факторов транкрипции, т. е. инициации процесса транскрипции. Например, разные формы *гистон-ацетилтрансферазы* (К.Ф. 2.3.1.48) катализируют ацетилирование остатков лизина, расположенных в строго специфических позициях в составе белка. Так, в октамерном ядре нуклеосомы, содержащем по две копии гистонов H2A, H2B, H3 и H4, существует 30 консервативных остатков лизина в N-концевой части белка, способных ацетилироваться (остатки в положениях 5, 9 в H2A, остатки 5, 12, 15, 20 в H2B, остатки 9, 14, 18, 23, 27 в H3 и остатки 5, 8, 12, 16 в H4). В зависимости от количества и места расположения ацетилированных остатков аминокислоты получается огромное число комбинаций распределения ацетилированных остатков, что играет важную роль в функционировании хроматина.

В случае лизина в реакциях, катализируемых различными метилтрансферазами, возможно образование моно-, ди-, триметиллизинов, в случае аргинина – моно- и диметиларгининов. Полученные соединения отличаются размерами модифицированного остатка и степенью гидрофобности.

Метилирование белков наиболее изучено на примере модификации гистонов. Метилирование остатков лизина в гистонах играет важную роль в упомянутом выше «гистоновом коде». Наиболее охарактеризованные положения метилирования в гистонах – это Lys4 и Lys9 в гистоне H3. Кроме указанных остатков, в гистоне H3 могут метилироваться выступающие над поверхностью нуклеосомы Lys27, Lys36, Arg2, Arg17 и Arg26, а в гистоне H4 – Arg3.

Метилированию, как и другим описанным выше модификациям боковых групп, соответствует противоположная реакция деметилирования.

Деметилирование лизина является окислительным процессом и может катализироваться или FAD-зависимой полиаминоксидазой, или лизин-специфичной деметилазой, функционирующей как диоксигеназа в присутствии кофакторов – ионов Fe^{2+}, α-кетоглутарата и аскорбата (К.Ф. 1.5.3.4). Схема процесса приведена на рис. 55.

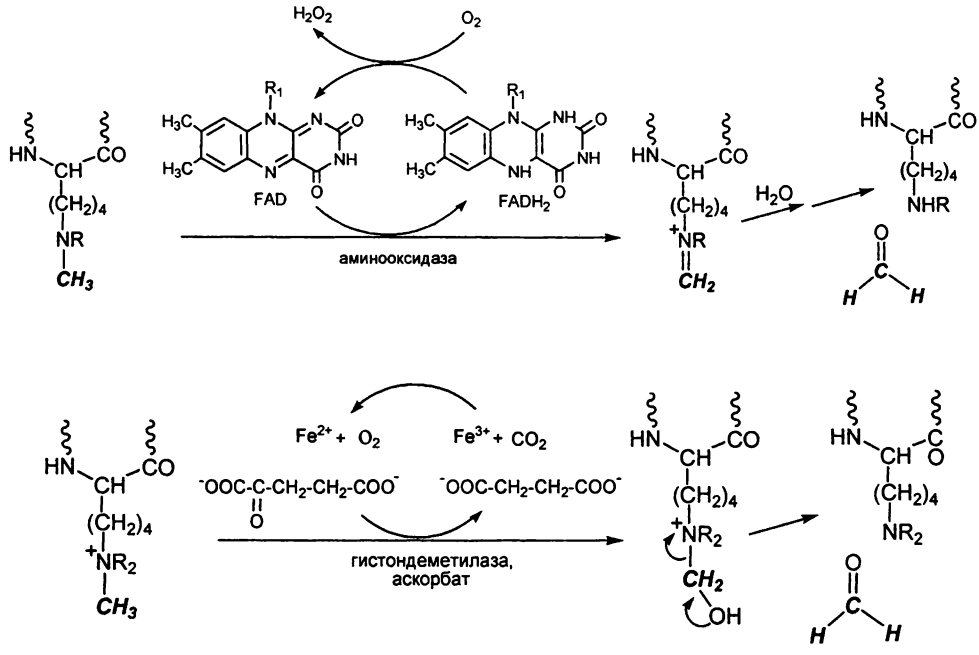
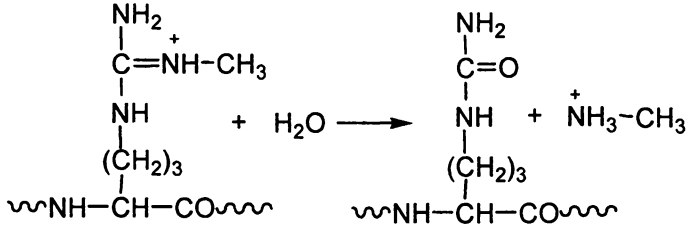


Рис. 55. Реакция деметилирования ди- и монометилированных остатков лизина в гистонах, катализируемая FAD-зависимой аминооксидазой (*вверху*), и три-, ди- и монометилированных остатков лизина в гистонах, катализируемая гистондеметилазой, функционирующей в присутствии кофакторов – ионов Fe^{2+}, α-кетоглутарата и аскорбата (*внизу*)

Деметилирование остатка модифицированного аргинина осуществляет ядерная пептидиларгинин деиминаза (К.Ф. 3.5.3.15), превращающая метилированный аргинин в цитруллин.



Для облегчения взаимодействия белков с мембранами необходимо введение в белки объемных гидрофобных остатков. Такими процессами являются изопренилирование по остатку цистеина (разд. 7.3.2), миристоилирование аминогруппы N-концевого глицина, пальмитоилирование остатков цистеина

ацильными радикалами миристиновой и пальмитиновой кислот. Донором ацильного остатка являются соответствующие ацил-CoA.

Важное биологическое значение имеет ацилирование белков активированной С-концевой карбоксильной группой остатка глицина убиквитина (8 кДа), состоящего из 76 аминокислотных остатков (*убиквитинилирование*). Главная, хотя и не единственная, функция этого процесса заключается во введении метки в белки, подлежащие уничтожению. К ним относятся различные поврежденные белки и нормальные белки, которые должны выполнять свою функцию в определенной фазе развития клетки, и присутствие их за пределами этой фазы нежелательно.

Конъюгация белка-мишени с убиквитином включает три стадии. Первая представляет собой активацию карбоксильной группы убиквитина с помощью убиквитин-активирующего фермента E1 и ATP с образованием убиквитил-AMP. На второй стадии остаток убиквитина переносится на SH-группу убиквитин-переносящего белка E2. На третьей стадии убиквитин-протеин лигаза E3 катализирует перенос убиквитильного остатка на белковый субстрат с образованием амидной связи между С-концевым остатком глицина убиквитина G76 и остатком лизина белка-мишени (субстрата). Модифицированный остатком убиквитина белок подвергается протеолизу в протеасомах или лизосомах (рис. 56).

Если E1 представлен в клетке единственным ферментом, то фермент E2 в клетках млекопитающих имеет уже 20–40 изоформ, а для E3 фермента существуют сотни изоферментов.

На молекулу белка-мишени может переноситься как один остаток убиквитина, так и несколько. На рис. 56 такой продукт обозначен как субстрат-Ub_n. При полиубиквитилировании субстрата фрагмент убиквитин, непосредственно связанный с белком-мишенью, ацилируется по остаткам Lys-29,

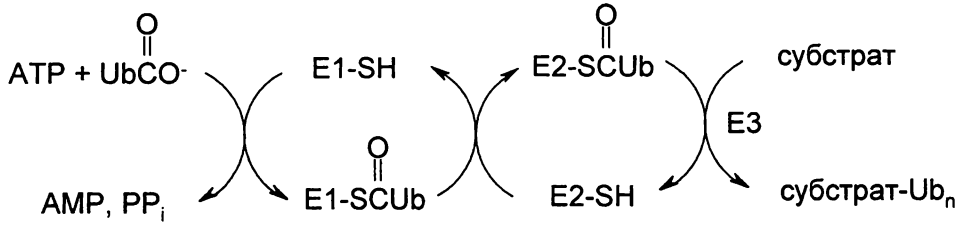


Рис. 56. Схема введения остатка (остатков) убиквитина в белок-субстрат: E1-SH – убиквитин-активирующий фермент, E2-SH – убиквитин-переносящий белок, E3 – убиквитин-протеин лигаза, Ub – остаток убиквитина

Lys-48 или Lys-63 С-концевым остатком глицина следующей молекулы убиквитина. При образовании ковалентного аддукта у присоединенного фрагмента убиквитина сохраняется способность к конъюгированию вышеназванных лизинов со следующего остатком убиквитина, что в конечном счете приводит к полиубиквитилированию белка-субстрата (рис. 57).

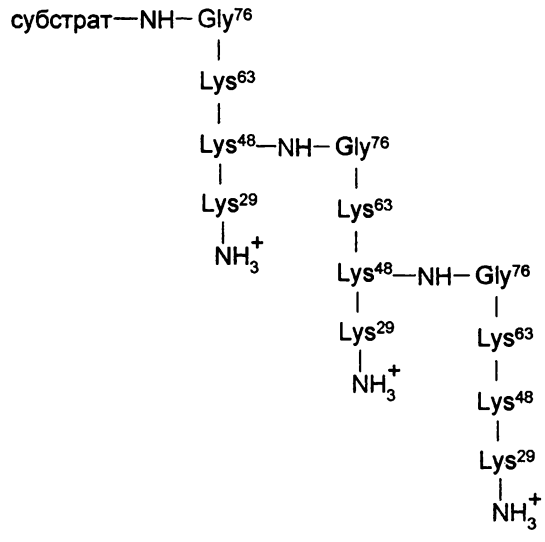


Рис. 57. Тандем из нескольких остатков убиквитина, связанный субстратом. Номера соответствуют остаткам аминокислот, которые участвуют в модификации субстрата (Gly76) и в формировании тандема (Gly76 и Lys48)

В некоторых специальных случаях посттрансляционная модификация состоит в галогенировании белков. Важнейшим из этих процессов является иодирование белка тиреоглобулина, который является источником гормонов щитовидной железы (гл. 17).

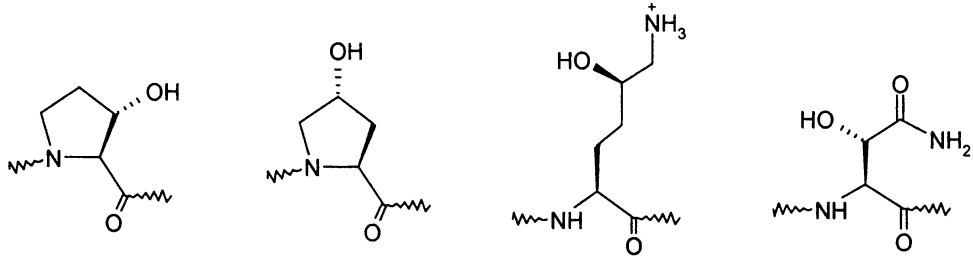
Рассмотренные группы посттрансляционных модификаций боковых радикалов обеспечивают функционирование белков. Наряду с этим некоторые модификации существенны для формирования конечной пространственной структуры белка. Поскольку в поддержании конформационной стабильности свернутой полипептидной цепи существенную роль играют S-S-мостики, образованные двумя остатками цистеина, важной посттрансляционной модификацией является окисление SH-групп. Число таких мостиков у различных белков варьирует в широких пределах. Например, в молекуле панкреатической рибонуклеазы имеется четыре мостика, у сывороточного альбумина человека – 16. Мостики в нативных белках образуются между строго определенными парами остатков цистеина, причем далеко не всегда между ближайшими по цепи. Например, в панкреатической РНКазе существуют следующие пары связанных между собой остатков: Cys-26 – Cys-84, Cys-40 – Cys-95, Cys-58 – Cys-110, Cys-65 – Cys-72.

Дисульфидными мостиками часто связаны между собой различные субъединицы белка, обладающего четвертичной структурой. Например, как было показано на рис. 48, дисульфидными мостиками связаны между собой легкая

и тяжелая цепи иммуноглобулина и два Fc-фрагмента этого четырехсубъединичного белка.

Посттрансляционной модификацией, необходимой для образования необходимой пространственной структуры фибриллярных белков, является *гидроксилирование*. В основном этой модификации подвергается предшественник коллагена – основного белка соединительной ткани.

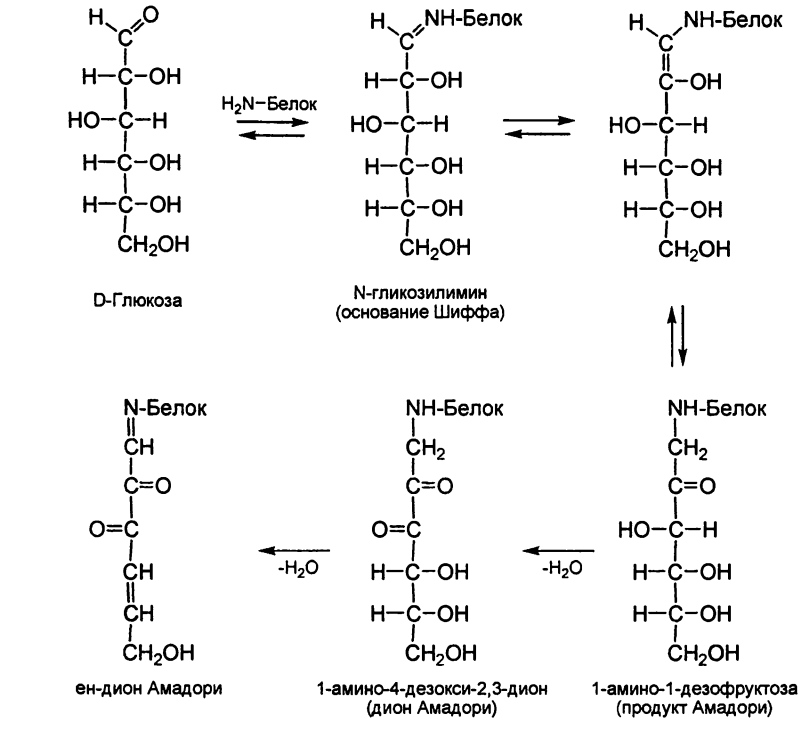
Реакция происходит по остаткам аминокислот, не являющимся нуклеофилами: CH_2-группам пролина, лизина и аспарагина с образованием остатков соответственно 3-гидроксипролина, 4-гидроксипролина, 5-гидроксилизина и 3-гидроксиаспарагина катализируется железосодержащими монооксигеназами подподкласса К.Ф. 1.14.16.

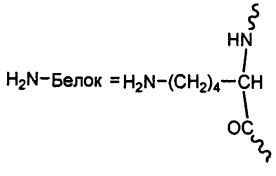


3-OH-Pro 4-OH-Pro 5-OH-Lys 3-OH-Asn

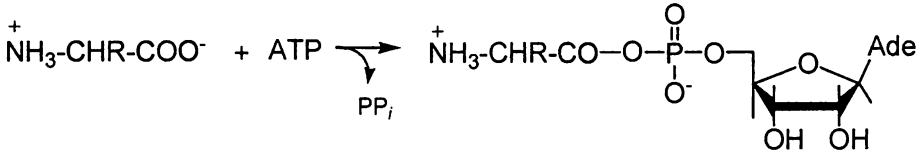
Важное функциональное значение имеет присоединение к белкам остатков олигосахаридов (гликозилирование), превращающее белки в гликопротеиды. Процесс является ферментативным и будет рассмотрен в § 13.5.

Однако наряду с описанными ферментативными процессами в некоторых случаях белки подвергаются неферментативным модификациям. Белки плазмы крови находятся в контакте с глюкозой, и аминогруппы остатков лизина этих белков могут образовывать основания Шиффа с альдегидными группами присутствующих в линейной форме молекул глюкозы. Этот процесс часто называют *гликированием*, чтобы отличить его от многочисленных ферментативных процессов образования гликопротеинов, которые рассматриваются в § 16.5.





Кроме того, в плазме крови происходит неферментативное взаимодействие ε-аминогрупп остатков лизина с тиолактоном гомоцистеина (*гомоцистеинилирование*). Первичным источником этого соединения является S-аденозилгомоцистеин, образующийся в многочисленных реакциях метилирования (разд. 7.3.2). Этот продукт гидролизуется специальной гидролазой до гомоцистеина, и его карбоксильная группа активируется, по-видимому, в результате катализа этой реакции некоторыми аминоацил-тРНК синтетазами (см. § 1.7). Указанные ферменты катализируют с высокой специфичностью на первой стадии образование аминоциладенилата, который ацилирует одну из концевых ОН-групп той тРНК, которая подлежит активации.



Возможно, что первая стадия не абсолютно специфична, и некоторые из этих ферментов образуют аминоациладенилат с гомоцистеином, который внутримолекулярно легко превращается в тиолактон гомоцистеина.

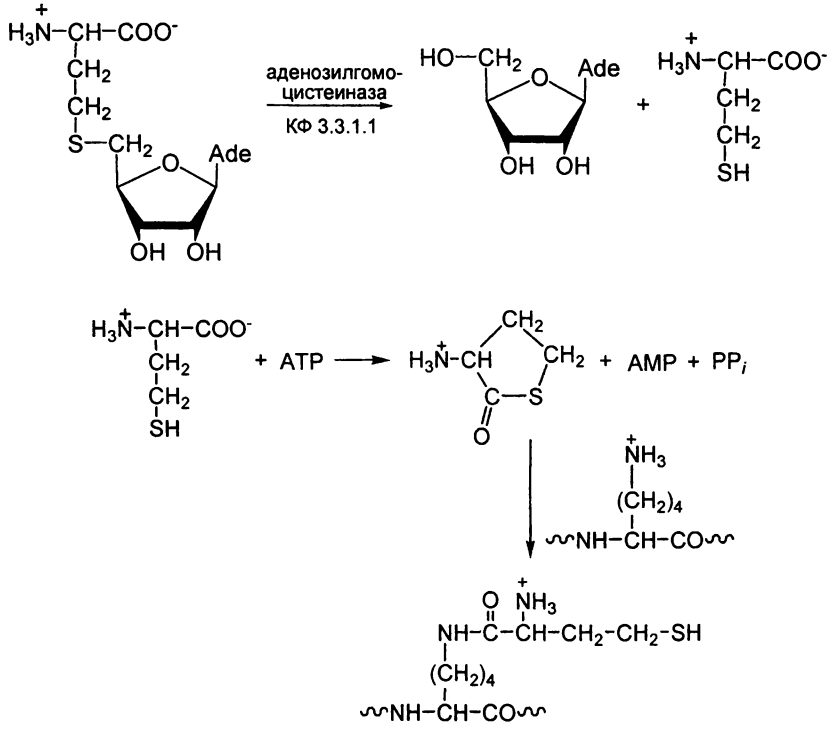


Рис. 58. Образование тиолактона гомоцистеина и его реакция с остатком лизина белка

Как видно из рис. 58, модификация белка этим тиолактоном приводит к появлению у белка дополнительной SH-группы. Напомним, что такой же результат получается при действии на белки тиолана (§ 9.2).

Глава 8. Первичная структура пептидов и белков

§ 8.1. Общие принципы установления первичной структуры белков. Специфическая фрагментация полипептидных цепей

Задача установления первичной структуры белков является менее масштабной, чем установление первичной структуры геномов. Если в случае геномов речь идет о секвенировании последовательностей, состоящих из сотен миллионов нуклеотидов, то при рассмотрении белков в большинстве случаев приходится иметь дело с последовательностями, состоящими из нескольких сотен аминокислотных остатков, в редких случаях превышающих тысячу. Некоторым осложнением является наличие у ряда белков четвертичной структуры, т. е. наличие в них нескольких полипептидных цепей. Это осложнение преодолевается достаточно просто. Вопрос о четвертичной структуре белков рассматривается в § 9.2.

Первичную структуру белков можно определить двумя способами:

1) с помощью генетического кода по расшифрованной нуклеотидной последовательности кодирующей мРНК или соответствующего гена (в последнем случае после установления структуры экзонов);

2) путём непосредственного анализа аминокислотной последовательности.

В качестве иллюстрации первого подхода можно привести выявление мутации в гене, кодирующем β-цепь гемоглобина, которая приводит к тяжелому заболеванию – серповидноклеточной анемии. На участке генома, где происходит мутация, на транскрибируемой нити кодон CTC заменен на CAC, что приводит к замене тринуклеотида GAG в мРНК на тринуклеотид GUG. В соответствии с генетическим кодом это приводит к замене остатка глутаминовой кислоты на остаток валина, что как раз и является причиной изменения свойств гемоглобина (рис. 59).

Непосредственное секвенирование белков имеет несколько этапов:

а) количественный анализ гидролизата для определения аминокислотного состава белка и мольного соотношения входящих в него аминокислот;

б) определение с помощью подходящего физического метода молекулярной массы белка для вычисления количества всех присутствующих аминокислотных остатков;

в) определение количества входящих в молекулу полипептидных цепей либо с помощью хроматографического или электрофоретического разделения, либо посредством количественного анализа остатков, содержащих аминогруппу (N-конец) и карбоксильную группу (C-конец);

г) разделение цепей, если их несколько, с учетом, что эти цепи могут

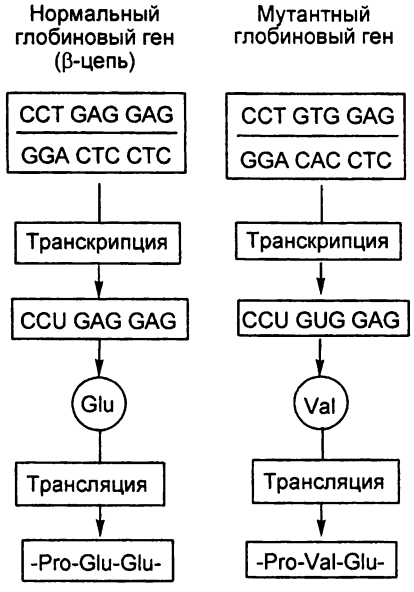


Рис. 59. Схема мутации в β-цепи гемоглобина, приводящей к серповидноклеточной анемии

быть связаны либо ковалентно, например, посредством дисульфидных мостиков, либо нековалентно, образуя четвертичную структуру;

д) расщепление каждой цепи специфическими методами на фрагменты, в которых удобно анализировать последовательность (в связи с тем, что существующие методы собственно секвенирования не позволяют провести его на целом белке);

е) определение для каждой цепи последовательности аминокислот с помощью ступенчатой деградации по Эдману или MS/MS-спектрометрии (§ 8.2);

ж) восстановление структуры исходного биополимера, т. е. определение порядка расположения в исходном белке набора фрагментов с уже установленной первичной структурой.

Подходы к определению аминокислотного состава уже были рассмотрены в § 7.2, а к определению концевых групп – в § 7.3. Вопрос о четвертичной структуре белков будет рассмотрен в § 9.2. Вопрос восстановления структуры исходного биополимера по набору установленных фрагментов рассматривается после описания методов селективного расщепления белков на фрагменты. Специфическое расщепление белков может быть осуществлено энзиматически или специальными химическими методами.

В живой природе существует большое число ферментов, катализирующих селективный гидролиз определенных пептидных связей. Многие из них являются пищеварительными ферментами и способствуют превращению

белков, получаемых с пищей, в усваиваемую живыми организмами смесь аминокислот. Процесс является многоступенчатым. У млекопитающих основной процесс начинается в желудке, где происходит расщепление белка на крупные полипептиды с участием фермента *пепсина*, действующего в основном на связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот. Далее в тонком кишечнике происходит гидролиз до более мелких блоков с помощью таких ферментов, как *трипсин*, катализирующий расщепление пептидных связей, образованных остатками лизина и аргинина, и *химотрипсин*, катализирующий расщепление по остаткам ароматических аминокислот. Дальнейшее расщепление до аминокислот происходит при участии *аминопептидаз* и *карбоксипептидаз*, катализирующих отщепление аминокислот соответственно от N- и C-конца пептидов.

Перечень ферментов, нашедших широкое применение для специфической фрагментации пептидных цепей, приведен в табл. 11.

Таблица 11

Ферменты, используемые для специфического гидролиза пептидных связей

Фермент	**Оптимум pH**	**Гидролизуемая пептидная связь**	**Дополнительный сайт гидролиза**	**Гидролиз не идёт по сайтам:**
Трипсин	7-9	~Lys↓X~; ~Arg↓X~; ~Aec↓X~	–	~Lys↓Pro~
Тромбин	8,0	~Arg↓X~; (X = Gly; Ala; Val; Asp; Cys; Arg)	–	–
Протеаза V8 из *S. aureus*	4 и 7-8	~Glu↓X~	~Asp↓X~	~Glu↓Pro~; ~Glu↓Glu~
Клострипаин	7,7	~Arg↓X~	~Lys↓X~	–
Протеаза подчелюстной железы мыши	7,5-8	~Arg↓X~	–	–
Протеаза *A. mellea*	8,0	~X↓Lys~; ~X↓Aec~	~Arg↓X~	~X↓Lys~Pro~
Протеаза *Myxobacter AL1*	9,0	~X↓Lys~	–	–
Постпролин-специфичная протеаза	7,5-8	~Pro↓X~	–	~Pro↓Pro~
Химотрипсин	7-9	~Z↓X~; (Z = Tyr; Phe; Trp; Leu)	–	~Z↓Pro~
Термолизин	7-8	~X↓Z~; (Z = Val; Leu; Ile; Phe; Tyr; Trp)	–	~X↓Z~Pro~

Окончание табл. 11

Протеаза *Crotalus atrox*	7,5-8	Аналогично термолизину	–	Аналогично термолизину
Пепсин	2,0	~X↓Z↓Y~; ~X↓Glu↓Y~; (Z – ароматический, или объёмный алифатический аминокислотный остаток)	–	–
Папаин	5-7,5	~Phe~X↓Y~; (идёт гидролиз ряда других пептидных связей)	–	–
Эластаза	7-9	~Z↓X~; (Z = Ser; Ala; Gly; Val; Leu)	–	–
Литическая протеаза	7-8	Аналогично эластазе	–	–

Наряду с этим разработано несколько химических методов специфического расщепления полипептидов. Среди них особенно широко используется бромциановый метод расщепления по остаткам метионина.

По указанному методу анализируемый полипептид обрабатывается бромцианом BrC≡N, который атакует атом S остатков метионина с образованием цианосульфониевого производного. Последнее благодаря наличию положительного заряда на атоме S становится эффективным алкилирующим реагентом, способным атаковать соседнюю карбонильную группу с образованием иминолактона и одновременным отщеплением метилизотиоцианата. Иминолактон легко гидролизуется, что приводит к разрыву пептидной связи (рис. 60).

Метод селективного расщепления пептидных связей остатка триптофана основан на высокой реакционной способности индольного ядра. При этом благодаря низкому содержанию в белках триптофана должны образоваться несколько крупных фрагментов, удобных для секвенирования. Были предложены некоторые подходы к такому расщеплению. В качестве примера ниже рассмотрен процесс, основанный на окислительном галогенировании индольного ядра остатка триптофана *N*-бромсукцинимидом. Благодаря своей высокой реакционной способности он генерирует электрофильную частицу – положительно заряженный ион Br^+ На рис. 61 приведена предполагаемая схема процесса, приводящего к расщеплению пептидной связи, образованной карбоксильной группой триптофана.

Согласно этой схеме процесс начинается с электрофильного присоединения Br^+ к атому ^3C индольного цикла остатка триптофана с превращением этого цикла в остаток 3-броминдоленина (1). Далее следует нуклеофильное присоединение молекулы воды и затем элиминация HBr и депротонирование NH_2^+-группы, в результате чего индольный фрагмент превращается в окси-

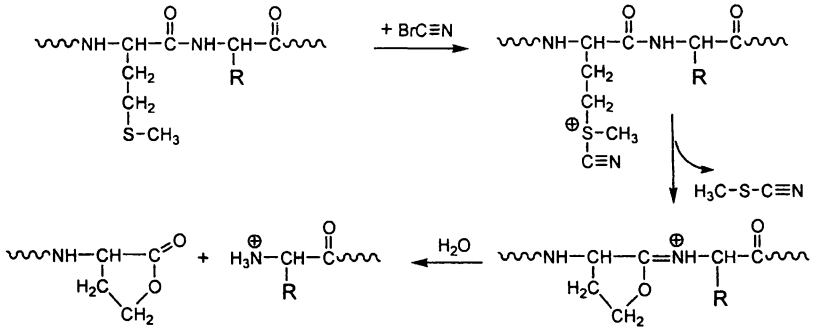


Рис. 60. Расщепление полипептидов бромцианом

индольный (2). Повторное присоединение Br^+ и последующая реакция атома Br остатка 3-бромоксиндола (3) с карбонильным кислородом остатка триптофанила приводит к циклизации с образованием фрагмента иминолактона (4). При этом пептидная связь, образуемая остатком триптофанила, превращается в легко гидролизуемую связь $C{=}NH^+$, что и приводит к разрыву пептидной связи (см. рис. 61).

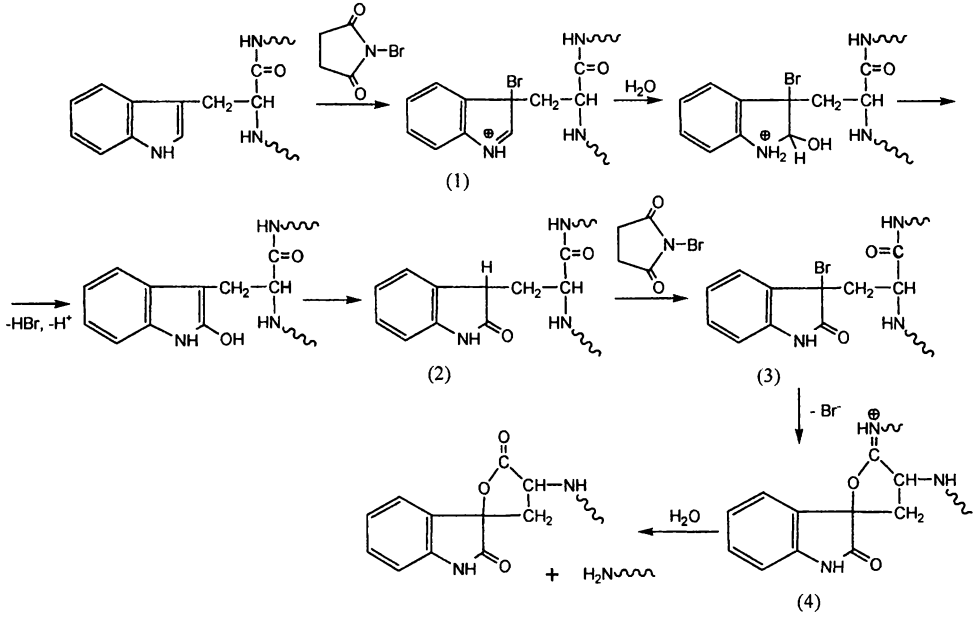
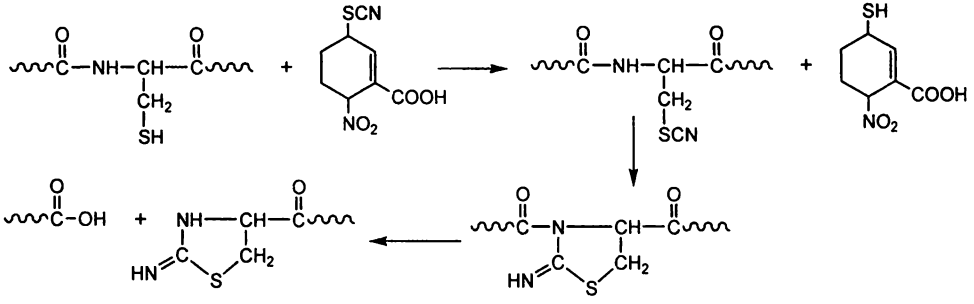
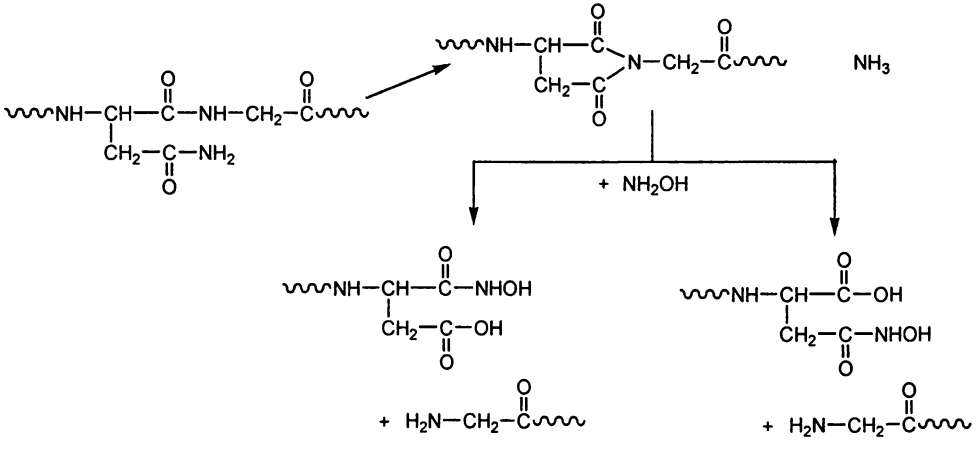


Рис. 61. Схема расщепления пептидной связи по остаткам триптофана. На схеме обозначены остатки: *1* – 3-броминдоленина, *2* – оксоиндола, *3* – 3-бромоксоиндола, *4* – продукт циклизации

Селективное расщепление пептидной цепи по остаткам цистеина может быть осуществлено путем цианирования SH-группы. Хорошими цианирующими реагентами являются 2-нитро-5-тиобензойная кислота и соли 1-цианодиметиламинопиридина. Остатки цистеина превращаются в остатки тиоцианоаланина, которые циклизуются с образованием фрагментов ацилиминотиазолидина, по которым проходит гидролиз с разрывом пептидной связи. Процесс протекает по схеме:



Расщепление на достаточно крупные блоки осуществляют по фрагментам Asn-Gly. Такие фрагменты могут образовывать циклические структуры, по которым обычно происходит фрагментация пептидной цепи под действием гидроксиламина по схеме:



Повышенная лабильность связи Asn-Gly по сравнению со связями Asn с другими аминокислотами, вероятно, обусловлена отсутствием при циклизации с глицином стерических затруднений, которые могут возникать с другими боковыми радикалами.

Установление порядка, в котором секвенированные фрагменты были расположены в исходном белке, проводится с помощью подхода, известного как метод перекрывающихся блоков. Метод основан на проведении двух (в неко-

торых случаях большем) расщеплений белка по двум точкам, отличающимся по природе аминокислотных остатков. Суть метода проще всего уяснить на конкретных методах расщепления, допустим, на примере расщеплений с помощью трипсина и химотрипсина. Если два пептида, получившиеся в результате специфического расщепления трипсином (Т-пептиды), были соседними в анализируемом белке, то среди пептидов, полученных расщеплением с помощью химотрипсина (С-пептид), должен находиться такой, N-конец которого совпадает с С-концом одного из двух соседствующих Т-пептидов, а С-конец этого С-пептида – с N-концом второго Т-пептида. Иными словами, два соседствующих Т-пептида полностью перекрываются каким-либо С-пептидом. Аналогично два любых соседствующих С-пептида перекрываются каким-либо Т-пептидом. При установленных первичных структурах не представляет труда вручную установить все перекрываемые пары, т. е. восстановить всю первичную структуру белка или каждой из его субъединиц.

В качестве иллюстрации как самого подхода, так и возникающих осложнений, на рис. 62 приводится пример установления порядка расположения двух пептидов трипсинового гидролизата белка ТВР человека, первичная структура которого приведена на рис. 65 в § 8.3.

а) Met-Val-Cys-Thr-Gly-Ala-Lys-OH Ser-Glu-Glu-Gln-Ser-Arg-OH

б) Val-Cys-Thr-Gly-Ala-Lys-Ser-Glu-Glu-Gln-Ser-Arg-Leu-OH

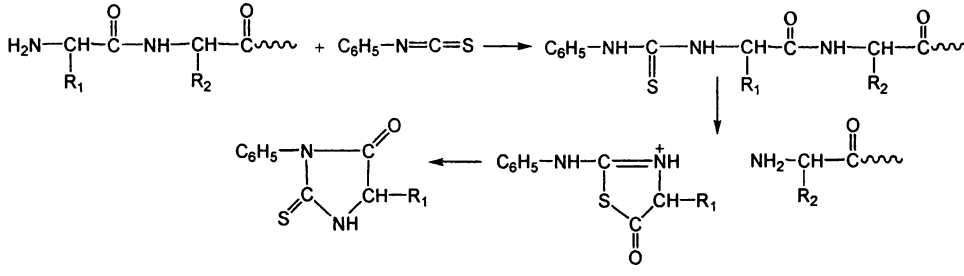
в) LDLK LAAR LGFPAK LEGLVLTHQQESSYEPELFPGLIYR

Рис. 62. Первичные структуры двух пептидов трипсинового гидролизата ТАТА-бокссвязывающего белка человека – *а*; структура перекрывающего их пептида химотрипсинового гидролизата того же белка – *б*; первичные структуры пептидов того же трипсинового гидролизата с лейцином на N-конце – *в* (в однобуквенном представлении)

Из приведенных структур двух Т-пептидов (рис. 62, *а*) следует, что они являются соседями в белке, поскольку они перекрываются приведенным под ними пептидом химотрипсинового гидролизата (рис. 62, *б*). В то же время для продолжения расстановки пептидов недостаточно найти среди Т-пептидов продолжающий справа второй из представленных, поскольку он должен начинаться с лейцина, а таких Т-пептидов в трипсиновом гидролизате четыре (рис. 62, *в*). Чтобы выбрать из них тот, который примыкает ко второму Т-пептиду, необходимо провести еще одно специфическое расщепление по участку, не совпадающему с расщеплением трипсином и химотрипсином.

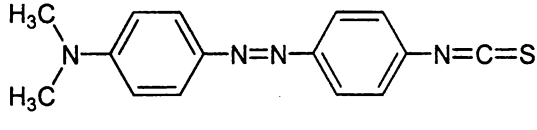
§ 8.2. Секвенирование пептидов. Метод Эдмана. MS/MS-секвенирование

Чисто химический подход к секвенированию пептидов был разработан Эдманом (P. V. Edman), и метод носит его имя. Метод основан на реакции N-концевой α-аминогруппы с фенилизотиоцианатом, приводящей к превращению N-концевого аминоацильного остатка в N-фенилтиокарбамоильное производное, которое отщепляется в виде 2-анилино-5-тиазолинона с освобождением пептида, укороченного на один аминокислотный остаток. Тиоазолинон при подкислении превращается в фенилтиогидантоин, соответствующий отщепленной N-концевой аминокислоте. Ниже приводится схема этого многостадийного процесса.



Фенилтиогидантоины обладают интенсивным УФ-поглощением (молярные экстинкции от 12654 $M^{-1}см^{-1}$ для производного гистидина до 30224 $M^{-1}см^{-1}$ для производного аланина). Поскольку свойства фенилтиогидантоинов с различными радикалами R отличаются в соответствующим образом подобранных хроматографических системах, можно идентифицировать фенилтиогидантоин, а следовательно и отщепленную аминокислоту. Для большинства аминокислотных остатков удобным методом идентификации является масс-спектрометрический. Проведение ступенчатого отщепления N-концевых аминокислотных остатков и их идентификация через идентификацию образующихся фенилтиогидантоинов позволяет установить последовательность этих остатков в анализируемом пептиде. При тщательном проведении каждой стадии и использовании высокоочищенных реактивов можно установить последовательность до 30 аминокислотных остатков.

Помимо фенилизотиоцианата, для аналогичной процедуры предложены и некоторые другие изотиоцианаты. Так, для повышения чувствительности метода вместо фенилизотиоцианата предложено использовать диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат (ДАБИТЦ).



При этом образуются окрашенные аминокислотные производные 4-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоины с $\lambda_{мах}$ = 520 нм ε = 47 000 $М^{-1}см^{-1}$ (в кислой среде). Однако 4-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат менее реакционноспособен в отношении *N*-концевых аминогрупп. Поэтому в каждом цикле после его реакции с полипептидом для полного израсходования N-концевых *α*-аминогрупп приходится проводить дополнительную реакцию с более эффективно реагирующим фенилизотиоцианатом. Получающиеся 3-фенил-2-тиогидантоинаминокислоты бесцветны и не мешают идентификации окрашенных тиогидантоинов. Кроме этого, ограничением для широкого распространения 4-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианата является его нестабильность при хранении.

Специфической особенностью секвенирования пептидов по Эдману является огромное число идентичных по типу реакции стадий, которые необходимо проводить на каждом этапе укорочения пептидной цепи. Методологически эта ситуация аналогична рассмотренной ранее применительно к многоступенчатому синтезу олигонуклеотидов, и целесообразна автоматизация процесса. Поэтому созданы специальные приборы для автоматического секвенирования по методу Эдмана (автоматические *секвенаторы белков*). В секвенаторах анализируемый полипептид ковалентно связан с нерастворимым носителем и через колонку с анализируемым пептидом по заданной программе последовательно пропускаются раствор фенилизотиоцианата, растворитель для отмывки от избытка реагента, раствор CF_3COOH для превращения N-концевого остатка в фенилтиогидантоин и его отщепления от иммобилизованного пептида, последующее определение природы отщепившегося остатка и продолжения секвенирования.

В качестве нерастворимого носителя обычно используются полимерные материалы, несущие алифатические аминогруппы, с которыми связываются концевые карбоксильные группы секвенируемого белка или полипептида – производные сополимера стирола и дивинилбензола или стекло, несущее аминопропильные остатки. Фрагменты анализируемого белка, полученные гидролизом белка специфическими протеазами, имеют на С-конце карбоксильную группу. Присоединение таких пептидов к аминогруппам можно осуществить с помощью карбодиимида. Чтобы избежать выпадение на носителе дициклогексилмочевины, используют водорастворимые карбодиимиды, например, *N*-(3-диметиламино)-*N'*-этоксипропилкарбодиимид. При этом одновременно активируются карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, что неизбежно приведет к иммобилизации пептида по этим группам. Это не позволило бы проводить процедуру Эдмана после первого же остатка одной из дикарбоновых аминокислот. Избежать такого процесса можно предварительным выдерживанием пептида с карбодиимидом. При этом С-концевая группа превращается в оксазолон, который способен ацилировать аминогруппы носителя, а активированные COOH-группы

дикарбоновых кислот переходят в неактивные производные N-ацилмочевины. Схема процесса приведена на рис. 63.

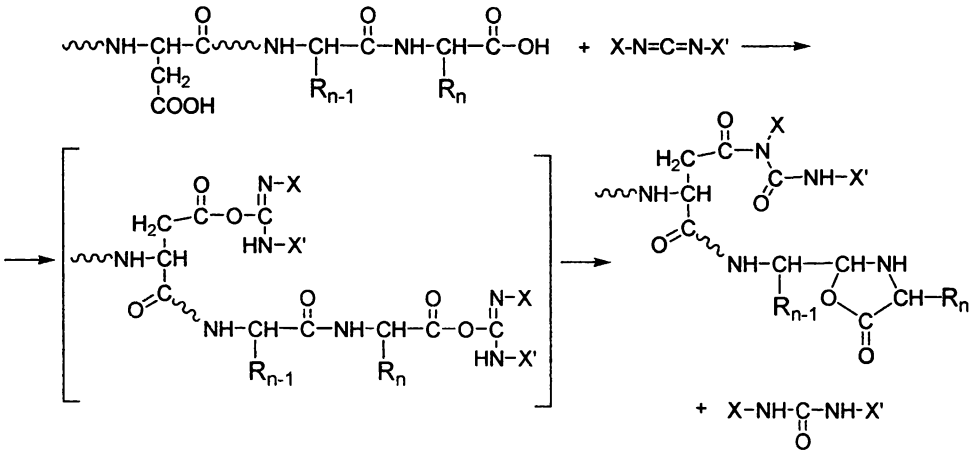


Рис. 63. Получение С-концевого оксазолона

При использовании бромцианового расщепления белка по остаткам метионина, как видно из рис. 63, получаются пептиды с С-концевым оксазолоном, которые можно непосредственно присоединять к аминогруппам носителя.

В настоящее время интенсивное развитие приобрел масс-спектрометрический метод определения последовательности аминокислот в пептидах. Он основан на масс-спектрометрическом анализе смеси пептидов, образованных при специфическом гидролизе анализируемого белка. Молекулярные ионы пептидов, имеющие одинаковую массу, аккумулируются в ионном источнике масс-спектрометра, где подвергаются фрагментации и затем повторному масс-спектрометрическому разделению. В связи с двукратным масс-спектрометрическим разделением такой метод установления первичной структуры принято называть MS/MS-секвенированием (этот подход часто обозначают как секвенирование *de novo*).

Главным принципом при этом подходе к MS/MS-секвенированию является сравнение масс фрагментов, полученных в результате однократного разрыва анализируемого пептида при его фрагментации в ионном источнике масс-спектрометра. При фрагментации главным образом разрушается пептидная связь. В результате образуются b_i- и y_i-фрагменты, содержащие N-конец или С-конец пептида соответственно. Индекс i означает число аминокислотных остатков во фрагменте. Наряду с этим в ряде случаев образуются осколки, получившиеся в результате разрыва связи CHR-CO, которые также содержат либо N-конец, либо С-конец пептида. Их обозначают как a_i и x_i соответственно. Осколки a_i и b_i различаются на массу CO-группы (28). Наличие в спектре пар линий с такой разницей позволяет вычленить из множества ли-

ний спектра те, которые относятся к b_i-фрагментам. То же самое относится и к паре линий, относящихся к фрагментам x_i и y_i.

Поскольку чаще всего первая фрагментация проводится с помощью трипсина, то С-концевыми аминокислотами в получаемых фрагментах являются лизин или аргинин, и среди осколков b_i должны присутствовать отличающиеся от массы фрагментированного пептида на массу лизина или аргинина (за вычетом массы ОН). Далее путем перебора по массам аминоацильных остатков находятся осколки, содержащие на один, два и т. д. аминоацильных остатков меньше, чем осколок с удаленным лизином или аргинином. Иными словами, в масс-спектре выявляются пики, т. е. массы серии осколков, соответствующих последовательному удалению аминоацильных остатков с N-конца. Поскольку приходится использовать достаточно трудоемкий перебор масс, его проводят с помощью ЭВМ, используя специально разработанные программы. Эти массы в подавляющем большинстве случаев однозначно определяют природу остатков. Исключением являются остатки лейцина и изолейцина, массы которых совпадают. Лишь на сотые доли единиц различаются массы лизина и глутамина, которые составляют соответственно 128,095 и 128,059. Эта разница может быть заметна лишь при использовании масс-спектрометров с высокой разрешающей способностью (времяпролетные спектрометры, Time Of Flight или TOF-спектрометры).

Аналогично для анализа масс-спектров фрагментов могут использоваться массы фрагментов, содержащих С-концевые аминокислотные остатки. На рис. 64 в качестве иллюстрации приведена схема фрагментации некоторого тетрапептида.

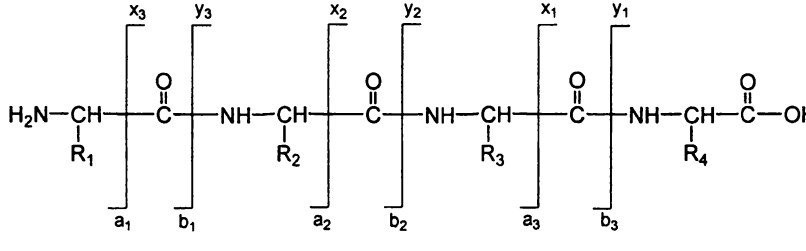


Рис. 64. Схема возможных случаев фрагментации тетрапептида по связям CHR-CO и CO-NH, обозначенным вертикальными линиями, пересекающими разрываемые связи. Символами a_i и b_i отмечены линии, от которых начинаются фрагменты с сохранившимся N-концом (*слева*), символами x_i и y_i – с сохранившимся С-концом (*справа*)

Естественно, что при подсчете масс исходят из масс аминокислот, из которых вычитается масса ОН-остатка, поскольку он теряется при образовании

каждой пептидной связи. Кроме того, образование ионов при расщеплении пептидов может сопровождаться разрушением боковых радикалов. Так, остатки аргинина, лизина, глутамина и аспарагина могут терять молекулу аммиака, что приводит к уменьшению массы на 17 единиц. Остатки серина, треонина и глутамата могут терять молекулу воды, что приводит к уменьшению массы фрагментов на 18 единиц.

Установление природы всех аминокислотных остатков означает и установление последовательности аминокислот в пептиде. Достоинством MS/MS-секвенирования по сравнению с секвенированием по Эдману является значительное снижение времени секвенирования и возможность оперировать с существенно меньшим количеством образца – фемтомоли вместо пикомолей, необходимых для метода Эдмана.

§ 8.3. Банки данных для последовательностей аминокислот в белках

В настоящее время накоплено огромное количество данных о последовательности аминокислотных остатков в белках (т. е. о первичных структурах белков). Они собраны в специальных банках данных, и для каждого из секвенированных белков эти последовательности могут быть извлечены на персональный компьютер через систему Интернет. Аминокислотные последовательности являются вторым важным источником биологической информации. Данные о последовательностях белков содержатся также в базе данных Genbank (см. § 3.5).

Кроме первичной структуры, в банке приводится экспертная (вводимая специальным экспертом) информация о белке, которая содержит сведения о функции белка (в случае ферментов – данные о кофакторах, метаболических путях, механизмах регуляции), о биологически важных доменах и сайтах; о вариантах посттрансляционной модификации; о молекулярной массе по данным масс-спектрометрии; о внутриклеточной локализации; тканеспецифичной экспрессии белка и ее зависимости от стадии развития; данные по разметке вторичной структуры белка (в случае, если она известна на основании структурных данных); данные о четвертичной структуре, об участии во взаимодействиях с различными биологически значимыми молекулами и ионами и ряд других сведений.

Для того, чтобы получить информацию об интересующей нас аминокислотной последовательности, нужно зайти на сайт http://www.ncbi.nclm.nih.gov/Genbank/. В открывающемся окне во вкладке «Search» теперь выбрать «protein» и рядом с ней окно, в которое надо ввести название искомого объекта, например, TATA-box binding protein AND Human[Organism], нажать «Enter»/кнопку «Go». В появившемся окне из таблички с описанием выбрать интересующую последовательность (например, TBP_HUMAN), напротив нее в поле Accession (доступ) нажать гиперссылку

(в нашем случае это P20226) – открывается окно с наиболее полной на данный момент информацией об этой последовательности в выбранном организме: откуда, где находится, ссылки на соответствующую литературу, все свойства и модификации данной последовательности, известные на настоящий момент, и сама последовательность.

В качестве примера на рис. 65 в оригинале приведен фрагмент из Генбанка, полученного для участвующего в инициации транскрипции белка TBP.

Protein names: *Recommended name:* **TATA-box-binding protein**

Organism: **Homo sapiens (Human)**

Function: General transcription factor that functions at the core of the DNA-binding multiprotein factor TFIID. Binding of TFIID to the TATA box is the initial transcriptional step of the pre-initiation complex (PIC), playing a role in the activation of eukaryotic genes transcribed by RNA polymerase II.

Involvement in disease: Defects in TBP are the cause of spinocerebellar ataxia type 17 [MIM:607136]. Spinocerebellar ataxia is a clinically and genetically heterogeneous group of cerebellar disorders. Patients show progressive incoordination of gait and often poor coordination of hands, speech and eye movements, due to degeneration of the cerebellum.

Sequence:

```
        10         20         30         40         50
MDQNNSLPPY AQGLASPQGA MTPGIPIFSP MMPYGTGLTP QPIQNTNSLS
        60         70         80         90        100
ILEEQQRQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQ QQQQQAVAAA
       110        120        130        140        150
AVQQSTSQQA TQGTSGQAPQ LFHSQTLTTA PLPGTTPLYP SPMTPMTPIT
       160        170        180        190        200
PATPASESSG IVPQLQNIVS TVNLGCKLDL KTIALRARNA EYNPKRFAAV
       210        220        230        240        250
IMRIREPRTT ALIFSSGKMV CTGAKSEEQS RLAARKYARV VQKLGFPAKF
       260        270        280        290        300
LDFKIQNMVG SCDVKFPIRL EGLVLTHQQF SSYEPELFPG LIYRMIKPRI
       310        320        330
VLLIFVSGKV VLTGAKVRAE IYEAFENIYP ILKGFRKTT
```

Рис. 65. Последовательность аминокислот человеческого белка TBP вместе с выборкой из экспертной информации (данные Genbank)

На этой последовательности авторы выделили жирным шрифтом (в данных Генбанка этого выделения, естественно, нет) фрагменты, полученные трипсиновым гидролизом, имеющие на N-конце остаток лейцина и использованные в § 8.1 для иллюстрации метода перекрывающихся блоков. Исключительно в целях иллюстрации приведена лишь малая часть выборки из экспертных данных.

Глава 9. Пространственная структура белков

§ 9.1. Вторичная, третичная и доменная структура белков

9.1.1. Глобулярные белки. Формирование их пространственной структуры. Шапероны. Прионы

В функционировании белков решающее значение имеет их пространственная структура. По типам пространственных структур белки разделяют на глобулярные и фибриллярные.

Подавляющее большинство наиболее тонких функций выполняется *глобулярными белками.* Они имеют уникальную объемную структуру, в которой аминокислотные остатки с гидрофобными боковыми радикалами в основном сосредоточены во внутренней части молекулы, а гидрофильные, в том числе несущие электрический заряд остатки, располагаются преимущественно на поверхности глобулы. В частности, снаружи формируются активные центры ферментов, которые взаимодействуют с соответствующими субстратами, аллостерическими эффекторами и кофакторами. Способная к функционированию пространственная структура белка часто называется нативной структурой, или *нативной конформацией.*

Глобулярная структура легко разрушается при повышении температуры, при добавлении органических растворителей или воздействии других неблагоприятных факторов. Процессы, приводящие к разрушению пространственной структуры, называются *денатурацией белка.* К денатурирующим агентам относятся и такие вещества, как мочевина и гуанидин, замещающие молекулы воды в сольватной оболочке белка. Восстановление пространственной структуры называется ренатурацией.

Пространственная структура белка, скорее всего, формируется по ходу трансляции. Хотя эта структура предопределяется последовательностью аминокислот, образование ее из развернутой полипептидной цепи, в особенности для достаточно протяженных пептидных цепей, не происходит самопроизвольно. В этом процессе принимают участие белки, получившие название *шапероны*. Они были впервые обнаружены у дрозофилы, подвергнутой действию повышенной температуры, и получили название *белков теплового шока* (белки Hsp, heat shock proteins). Такие белки в настоящее время обнаружены у самых разнообразных живых организмов. В этом случае их роль состоит в предотвращении денатурации белков путем их взаимодействия с частично или полностью денатурированными белками. По-видимому, узнавание поврежденных белков шаперонами в значительной мере обусловлено

появлением у поврежденных белков экспонированных гидрофобных фрагментов.

С образованием измененной пространственной структуры, в частности, связано действие инфекционных белков *прионов*. Они являются возбудителями некоторых смертельных нейродегенеративных заболеваний человека и животных, например, коровьего бешенства. Регистрируемым биохимическим признаком этих заболеваний является превращение одного из генетически программируемых неинфекционных белков PrP^c в инфекционный белок PrP^{Sc}. Оба белка имеют одну и ту же первичную структуру, но резко отличающиеся пространственные структуры, т. е. превращение PrP^c в PrP^{Sc} представляет собой направленный конформационный переход. Последний обладает удивительным свойством катализировать превращение продолжающих синтезироваться белков PrP^C в инфекционную конформацию.

Каждый фрагмент полипептидной цепи представляет собой структуру

$$NH\text{-}C^{\alpha}HR\text{-}C'{=}O.$$

Связь группы C'=O с NH- следующего аминокислотного остатка не является строго одинарной связью из-за сопряжения π-связи карбонильной группы с неподеленной парой электронов атома N. Поэтому фрагмент C^{α}_i-C'O-NH-C^{α}_{i+1} является плоским, причем в одной плоскости находятся атомы C', N, связанные с ними соответственно атомы O и H и оба атома C^{α}. Индексы i и $i+1$ указывают на номера соответствующих аминокислотных фрагментов в полипептидной цепи. На рис. 66 приведена схема расположения двух соседних плоских фрагментов.

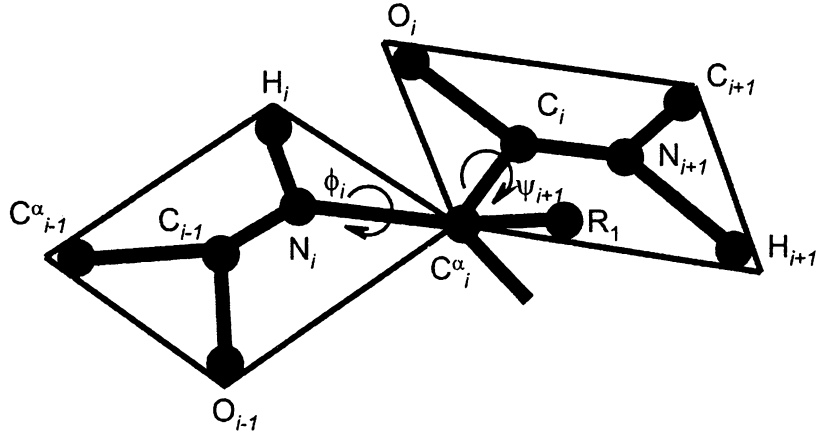


Рис. 66. Взаимное расположение в пространстве двух плоскостей соседних аминоацильных фрагментов

Вокруг обеих связей, образуемых каждым атомом C^{α}, возможно заторможенное вращение, и соответствующие торсионные углы обозначают буквами φ для связи C^{α}-N и ψ для связи C^{α}-C' Именно эти два угла характеризуют ход полипептидной цепи в пространстве. Из сказанного следует, что полипептидную цепь можно представить как серию связанных между собой плоских фрагментов, соединенных между собой хиральными атомами C^{α} (см. рис. 66).

9.1.2. Вторичная структура белков. α-Спирали и β-складки

Если на протяжении некоторого участка полипептидной цепи все углы φ имеют близкие значения между собой и то же самое имеет место для углов ψ, то структура полипептидной цепи приобретает периодический характер. Такие регулярные элементы пространственной структуры называют *вторичной структурой белка.* В белках широко представлены два типа таких периодических структур – α-спирали и β-складки.

Спиральной является структура, у которой все однотипные атомы расположены на одной винтовой линии. При этом спираль считается правой, если при наблюдении вдоль ее оси она удаляется по часовой стрелке. В противоположной ситуации (удаляется от наблюдателя против часовой стрелки) спираль считается левой (рис. 67).

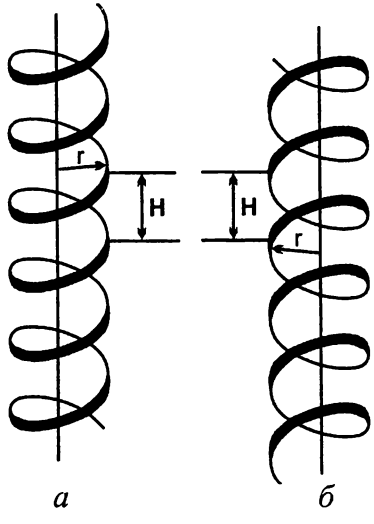


Рис. 67. Схематическое изображение спирали: *H* – шаг спирали; *r* – радиус; *а* – правая спираль; *б* – левая спираль

В спиральной пептидной цепи на одной винтовой линии находятся все хиральные атомы C^{α}, на другой – все атомы N, на третьей – все атомы C' При этом для всех групп атомов должен быть один и тот же шаг спирали H

и одинаково число атомов на один виток спирали. Расстояние r до винтовой оси для каждой из групп атомов различно, но должно быть приблизительно одинаковым для всех атомов, формирующих свою винтовую линию.

Среди различных возможных типов спиралей в белках наиболее распространена конформация, получившая название *α-спираль*. Это правая спираль, конформация которой стабилизирована образованием водородных связей между C=O группой каждого *i*-го остатка аминокислоты и N-H группой (*i*+*4*)-го остатка, где *i* – порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи. При этом на один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка (рис. 68). Такая структура была впервые предсказана Л. Полингом и Р. Кори, которые исходили из данных по геометрии небольших пептидных фрагментов, полученных к тому времени с помощью рентгеноструктурного анализа. Модель была построена авторами исходя из того, что структура должна обеспечить максимально возможное число водородных связей.

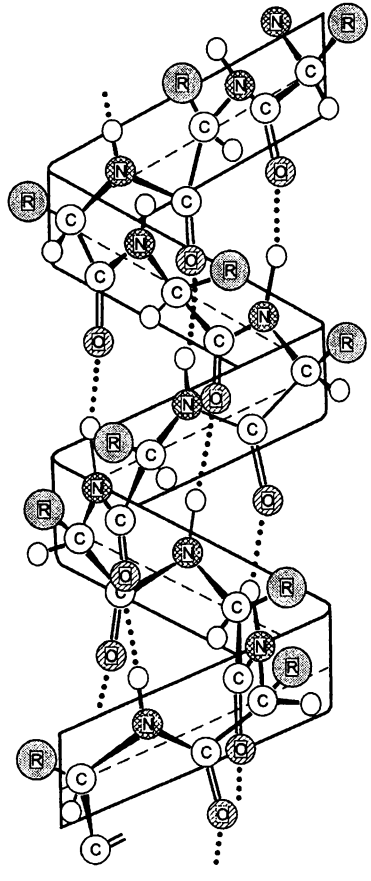


Рис. 68. Фрагмент α-спирали полипептидной цепи. Зачернены боковые радикалы R, заштрихованы карбонильные атомы O, пунктиром отмечены атомы N

Проведенный к настоящему времени рентгеноструктурный анализ сотен белков показал наличие у многих из них α-спиральных фрагментов. Естественно, что идеальная α-спираль в белках не реализуется, поскольку на параметры спирали в разной степени оказывают влияние боковые радикалы аминокислотных остатков. В идеальной спирали угол φ должен составлять -57^0, а угол ψ -47^0. Расстояние до оси спирали должно быть для атомов N 0,15 нм, для атомов C^α – 0,23 нм, для атомов C' – 0,17 нм.

В табл. 12 в качестве иллюстрации приведены найденные из рентгеноструктурных данных параметры для α-спирального фрагмента фосфоглицераткиназы, фермента, катализирующего реакцию

$$^-O_3P\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}COO^- + ATP \rightarrow {}^-O_3P\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}COOPO_3^- + ADP$$

Эта реакция является одной из стадий цикла Кальвина, в результате которого при фотосинтезе происходит фиксация CO_2 молекулой рибулозо-1,5-дифосфата, приводящая через ряд промежуточных реакций к синтезу фруктозо-6-фосфата.

Из приведенных в таблице данных видно, что все основные геометрические параметры не одинаковы, но в пределах α-спирального фрагмента они не сильно отличаются от величин, рассчитанных для идеальной спирали. В то же время те же параметры для примыкающих участков могут резко отличаться от идеальных величин. Эти отличия видны лишь по значениям торсионных углов, поскольку величины расстояний до оси не имеют смысла, так как при отсутствии спиральной конформации отсутствует и сама ось.

Таблица 12

Геометрические параметры α-спирального фрагмента полипептидной цепи фосфоглицераткиназы

Амино-кисл. остаток	Номер	Торсионные углы		Расстояния до оси винтовой линии		
		φ	ψ	N	C^α	C'
Ile	254	–119,5	142,3	–	–	–
Phe	255	–106,6	–115,1	–	–	–
Asn	256	–109,2	113,7	–	–	–
Lys	257	–52,7	–51,6	0,155	0,210	0,170
Ala	258	–63,8	–48,9	0,141	0,217	0,147
Val	259	–51,1	–28,5	0,142	0,217	0,165
Gly	260	–59,9	–56,8	0,126	0,213	0,154
Pro	261	–62,9	–51,1	0,156	0,229	0,172
Glu	262	–57,7	–48,5	0,159	0,234	0,173
Ile	263	–60,5	–50,7	0,155	0,227	0,170
Ala	264	–57,9	–46,8	0,168	0,236	0,162

Окончание табл. 12

Lys, α-спираль	265	–61,4	–55,3	0,163	0,210	0,155
Leu	266	–60,0	–43,4	0,141	0,224	0,161
Met	267	–53,3	–46,0	0,145	0,217	0,155
Glu	268	–57,9	–50,1	0,141	0,210	0,165
Lys	269	–53,4	–42,5	0,142	0,228	0,164
Ala	270	–53,9	–46,8	0,157	0,227	0,167
Lys	271	–57,4	–50,1	0,152	0,230	0,166
Ala	272	–61,1	–50,9	0,154	0,227	0,179
Lys	273	–59,8	–47,6	–	–	–
Gly	274	–129,4	–86,1	–	–	–

Примечание. Для сравнения даны также параметры для атомов, непосредственно примыкающих к спиральному участку

Другим столь же существенным элементом вторичной структуры белка являются *β-складки*. Их образование связано со взаимодействием между двумя участками полипептидной цепи, расположенными так, что между этими участками образуются водородные связи между C'=O одного фрагмента и N-H-группами второго фрагмента. Каждый фрагмент такой складки состоит из двух плоских участков двух цепей, которые сочленены образованием водородных связей C'=O····H-N между двумя разными цепями. При этом вторая цепь может быть либо параллельна, либо антипараллельна первой. Обе цепи могут быть участками одной полипептидной цепи, либо, при образовании комплекса между двумя белками, участками двух разных полипептидных цепей (рис. 69).

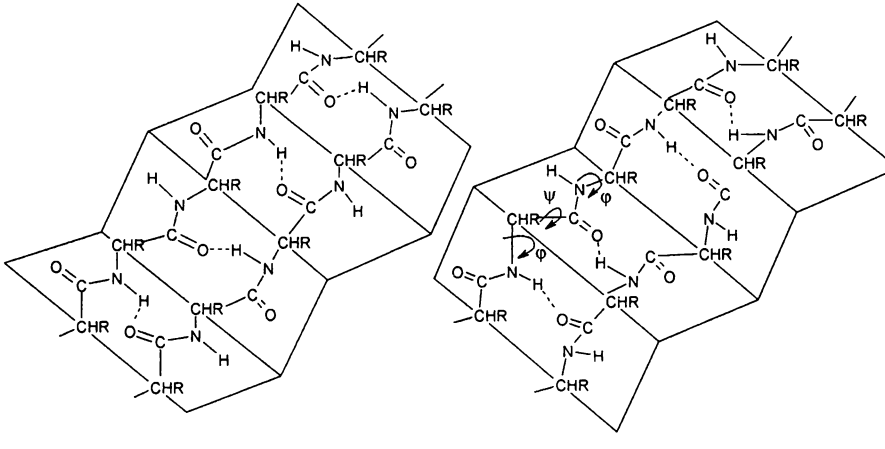


Рис. 69. Конформация β-складчатой структуры: параллельная и антипараллельная ориентации связанных полипептидных цепей

В идеализированной β-складке торсионные углы должны иметь значения $\varphi = -119^0$ и $\psi = +113^0$. Как и в случае α-спирали, реальные значения этих углов несколько отличаются от идеальных из-за влияния боковых радикалов. В качестве примера в табл. 13 представлены данные для фрагмента 282–286 полипептидной цепи фосфоглицераткиназы. Для сравнения даны также параметры для атомов, примыкающих к структурированному фрагменту.

Из приведенных в таблице данных видно, что в образовании β-складки участвует пептид Asp-Phe-Ile-Ile-Ala.

Какую конформацию примет тот или иной участок полипептидной цепи зависит от его первичной структуры. Но существенное влияние могут оказывать и другие участки белковой молекулы, так что задача установления вторичной структуры по первичной до сих пор не имеет однозначного решения.

Таблица 13

Некоторые геометрические параметры β-складки фрагмента полипептидной цепи фосфоглицераткиназы

Аминокисл. остаток	Номер	Торсионные углы	
		φ	ψ
Val	281	109,8	–27,7
Asp	282	–133,8	125,3
Phe	283	–142,6	154,6
Ile	284	–124,8	132,7
Ile	285	–137,6	144,0
Ala	286	–135,0	139,8
Asp	287	–8,2	–91,3

Образование систем водородных связей в α-спиралях и β-складках частично элиминирует полярность гидрофильной полипептидной цепи, что допускает существование таких элементов внутри глобулы.

9.1.3. Третичная структура белков

Высшим уровнем пространственной организации полипептидной цепи является лишенная какой-либо периодичности *третичная структура*. Под этим термином понимают полную укладку в пространстве всей полипептидной цепи, включая и укладку боковых радикалов. Полное представление о третичной структуре дают координаты всех атомов белковой молекулы. Такие сведения получают в первую очередь с помощью рентгеноструктурного анализа и двумерной ЯМР-спектроскопии. В настоящее время такие данные получены для многих сотен белков. Сведения для каждого из белков представляют собой огромное количество информации, которую накапливают в специальных банках данных по пространственной структуре белков. Однако их обработка в большинстве случаев возможна лишь с помощью вы-

сокоэффективных ЭВМ. Эти данные позволяют получить полные сведения о геометрии белковых молекул, в частности выявить α-спиральные участки, β-складки и участки, не имеющие периодической структуры. Именно опираясь на данные, взятые из банка данных, ученые получили все сведения о геометрии фрагментов фосфоглицераткиназы, приведенные в табл. 12 и 13.

Изображение пространственной структуры молекулы в целом с приведением каждого атома и даже просто каждого аминокислотного остатка дает очень сложную, лишенную наглядности картину и практически не используется. Более наглядным и поэтому довольно часто используемым является представление структуры в виде системы цилиндров, изображающих α-спиральные фрагменты; стрелок, изображающих β-складки, и линий, соединяющих элементы вторичной структуры. Острие стрелки располагают на С-конце складки. Такое изображение не подразумевает, что фрагменты цепи, соединяющие элементы вторичной структуры, не имеют достаточно жесткой пространственной структуры. Эти участки лишены простой периодичности и не могут рассматриваться как фрагменты вторичной структуры.

На рис. 70 представлена пространственная структура фосфоглицераткиназы – фермента, детальное описание двух фрагментов которого было дано выше.

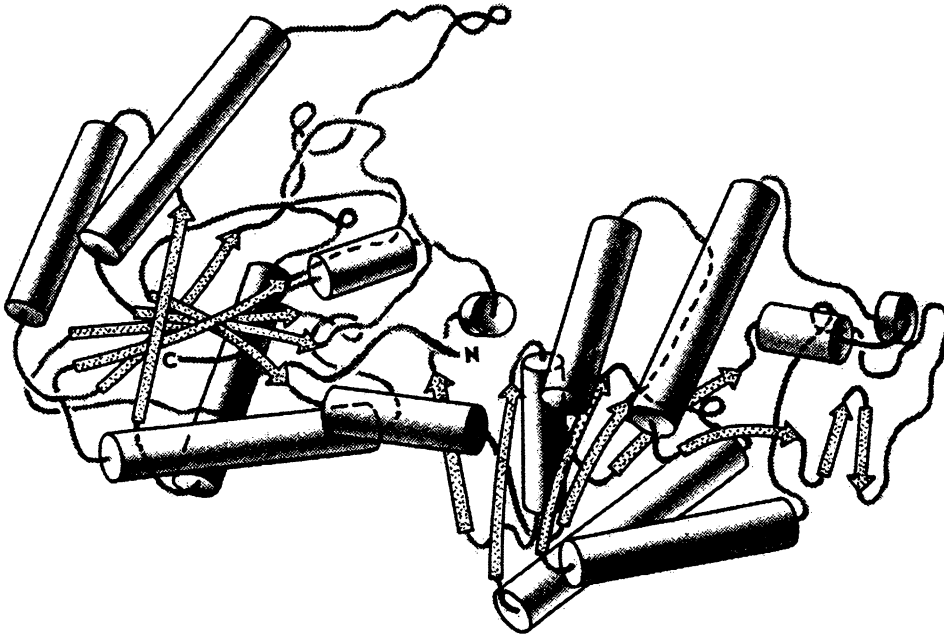


Рис. 70. Общая схема строения фосфоглицераткиназы

Видно, что фермент содержит 14 α-спиральных фрагментов и 13 β-складок. Этот пример показывает, что структура отчетливо разделяется на две

достаточно автономно устроенных половины. Такие части общей третичной структуры, как уже говорилось при рассмотрении строения иммуноглобулинов в разд. 6.2.3, называют доменами. В большом числе случаев, если белок имеет несколько активных центров (например, если фермент катализирует реакцию между двумя или тремя субстратами), активные центры белков разнесены по разным доменам. В приведенном случае установлено, что один из доменов взаимодействует с АТР, а другой – с 3-фосфо-глицератом. Каждый домен имеет свою третичную структуру.

Соотношение числа β-складок с числом α-спиралей может быть весьма разнообразным. Известны белки, которые состоят только из α-спиралей. Примером может служить белок мышечных клеток *миоглобин*, содержащий молекулу гема и способный присоединять в качестве одного из лигандов гема молекулу O_2, которую он получает от молекулы гемоглобина.

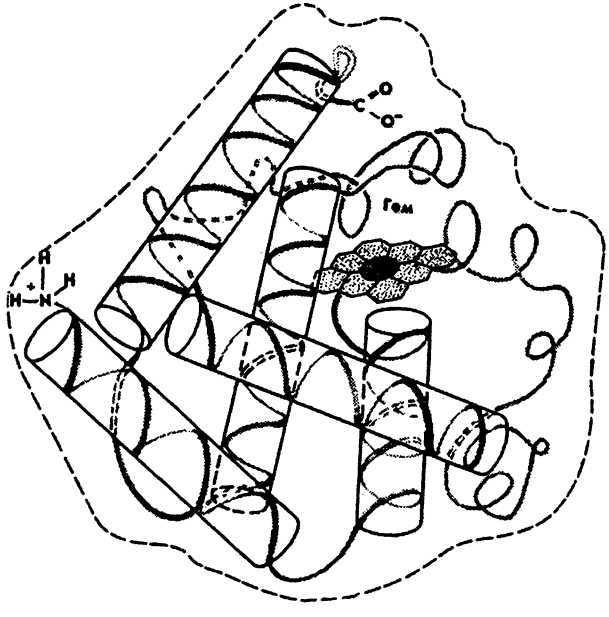


Рис. 71. Схема пространственной структуры миоглобина

Второй крайний случай может быть представлен структурой цепи иммуноглобулина, которая построена из девяти β-складчатых элементов и не содержит ни одной α-спирали (рис. 72).

Но в большинстве случаев достаточно сложные белки имеют смешанные α/β-структуры. Несколько элементов вторичной структуры часто характеризуются определенным взаимным пространственным расположением, встречающимся у целого ряда белков. Такие расположения получили название *мотивов*. Эти мотивы в ряде случаев имеют определенное функциональное

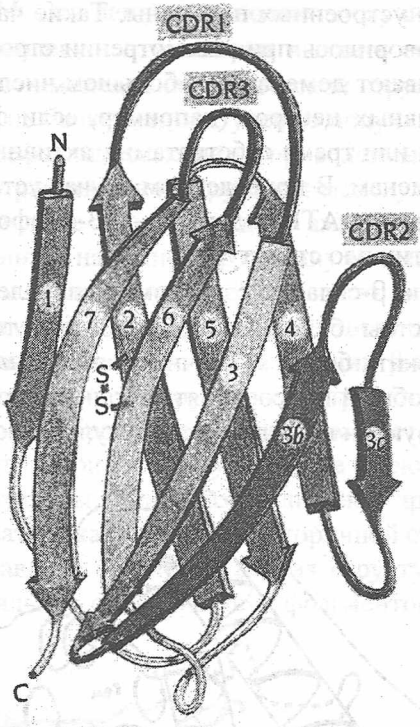


Рис. 72. Схема пространственной структуры вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина G. CDR – complementary determining regions, области, определяющие комплементарность (специфичное связывание с антигеном)

значение. Например, узнавание участков ДНК регуляторными белками прокариот происходит при наличии у них мотивов α-спираль-поворот-α-спираль.

Даже изображение пространственной структуры в виде столбиков (α-спирали), стрелок (β-складок) и соединяющих их линий является достаточно громоздким и не всегда удобным для восприятия. Поэтому иногда приводят упрощенную схему, на которой безотносительно к третичной структуре α-спирали изображают в виде столбиков, а β-складки – в виде утолщенных стрелок, соединенных линиями. Такой способ изображения получил название *топологических диаграмм*. На рис. 73 представлена схема пространственной структуры и топологическая диаграмма домена, связывающего кофермент некоторых дегидрогеназ.

Взаимное расположение α-спиралей и β-складок отнюдь не носит случайного характера. На рис. 74 приведена пространственная структура и топологическая диаграмма фермента триозофосфатизомеразы, катализирующего взаимопревращение фосфоглицеринового альдегида и диоксиацетонфосфата, одного из ключевых ферментов гликолиза (деградации глюкозы).

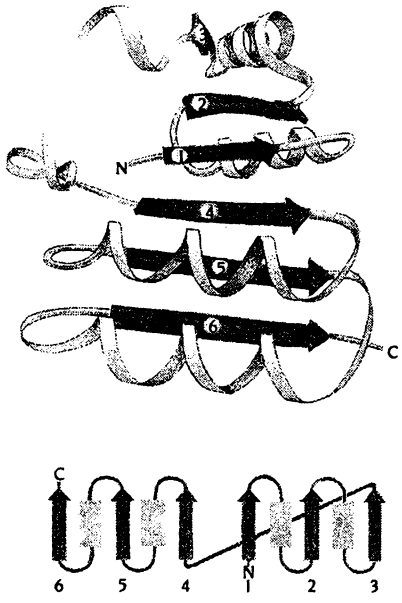


Рис. 73. Схема пространственной структуры и топологическая диаграмма домена, связывающего кофермент некоторых дегидрогеназ

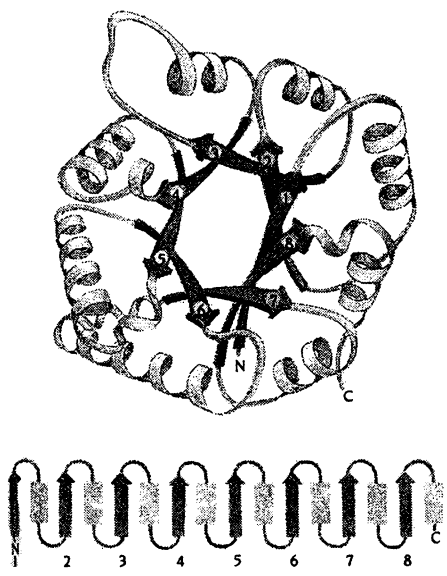


Рис. 74. Схематическая структура и топологическая диаграмма триозофосфатизомеразы

Как видно из рис. 74, белок состоит из ядра, образованного восемью параллельными β-складками, на поверхности которого расположено восемь α-спиралей. Приведенную структуру ядра часто называют бочонком, и она встречается у большого числа белков.

9.1.4. Фибриллярные белки

Наряду с глобулярными белками в живых организмах широко представлены белки, выполняющие структурную функцию. Они имеют нитевидную форму и называются *фибриллярными белками*. В их первичной структуре присутствуют повторяющиеся мотивы, формирующие достаточно однотипную для всей полипептидной цепи вторичную структуру. Так, белок *α-кератин*, основной белковый компонент копыт, ногтей, волос, шерсти, рогов, панцирей черепах, построен из протяженных α-спиралей. Фиброин шелка, из которого формируется куколка тутового шелкопряда, на большом протяжении представлен фрагментами Gly-Ala-Gly-Ser, формирующими β-складки. Полипептидные цепи коллагена, основного белка сухожилий, хрящей и некоторых других тканей, в значительной степени построены из фрагментов Gly-X-Pro и Gly-X-Hyp, где Hyp – остатки гидроксипролина, а X может быть

весьма разнообразна. Последовательности аминокислот коллагена формируют левые спирали с параметрами, существенно отличающимися от таковых для α-спирали. Три таких спиральных полипептида скручены в единую суперспираль.

§ 9.2. Белки, состоящие из нескольких полипептидных цепей (четвертичная структура белков). Нуклеопротеиды

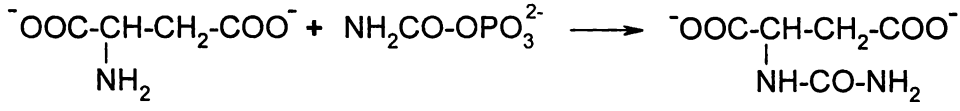
Большое число белков, выполняющих определенные биологические функции, состоит из нескольких полипептидных цепей, связанных нековалентными взаимодействиями в прочный, не разрушаемый при обычных методах выделения комплекс. В ряде случаев полипептидные цепи дополнительно ковалентно связаны дисульфидными мостиками. Этот уровень строения белков называют *четвертичной структурой*. Примерами белков с четвертичной структурой являются уже рассмотренные инсулин (см. § 7.4, рис. 54) и иммуноглобулины (см. § 6.2, рис. 48). Отдельные полипептидные цепи, формирующие четвертичную структуру, называют *субъединицами*. Определение субъединичного состава проводится путем разделения (как правило, электрофорезом) субъединиц в растворах, способствующих разрушению сильных нековалентных взаимодействий, например, в растворах гуанидина или мочевины и в присутствии додецилсульфата натрия. Если есть основания полагать, что субъединицы связаны дисульфидными мостиками, то перед разделением нужно разрушить эти связи, используя реакцию дисульфидного обмена с избытком низкомолекулярного тиола, например, меркаптоэтанола или дитиотреита.

Число белков, обладающих четвертичной структурой, очень велико. Простейшими из них являются димеры, состоящие из двух одинаковых субъединиц. В этих случаях, как правило, наличие двух субъединиц связано с существованием между ними кооперативных взаимодействий. В качестве примера можно привести триптофанил-тРНК-синтетазу. Отдельные субъединицы этого фермента в составе димера взаимодействуют только с одной молекулой тРНК, связывание которой делает вторую субъединицу неактивной по отношению к тРНК. Субъединицы обычно обозначают греческими буквами с нижним индексом, указывающим на число каждой из разнотипных субъединиц. В данном случае четвертичная структура записывается как α_2.

Наряду с этим широко распространены комплексы, состоящие из двух структурно и функционально различных субъединиц. В случае ферментов часто одна из субъединиц является каталитической, а вторая – регуляторной. Типичным примером таких димеров являются протеинкиназы – ферменты, катализирующие фосфорилирование белков. В ряде случаев каталитическая субъединица такого фермента способна осуществлять фосфорилирование

белка-субстрата только при наличии на регуляторной субъединице специального эффектора.

У ряда ферментов пара каталитическая-регуляторная субъединица повторяется многократно. Таким ферментом является, например, аспартаткарбамоилтрансфераза, катализирующая взаимодействие аспартата с карбамоилфосфатом,



(первая стадия биосинтеза пиримидиновых оснований). Этот фермент состоит из шести одинаковых пар каталитических и регуляторных субъединиц.

Число различных субъединиц может быть существенно больше двух. Из четырех различных субъединиц состоит РНК-полимераза из *Escherichia coli*. Она имеет структуру $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Субъединица σ необходима для взаимодействия фермента с промотором и обеспечивает правильную ориентацию фермента относительно точки начала транскрипции. Ее участие в комплексе с транскрибируемой нитью ДНК нужно лишь на первый период инициации транскрипции. После образования короткого транскрипта длиной порядка 10 нуклеотидных остатков происходит отщепление субъединицы от комплекса, и дальнейшая элонгация полирибонуклеотидной цепи осуществляется в комплексе $\alpha_2\beta\beta'$ Еще более сложно устроены РНК-полимеразы эукариот. Так, РНК-полимераза II из дрожжей состоит из 12 разных субъединиц.

В живой природе широко представлены комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, которые называют нуклеопротеидами. Важнейшим примером нуклеопротеидного комплекса являются рибосомы, общие принципы строения которых были описаны в § 1.7. Нуклеиновые кислоты в составе этих комплексов можно рассматривать как субъединицы.

Одним из наиболее информативных подходов к изучению взаимного расположения субъединиц в составе многосубъединичных белков и нуклеопротеидов является применение *бифункциональных реагентов*, которые содержат две реакционноспособные группы и могут осуществлять химическую модификацию двух компонентов комплекса. Первая модификация может происходить по любой из субъединиц, содержащей способный к реакции остаток мономера. После этого вторая модификация может проходить только по субъединице, находящейся на достаточно близком расстоянии от первой точки модификации. В результате две субъединицы оказываются ковалентно связанными (сшитыми), что дает определенную информацию об их взаимном расположении в составе многосубъединичного белка или нуклеопротеида.

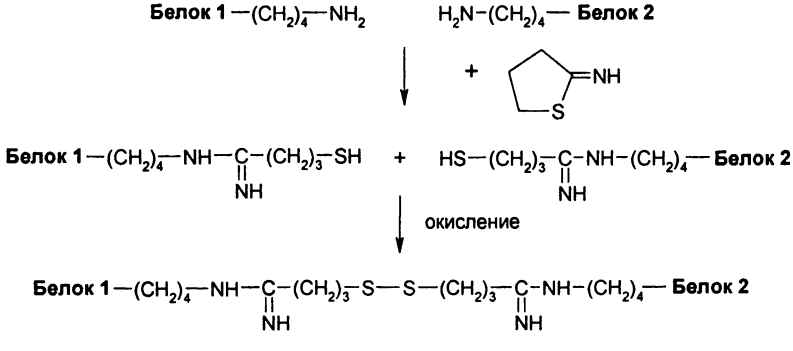
Бифункциональные реагенты для изучения многосубъединичных белков могут в принципе быть созданы на основе любых соединений, способных реагировать с какими-либо боковыми радикалами аминокислотных остатков,

присутствующих в исследуемых белках. Для выбора этих реагентов полезно предварительно иметь сведения об аминокислотном составе белков, формирующих изучаемый комплекс. Выбранные группы соединяются с помощью специального связующего их *спейсера* (*линкера*).

Для изучения нуклеопротеидов используются реагенты, у которых одна из групп реакционноспособна к каким-либо боковым радикалам аминокислотных остатков, а другая – к боковым радикалам нуклеотидов. Образовавшиеся при действии бифункциональных реагентов продукты сшивки могут быть разделены с помощью хроматографии или электрофореза.

Первоочередной задачей после их выделения является выяснение, какие именно компоненты комплекса оказались сшитыми. Каждый из компонентов комплекса в используемой системе разделения имеет определенное положение, которое позволяет его идентифицировать. Однако, будучи сшитым с помощью бифункционального реагента с каким-либо другим макромолекулярным компонентом комплекса, он, естественно, займет в этой системе разделения совершенно другое положение. Поэтому особенно перспективным является использование таких бифункциональных реагентов, содержащие наряду с наличием двух реакционноспособных групп группу (функцию), по которой после выделения можно расщепить линкер, после чего сшитые компоненты могут быть разделены. В используемой для разделения системе они займут положение, близкое к положению исходных компонентов, от которых они отличаются лишь небольшими дополнительными остатками при модифицированных аминокислотах в составе биополимеров. Такие реагенты называются полифункциональными.

В качестве конкретного примера использования подобного типа реагентов можно привести широко применяемый для этих целей иминотиолан, взаимодействующий с остатками лизина и вводящий в модифицируемые белки остатки SH. Последующее окисление приводит к образованию S-S-мостиков между сшитыми белками. После выделения сшитых белков мостики могут быть легко разрушены с образованием белков, которые отличаются от сшиваемых белков всего лишь наличием небольших дополнительных остатков $HS-(CH_2)_3-C{=}NH$:



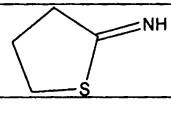
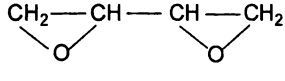
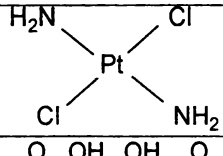
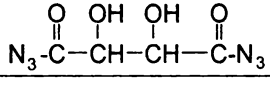
Такая же методология используется и для изучения организации нуклеопротеидов, к числу которых относятся рибосомы, нуклеосомы и вирусы. В этом случае целесообразно использовать такие бифункциональные реагенты, у которых одна из реакционноспособных групп реагирует преимущественно с какими-либо аминокислотными остатками, а другая – с остатками нуклеотидов.

В качестве реакционноспособных групп бифункциональных реагентов нашли применение имидоэфирные группы, реагирующие с ε-аминогруппами остатков лизина; эпоксигруппы, реагирующие с атомами N7 остатков гуанина, ε-аминогруппами остатков лизина и SH-группами остатков цистеина; диаминодихлорплатина, образующая координационные соединения с остатками серусодержащих аминокислот, имидазольным кольцом остатков гистидина и атомами N7 остатков гуанина; азиридиновое кольцо, образующее при облучении радикалы карбена; азидогруппы, образующие при облучении радикалы нитрена, и многие другие.

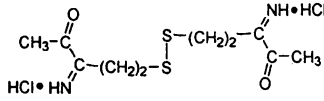
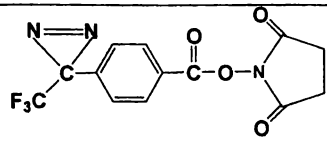
В табл. 14 приведены некоторые бифункциональные реагенты с расщепляемыми спейсерами, которые использовались для изучения четвертичной структуры бактериальных рибосом и их субъединиц. В качестве расщепляемых в приведенной таблице показаны спейсеры с S-S-фрагментами, которые легко разрушаются окислением или обработкой тиолами; с диэпоксигруппами, которые после алкилирования превращаются в *цис*-диольные, расщепляемые окислением перйодатом, омыляемыми сложноэфирными группами – C(O)O-. Сшивка диаминодихлорплатиной может быть разрушена добавлением тиомочевины.

Таблица 14

Структурные формулы некоторых бифункциональных реагентов

Название реагента	Структурная формула	Реагирующие группы в белках и РНК
2-иминотиолан		ε-аминогруппы остатков лизина
диэпоксибутан		атомы N7 остатков гуанина, ε-аминогруппы остатков лизина, SH-группы остатков цистеина
транс-дихлордиаминоплатина (II)		S-атомы остатков цистеина и метионина, имидазольные кольца остатков гистидина, атомы N7 остатков гуанина
тартилдиазид		ε-аминогруппы остатков лизина

Окончание табл. 14

диметил-3,3-дитио-бис(пропион-имидат) дигидрохлорид		ε-аминогруппы остатков лизина
азиридин		все остатки, способные реагировать с карбеном

Основные данные о третичных и четвертичных структурах макромолекул, а также о структуре их комплексов с малыми молекулами накапливаются в банке данных PDB. Об этом детально будет рассказано в гл. 20, посвященной биоинформатике.

Глава 10. Химический синтез пептидов и белков

§ 10.1. Общие проблемы химического синтеза полипептидов

Пептидная связь образуется при взаимодействии N-компонента, являющегося донором амидной группы, и С-компонента – донора карбонильной группы. Для *химического синтеза полипептида* длиной *n* аминокислотных остатков необходимо образовать n-1 пептидную связь. Как и при синтезе олиго- и полинуклеотидов, это может быть достигнуто либо *блочным методом* путем синтеза нескольких более коротких пептидов и их последующим соединением, либо ступенчатым наращиванием растущей полипептидной це-пи аминоацильными остатками с N- или С-конца. В настоящее время преимущественно используется ступенчатый синтез с наращиванием цепи с N-конца.

Первый синтез биологически активного пептида был осуществлен Дю Виньо и его коллегами в 1953 году. Ими были синтезированы два девятизвенных пептидных гормона – окситоцин и вазопрессин. За этим последовал синтез 39-звенного адренокортикотропного гормона, основной функцией которого является стимуляция коры надпочечников.

В начале 1960-х годов был осуществлен синтез человеческого инсулина – важного препарата для лечения такого распространенного заболевания, как сахарный диабет, вызываемый недостатком или отсутствием у больного инсулина. Этот препарат нужен в больших количествах, так как его нужно вводить больным ежедневно в виде инъекций. Структура человеческого инсулина, который длительное время использовался в качестве основного препарата для ежедневных инъекций больных диабетом, приведена на рис. 75. Химический синтез инсулина был важным достижением биоорганической химии, хотя в настоящее время этот метод получения инсулина не используется. Человеческий инсулин получают генно-инженерными методами. Как видно из приведенной формулы на рис. 75, инсулин состоит из двух полипептидных цепей: цепи А, состоящей из 21 аминокислотного остатка, и цепи В (30 аминокислотных остатков), соединенных двумя дисульфидными мостиками.

Наконец, в 1969 году был завершен первый синтез фермента – РНКазы из поджелудочной железы (РНКазы А), катализирующей расщепление РНК по межнуклеотидным остаткам, связывающим пиримидиновый нуклеотид со следующим за ним произвольным рибонуклеотидом.

Пептидная связь – прочная связь. Это находит отражение в величине свободной энергии гидролиза амидной связи, $\Delta G^0_{гидр} \approx -12$ кДж/моль (от –3 до –4 ккал/моль). Для образования пептидных связей необходимо затратить энергию. Это достигается либо использованием активированного производ-

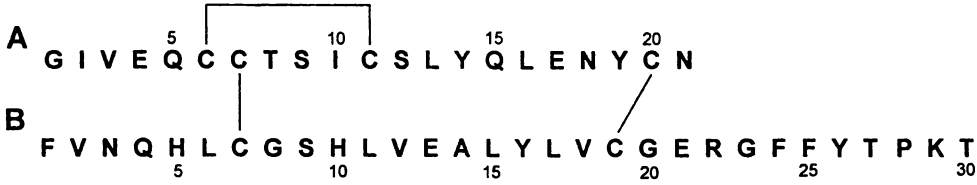


Рис. 75. Структура человеческого инсулина. А и В – полипептидные цепи, линиями обозначены дисульфидные мостики

ного одного из компонентов, которое способно реагировать со вторым компонентом без затраты энергии, либо путем сопряжения образования пептидной связи с каким-либо превращением, сопровождающимся существенным понижением свободной энергии. Во всех нашедших применение в пептидной химии активированных производных активации подвергается карбоксильная группа С-компонента. В этом случае энергия затрачивается при получении активированного производного. В качестве таковых используются ангидриды (§ 10.2) и активированные эфиры (§ 10.4). Сопряжение также реализуется в карбодиимидном методе синтеза, который основан на промежуточном образовании производного с активированной карбоксильной группой С-компонента, но без его выделения (§ 10.3).

При соединении С-компонента с N-компонентом нужно избежать как реакции между двумя молекулами С-компонента, так и реакции между двумя молекулами N-компонента. Эта проблема совершенно аналогична рассмотренной при олигонуклеотидном синтезе. Все используемые методы пептидного синтеза основаны на реакции активированного С-компонента с N-компонентом. Поэтому при образовании каждой новой пептидной связи нужно использовать С-компонент, α-аминогруппа которого защищена так, чтобы защитную группу можно было бы удалить перед стадией образования следующей пептидной связи без повреждения ранее образованных. Эта защитная группа является временной. Аналогично у N-компонента должна отсутствовать свободная карбоксильная группа или какие-либо ее активированные производные. Кроме того, активированные карбоксильные группы и реагенты, используемые для их введения, могут взаимодействовать с некоторыми из боковых радикалов аминокислот, и последние также следует защищать для введения этих аминокислот в пептидный синтез. Такие защитные группы должны сохраняться на протяжении всего синтеза и удаляться на заключительной стадии, т. е. являются постоянными. Используемые в пептидной химии методы введения и удаления защитных групп описываются в § 10.5–10.7. Для ступенчатого синтеза, следовательно, в общем виде уравнение для каждой стадии удлинения пептидной цепи можно записать следующим образом:

$$Z\text{-}NH\text{-}CHR_i\text{-}CO\text{-}X + NH_2\text{-}CHR_{i-1}\text{-}CO\text{-}NH\cdots \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{Z-NH-CHR}_i\text{-CO-NH-CHR}_{i-1}\text{-CO-NH}\cdots$$

где Z – временная защитная группа, R – защищенные боковые радикалы, X – остаток, активирующий карбоксил. По этой схеме синтез проводится в направлении N-конца создаваемой цепи.

Защитные группы, кроме своей основной функции (предотвращение нежелательных реакций), могут выполнять некоторые «дополнительные» функции: изменять растворимость пептида, его гидрофобность, молекулярную массу и т. д.

Наконец, для получения пептидов и белков необходимо сохранение оптической чистоты получаемых продуктов. Между тем активация карбоксильной группы и само образование пептидной связи в той или иной мере сопровождается некоторым обращением конфигурации при α-углеродном атоме, т. е. рацемизацией аминокислотного остатка. Механизм рацемизации и методы, позволяющие в наибольшей мере избежать ее, рассмотрены в § 10.9.

§ 10.2. Методы образования пептидных связей. Метод смешанных ангидридов

Первые работы по образованию пептидных связей между аминокислотами были выполнены в самом начале XX века. Эмиль Фишер (Fischer, 1903) применил для этого ацилирование α-аминогруппы одной аминокислоты хлорангидридом другой аминокислоты, защищенной с помощью группы Z по аминогруппе:

$$\text{Z-NH-CHR-C(O)-Cl} + \text{NH}_2\text{CHR}_1\text{C(O)OC}_2\text{H}_5 \rightarrow$$

$$\rightarrow \text{Z-NHCHRC(O)NHCHR}_1\text{C(O)OC}_2\text{H}_5$$

где Z – защитная группа.

Теодор Курциус (Curtius, 1902) предложил для той же цели азидный метод, в котором ацилирующим агентом служил азид защищенной по аминогруппе аминокислоты, получавшийся последовательной этерификацией карбоксильной группы, превращением эфира в гидразид, обработкой гидразином и превращением последнего в азид обработкой азотистой кислотой:

$$Z\text{-}NH\text{-}CHR_1\text{-}C(O)OC_2H_5 + NH_2NH_2 \rightarrow Z\text{-}NHCHR_1C(O)NHNH_2$$

$$Z\text{-}NHCHR_1C(O)NHNH_2 + HNO_2 \rightarrow NH_2CHR_1C(O)N_3$$

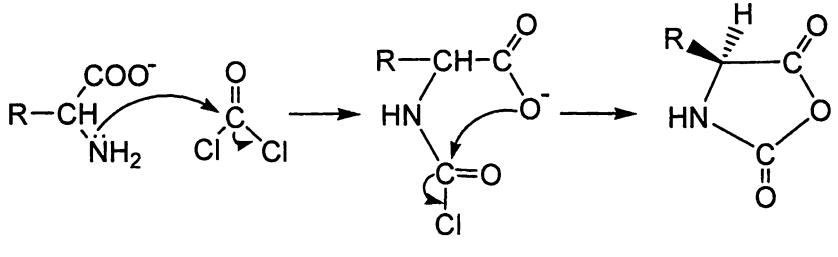
$$Z\text{-}NHCHR_1C(O)N_3 + NH_2CHR_2COOZ' \rightarrow Z\text{-}NHCHR_1CONHCHR_2COOZ'$$

где Z, Z' – защитные группы, R_1,R_2 – боковые радикалы.

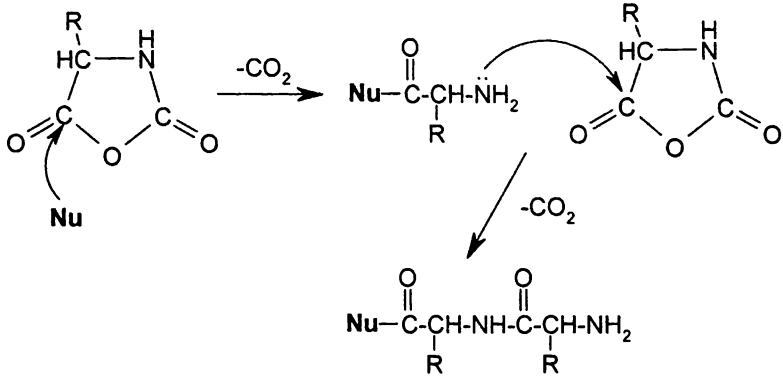
Оба подхода могут квалифицироваться как *метод смешанных ангидридов*, поскольку хлорангидриды рассматриваются как смешанные ангидриды аминокислоты и HCl, а азиды – как смешанные ангидриды с азотистоводородной кислотой HN_3.

В дальнейшем были использованы и другие смешанные ангидриды, но в настоящее время метод смешанных ангидридов не используется в связи с созданием более эффективных и менее осложненных рацемизацией методов, рассматриваемых в следующих разделах этой главы.

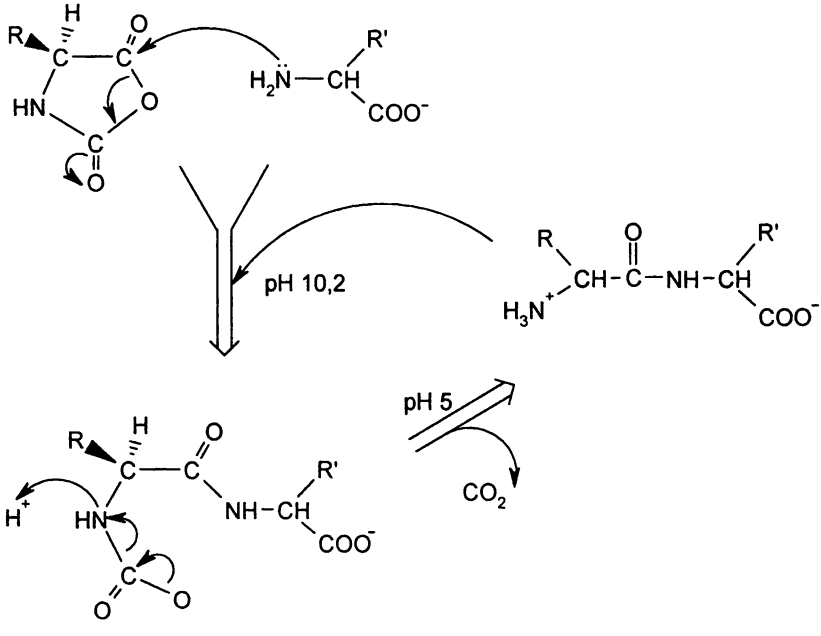
Стоит упомянуть применение внутримолекулярных ангидридов, образующихся при обработке α-аминокислот фосгеном. При реакции с фосгеном аминогруппа образует фрагмент хлорангидрида карбаминовой кислоты, который затем взаимодействует с α-карбоксильной группой, превращаясь в N-карбоксиангидрид (*ангидрид Лейкса,* по имени получившего его автора).



Такие ангидриды могут использоваться для ступенчатого синтеза пептидов, но свое основное применение они нашли для синтеза полиаминокислот, сыгравших большую роль в установлении общих принципов формирования пространственной структуры белков. В присутствии нуклеофила **Nu**, роль которого, в частности в щелочной среде, могут играть α-NH_2-группы следовых количеств свободной аминокислоты, происходит ацилирование нуклеофила с освобождением фрагмента карбаминовой кислоты. При слабокислых pH последний декарбоксилируется, и освобождается новая аминогруппа, которая в щелочной среде может ацилироваться новой молекулой ангидрида Лейкса.



Многократное повторение этих процессов приводит к полиаминокислоте. Такой подход требует постоянного регулирования pH среды: конденсация *N*-карбоксиангидрида с аминокислотой проводится при pH 10,2, при подкислении до pH 5,0 осуществляется *N*-декарбоксилирование производных карбаминовой кислоты, затем цикл реакции повторяется. Обычно синтез ведут при температуре 0–3 ^{0}C в течение 2 мин на каждую стадию (иногда этот прием с «качанием» на каждой стадии между двумя значениями pH называют «pH-весы»).



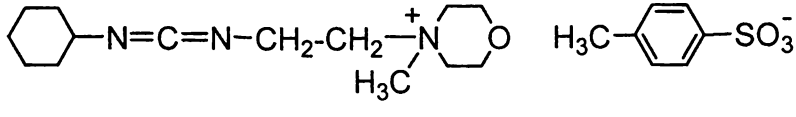
Рацемизация, возможная во время пребывания системы в щелочной среде, при синтезе полиаминкислот незначительна.

§ 10.3. Карбодиимидный метод синтеза

Как уже говорилось в начале этой главы, для осуществления процесса образования пептидной связи необходимо затратить энергию. Одним из подходов к решению этой задачи является *карбодиимидный синтез* – образование пептидной связи сопряженно с гидратацией дизамещенных *карбодиимидов,* протекающей по реакции

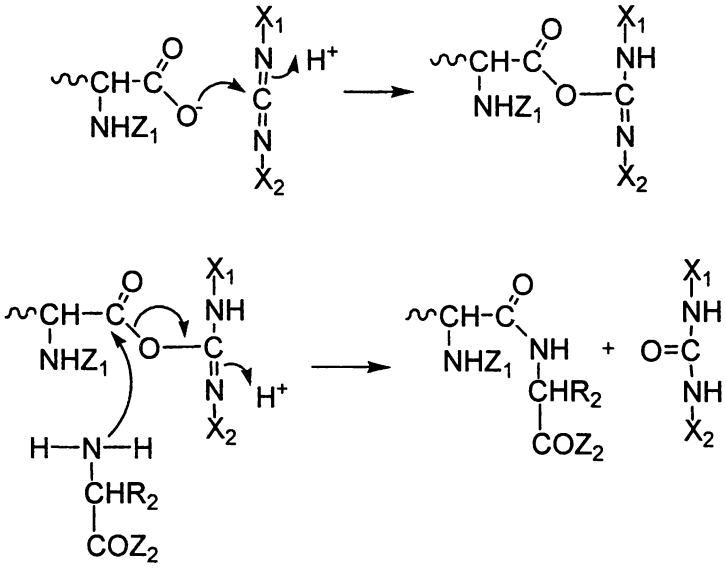
$$X_1\text{-}N{=}C{=}N\text{-}X_2 + H_2O \rightarrow X_1\text{-}NH\text{-}CO\text{-}NH\text{-}X_2$$

Этот реагент, введенный в практику пептидного синтеза в 1955 году Дж. Шиеном и Г. Гессом, в дальнейшем сыграл важную роль в решении целого ряда задач химии пептидов и нуклеотидной химии. Авторы предложили использовать для конденсации двух аминокислот *N,N'-дициклогексилкарбодиимид* (ДЦК). При смешении в эквимолярных количествах *N*-защищенной аминокислоты и сложного эфира другой аминокислоты в присутствии этого реагента происходит быстрое образование пептидной связи, а побочный продукт реакции (*N,N'*-дициклогексилмочевина, ДЦГМ) легко удаляется благодаря чрезвычайно низкой ее растворимости в применяемых для проведения реакции растворителях. В некоторых случаях целесообразно использовать карбодиимиды с другими заместителями. В частности, нашли разнообразное применение водорастворимые карбодиимиды, например, 1-циклогексил-3-(2-морфолинийэтил)карбодиимид (в виде *п*-толуолсульфоната) и 1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид.

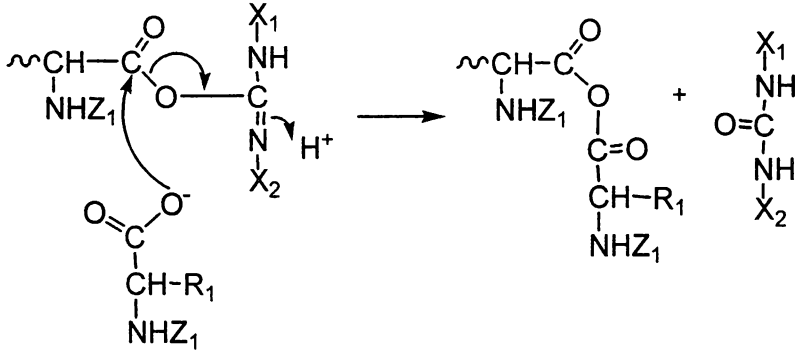


$$C_2H_5\text{-}N{=}C{=}N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N(CH_3)_2$$

Активация карбоксильной группы аминокислоты происходит в результате атаки карбоксилат-аниона на атом С протонированного карбодиимида. По-видимому, при этом образуется активное промежуточное соединение – *дизамещенная О-ацилизомочевина.* Последняя, скорее всего в протонированной форме, атакует α-аминогруппу N-компонента с образованием пептидной связи с защищенной по N-концу второй аминокислотой, образуя соответствующий пептид.



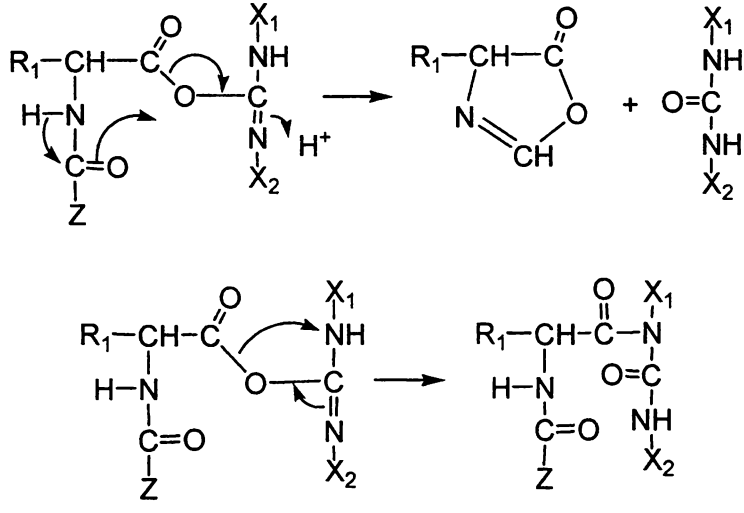
Из-за высокой реакционной способности *O*-ацилизомочевина обладает низкой селективностью к различным кислород- и азотсодержащим нуклеофилам. Поэтому аминолиз обычно сопровождается конкурентными реакциями с другими нуклеофилами, в том числе со вторым карбоксилат–анионом с образованием ангидрида, с атомом N второй молекулой карбодиимида с образованием N-ацилмочевины и внутримолекулярной реакцией с атомом N собственной α-амидной группой с образованием 5(4H)-оксазолона. (В литературе эту же структуру можно встретить под названиями азлактон, дигидрооксазол-1,3-он-5, оксазолинон, 1,3-оксазолинон-5, 2-оксазолинон-5.)



Образующийся в этой реакции ангидрид достаточно реакционноспособен и может реагировать с *N*-компонентом с образованием пептидной связи. При этом от ангидрида отщепляется С-компонент, который может снова активироваться карбодиимидом и образовывать новую пептидную связь. Образова-

ние ангидрида протекает даже при соотношении ДЦК и карбоксильной группы *N*-защищенной аминокислоты 1:1, поскольку карбоксильная группа реагирует с *O*-ацилизомочевиной быстрее, чем с ДЦК.

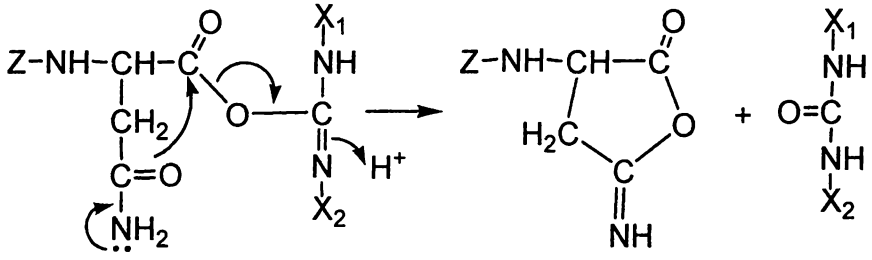
Кроме того, происходят побочные реакции, приводящие к нереакционноспособным побочным продуктам.



В присутствии других нуклеофилов протекающие с ними реакции *O*-ацилизомочевины уменьшают уровень приведенных выше побочных превращений. Условия, в которых предпочтительно протекает межмолекулярная нуклеофильная атака *O*-ацилизомочевины, способствуют уменьшению числа побочных реакций и, следовательно, приводят к получению более чистого конечного продукта, содержащего значительно меньшие количества 5(4H)-оксазолона или *N*-ацилмочевины.

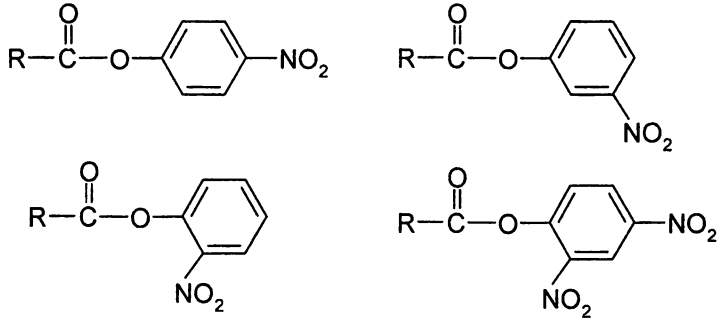
В растворителях с низкими значениями диэлектрической проницаемости (CCl_4, CH_2Cl_2, C_6H_6) образуется значительно меньшее количество *N*-ацилмочевины, чем в полярных средах (*N,N*-диметилформамид (ДМФА), ацетонитрил, диметилсульфоксид (ДМСО), H_2O). Это объясняется тем, что в неполярных растворителях карбоновые кислоты находятся преимущественно в виде димеров. Например, константа ассоциации уксусной кислоты в CCl_4 имеет порядок 2000, тогда как в ацетонитриле – только 0,5. Димеры реагируют с ДЦК в 30 раз быстрее, чем мономеры, образуя с высоким выходом ангидриды и почти не давая *N*-ацилмочевину.

О-ацилизомочевина, образованная аспарагином, может подвергаться внутримолекулярной циклизации по реакции



§ 10.4. Метод активированных сложных эфиров

В начале 1950-х годов для активации карбоксильной группы в пептидном синтезе был предложен новый способ, основанный на использовании сложных эфиров с хорошей уходящей группой, т. е. активированных эфиров (*метод активированных эфиров*). Впервые этот метод был осуществлен на примере *п*-нитротиофениловых эфиров аминокислот. В дальнейшем в связи с неприятным запахом *п*-нитротиофенола, выделяющегося в результате реакции аминолиза, стали использоваться другие нитрофениловые эфиры.



Наибольшее распространение при синтезе пептидов получили *п*-нитрофениловые эфиры. Особых различий в скоростях ацилирования производными мононитрозамещенных фенолов не наблюдается, однако при их получении *п*-нитрофениловые эфиры защищенных аминокислот кристаллизуются лучше других. Высокая стабильность при хранении позволила выпускать коммерчески доступные *п*-нитрофениловые эфиры защищенных аминокислот. 2,4-Динитрофениловые эфиры оказались чрезвычайно активными и вследствие этого весьма чувствительными к гидролизу.

Широкое распространение в пептидном синтезе получили и другие ариловые эфиры. Структурные формулы арильного остатка и реакционная способность сложных эфиров (константа скорости ацилирования k_0) представлены в табл. 15.

Таблица 15

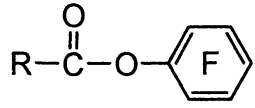
Сравнение реакционной способности активированных эфиров (23 ± 1 ^{0}C)

ROH*	Название	k_0x10^2, $M^{-1}c^{-1}$	Время ацилирования на 90 %, мин
HO–C$_6$F$_5$	пентафторфенол	40 ± 9	2,9
HO–C$_6$H$_3$(NO$_2$)$_2$	2,4-динитрофенол	18,4 ± 3	6,3
HO–N(C=O)CH$_2$CH$_2$(C=O)	*N*-гидроксисукцинимид	5,4 ± 0,7	21
HO–C$_6$Cl$_5$	пентахлорфенол	1,72 ± 0,03	62
HO–C$_6$H$_2$Cl$_3$	2,4,5-трихлорфенол	0,3 ± 0,03	385
HO–C$_6$H$_4$–NO$_2$	*n*-нитрофенол	0,1 ± 0,01	1088

* ROH – спиртовый компонент эфира.

Реакционная способность замещенных ариловых эфиров определяется двумя факторами: 1) константой диссоциации фенольного гидроксила и 2) доступностью реакционного центра атома углерода карбонильной группы для нуклеофильного агента. Последнее зависит от степени пространственного экранирования электрофильного центра за счет введения заместителя в *орто*-положение к эфирной связи. Так, сложные эфиры на основе 2,4,5-трихлорфенола (pK_a 9,45) по способности к аминолизу примерно аналогичны *n*-нитрофениловым эфирам аминокислот (pK_a 9,27). В то же время, хотя пентахлорфенол (pK_a 5,65) и пентафторфенол (pK_a 5,32) имеют близкие величины констант диссоциации ОН-групп, скорость ацилирования пентахлорфениловыми эфирами в результате указанного экранирования в 20 раз ниже, чем соответствующими пентафторфениловыми эфирами. В отличие от атомов хлора, атом F в *орто*-положении не вызывает пространственного эк-

ранирования атома углерода карбонильной группы, так как ван-дер-ваальсов радиус атома фтора значительно меньше, чем у хлора, и ненамного больше, чем у водорода. В связи с этим лучшими в серии сложных эфиров на основе галогензамещенных фенолов можно считать пентафторфениловые эфиры.

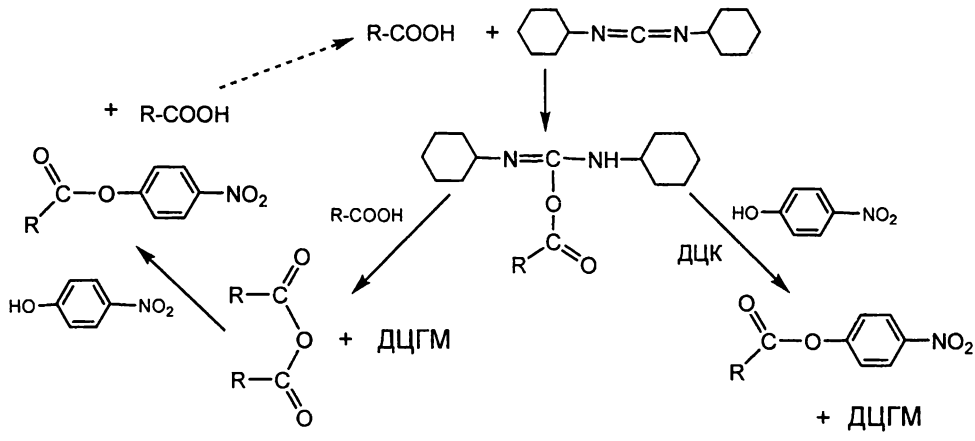


Поскольку атомы фтора проявляют сильный электроноакцепторный эффект и в то же время не создают стерических препятствий, пентафторфениловые эфиры можно применять для проведения реакции в пространственно-затрудненных условиях, например, при твердофазном синтезе. В настоящее время пентафторфениловые и *N*-гидроксисукцинимидные эфиры являются наиболее широко используемыми вариантами активации карбоксильной группы в аминокислотах при проведении синтеза на полимерных носителях.

Галогензамещенные фениловые эфиры, в отличие от нитропроизводных, предпочтительно использовать, если в ходе синтеза удаление таких защитных групп, как бензилоксикарбонильные, проводится путем гидрогенолиза, поскольку в противном случае из остаточных количеств *п*-нитрофенола получается высокореакционноспособный *п*-аминофенол.

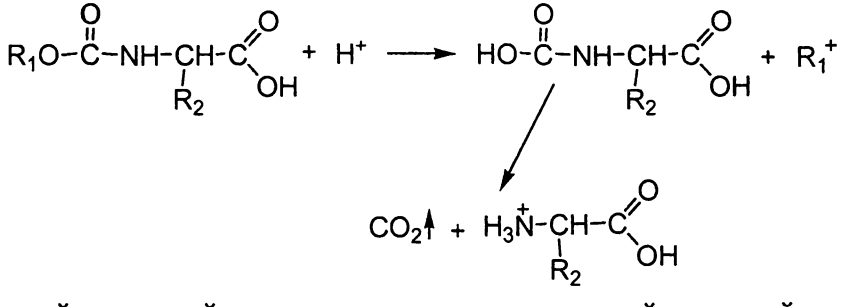
Активированные эфиры – очень удобные реагенты для синтеза пептидов. Основным их достоинством является то, что, в отличие от смешанных ангидридов, они выдерживают длительное хранение и могут быть приготовлены заранее и поэтому выпускаются как коммерческие продукты. Применяя избыток активированного эфира (30–50 %), можно достичь практически количественного выхода желаемого продукта на каждой стадии процесса. Избыток активированных эфиров можно удалять после окончания реакции добавлением *N,N*-диметилэтилендиамина. При ацилировании этого амина непрореагировавшим эфиром образуется соединение, способное легко растворяться в кислотах и поэтому без труда удаляемое при промывках растворами кислот.

Для получения ариловых эфиров защищенных аминокислот используют ДЦК. Реакция между защищенной аминокислотой, ДЦК и нуклеофилом, например, *п*-нитрофенолом, может протекать по двум различным механизмам: 1) через взаимодействие *п*-нитрофенола с *O*-ацилизомочевиной и 2) через взаимодействие *п*-нитрофенола с симметричным ангидридом, образующимся в качестве промежуточного продукта. Если реализуется второй механизм, то аминокислота, освобождающаяся при его реакции с *п*-нитрофенолом, вновь реагирует с ДЦК, образуя в итоге активированный эфир аминокислоты и *N,N'*-дициклогексилмочевину (ДЦГМ). Эти же продукты образуются и при альтернативном механизме.

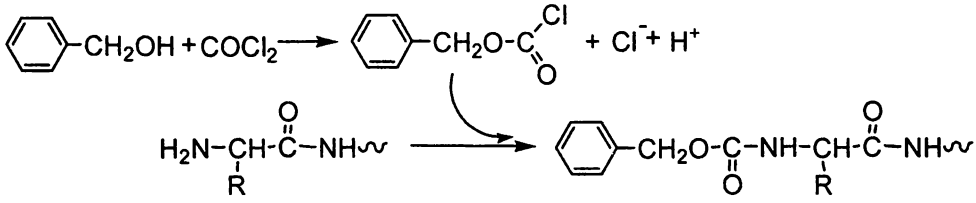


§ 10.5. Защитные группы в пептидном синтезе. Блокирование α-аминогрупп

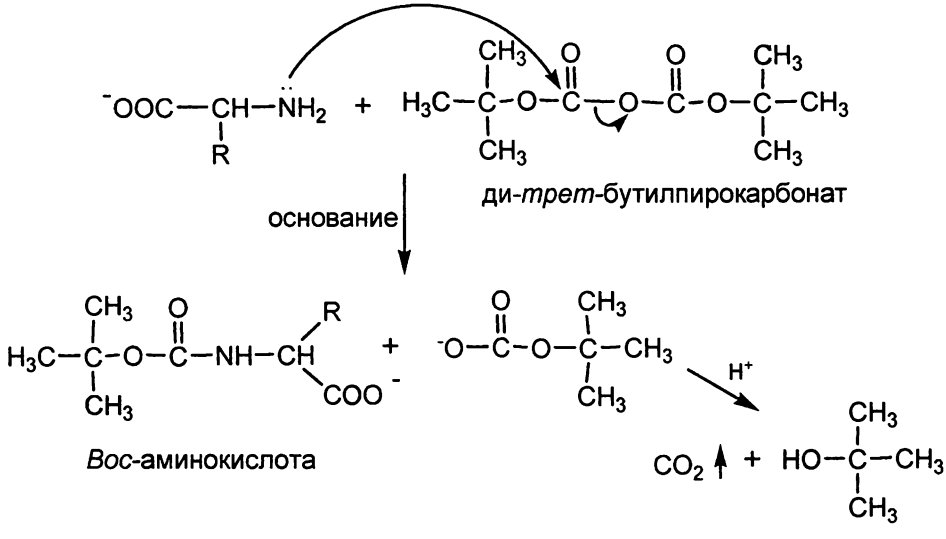
При проведении ступенчатого синтеза пептидов по α-аминогруппам исходных или активированных по карбоксильным группам аминокислот должны вводиться временные защиты. За период становления и развития работ по пептидному синтезу было разработано и применено большое число различных временных защит. Наиболее широкое применение нашли защитные группы уретанового типа. Подобные группы в кислой среде легко гидролизуются с последующим самопроизвольным декарбоксилированием образовавшегося на N-конце остатка карбаминовой кислоты по схеме



Первой нашедшей широкое применение временной защитной группой этого типа была *бензилоксикарбонильная* группа (*Cbz* или *Z*). Она вводится обработкой аминокислоты карбобенилоксихлоридом. Последний может быть получен путем насыщения бензилового спирта фосгеном.



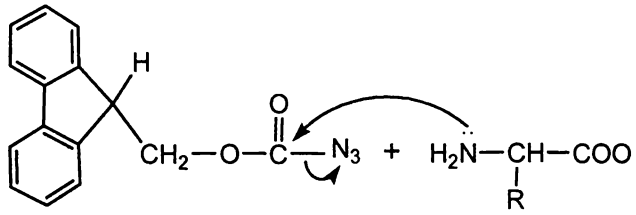
В настоящее время этот тип защиты по α-аминогруппам практически не используется, поскольку более удобным оказалось применение *трет-бутилоксикарбонильной* (*Boc*) группы, которая вводится обработкой аминокислоты *трет*-бутилпирокарбонатом (Boc_2O). Поскольку реакция проходит только с депротонированной аминогруппой, ее проводят в присутствии сильного основания.



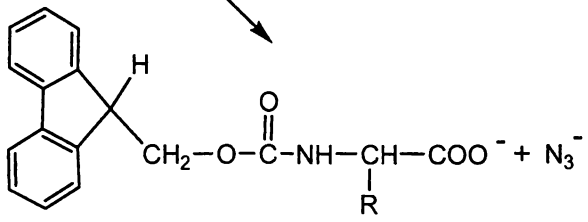
Эта защита удаляется при более мягких условиях, чем *Cbz-группа*.

Второй широко используемой защитной группой является *9-флуоренилметилоксикарбонильная* (*Fmoc*). Она вводится с помощью 9-флуоренилметилазидоформиата.

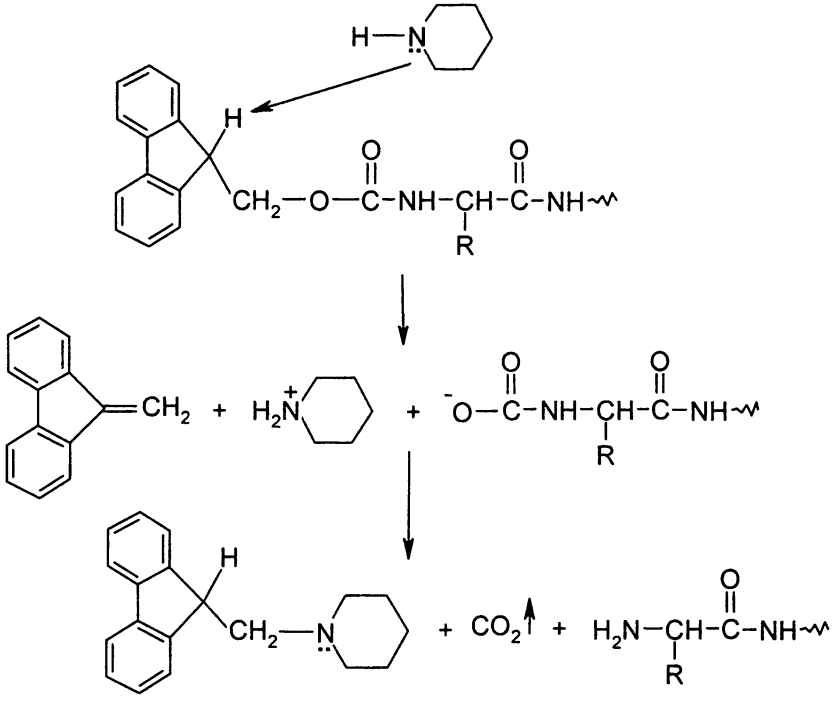
Fmoc-группа стабильна в кислой среде, но отщепляется основаниями: пиперидином, морфолином и др. В результате сильного электроноакцепторного эффекта бензольных колец атом водорода, находящийся в девятом положении, приобретает кислый характер и легко отрывается основаниями. Это ведет к возникновению карбаниона. Легкость деблокирования определяется в данном случае стабильностью карбаниона, который образуется путем β-элиминирования. Стабильность карбаниона обусловлена делокализацией



9-флуоренилметилазидоформиат



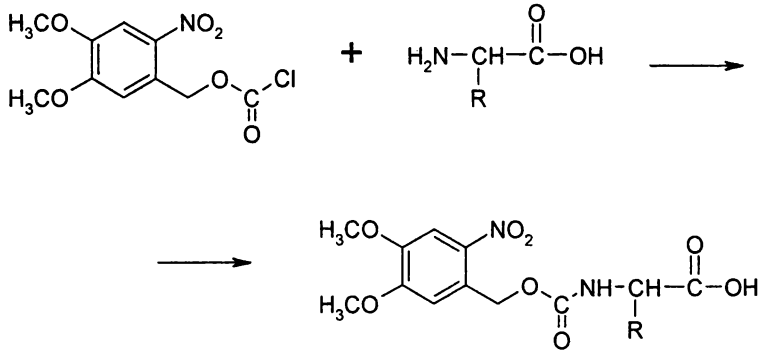
отрицательного заряда по всей ароматической дибензоциклопентадиенильной системе. Карбанион быстро распадается, образуя свободный аминокомпонент и дибензофульвен, который дает аддукт с основаниями.



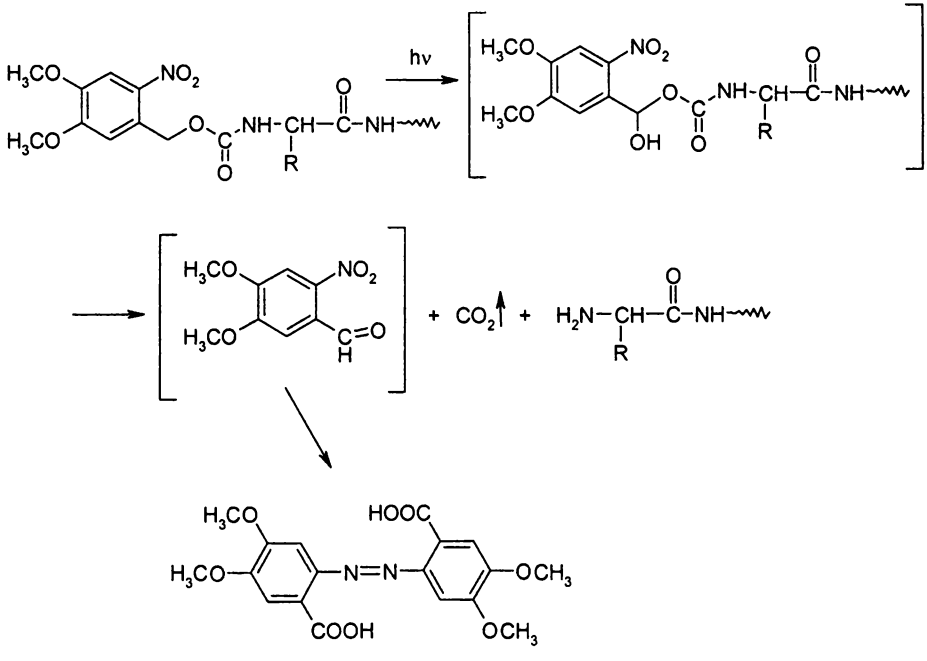
фульвен-пиперидиновый аддукт

В 1970 году для защиты N-конца растущего пептида в практику пептидного синтеза была введена *защитная группа, удаляемая фотохимически* –

6-нитровератрилоксикарбонильная защита (*NVOC*). *NVOC*-аминокислоты синтезируют путем взаимодействия 6-нитровератрилоксикарбонил-хлорида со свободной N^{α}-аминогруппой аминокислоты:



NVOC-защитная группа удаляется при облучении соответствующего пептида светом с длиной волны 350 нм с выделением CO_2 и образованием производного *о*-нитробензальдегида. Последнее при дальнейшем облучении может димеризоваться в азосоединение:

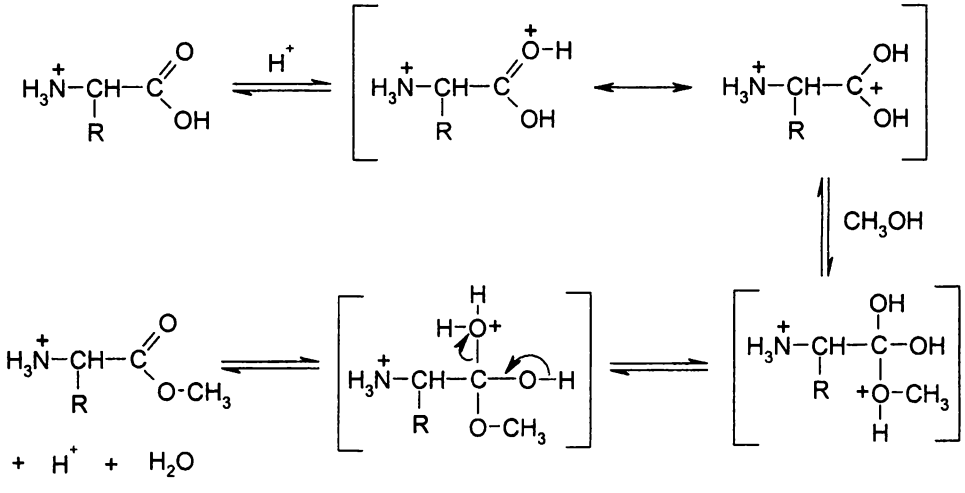


Эта защитная группа может быть использована для получения чипов, содержащих набор пептидов, методом фотолитографии, подобно получению олигонуклеотидных чипов, описанному в разд. 5.4.2.

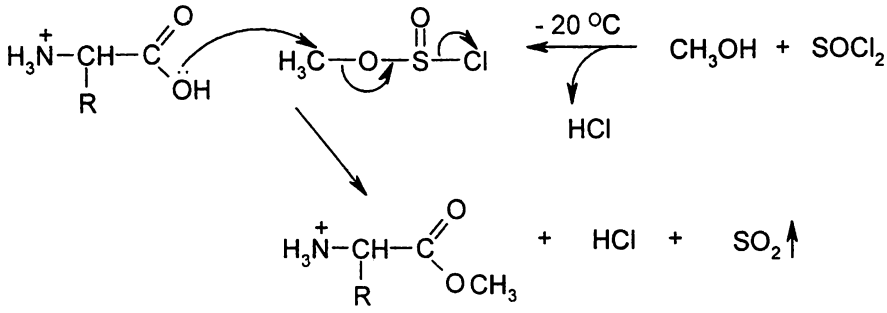
§ 10.6. Блокирование α-карбоксильных групп

Блокирование С-концевых карбоксильных групп в современных методах пептидного синтеза имеет существенно меньшее значение, чем блокирование α-аминогрупп, и необходимо лишь при гомогенном синтезе коротких пептидов. Образование новых пептидных связей проводится путем реакции активированной карбоксильной группы С-компонента с незащищенной аминогруппой N-компонента, и, естественно, активируемая карбоксильная группа защите не подлежит. При твердофазном пептидном синтезе (§ 10.9) С-концевая карбоксильная группа синтезируемого пептида используется для связывания его с полимерным носителем, т. е. защищена самим носителем. Только при получении коротких пептидов, в том числе для их последующего использования в блочном синтезе, С-концевая COOH-группа должна быть снабжена какой-либо временной защитой.

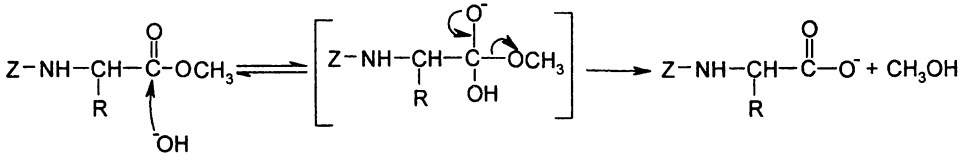
Для защиты С-концевого карбоксила широко используется его этерификация. Это достигается пропусканием безводного хлористого водорода через раствор аминокислоты в абсолютном метаноле или этаноле. Согласно общепринятому механизму реакции на первой стадии карбоксильная группа протонируется. Это повышает чувствительность к нуклеофильному реагенту, т. е. к соответствующему спирту.



Более удобным является этерификация в присутствии хлористого тионила по схеме:



Омыление метиловых и этиловых эфиров проводят при комнатной температуре в водно-спиртовых растворах едкого натра или в смеси NaOH с такими органическими растворителями, как ацетон, метанол, диоксан. Предполагается, что реакция идет по следующему механизму:



§ 10.7. Блокирование боковых групп в аминокислотах

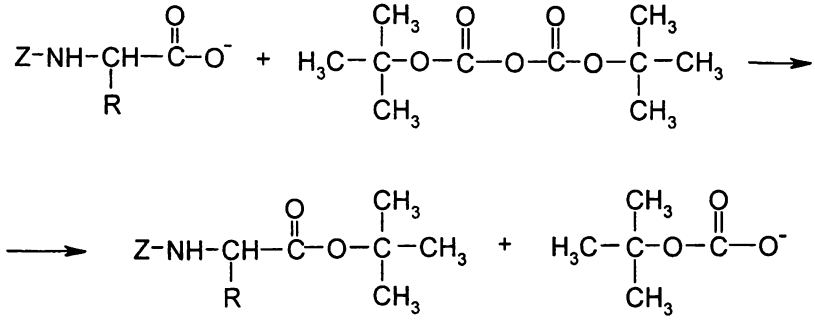
Степень блокирования боковых групп – важный вопрос при планировании синтеза. Его решение зависит от растворимости индивидуальных пептидов и от выбора методов конденсации. Боковые функции аспарагина, глутамина, серина, треонина, тирозина, аргинина и гистидина могут оставаться незащищенными (например, при использовании метода активированных эфиров). Боковая аминогруппа лизина, сульфгидрильная группа цистеина, индольный гетероцикл триптофана и боковые карбоксильные группы аспартата и глутамата должны защищаться при любой стратегии синтеза.

Полное блокирование всех функциональных групп, т. е. максимальная защита, оптимально способствует предотвращению нежелательных побочных реакций и обеспечивает свободу выбора методов конденсации. Однако некоторые используемые в настоящее время защитные группы вызывают такой нежелательный эффект, как понижение растворимости крупных пептидов в органических растворителях. В то же время одно из главных преимуществ минимальной защиты, особенно важное для промышленного производства пептидов и для синтеза крупных пептидов и белков, состоит в большей легкости удаления небольшого количества защитных групп при получении желаемого свободного пептида в конце синтеза.

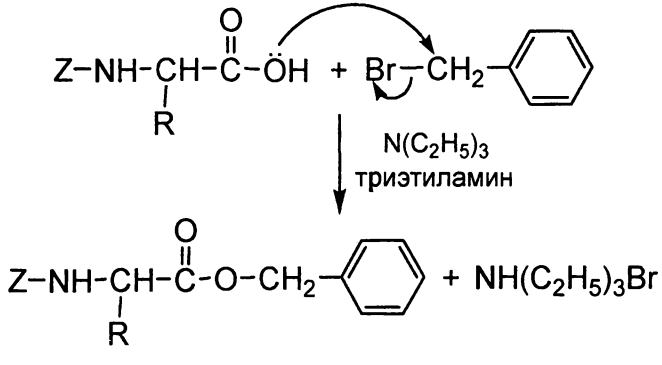
В зависимости от относительной реакционной способности α-аминогруппы аминокислоты и защищаемой боковой группы защита последней по вводится либо в исходную, либо в N-защищенную аминокислоту.

Для защиты карбоксильных боковых радикалов аспарагиновой и глутаминовой кислот наибольшее применение нашли *трет*-бутиловые и бензиловые эфиры. Простые алкиловые эфиры с боковыми карбоксильными группами для защиты боковых COOH-групп не используют, поскольку при их деблокировании на заключительной стадии синтеза возможна изомеризация пептидной связи, образованной α-карбоксильной группой остатка дикарбоновой аминокислоты, с образованием амидной связи с боковой карбоксильной группой.

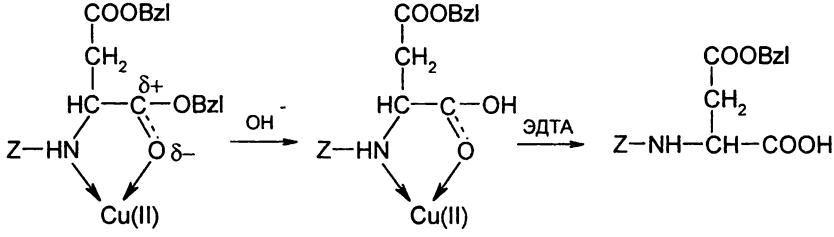
трет-Бутиловые эфиры можно получать с высоким выходом при взаимодействии защищенных аминокислот и ди-*трет*-бутилпирокарбоната.



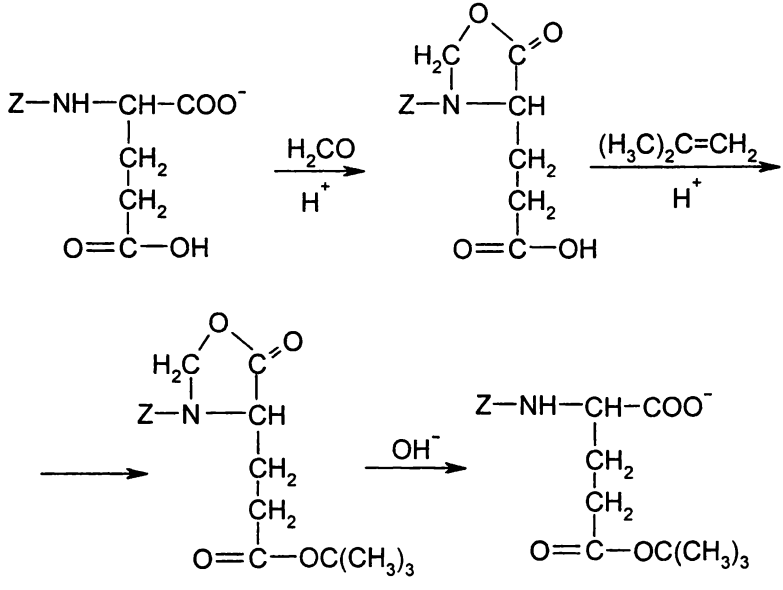
Синтез *бензиловых эфиров* проводят путем нагревания суспензии α-аминокислот в бензоле или четыреххлористом углероде с бензиловым спиртом в присутствии сульфокислоты, осуществляя одновременно азеотропную отгонку образующейся в процессе реакции воды. В ряде случаев этерификацию проводят путем обработки в присутствии основания бензилбромидом производных аминокислот, защищенных по всем группам, кроме карбоксильных.



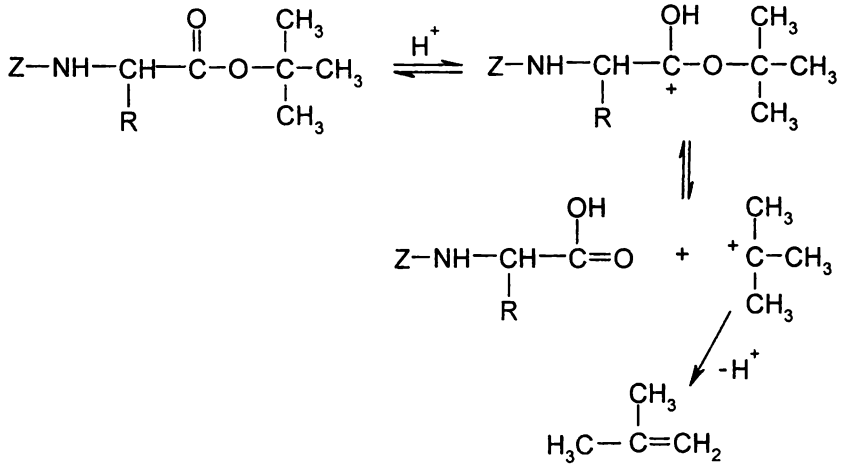
Вторая стратегия получения аминокислот с избирательно защищенной боковой COOH-группой состоит в получении диэфира с последующим селективным его гидролизом. Дибензиловые эфиры могут быть избирательно гидролизованы по α-эфирной связи в присутствии ионов меди, поскольку хелат образуется только с участием α-карбоксильной группы. В составе хелата карбоксильная группа поляризуется, что увеличивает электрофильность атома углерода и обеспечивает избирательность гидролиза:



Блокирование боковой карбоксильной группы с сохранением концевой COOH-группы для последующей ее активации проводится предварительным ее превращением в оксазалон по реакции с формальдегидом. В полученный оксазолон по боковой карбоксильной группе вводится *трет*-бутильная защита обработкой изобутиленом, после чего оксазолоновое кольцо разрушается в щелочной среде. Например, в случае глутаминовой кислоты схема процесса имеет вид:

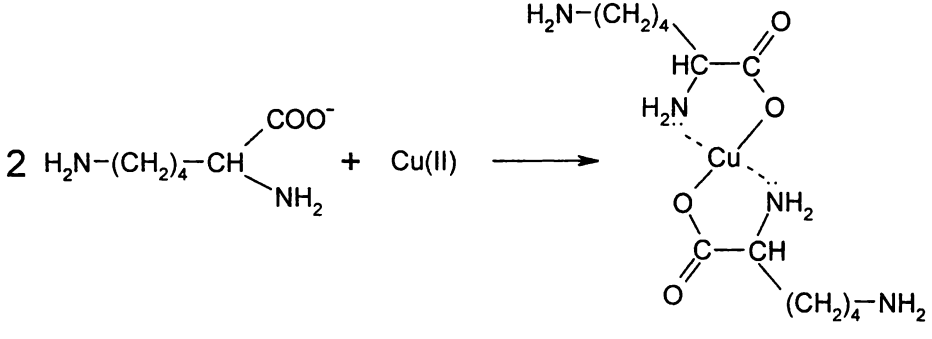


Удаление *трет*-бутильной защиты описывается схемой

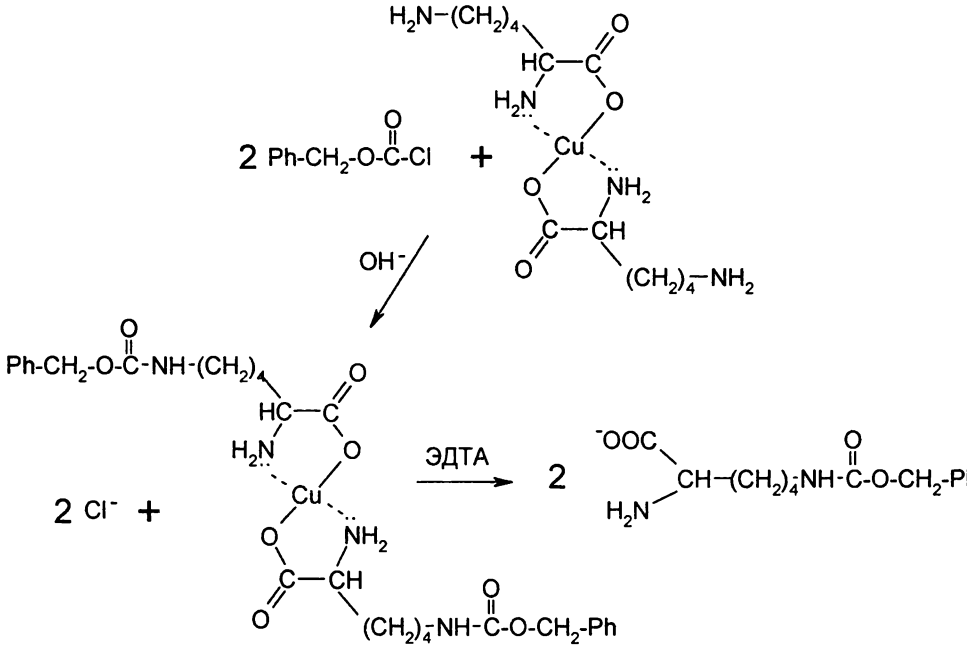


Для удаления бензильного остатка наиболее приемлемым является каталитическое гидрирование над Pd/C.

При защите ε-аминогруппы лизина с помощью какого-либо электрофильного реагента необходимо избежать его реакции с α-аминогруппой. Это может быть достигнуто путем формирования комплекса с ионами двухвалентной меди. Такому процессу способствует благоприятное взаимное расположение α-амино- и карбоксильной групп:

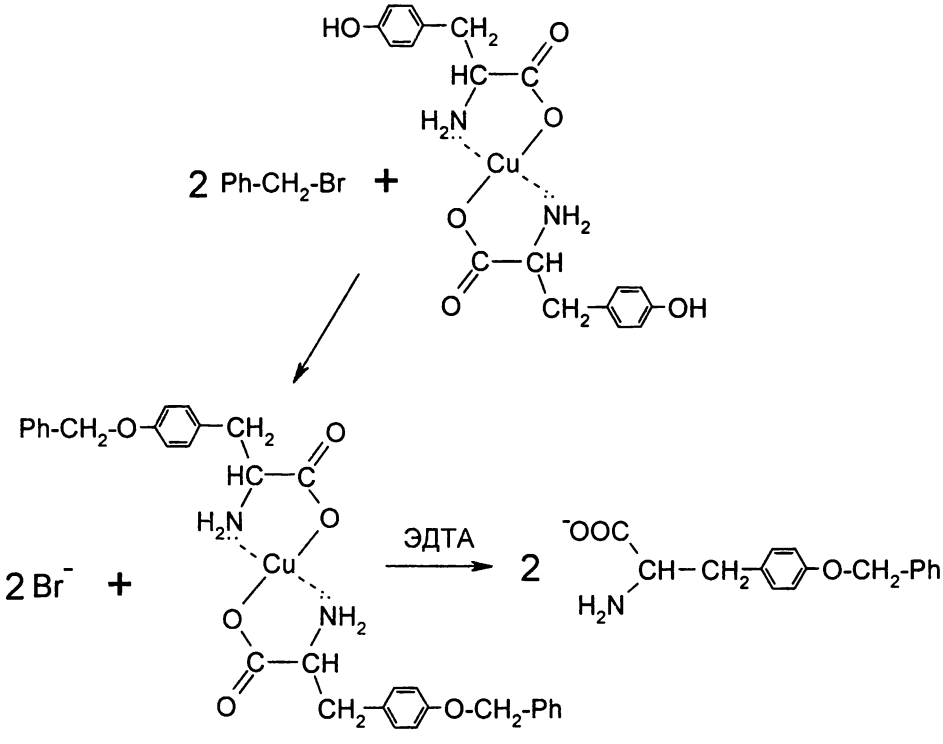


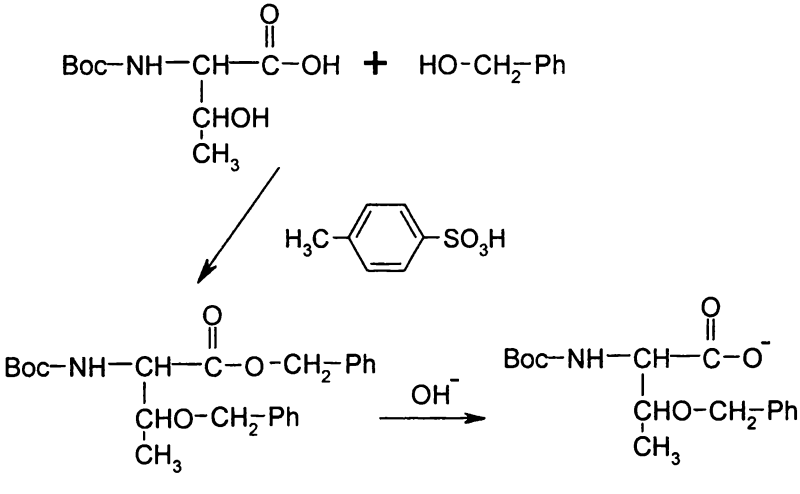
Участие неподеленных пар электронов α-аминогрупп в образовании координационной связи резко снижает их нуклеофильность, что позволяет избирательно ввести *защитную группу,* например, бензилоксикарбонильную, *по ε-аминогруппе лизина.* После введения защиты комплекс с ионами меди разрушают путем добавления хелатирующего соединения, например, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты).



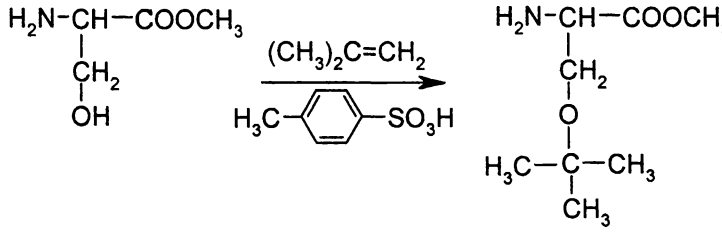
При некоторых методах создания пептидной связи необходима защита гидроксильных групп в тирозине, серине и треонине. Это достигается введением *бензильной* (*Bzl*) или *трет-бутильной* защиты с помощью соответствующих алкилирующих реагентов. Одновременно с реакцией по ОН-группе аминокислоты в обычных условиях происходит алкилирование карбоксильной группы этих аминокислот с образованием соответствующих сложных эфиров. Последние могут быть удалены щелочным омылением, при котором простые эфиры, образованные ОН-группами, не разрушаются.

Реакции алкилирующих реагентов с карбоксильными группами можно избежать, если при алкилировании использовать медные комплексы соответствующих аминокислот. Так, процессы, приводящие к получению *О*-бензилтирозина, описываются следующей схемой:



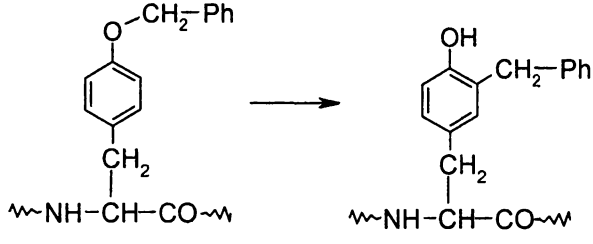


О-трет-бутиловые эфиры гидроксиаминокислот образуются с хорошим выходом при обработке свободных аминокислот или их метиловых эфиров изобутиленом в присутствии кислоты (H_2SO_4, TosOH, $BF_3 \cdot Et_2O$).



Удаление этой защитной группы в синтезированных пептидах проводится мягкой кислотной обработкой. Условия удаления *О-трет*-бутильной группы: HBr/CF_3COOH 30 мин, CF_3COOH – 6 ч.

Удаление *О*-бензильной группы остатков *О*-бензил-тирозина в синтезированных пептидах может быть проведено обработкой сильными кислотами (например, жидкий HF). Однако в этих условиях иногда происходят перегруппировки в ароматическом кольце.



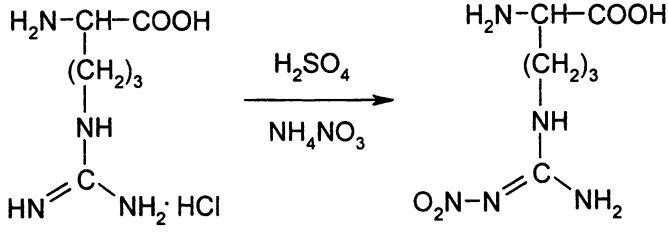
Для уменьшения степени протекания этого процесса при обработке пептидов жидким HF обычно используют защитные добавки (анизол, тиоанизол), которые играют роль своеобразных ловушек для реакционноспособных катионов.

Некоторые защитные группы для тирозина, например, *2,6-дихлорбензильная* [(2,6)Cl-Bzl], отличаются существенно меньшей способностью алкилировать кольцо Tyr в условиях деблокирования. Эта группа вводится путем обработки медного комплекса тирозина *О*-2,6-дихлорбензилбромидом. После завершения синтеза пептидной цепи защитная группа гладко удаляется безводным фтористым водородом в течение 1 ч при 0 ^{0}C.

Гуанидиновая группа аргинина является сильно основной (pK_a ~ 12,5) и поэтому остается протонированной на всех стадиях обычного пептидного синтеза, что фактически эквивалентно ее защите. В связи с этим в ряде случаев не требуется дополнительная защита, и описано немало синтезов, при которых гуанидиновая группа аргинина оставалась немодифицированной. Отсутствие защиты особенно полезно на завершающих стадиях синтеза, когда протонирование гуанидиновой группировки обеспечивает достаточную растворимость вещества в полярной среде.

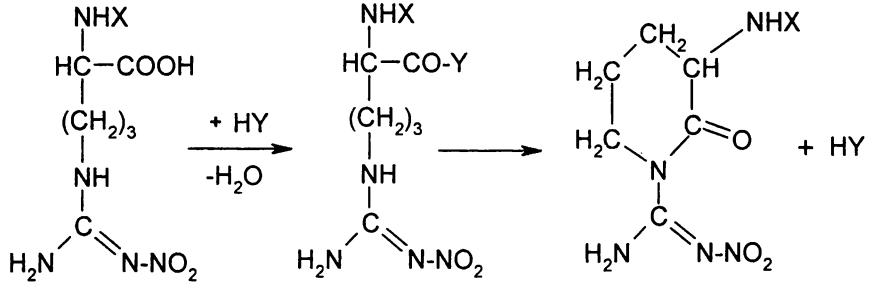
Если вводится *защита по гуанидиновой группе*, то, как правило, ограничиваются реакцией по одному (обычно ω), иногда двум (δ и ω) атомам N гуанидинового фрагмента. Наиболее широко используемыми защитами являются нитро-, бензилкарбокси-, *п*-толуолсульфонильная и адамантилкарбокси(*Adoc*)-группы.

ω'-Нитро-L-аргинин легко получить из свободной аминокислоты действием смеси олеума и азотной кислоты. Лучшие результаты получаются при нитровании аргинина нитратом аммония в серной кислоте.



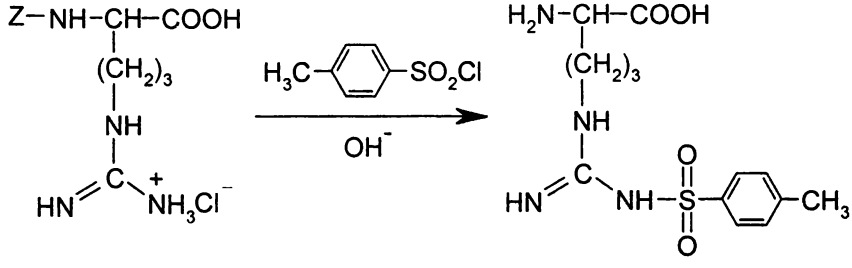
После завершения синтеза пептида защиту можно удалить каталитическим гидрированием над палладием. Гидрирование над палладиевой чернью продолжается обычно 12–30 ч; иногда для этого требуется повышенная температура. Поэтому для удаления нитрогруппы более удобны методы восстановления без применения водорода. Например, при обработке нитроаргинина муравьиной кислотой или формиатом аммония в присутствии палладия защитная группа отщепляется в первом случае за 5 ч, а во втором – за 10 мин. Нитрогруппу можно удалить циклогексеном в присутствии палладиевой черни. В случае проведения синтеза пептида твердофазным методом (§ 10.9) нитрогуанидиновая группа деблокируется безводным фтористым водородом.

Введение нитрогруппы приводит к понижению основности гуанидиновой функции. Однако нуклеофильность гуанидиновой группы подавляется не в полной мере, и поэтому в процессе активации карбоксильной группы в защищенном по α-аминогруппе аргинине может наблюдаться образование δ-лактама. Это преобладающая побочная реакция при таком типе защиты.



Применение бензилоксикарбонильной группы позволяет одновременно ввести защиту как по боковой гуанидиновой, так и по концевой α-аминогруппе. Для получения $N^{\alpha},N^{\delta},N^{\omega}$-$Z_3$-аргинина лучшим является метод, основанный на предварительном триметилсилилировании аргинина с последующим его бензилоксикарбонилированием. Реакция завершается в течение 60 ч при температуре 60 ^{0}C и проходит с выходом конечного продукта реакции порядка 50 %. Защиту можно удалить каталитическим гидрированием.

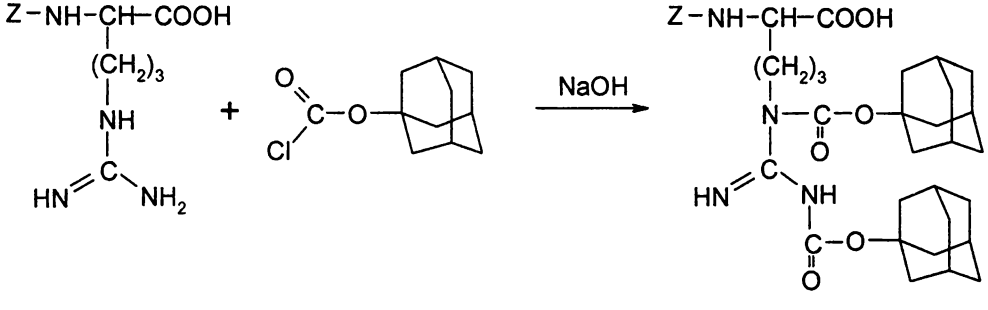
Очень устойчивые N^{ω}-толуол-*n*-сульфонилпроизводные аргинина находят все возрастающее применение особенно в твердофазном синтезе пептидов. Эти производные получают обработкой *Z*-Arg или *Boc*-Arg в течение 2 ч при 0 ^{0}C *n*-толуолсульфохлоридом в сильнощелочной водно-органической среде.



n-Толуолсульфонильная группа может быть удалена только при действии очень сильной кислоты (жидкого фтористого водорода) или путем восстановления натрием в жидком аммиаке.

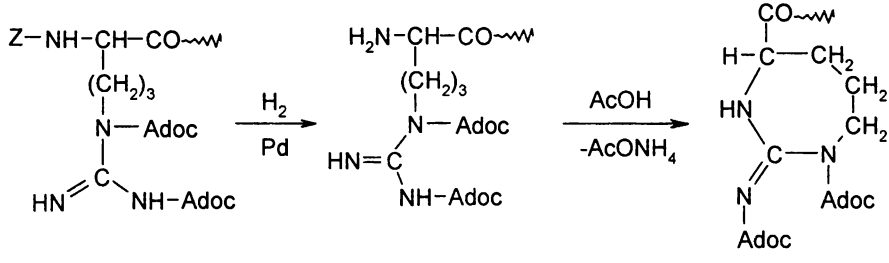
В случае использования *Fmoc*-Arg(*Tos*) протекание побочной реакции образования δ-лактама может быть существенно подавлено, если проводить синтез карбодиимидным методом в присутствии *N*-гидроксибензотриазола.

Adoc-группу (*адамантилоксикарбонильную*) можно ввести, добавляя к N^{α}-защищенной аминокислоте (например, *Z*-Arg) при 6–8 ^{0}C раствор свежеприготовленного 1-хлорформилоксиадамантана. Общее время реакции 4 ч. В качестве примера ниже приведена реакция получения N^{δ},N^{ω}-$(Adoc)_2$-аргинина с защищенной α-аминогруппой:



Adoc-группы сохраняются при удалении N-концевой бензилкарбоксигруппы путем гидрогенолиза и удаляются в кислых условиях. Образование δ-лактама минимально при использовании в пептидном синтезе *n*-нитрофениловых эфиров N^{α}-*Fmoc*-N^{δ},N^{ω}-Arg(*Adoc*)$_2$-$OC_6H_4NO_2$.

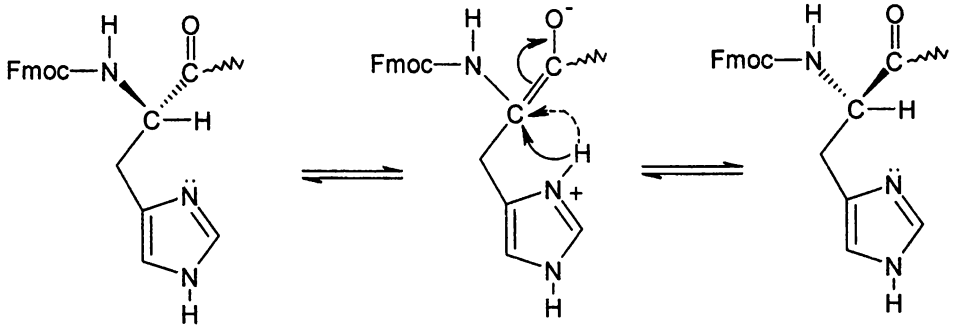
Adoc-группы удаляются в кислых условиях. Побочной реакцией, наблюдаемой в этой серии превращений, является атака свободной α-аминогруппы на диацилированную гуанидиновую функцию. Этот процесс, вероятно, катализируется слабыми кислотами.



Необходимость *защиты остатков гистидина* в пептидном синтезе обусловлена в первую очередь двумя свойствами остатков имидазола. Во-первых, имидазол и его производные с незащищенным гетероциклом являются эффективными катализаторами расщепления амидных и сложноэфирных групп. В особенности это свойство может проявляться при соответствующем наборе аминокислотных остатков в синтезируемом пептиде, когда гистидин может формировать системы «с переносом заряда» по типу геометрически близко расположенных аминокислотных остатков триады Asp-His-Ser в активном центре сериновых протеаз (§ 16.2).

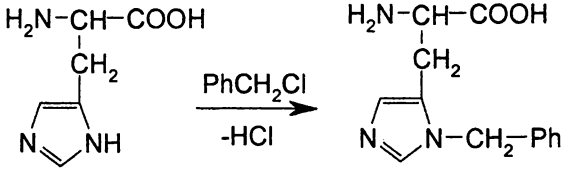
Во-вторых, незащищенный имидазольный гетероцикл может подвергаться ацилированию активированными карбоксильными компонентами, причем получающиеся ацильные производные сами по себе достаточно реакционноспособны и могут затем вызывать перенос ацильной группировки в разные участки молекулы. По этой же причине N^{im}-ацильные производные гистидина часто неудобны в качестве синтетических интермедиатов, если на ряде стадий нужно сохранить находящуюся в боковом радикале защиту.

Кроме того, отмечено, что гистидиновые производные с незащищенным имидазольным циклом особенно склонны к рацемизации в процессе пептидного синтеза (§ 10.10), по-видимому, по реакции:



При введении защитных групп в боковую цепь гистидина возможно образование двух производных – по π- или τ-атомам азота имидазольного кольца; в условиях обычной обработки N^{α}-защищенного гистидина арил-, алкил- или ацилгалогенидами в щелочной среде образуются в основном τ-производные.

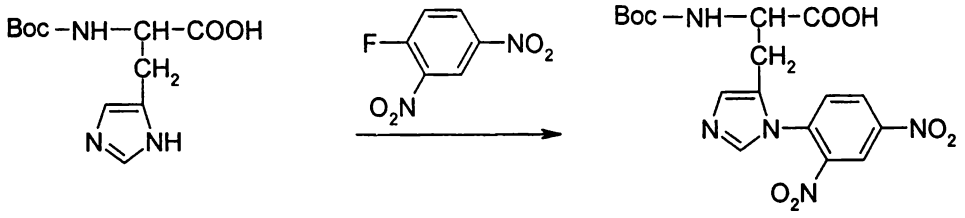
Для блокирования *имидазольного кольца* гистидина в настоящее время успешно используют *Bzl*-защиту. N^{im}-бензилгистидин получают при взаимодействии хлористого бензила с гистидином:



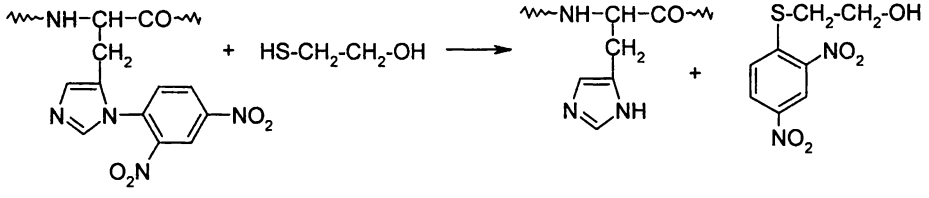
Реакцию проводят с депротонированным гистидином при температуре –70 ^{0}C. Благодаря высокой нуклеофильности гетероцикла в этих условиях протекает избирательное введение защиты именно по имидазольному остатку гистидина. Отщепление протона от имидазольного цикла проводят с использованием амида натрия (сильное основание), который получают непосредственно в реакционной колбе при добавлении натрия к раствору аминокислоты в безводном аммиаке до появления устойчивой синей окраски раствора.

Бензильную группу можно удалить натрием в жидком аммиаке или при каталитическом гидрировании в течение 72 ч. Гидрирование над палладием в присутствии циклогексена позволяет отщепить бензильную группу за 3 ч.

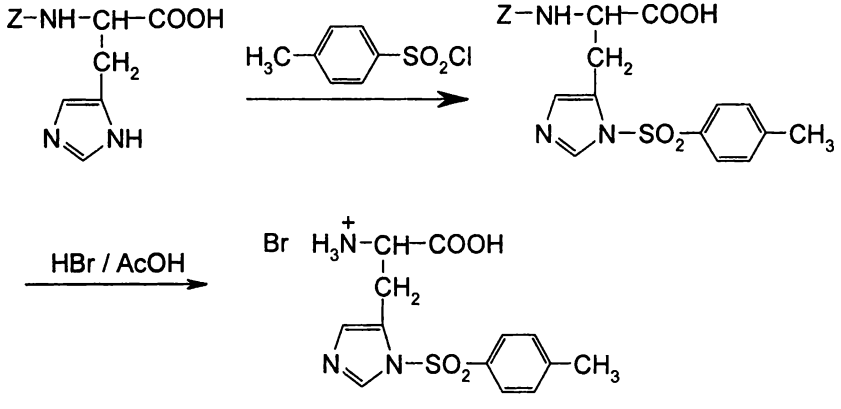
В качестве весьма удобной защиты имидазольного кольца гистидина нашла применение динитрофенильная (*Dnp*) группа. Синтез *трет*-бутилоксикарбонил-N^{im}-динитрофенилгистидина осуществляют путем взаимодействия N^{α}-*Boc*-защищенного гистидина с 2,4-динитрофторбензолом в течение 10 ч при комнатной температуре.



По завершении пептидного синтеза динитрофенильную защиту можно удалить действием сильного нуклеофила, например, тиола.



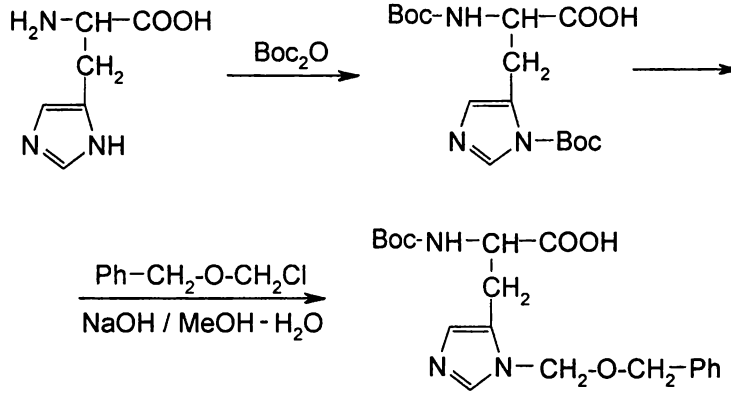
Для защиты гистидина часто используют тозильную (*Tos*) защиту. Ее можно ввести путем взаимодействия *Z*-гистидина с *п*-толуолсульфохлоридом (30 мин при –10 ^{0}C; затем 4 ч при комнатной температуре).



Защитная группа N^{im}-тозилгистидина устойчива к каталитическому гидрированию, к действию трифторуксусной кислоты или бромистого водорода. Ее можно удалить 1 н раствором NaOH (1 ч, 20 ^{0}C), безводным фтористым водородом (30 мин, 0 ^{0}C), натрием в жидком аммиаке. В последнем случае для удаления тозильной группы защищенную аминокислоту или пептид растворяют в жидком аммиаке и к этому раствору медленно добавляют натрий. По окончании реакции избыток натрия связывают, добавляя хлорид аммония, йодид аммония или уксусную кислоту. Защищенный пептид может деблокироваться ангидридами карбоновых кислот в пиридине (3,5 ч, комнатная тем-

пература), а также в присутствии широко применяемого в пептидном синтезе 1-*N*-гидроксибензотриазола (1 ч, комнатная температура). При таком типе защит не следует использовать карбодиимидный способ активации карбоксильной группы в присутствии нуклеофильного катализатора, так как деблокированный остаток гистидина может реагировать с образующимся в процессе активации *N*-гидроксибензотриазолиевым производным. Образующийся ацилимидазолид является ацилирующим агентом, поэтому появляется серьезный риск получения пептидов с незапланированной структурой.

N^{im}-(π)-бензилоксиметильная (*Bom*) и N^{im}-(π)-*трет*-бутилоксиметильная (*Bum*) группы оказались в наибольшей мере удовлетворяющими всем требованиям, предъявляемым к защитным группам, используемым в пептидном синтезе, так как получающиеся производные устойчивы к рацемизации, действию нуклеофилов и щелочей. *Boc*-His(π-*Bom*)-OH и *Boc*-His(π-*Bum*)-OH синтезируют обработкой *Boc*-His(τ-*Boc*)-OMe бензилхлорметиловым или *трет*-бутилхлорметиловым эфиром соответственно с последующим удалением *Boc*-защиты с остатка гистидина и омылением метилового эфира. В отличие от *Boc*-защиты, на α-аминогруппе производное His(*Boc*) неустойчиво в присутствии щелочей.



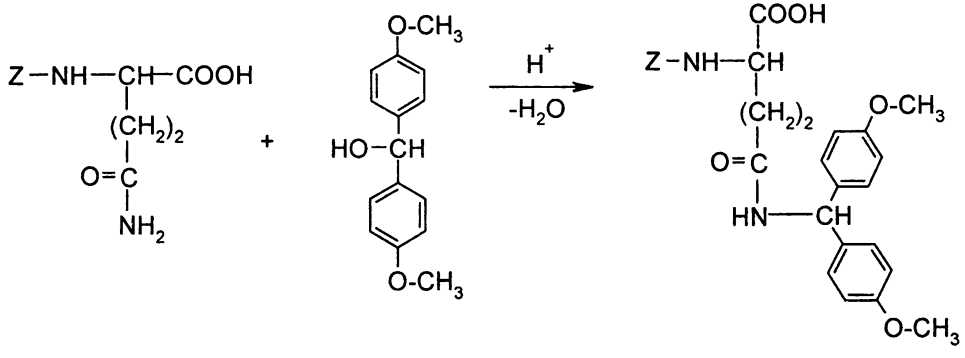
N^{im}-(π)-*трет*-бутилоксиметильная группа достаточно легко удаляется обработкой трифторуксусной кислотой. N^{im}-(π)-бензилоксиметильная группа может быть удалена только при действии очень сильной кислоты (жидкого фтористого водорода) или каталитическим гидрогенолизом.

Введение в полипептидную цепь остатков глутамина и аспарагина карбодиимидным методом сопровождается иногда побочной реакцией дегидратации амидной группы. Однако если при этом добавить эквимольное количество 1-*N*-гидроксибензотриазола или использовать активированные эфиры глутамина или аспарагина, то указанный нежелательный процесс не идет. Другим способом подавления этой побочной реакции является использование для синтеза аспарагин- или глутаминсодержащих пептидов мономеров с бло-

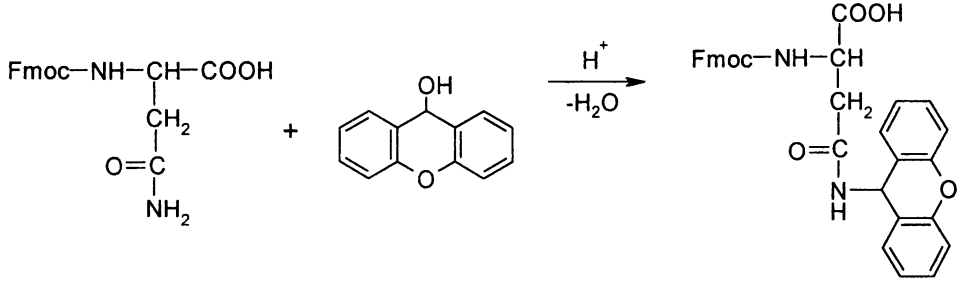
кированными амидными группами. Следует подчеркнуть, что при этом улучшается растворимость пептидов в органических растворителях.

Наиболее употребительными из защитных групп являются: 4,4'-диметоксибензгидрильная (*MbH*), 9-ксантильная (*Xan*), 2,4,6-триметоксибензильная (*Tmob*) и тритильная (*Trt*).

4,4'-Диметоксибензгидрильную (*MbH*) защиту вводят через взаимодействие 4,4'-диметоксибензгидрилового спирта с карбобензокси-L-глутамином или карбобензокси-L-аспарагином в концентрированной серной кислоте в течение 12 часов при комнатной температуре:



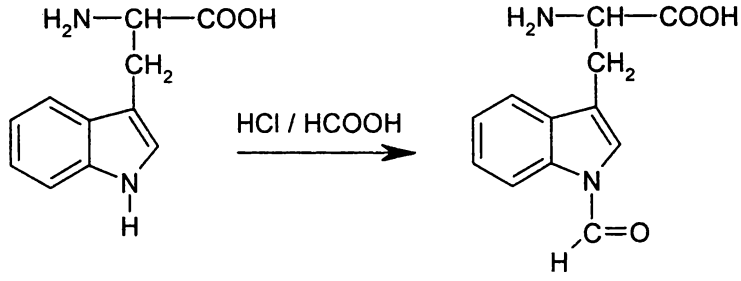
9-Ксантильную (*Xan*) и *тритильную* (*Trt*) группы вводят аналогично *MbH*-защите, используя 9-ксантиловый и тритиловый спирт соответственно.



2,4,6-Триметоксибензильную (*Tmob*) защитную группу вводят карбодиимидным методом в присутствии 1-*N*-гидроксибензотриазола или *N*-гидроксисукцинимида, используя 2,4,6-триметоксибензиламин и защищенные по *C*-концу Asn или Gln.

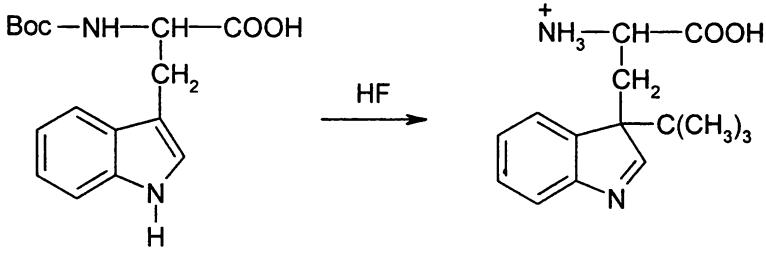
Все четыре защитные группы устойчивы в присутствии оснований и деблокируются в кислых условиях. 4,4'-Диметоксибензгидрильная группа легко удаляется смесью трифторуксусной кислоты с анизолом (10:1) при нагревании (5 мин) или при комнатной температуре (22 ^{0}C, 2–3 ч). Остальные группы еще более лабильны в присутствии кислоты.

В качестве группы для *защиты индольного гетероцикла* в триптофане используется формильная группа. Для введения этой группы через раствор триптофана в муравьиной кислоте пропускают ток сухого HCl:



В отличие от триптофана, образующийся N^{in}-*Form*-триптофан не флуоресцирует в ультрафиолете и не дает фиолетовой окраски с реактивом Эрлиха (*п*-диазобензолсульфокислота). Это можно использовать для наблюдения за протеканием процесса. От триптофансодержащих пептидов N^{in}-формильная группа легко отщепляется при обработке соответствующих соединений 0,1 М раствором пиперидина или триэтиламина в воде в течение 10 мин при температуре 0 ^{0}C с последующей лиофилизацией.

Поскольку индольное кольцо в кислой среде весьма склонно к окислению, при удалении защитных групп триптофансодержащих пептидов трифторуксусной кислотой добавляют в реакционную смесь 2 % меркаптоэтанола или дитиотреита. При использовании для удаления *Boc*-защиты безводного фтористого водорода наблюдается *трет*-бутилирование триптофана:

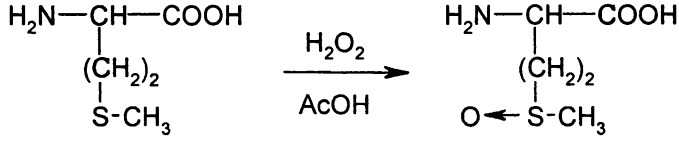


Для защиты индольного кольца от этой побочной реакции необходимо добавлять тиоанизол, диметилсульфид или другие нуклеофильные реагенты. Разрушение триптофана не идет при деблокировании каталитическим гидрогенированием или при обработке триптофансодержащих пептидов концентрированной муравьиной кислотой.

Синтез метионинсодержащих пептидов можно проводить без специальной защиты тиоэфирной группы метионина. Однако замечено, что при деблокировании *Z*-группы метионинсодержащих пептидов бромистым водоро-

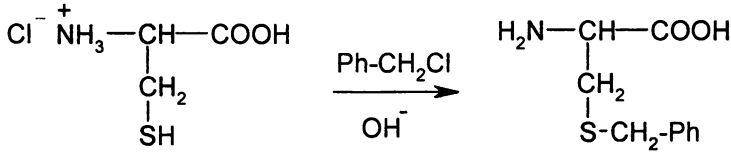
дом в уксусной кислоте может происходить расщепление тиоэфирной связи с образованием *S*-бензилгомоцистеина.

Чтобы избежать этой побочной реакции, предложено использовать сульфоксидную ($CH_3S{\rightarrow}O$) защиту. *Метионинсульфоксид* легко получается при окислении метионина (или соответствующих его производных) 30 % перекисью водорода в соляной или уксусной кислоте (60 мин, комнатная температура):



Остаток метионинсульфоксида в синтезированном пептиде легко восстанавливается до метионина в присутствии тиогликолевой кислоты, β-меркаптоэтанола, водородом над палладиевым катализатором, никелем Ренея, натрием в аммиаке и др. Лучше всего проводить восстановление тиогликолевой кислотой (меркаптоуксусная кислота, 20 ч в атмосфере азота, 50 ^{0}C).

Поскольку тиольная группа является сильным нуклеофилом, при пептидном синтезе необходима *защита SH-группы.* Одной из широко применяемых защитных групп является *S*-бензильная группа. Защиту вводят обработкой цистеина бензилхлоридом:

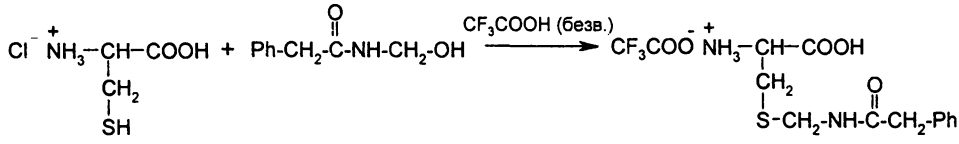


Бензильные группы чувствительны к гидрогенолизу, и поэтому деблокирование можно проводить с помощью натрия в жидком аммиаке. Менее желательно использовать каталитическое гидрирование, так как катализатор будет отравляться серосодержащим соединением.

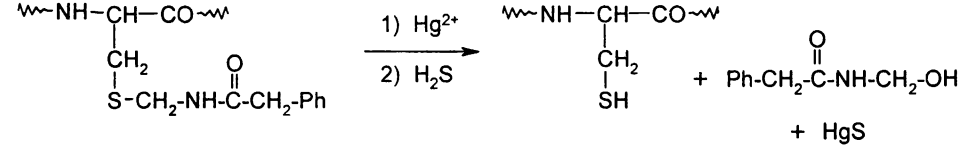
Эта защита гладко удаляется безводным фтористым водородом при комнатной температуре (30 мин, 20 ^{0}C). При использовании последнего иногда имеет место неполное деблокирование защищенной сульфгидрильной группы. В более мягких условиях (30 мин, 0 ^{0}C) отщепляется безводным фтористым водородом *n*-метоксибензильная (*MBzl*) группа; ее целесообразно использовать при твердофазном синтезе пептидов.

Позднее в качестве ценного интермедиата в пептидном синтезе были предложены *S*-ацетамидометил-L-цистеин (*Acm*) и *S*-бензамидометил-L-цистеин (*Bam*). Последний получают обработкой хлоргидрата L-цистеина

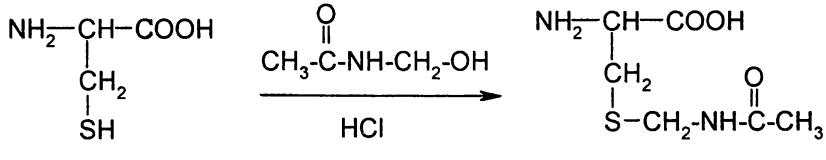
N-гидроксиметилбензамидом в безводной трифторуксусной кислоте (45 мин, комнатная температура):



Bam-группа устойчива к действию щелочи, гидразингидрата и других аналогичных соединений. Удаление *S*-бензамидометильной группы проводят в водно-метанольном растворе в присутствии ацетата ртути (1 ч, комнатная температура). По завершении процесса через раствор пропускают ток сероводорода и образующийся осадок сульфида ртути удаляют фильтрованием:



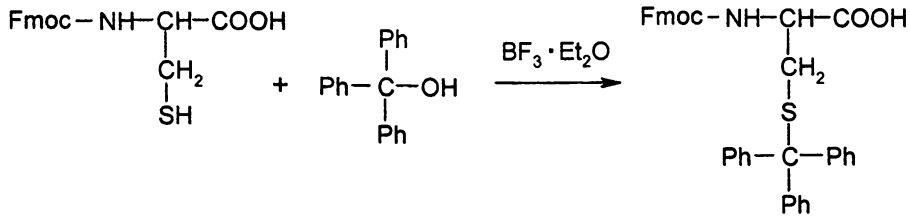
Acm-Cys легко получить из ацетамидометанола и цистеина в присутствии кислоты. Производное цистеина устойчиво в широком диапазоне кислых и щелочных условий:



Ацетамидометильная (*Acm*) группа гладко удаляется при pH 4 в присутствии иона Hg^{2+} (60 мин, 20 ^{0}C).

Особого внимания заслуживает окислительное отщепление действием йода с непосредственным образованием содержащих дисульфидную группировку пептидов цистеина. Этот процесс может идти как внутри-, так и межмолекулярно.

Аналогично дисульфидные связи образуются в пептидах при окислительном отщеплении в присутствии йода тритильной (*Trt*) (в нуклеотидной химии *Tr*) защиты. Если окисление йодом проводить в трифторэтаноле, то можно добиться избирательного деблокирования *Trt* защиты с образованием дисульфидных производных при сохранении *Acm*-Cys. Тритильную защиту можно ввести путем взаимодействия цистеина с тритиловым спиртом в присутствии $BF_3 \cdot Et_2O$:



Таким образом, в распоряжении исследователей, работающих в области пептидного синтеза, и фирм-производителей пептидов имеется широкий спектр защитных групп, из которых можно выбрать нужные с учетом планируемого метода синтеза и экономичности планируемого метода.

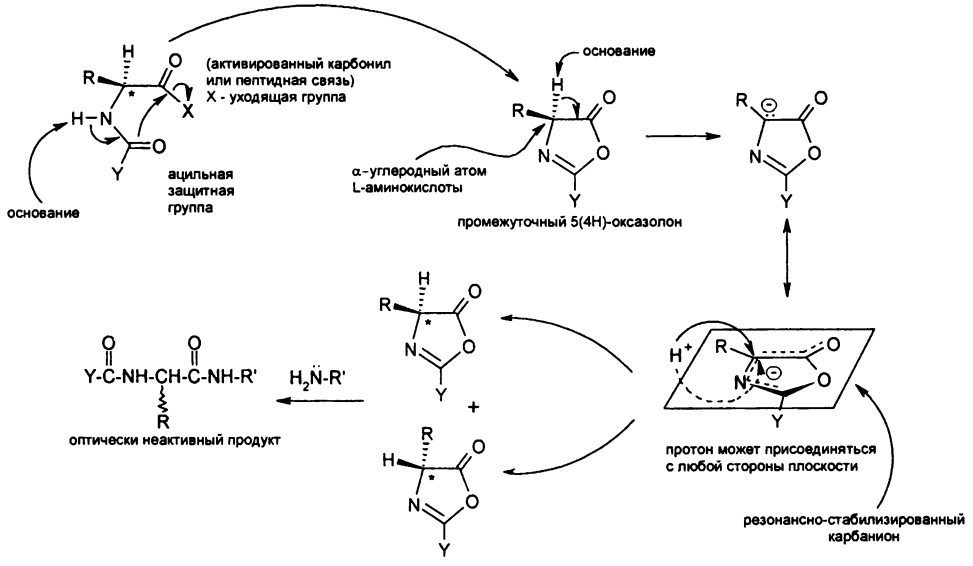
§ 10.8. Механизм рацемизации производных аминокислот и пептидов

Белки состоят из L-аминокислот, поэтому при их химическом синтезе следует исходить из мономеров именно такой конфигурации, а в процессе синтеза рацемизация должна быть сведена к минимуму. *Рацемизация* хирального α-центра, т. е. полная или частичная потеря оптической чистоты одного или более аминокислотных остатков, является одним из основных осложнений при пептидном синтезе. Она приводит к образованию оптически неоднородных продуктов, разделение которых по мере удлинения цепи резко осложняется и превращается в практически неосуществимую задачу. Зависимость свойств пептида от его оптической чистоты можно проиллюстрировать на очень простом примере. Нередко использующийся в кондитерской индустрии дипептид – метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, получивший название *аспартам* (Asp–Phe–OMe), который в 200 раз слаще сахарозы, обладает сладким вкусом только в том случае, если обе аминокислоты в его составе – L-изомеры. Если при синтезе аспартама произойдет замена L-Asp на D-Asp, получается безвкусное соединение.

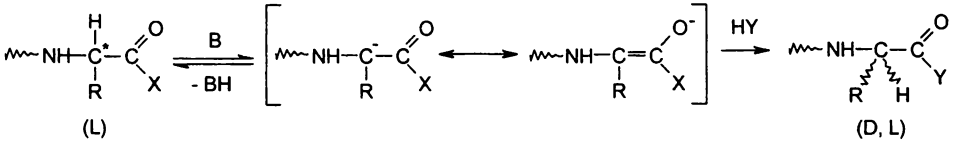
Аминокислоты особенно легко подвергаются рацемизации, когда они ацилированы по α-аминогруппе. В этом случае в отсутствие особых эффектов боковой группы или заместителя при азоте защитной группы наиболее существенным процессом является образование 5(4H)-оксазолона (азлактона). Протон последнего подвижен в щелочных условиях. В случае отрыва α-протона он может присоединиться вновь с любой стороны плоскости кольца, что приводит к потере оптической чистоты. Такое превращение может произойти в процессе введения защитной группы или при образовании пептидной связи.

Более того, 5(4H)-оксазолоны могут принимать участие в реакциях образования пептидной связи, так что в процессе синтеза они исчезают, вызывая появление рацемических аминокислотных остатков в конечном белковом продукте. На образование оксазолона оказывает сильное влияние природа

N-ацильного заместителя, а также растворитель и сила основания. При планировании пептидного синтеза все эти факторы следует принимать во внимание. Способ активации карбоксильной группы должен быть выбран такой, чтобы свести к минимуму образование 5(4H)-оксазолона:



Другой важный механизм рацемизации состоит в отщеплении атома водорода от α-углеродного атома и последующей енолизации:



По такому механизму происходит рацемизация аминокислот. В случае пептидов рацемизация через образование енолят-аниона примерно в 100 раз менее вероятна, чем через образование 5(4H)-оксазолона.

Рацемизация существенно подавляется, если при образовании пептидной связи в реакционную систему вводятся нуклеофильные добавки. Исследование влияние таких добавок было проведено в модельной системе

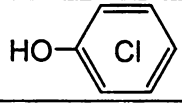
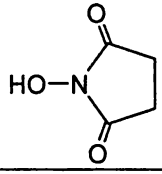
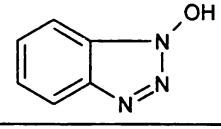
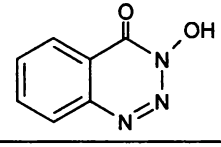
Tfa-L-Pro-L-ValOH + L-Pro*OtBu* → *Tfa*-L-Pro-L-Val-L-Pro*OtBu*

(*Tfa* – трифторацетильная защита; –*OtBu* – *трет*-бутиловый эфир)

Синтез проводился карбодиимидным методом в полярном растворителе (диметилформамид), который благоприятствовал рацемизации. Данные представлены в табл. 16.

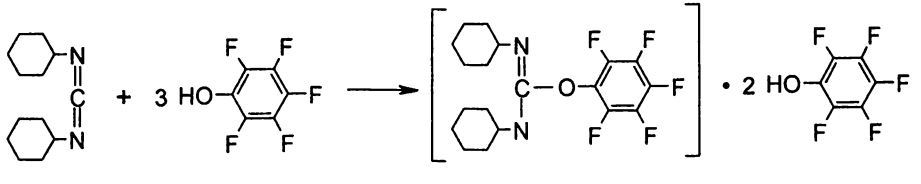
Таблица 16

Степень рацемизации модельного пептида в присутствии нуклеофильных добавок

Нуклеофильная добавка	Название	Кол-во использ. реагента, моль	Степень рацемизации в ДМФА, %
Без нуклеофила	–	–	38
	пентахлорфенол	2	27
	*N*-гидроксисукцинимид	2	17,2
	1-гидрокси-бензотриазол	1	3,4
	3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензотриазин	1	1,0

Видно, что в присутствии 1-гидроксибензотриазола и 3-гидрокси-4-оксо-3,4-дигидро-1,2,3-бензтриазина рацемизация практически полностью подавляется.

Одной из нуклеофильных добавок, предотвращающих рацемизацию, является пентафторфенол. Его используют часто в составе так называемого «F-комплекса», состоящего из трех молекул пентафторфенола и одной молекулы ДЦК. Для получения комплекса составляющие его компоненты инкубируют в течение часа, выпавший осадок отфильтровывают и добавляют к смеси карбоксильного и аминокомпонента в эквимольных количествах. Иногда используют небольшой избыток комплекса:



ДЦК и водорастворимый карбодиимид в присутствии таких соединений, как 1-*N*-гидроксибензотриазол или *4-N,N*-диметиламинопиридин, используют также для получения сложных эфиров защищенных аминокислот с целью введения защиты по С-концевому карбоксилу. Реакция идет через образование 1-*N*-оксибензотриазоловых эфиров или *N*-ацилпиридиниевых солей, которые далее способны ацилировать спирты без рацемизации.

§ 10.9. Твердофазный синтез пептидов. Автоматизация синтеза

Метод твердофазного синтеза первоначально был предложен Меррифилдом для синтеза пептидов. В реализованном, в том числе в настоящее время, автоматизированном виде *твердофазный синтез пептидов* полипептидной цепи начинается с С-концевой аминокислоты с помощью N-защищенных аминокислот с удалением защитной группы после каждого акта образования новой пептидной связи. Наиболее практичным оказалось применение *Boc*- и *Fmoc*-аминокислот. Для сведения к минимуму рацемизации в твердофазном пептидном синтезе образование пептидных связей рекомендуется проводить либо методом активированных эфиров, либо карбодиимидным методом в присутствии нуклеофильных добавок. При этом предпочтительным является применение водорастворимых карбодиимидов, поскольку в случае традиционного дициклогексилкарбодиимида возникает проблема в связи с осаждением нерастворимой дициклогексилмочевины, смешивающейся с нерастворимым носителем. Для связывания С-концевой аминокислоты с носителем в первоначальном варианте было предложено использовать хлорметилированный сополимер полистирола и дивинилбензола. Этот полимер получил название *смолы Меррифилда* (Merrifield's resin). Отщепление синтезированного полипептида от носителя и удаление постоянных защитных групп может быть осуществлено обработкой сильной кислотой, в частности HF. На рис. 76 представлена схема твердофазного пептидного синтеза на хлорметилированном полистироле с использованием в качестве синтонов *Boc*-аминокислот. Поскольку удаление временной защиты в этом случае проводится с помощью кислоты, то предусмотрена стадия нейтрализации (3). При использовании *Fmoc*-аминокислот необходимость в этой стадии отпадает.

Специфика твердофазного синтеза пептидов должна учитываться при выборе защитных групп. Во-первых, в твердофазном синтезе из-за отсутствия очистки синтезируемой цепи на промежуточных стадиях ее роста особенно существенным является достижение максимального выхода на каждой стадии удлинения цепи. Поэтому используется большой избыток синтона (4–5-кратный). Это увеличивает опасность побочных реакций, в связи с чем рекомендуется применение всего спектра защитных групп для боковых радикалов.

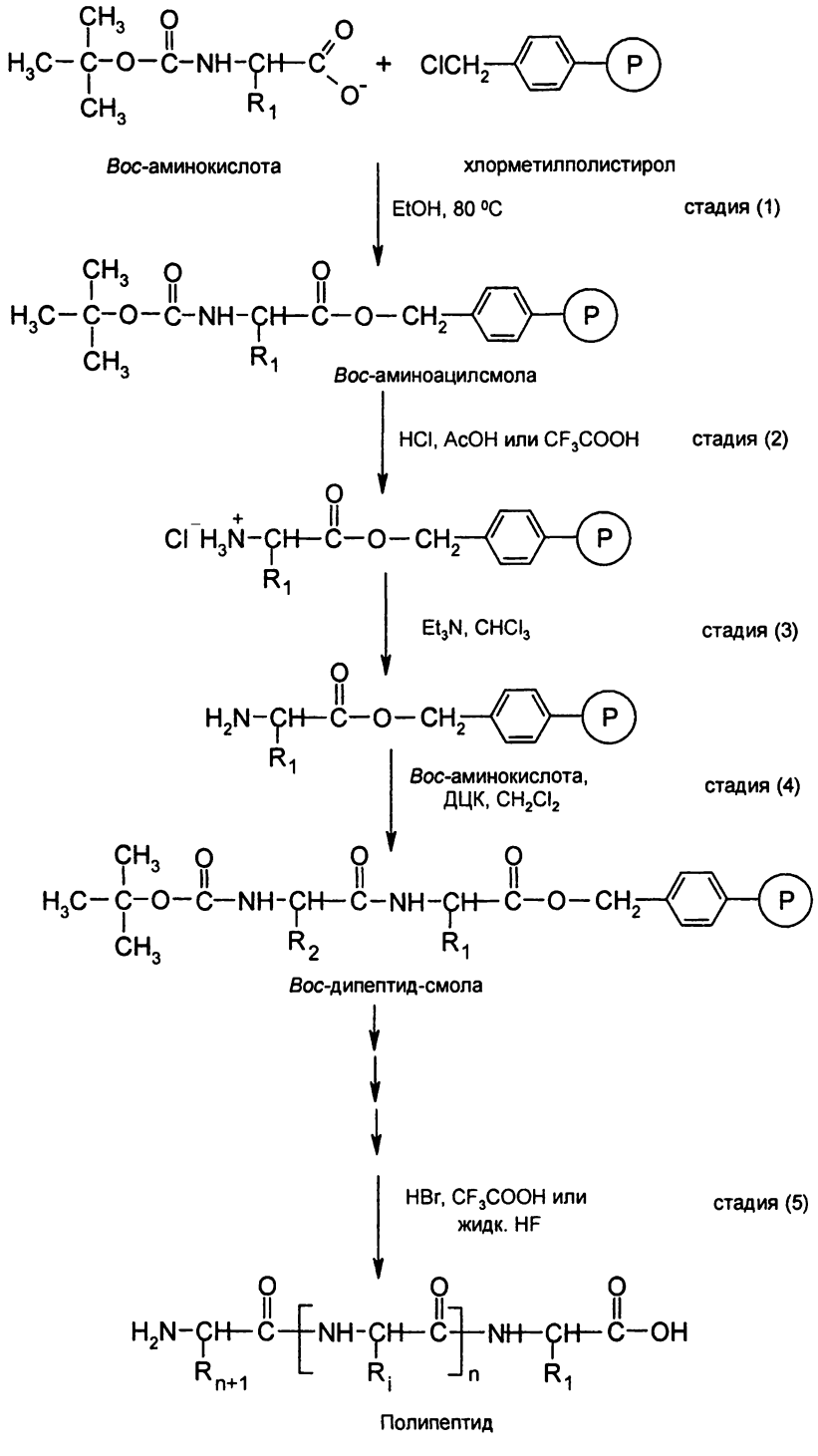


Рис. 76. Схема твердофазного пептидного синтеза

Для защиты гидроксигрупп в тирозине при использовании *Boc*-аминокислот требуется повышенная устойчивость защищенной OH-группы, которая должна выдерживать многократную обработку кислотой при удалении защиты на каждой стадии. Поэтому предпочтительной, по сравнению с бензильной группой, для защиты гидроксигруппы остатков тирозина являет-ся 2,6-дихлорбензильная группа, эфир которой в 50 раз устойчивее, чем *O*-бензиловый эфир.

Для защиты остатков аргинина в твердофазном синтезе широкое применение находит N^{ω}-толуол-*n*-сульфонильная группа, дающая особенно устойчивые производные.

n-Толуолсульфонильная группа может быть удалена только при действии очень сильной кислоты (жидкого фтористого водорода) или путем восстановления натрием в жидком аммиаке.

Для автоматического твердофазного синтеза пептидов созданы специальные *синтезаторы пептидов*. По принципу работы они сходны с ген-синтезаторами, но, в отличие от последних, содержат 20 вместо четырех сосудов для мономеров. Кроме хлорметильных, в качестве «якоря» для присоединения первой аминокислоты к полимерному носителю используют другие группы (табл. 17). С целью повышения кислотоустойчивости «якорных» групп, связывающих пептид с полимером, при использовании в процессе синтеза пептида *Boc*-защищенных аминокислот применяются полимерные смолы с фенилацетамидометильными группами. Если в качестве временной защиты используется *Fmoc*-защита, то первый аминокислотный остаток присоединяют к смоле, содержащей щелочеустойчивую «якорную» группировку, например 4-метоксибензильный остаток. Но в ряде случаев при синтезе требуется получить пептид с защитой на *C*-конце. Для этого используют «якорные» группы, в которых присутствуют два типа связей, расщепляемых в разных условиях, например 4-[4-(гидроксиметил)феноксиметил]-3-нитробензамидометильная смола. Для получения *C*-концевого амида первый аминокислотный остаток присоединяют к *n*-нитробензгидриламидной смоле.

Первую защищенную аминокислоту к гидразидной смоле присоединяют через амидную связь карбодиимидным методом. Далее получают пептид вышеописанным твердофазным методом синтеза. В качестве временной N^{α}-защитной группы используют 2-(*n*-дифенил)пропил-(2)-оксикарбонильную группу (*Bpoc*). Условия отщепления *Bpoc*-группы (0,5 % CF_3COOH в CH_2Cl_2, 12 мин, 25 ^{0}C) являются достаточно мягкими, поэтому расщепление амидной связи на полимере минимально (< 0,2 %). Синтезированный гидразид защищенного пептида отщепляют от полимера путем 30-минутной обработки 50 % CF_3COOH в CH_2Cl_2 при 25 ^{0}C в течение 30 мин.

Впервые твердофазный метод был применен Р. Меррифилдом для синтеза брадикинина. Брадикинин – это тканевый гормон, представляющий собой пептид Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Он образуется в плазме крови из неактивного предшественника и оказывает регулирующее действие на кро-

вяное давление, понижая его. В низких концентрациях брадикинин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры кишечника, а в более высоких – сокращение мышц матки. Этот гормон участвует в функционировании центральной нервной системы и является одним из медиаторов боли. При введении в организм брадикинин вызывает сильные болевые ощущения.

Таблица 17

Смолы, используемые для твердфазного синтеза пептидов

Смола	Условия отщепления пептида	Структура С-конца
O_2N–C6H4–CH(NH$_2$)–C6H4–P *п*-нитробензгидриламидная смола	H_2/Pd	Амид
$HOCH_2$–C6H4–OCH_2–C6H4–P 4-метоксибензиловый спирт	TFA	-COOH
$HOCH_2$–C6H4–CH_2–C(=O)–$NHCH_2$–P Фенилацетамидометильная смола	TFA	-COOH
$HOCH_2$–C6H4–O–Si(CH_3)$_2$–C(CH$_3$)$_3$–C6H4–NH–C(=O)–$(CH_2)_3$–C(=O)–P (3 или 4)-[[[(4-гидроксиметил)фенокси-*трет*-бутилфенил]силил]фенил]пентадикарбоновой кислоты моноамид	TBAF	-COOH
$HOCH_2$–C6H4–OCH_2–C6H3(O_2N)–C(=O)–$NHCH_2$–C6H4–P A B 4-[4-(гидроксиметил)феноксиметил]-3-нитробензамидометильная смола	A: TFA B: hν (350 nm)	-COOH 4-гидроксибензиловый эфир

Твердофазный метод синтеза пептидов, аналогично тому, как это было описано для олигонуклеотидов, открыл возможность одновременного синтеза большого набора пептидов, в том числе и иммобилизованных на подложке (пептидные чипы). Это может дать возможность быстрого определения функ-

ционально значимых фрагментов белков, например, выявления антигенных детерминант белков. Если чип содержит пептиды, перекрывающие всю аминокислотную последовательность белка, то с помощью антитела к этому белку можно выявить, какие из пептидов взаимодействуют с антителом, и тем самым определить аминокислотную последовательность, взаимодействующую с антителом, т. е. антигенную детерминанту. Обычно с этой целью используется производное антитела, несущее флуоресцентную метку. Положение комплекса такого производного с иммобилизованным пептидом позволяет определить данный пептид по положению флуоресцентной метки, поскольку каждый из иммобилизованных пептидов имеет определенное положение на матрице.

Пептидные чипы, как и олигонуклеотидные, могут быть получены методом фотолитографии, основанном на использовании при синтезе аминокислот с α-аминогруппами, несущими светолабильную (удаляемую фотохимически) защиту, например, описанную в § 10.5 1-(2-нитро-4,5-метилендиоксифенил)этил-1-оксикарбонильная группу.

Эта группа может быть удалена только при действии очень сильной кислоты (жидкого фтористого водорода) или путем восстановления натрием в жидком аммиаке.

Применительно к пептидам также используются подходы комбинаторной химии. Например, могут быть получены чипы, на которые нанесен набор пептидов определенной длины, представляющих все последовательности аминокислот какого-либо белка. Выявление пептидов, взаимодействующих с антителом, выработанным в ответ на введение в организм этого белка, позволяет определить его антигенную детерминанту.

§ 10.10. Образование дисульфидных мостиков в синтетических пептидах

Поскольку многие пептиды и белки содержат дисульфидные мостики, после завершения синтеза полипептидной цепи необходимо образовать эти мостики. В простейшем случае нужно внутримолекулярно окислить два остатка цистеина. Для этого необходимо сначала освободить временно блокированные остатки цистеина, затем связать их между собой. С этой целью используется несколько окислителей: I_2, $Hg(CH_3COO)_2$, $Tl(CF_3COO)_3$ и ряд других. Чтобы избежать сопровождающего окислительного повреждения остатков метионина, тирозина и триптофана, предложен также вариант неокислительного образования S-S-мостиков. В этом случае при синтезе пептида с двумя остатками цистеина по этим остаткам вводятся две разные защиты, одна из которых – *монометокситритильная* (*Mmt*), а вторая – какая-либо группа, удаляемая в условиях, более мягких, чем *Mmt*, например *трет-бутильная*. После селективного удаления этой защиты получается пептид, содержащий одну S-*Mmt*- и одну SH-группу. Последняя активируется добав-

лением 2,2'-дитиобис(5-нитропиридина) с образованием производного остатка цистеина, у которого атом S связан дисульфидным мостиком с остатком 5-нитро-пиридина. Активированный таким образом атом S остатка цистеина вытесняет остаток *Mmt* с образованием дисульфидного мостика (рис. 77).

Главным осложнением при образовании дисульфидных мостиков у пептида (белка) всего двух остатков цистеина является возможность образования

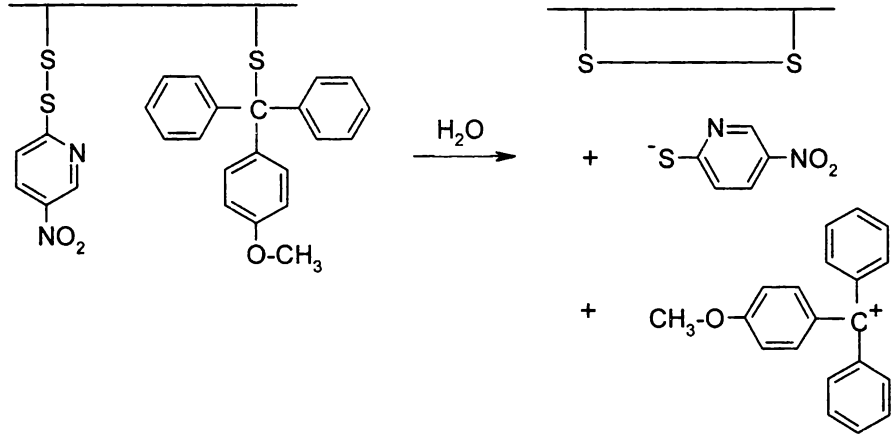
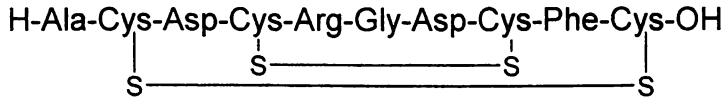


Рис. 77. Схема образования дисульфидного мостика (неокислительный вариант)

мостика между двумя остатками цистеина, принадлежащими двум разным полипептидным цепям. Чтобы избежать этого, следует проводить окисление в достаточно разбавленном растворе.

Задача существенно осложняется, если в конечном продукте должно быть несколько дисульфидных мостиков между строго определенными остатками цистеина. Например, панкреатическая рибонуклеаза (РНКаза) содержит восемь остатков цистеина, связанных попарно четырьмя мостиками. При химическом синтезе РНКазы получается полипептид с восемью защищенными SH-группами. После их деблокирования возникнет восемь SH-групп, которые могут теоретически попарно соединиться в 105 вариантах (7x5x3). Этого удается избежать, если поочередно деблокировать пары определенных групп и соединять их S-S-связями перед освобождением следующей пары. Для этого первая пара должна быть защищена группами, которые можно селективно удалить, не затрагивая защит остальных SH-групп. То же относится и к последующим парам. В качестве примера такой процедуры можно привести синтез пептида



который является лигандом одного из интегринов (поверхностных рецепторов, являющихся медиаторами передачи внутриклеточных сигналов).

Этот пептид содержит два S-S-мостика. При его синтезе первоначально образуется мостик между двумя внутренними остатками цистеина (рис. 78). На это время две SH-группы крайних остатков защищены тритильными (*Trt*)

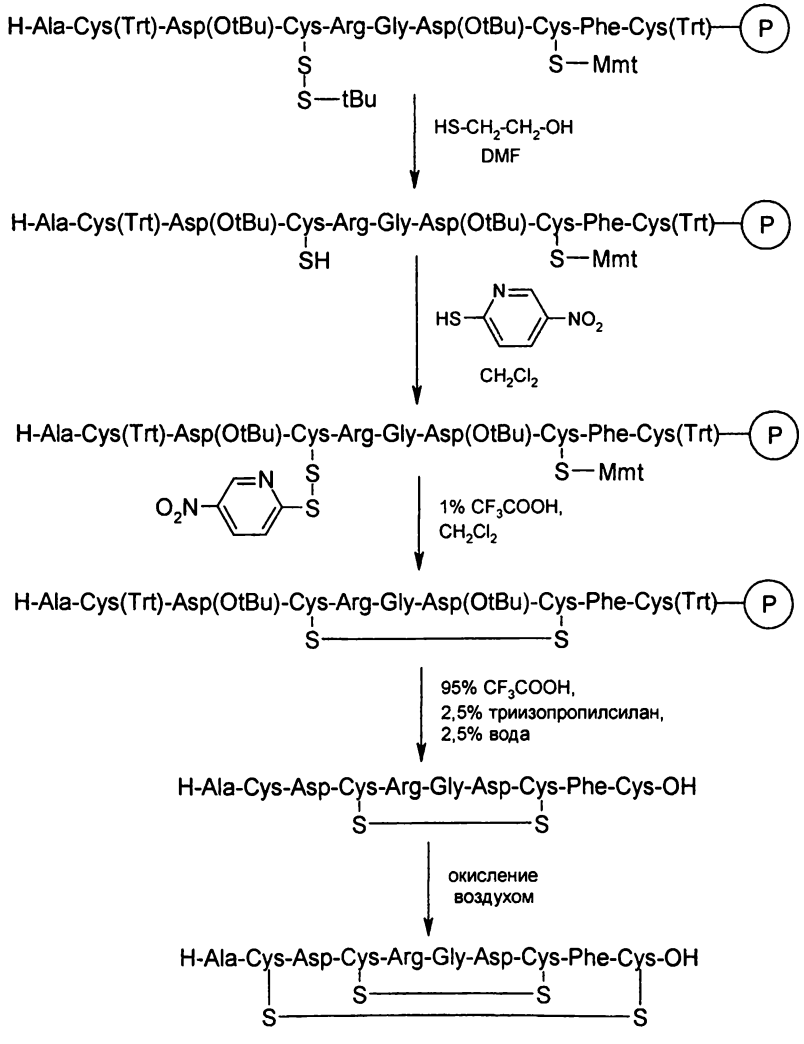


Рис. 78. Синтез пептида с двумя S-S-мостиками

группами, удаляемыми в более жестких условиях, чем *п*-метокситритильные. В рассматриваемом случае первый мостик образовывался по описанной выше неокислительной реакции между остатками цистеина. Для этого при синтезе пептида один из двух остатков цистеина защищали *Mmt*-группой, а другой – *трет*-бутильной. Последнюю можно было избирательно деблокировать и активировать с помощью 2,2'-дитиобис(5-нитропиридином) (DTNB). После образования S-S-мостика в более жестких условиях (95 % CF_3COOH вместо 1 % в дихлорэтане) удалялись *Trt*-группы с двух крайних остатков цистеина, после чего две освободившиеся SH-группы окислялись до S-S-мостика.

Глава 11. Химические методы получения производных белков и нуклеиновых кислот (дериватизация). Методы и задачи

§ 11.1. Иммобилизация биополимеров на нерастворимых носителях

Биополимеры, выполняющие специфические биологические функции, могут представлять большой интерес как инструменты биохимических исследований. Ферменты используются в биоорганической химии и технологии для направленного проведения определенных химических превращений. Они также находят широкое применение для анализа сложных смесей. Моноклональные антитела стали незаменимым инструментом для идентификации белков. Поли- и олигонуклеотиды с определенной последовательностью мономерных звеньев позволяют выявлять белки, взаимодействующие с такими последовательностями, и комплементарные структуры в анализируемых нуклеиновых кислотах.

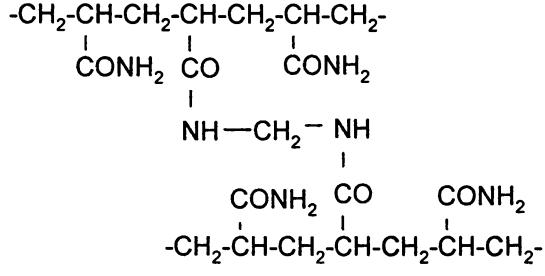
Многие из препаративных и аналитических процедур существенно упрощаются, если используемый биополимер оказывается в виде твердой фазы. Получение такой фазы достигается путем присоединения биополимера к нерастворимому носителю, т. е. *иммобилизации* биополимера. Иммобилизация может быть достигнута путем физической сорбции биополимера на нерастворимом носителе. Еще одним вариантом является захват биополимера в поры геля. Это может быть достигнуто проведением полимеризации мономеров, формирующей гель, в растворе, в котором одновременно находится подлежащий захвату биополимер. Однако в большинстве случаев предпочтительной является более прочная ковалентная иммобилизация.

Иммобилизованные биополимеры, как правило, используются как неподвижное вещество, через которое проходит поток растворителя, содержащего растворенные вещества, предназначенные для взаимодействия с биополимером. Поэтому носитель должен обладать достаточной механической прочностью, проницаемостью, хорошими гидродинамическими свойствами, химической и биологической устойчивостью, низким уровнем неспецифической сорбции.

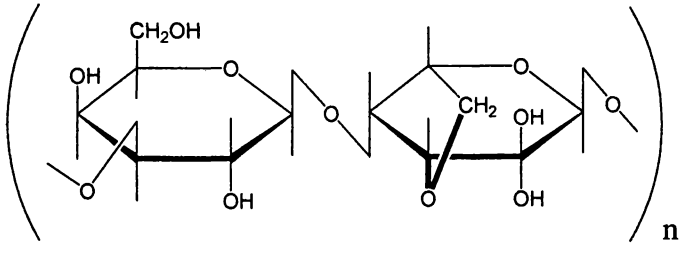
В настоящее время предложено большое число разнообразных носителей, многие из которых являются коммерческими продуктами. Они являются либо продуктами полимеризации, либо получаются из природных полисахаридов.

Цепной свободно-радикальной полимеризации легко подвергаются мономеры, содержащие винильную группу – стирол и акриламид. Образующиеся при полимеризации линейные полимеры растворимы и неудобны для использования в качестве носителей. Для придания им нерастворимости линейные цепи, образующиеся при полимеризации, соединяют между собой (сшивают),

что достигается введением в реакционную смесь контролируемого количества мономера, содержащего две винильные группы: в случае стирола – дивинилбензол, в случае акриламида – метиленбисакриламид. Такие бифункциональные реагенты при полимеризации входят в состав двух цепей, в результате чего между этими цепями возникает ковалентная сшивка. В силу статистического характера распределения сшивающих фрагментов каждая цепь оказывается ковалентно связанной с несколькими цепями и все множество цепей оказывается соединенным в одну гигантскую и, естественно, нерастворимую молекулу. В качестве примера ниже приведен фрагмент такого сшитого полиакриламида.



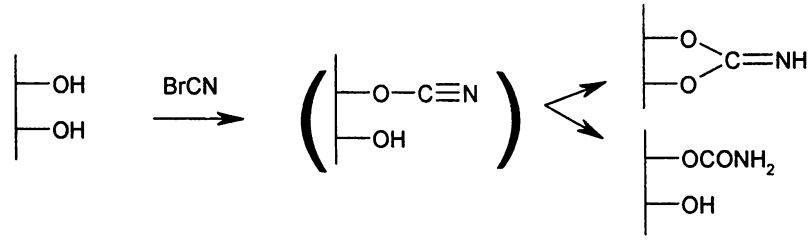
Широкое применение в качестве носителей для иммобилизации биополимеров нашли природные полимеры. Среди них по широте применения первое место занимает *агароза*, представляющая собой сополимер чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-галактозы (§ 13.1).

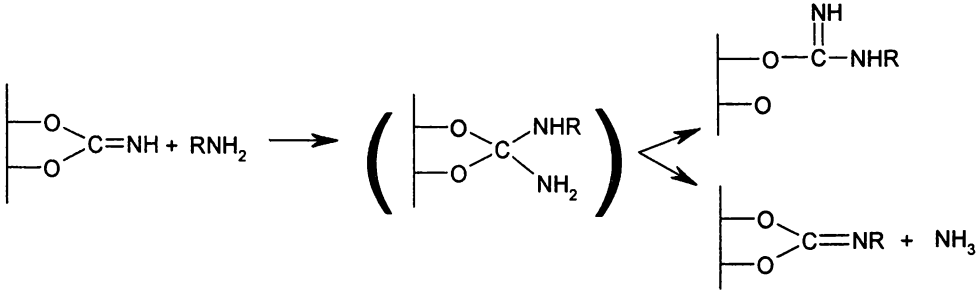


агароза

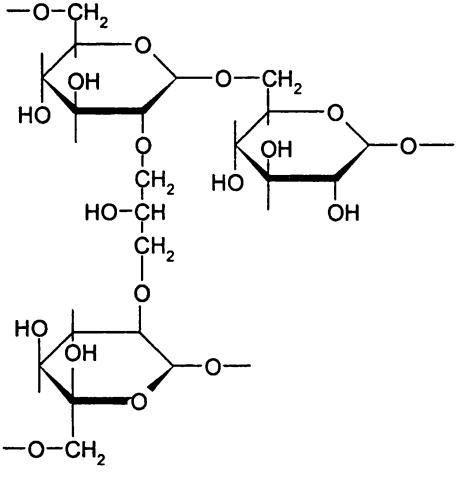
В каждом звене агароза имеет свободные OH-группы, которые частично могут быть использованы для сшивания углеводных цепей, что придает сорбенту повышенную устойчивость, а частично – для связывания с биополимером. Сшитая, приготовленная в виде шариков коммерческая форма агарозы называется *сефарозой*.

Широко используемым реакционноспособным носителем является активированная обработкой бромцианом агароза (*бромциансефароза*). Она легко реагирует с аминогруппами и, таким образом, может иммобилизовать разнообразные биополимеры, несущие эти группы.





Среди природных полимеров в качестве носителей нашли широкое применение также целлюлоза (§ 13.4) и декстран. Часть ОН-групп декстрана может быть использована для сшивания между цепями. Ниже приведен фрагмент декстрана, сшитый с помощью 1-хлор-2,3-эпоксипропана.



Применяются также носители на основе двуокиси кремния – пористое стекло, силикагель и цеолиты.

В настоящее время исследователям практически не приходится иметь дело с получением носителей. Как правило, носители являются коммерческими

продуктами, выпускаемыми специальными фирмами, с разнообразными характеристиками, такими как размер, форма и степень однородности частиц носителя, их механическая прочность и скорость протекания элюента или растворов реагентов через слой частиц.

Среди уникальных свойств биополимеров существенно выделяются два. Первое – это способность биополимеров к высокоспецифичному узнаванию некоторых определенных низко- и высокомолекулярных соединений. Это нашло широкое применение в выделении таких соединений из сложных смесей и для их тонкой очистки. Иммобилизация биополимера, специфично узнающего какого-либо партнера, позволяет получить сорбент, обладающий высоким селективным сродством к такому партнеру определенных биополимеров (§ 12.1).

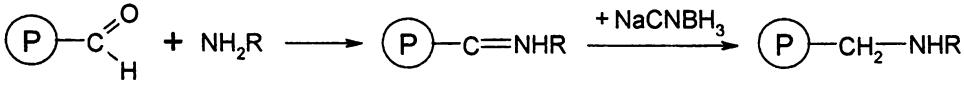
Второй важной для физико-химической биологии особенностью является наличие у некоторых биополимеров способности высокоспецифично и эффективно катализировать определенные химические реакции, т. е. служить ферментами. Катализ ферментами в силу их специфичности, мягких условий протекания реакций и огромной скорости катализируемых ими химических превращений в мягких условиях давно привлекает внимание химиков, занятых препаративными методами получения различных веществ, и химиков-технологов. Однако камнем преткновения на пути к широкому использованию ферментов в препаративной химии, и в особенности в химической промышленности, остается их дорогая цена и сложность повторного использования в силу их лабильности, препятствующей выделению из отработанной реакционной смеси. Значительная часть этих проблем исчезает при использовании *иммобилизованных ферментов*. В таком виде ферменты становятся гетерогенными катализаторами и обладают всеми основными достоинствами, свойственными гетерогенному катализу. Они позволяют проводить ферментативные процессы в потоке раствора субстрата (субстратов) до исчезновения каталитической активности в результате неизбежной инактивации катализатора. Это эквивалентно многократному использованию фермента. По окончании процесса, если продукты реакции остаются в той же фазе, они также легко отделяются от катализатора. Эти достоинства исчезают при проведении ферментативной реакции в растворе.

Несмотря на всю привлекательность подхода, иммобилизованные ферменты пока не нашли широкого применения. Среди процессов, имеющих технологическое применение, одним из первых была иммобилизация ацилазы пенициллина G, дающая 6-аминопенициллановую кислоту, исходя из которой было получено множество полусинтетических производных и глюкозоизомеразы, катализирующей превращение глюкозы в фруктозный сироп.

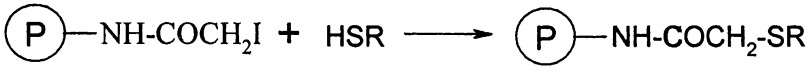
Естественно, что ковалентная иммобилизация белков проводится путем реакции каких-либо групп носителя с группами боковых радикалов биополимеров.

Для связывания с ε-аминогруппами остатков лизина удобными являются носители, содержащие альдегидные группы. Они легко образуют основания

Шиффа, которые восстанавливаются до аминогрупп цианоборгидридом натрия.

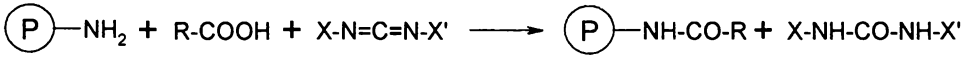


При наличии в иммобилизуемом биополимере сульфгидрильных групп можно воспользоваться реакцией алкилирования привязанными к носителю иодацетильными остатками.



В большинстве случаев количество остатков цистеина существенно меньше, чем остатков лизина, т. е. место расположения реакционноспособной группы носителя будет более определенным. Еще точнее можно задать положение остатка цистеина, если в качестве химически активной группы на носителе использовать синтетический пептид с остатком цистеина, введенным на С-конец в ходе синтеза.

Иммобилизацию за карбоксильную группу аспартата или глутамата можно провести, используя носитель с первичными аминогруппами по реакции с карбодиимидом:



Применять следует водорастворимый карбодиимид, поскольку образующаяся при реакции дизамещенная мочевина не должна выпадать в осадок и смешиваться с носителем.

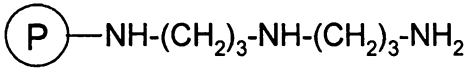
Для решения ряда задач оказываются полезными иммобилизованные хелатирующие группы, которые позволяют иммобилизовать ионы переходных металлов. В качестве хелатирующих групп широко используются остатки нитрилотриуксусной $N(CH_2COOH)_3$ и иминодиуксусной $NH(CH_2COOH)_2$ кислот.

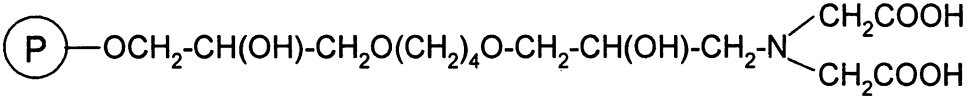
Для иммобилизации олигонуклеотидов целесообразно уже в процессе их синтеза вводить специальные радикалы для связывания с носителем. Например, можно присоединить к одному из концов остаток гексаметилендиамина и иммобилизовать по реакции с альдегидными группами, как это было описано для иммобилизации белков через остатки лизина.

Поскольку речь идет об иммобилизации биополимеров с уникальными свойствами, ее следует проводить так, чтобы эти свойства не были существенно повреждены. Источником подобных повреждений может быть та химическая реакция, которая используется для иммобилизации.

Например, при восстановлении оснований Шиффа при иммобилизации белков на альдегидные группы носителя не рекомендуется применять боргидрид лития, поскольку он, в отличие от более мягкого восстановителя – цианоборгидрида, может восстанавливать дисульфидные мостики в белках, необходимые для сохранения их нативности.

Вторым источником повреждений может быть взаимодействие иммобилизованного биополимера с носителем. Этого можно в значительной мере избежать, используя для удаления его от носителя спейсеры достаточной длины. В качестве примеров выпускаемых носителей с такими группами можно привести носители, несущие иммобилизованные остатки диаминодипропиламина и остаток иминодиуксусной кислоты, например:





§ 11.2. Введение меток в белки и нуклеиновые кислоты для их последующей детекции

Для решения широкого спектра задач с участием нуклеиновых кислот и белков необходимо «увидеть» определенные биополимеры в реакционных смесях, в составе сложных надмолекулярных комплексов, в органеллах или даже в клетках. Это может быть достигнуто введением в них специальных меток. Наиболее широко с этой целью используются *радиоактивные* и *флуоресцирующие метки.*

В качестве радиоактивных меток наиболее широко используют *радиоактивные изотопы* водорода (^{3}H, тритий, период полураспада 12,26 лет), углерода (^{14}C, период полураспада 5570 лет), фосфора (^{32}P и ^{33}P, периоды полураспада 14,3 и 25 дней), серы (^{35}S, период полураспада 87 дней) и йода (^{125}I и ^{129}I с периодами полураспада 60 дней и $2x10^{7}$ лет). В силу простоты регистрации присутствия радиоактивности в промежуточных и конечных продуктах превращения меченых субстратов применение радиоактивных меток стало одним из основных подходов для изучения механизмов химических превращений, в том числе и биохимических.

Такие важные для биоорганической химии элементы, как азот и кислород, имеют лишь очень короткоживущие радиоактивные изотопы. Даже наиболее долгоживущие изотопы этих элементов имеют периоды полураспада порядка минут: азота ^{13}N – 10,1 мин, кислорода ^{15}O – 2 мин. Оба эти изотопа являются излучателями позитронов (β^{+}-распад). Такие изотопы для решения задач,

направленных на изучение механизмов реакции, пока что нашли ограниченное применение. Основное использование радиоактивных изотопов в химии основано на методе меченых атомов, с помощью которого исследуются пути превращения различных химических соединений. Для этого в исследуемые соединения и известные или предполагаемые продукты их превращения вводится радиоактивный изотоп, т. е. получается меченое соединение, и наблюдается по радиоактивности их накопление или расходование. Если, как в случае изотопов O и N, их время жизни измеряется минутами, то соответственно и получение меченых соединений или промежуточных соединений и измерение их концентрации по ходу процесса также должно проводиться за доли минут. В принципе, в ряде случаев этого можно достигнуть, особенно если для получения меченых соединений можно использовать ферментативные методы.

Для изучения механизма реакций наряду с радиоактивными изотопами находят широкое применение стабильные изотопы водорода ^{2}H (дейтерий, D), углерода ^{13}C, азота ^{15}N, кислорода ^{17}O,^{18}O.

Для нуклеиновых кислот наиболее широко используется меченая ^{32}P фосфорная кислота. [γ-^{32}P]АТР является донором остатка меченой фосфорной кислоты при многочисленных реакциях фосфорилирования углеводов, липидов и других соединений. Этот реагент, в частности, является субстратом фермента полинуклеотидкиназы, который катализирует перенос остатка фосфорной кислоты на 5'-концевой фрагмент олиго- или полинуклеотидной цепи. Фермент продуцируется клетками *E. coli*, инфицированными фагом Т4, что позволяет получать меченные по концевому фосфату олигонуклеотиды и нуклеиновые кислоты. Аналогичным образом может использоваться изотоп ^{33}P.

Полностью меченная по всем остаткам фосфорной кислоты нуклеиновая кислота получается при репликации и транскрипции с использованием в качестве субстратов [α-^{32}P]-нуклеозидтрифосфатов с меченым остатком фосфорной кислоты, ближайшим к нуклеозиду (α-фосфат), так как только этот остаток входит в состав синтезируемого полимера – два остальных остатка фосфорной кислоты в ходе синтеза отщепляются в виде пирофосфата.

Введение в анализируемые соединения изотопов водорода часто можно осуществить путем обмена с меченой водой. В этом случае заменяемые атомы H должны в определенных условиях достаточно легко ионизоваться и в то же время сохраняться в составе меченой молекулы во время эксперимента. Этим условиям, в частности, удовлетворяют атомы H в положении C5 пиримидиновых и атомы C8 пуриновых оснований. Замена атома H, связанного с атомами N или O, на его изотопы в водном растворе проходит очень легко, но метка нестабильна в водных растворах и быстро обменивается с молекулами воды.

Получение соединений, содержащих вместо основного природного изотопа ^{12}C значительное, превосходящее природное содержание стабильного изотопа ^{13}C или радиоактивный ^{14}C, возможно лишь путем химического синтеза необходимого соединения с использованием меченого предшественника

или, если соединение получается из природных источников, выращиванием необходимого соединения на среде, содержащей меченый предшественник. Так, если необходимо приготовить меченое соединение, которое получается исходя из дрожжей или бактерий, то последние следует выращивать на среде, содержащей в качестве источника углерода меченый бикарбонат. Это же относится к получению меченных по сере сложных органических молекул цистеина и метионина.

Второй подход, широко используемый для наблюдения за биополимерами в исследуемых системах, основан на введении в биополимеры флуоресцирующей метки. В случае нуклеиновых кислот это может быть достигнуто путем введения в пиримидиновые гетероциклы по положениям С4 или С5 спейсера с алифатической аминогруппой, по которой можно ввести флуоресцентные метки.

Как уже указывалось в § 3.2, нуклеозидтрифосфаты, содержащие модифицированные по С4 или С5 радикалы, в ряде случаев могут служить субстратами полимераз нуклеиновых кислот. Это открывает возможность ввести алифатические аминогруппы в состав олиго- и полинуклеотидов. По таким аминогруппам можно проводить дериватизацию олигонуклеотидов и нуклеиновых кислот, в том числе вводить в них флуоресцентные метки. Однако в отличие от радиохимического подхода в этом случае в состав нуклеиновой кислоты вводится объемистый радикал, который может существенно повлиять на свойство исследуемой нуклеиновой кислоты, так что в каждом конкретном случае следует выяснить, в какой мере введенная метка влияет на исследуемые свойства нуклеиновой кислоты: способность специфично взаимодействовать с определенными партнерами и претерпевать направленные конформационные переходы в результате таких взаимодействий или действия специфических эффекторов.

Примеры используемых флуоресцентных меток для нуклеиновых кислот уже приводились в § 4.3 в связи с рассмотрением подходов по секвенированию нуклеиновых кислот методом Сэнгера.

Глава 12. Специфические взаимодействия биополимеров. Природа и применение в биоорганической химии

§ 12.1. Аффинные сорбенты

Большинство объектов биоорганической химии выделяются из природного материала (биомассы), представляющего собой смесь большого числа различных веществ. Для их выделения используются все основные приемы, применяемые в химии нелетучих соединений – осаждение, кристаллизация, различные классические виды хроматографии. Однако при выделении индивидуальных биополимеров этого в ряде случаев оказывается недостаточно. Для окончательного решения вопроса используется способность подлежащего выделению объекта к высокоселективному взаимодействию с некоторым определенным биополимером-партнером. Наиболее технологичным вариантом использования таких партнеров является их иммобилизация на нерастворимом носителе. Это позволяет сорбировать выделяемый объект из раствора, отделив его от всех других присутствующих в том же растворе компонентов, а затем его десорбировать соответствующим изменением условий.

Такие функционирующие на основе высокого сродства (аффиности) сорбенты получили название *аффинных сорбентов*. Эффективность разделения, основанного на сорбционных методах, существенно возрастает при использовании этих методов в хроматографическом варианте. При хроматографии разделяемая смесь наносится узкой полоской на колонку с сорбентом или на определенную точку листа специальной хроматографической бумаги и перемещается вместе с током растворителя. Из-за различия сродства разделяемых веществ к сорбенту они отличаются по времени удерживания на сорбенте и выходят с сорбента через различное время в виде отдельных фракций. В случае применения этого метода с использованием аффинных сорбентов его квалифицируют как *аффинную хроматографию*.

Число конкретных задач по фракционированию сложных смесей и выделению индивидуальных веществ очень велико. Выбор биополимеров и других соединений для иммобилизации определяется типом решаемой задачи. Для выделения какого-либо фермента можно иммобилизовать на носителе либо субстрат этого фермента, либо какой-либо аналог, обладающий специфичным сродством к этому ферменту, например, конкурентный ингибитор.

Для выделения тех белков, к которым получены моноклональные антитела, можно воспользоваться их иммобилизацией, т. е. получить *иммуносорбенты*. Иммобилизовав какой-либо антиген, можно из смеси иммуноглобулинов выделить те, которые специфичны к этому антигену.

Сорбенты, содержащие иммобилизованные олигонуклеотиды, могут быть использованы для выделения нуклеиновых кислот, содержащих последовательности, комплементарные иммобилизованным нуклеотидам. Особенно широкое применение нашли сорбенты с иммобилизованными олиготимидилатами или олигоуридилатами. Так как мРНК содержат на 3'-конце поли(А) фрагменты, то такие сорбенты позволяют отделять мРНК от суммы других РНК.

Одним из приложений аффинной хроматографии является выделение индивидуальных тРНК из их смеси. Например, используя сорбент, несущий олигонуклеотид pTpTpCpApG, комплементарный участку 32–36 антикодоновой петли фенилаланиновой тРНК, удалось добиться 100-кратной очистки этой тРНК, получив препарат, близкий к индивидуальному.

Высокую разрешающую силу аффинной хроматографии для разделения сложной смеси олигонуклеотидов демонстрирует хроматограмма на рис. 79. В качестве примера решения достаточно сложной задачи, решаемой с помощью аффинной хроматографии, можно привести разделение смеси диастереоизмерных олигонуклеотидов GpCpCp(OC_2H_5)Ap(OC_2H_5)Ap(OC_2H_5)ApCpA на колонке с иммобилизованным на аминосилохроме комплементарным олигонуклеотидом pdTpdGpdTpdTpdTpdGpdGpdC. Нефракционированный олигонуклеотид с тремя хиральными центрами должен содержать $2^3 = 8$ диастереомеров. Как видно, получено шесть фракций, т. е. значительная часть изомеров выделяется в индивидуальном виде.

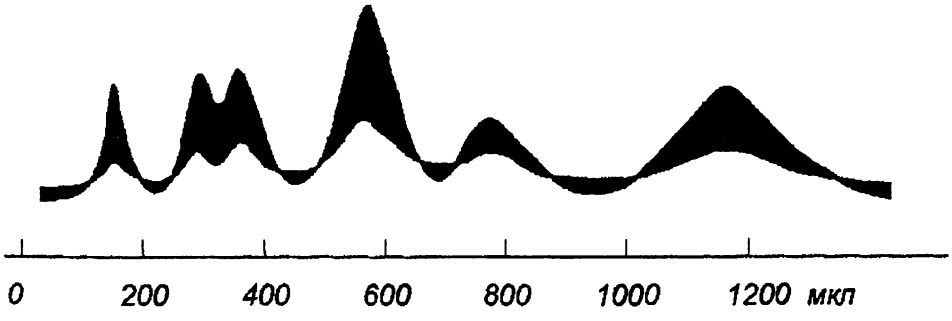


Рис. 79. Профиль элюции смеси 8 диастереоизомеров с колонки с иммобилизованным на аминосилохроме комплементарным олигонуклеотидом

Аффинные сорбенты с иммобилизованными олигонуклеотидами могут быть использованы и для выделения белков, обладающих сродством к определенным нуклеотидным последовательностям. В качестве примера можно привести выделение фермента рестрикции *FokI*. Этот фермент относится к группе ферментов рестрикции (см. § 3.2), которые обладают сродством к определенной последовательности нуклеотидов, но проводят расщепление вда-

ли от специфической области узнавания. Рестриктаза *FokI* узнает дуплекс, образованный комплементарными олигонуклеотидными фрагментами pd(GGATG) и pd(CATCC), но расщепляет нуклеиновую кислоту после 9-го нуклеотида от места узнавания первого из олигонуклеотидов и 13-го от места узнавания второго олигонуклеотида. В описываемом случае на носителе был иммобилизован олигонуклеотид pd(TTGGATGACGCATCTT), а для образования дуплекса в элюирующий раствор был добавлен комплементарный олигонуклеотид 3'd(AACCTACTGCGTAGAA) (последовательности, узнаваемые ферментом, подчеркнуты). В отсутствие этого олигонуклеотида элюция сорбированной рестриктазы происходила при концентрации NaCl в элюирующем растворе 0,16 М, а при наличии в среде дополнительного олигонуклеотида, формирующего полноценный сайт узнавания, элюция фермента происходила только в растворе 0,28 М NaCl.

Аффинная хроматография является важным элементом при получении рекомбинантных белков, образующихся путем экспрессии рекомбинантных ДНК. Поскольку экспрессия проводится в клетках, такие белки получаются в составе сложной смеси. Для выделения индивидуального рекомбинантного белка в ряде случаев удобно снабдить его дополнительной группой, обеспечивающей его специфическую сорбцию на специально приготовленном сорбенте. Так, широкое применение нашли рекомбинантные белки, у которых на С-конце присутствует цепочка из нескольких (обычно шести) остатков гистидина. Этот фрагмент обеспечивает высокое сродство к иммобилизованным на сорбенте хелатирующим реагентам, таким как нитрилоуксусная или иминодиуксусная кислота. С такого сорбента присоединившийся белок может быть удален избытком имидазола.

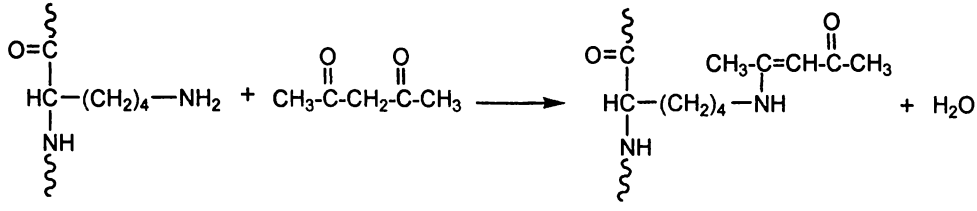
Для выделения гликопротеидов широко используются иммобилизованные лектины – белки, обладающие специфическим сродством к гликопротеидам, например конкановалин.

§ 12.2. Аффинная модификация биополимеров. Необратимые ингибиторы ферментов и рецепторов

Химические воздействия на белки и нуклеопротеиды (химическая модификация), как правило, приводят к потере ими функциональной активности, если модифицируемые остатки принимают участие в формировании функционально значимых областей. Поэтому химическая модификация может служить источником информации о структурных основах функционирования биополимеров. В первый период становления молекулярной биологии химическая модификация в ее непосредственном виде широко использовалась для получения сведений о связи функций биополимеров с их структурой. В то же время химические реагенты, действующие на группы определенного типа, модифицируют в той или иной степени все однотипные группы. Поэтому

в большинстве случаев одновременно с превращением групп, участвующих в функционировании белка или нуклеопротеида, затрагиваются и другие группы того же типа, что в значительной мере обесценивает получаемую информацию.

Например, была исследована модификация фермента фенилаланил-тРНК синтетазой, катализирующей присоединение фенилаланина к тРНК, специфичной для этой аминокислоты, 1,4-пентандионом. Этот реагент при нейтральном pH специфично взаимодействует с ε-аминогруппами лизина:



Модификация этим реагентом приводит к потере активности фермента. Отсюда можно сделать вывод, что в структуру активного центра фермента входит лизин. Однако оказалось, что для потери ферментом каталитической активности на 80 % требуется модификация 25 остатков лизина. Из общих соображений видно, что такое число остатков лизина в формировании активного центра участвовать не может. Какие же именно остатки лизина входят в структуру активного центра, определить из таких данных не представляется возможным. Для получения более определенных химических данных о связи функции со структурой наиболее важное значение приобрели методы, получившие название аффинной модификации.

Основная идея метода состоит в использовании реагентов, которые наряду с реакционноспособной группой определенной химической специфичности содержат остаток, обладающий специфическим сродством к определенному функционально значимому участку модифицируемого биополимера. Как уже говорилось, способность к высокоселективному взаимодействию с определенными партнерами (узнавание партнеров) является важнейшим условием функционирования биополимеров. Оно обеспечивается многоточечным нековалентным взаимодействием нескольких групп такого партнера с набором групп биополимера, имеющих соответствующее расположение на полимере. Как правило, не все группы этого партнера имеют одинаковую значимость для взаимодействия. Поэтому в большинстве случаев удается найти такие остатки, которые можно заменить на реакционноспособную группу или по которым можно присоединить такую группу, не нарушая в существенной степени способность к узнаванию соединения полимером. Созданный таким образом реагент нековалентно связывается с определенной областью биополимера и направляет реакционноспособную группу в область узнавания. Направленность реакции обеспечивается сродством (аффинностью) реагента, в связи с чем такая модификация получила название *аффин-*

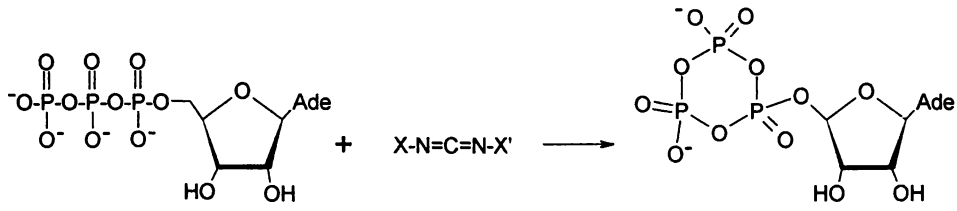
ной модификации. Так как описываемые подходы, в частности, позволяют ввести по определенному остатку биополимера радиоактивную, флуоресцентную, спиновую или какую-либо другую метку, то подход часто называют *аффинным мечением* (affinity labeling). Реагенты, с помощью которых осуществляется аффинная модификация, обычно называют аффинными реагентами. В типичных случаях аффинные реагенты состоят из двух основных функционально значимых частей – реакционноспособной группы, осуществляющей модификацию, и фрагмента, обеспечивающего специфичность. Последняя направляет химически активную группу, т. е. адресует ее определенной области модифицируемого биополимера. Поэтому эту часть иногда называют адресом.

Из самого определения понятия аффинной модификации биополимера следует, что модификация применяется к биополимерам, имеющим специфическое сродство к некоторому партнеру. Наиболее типичными объектами применения аффинной модификации являются ферменты, которым свойственно специфичное узнавание субстратов, ингибиторов и эффекторов, и белковые рецепторы, первичная функция которых сводится к селективному узнаванию определенных лигандов, например, гормонов. Аффинная модификация ферментов, проходящая по их активным центрам, как правило, сопровождается потерей ферментативной активности (инактивацией). Тем самым аффинные реагенты, модифицирующие активный центр фермента, являются необратимыми ингибиторами ферментов.

Описать даже в рамках одной монографии и тем более в рамках учебного пособия весь спектр задач, решенных к настоящему времени методом аффинной модификации, а также весь спектр использованных реагентов, не представляется возможным. Поэтому некоторые типичные подходы к конструированию реагентов будут приведены на примере соединений, являющихся реакционноспособными аналогами АТР, одного из веществ, участвующего в качестве субстрата в огромном множестве реакций.

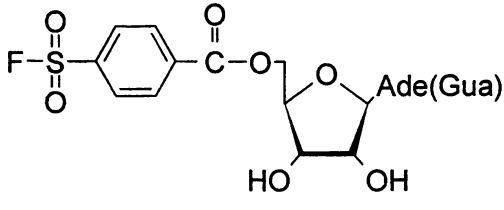
В молекулу АТР можно вводить реакционноспособные фрагменты по гетероциклу, в особенности по положениям 2 или **8**. Примерами таких реагентов, нашедших приложения в аффинной модификации, являются 2-азидо-АТР и **8**-азидо-АТР. Можно ввести реакционную группу по рибозному фрагменту, либо используя ацилирование по одной из ОН-групп, либо основываясь на особенностях цис-диольных групп. Эти группы легко образуют циклические структуры с карбонильными соединениями, с помощью которых можно вводить химически активные группы. Можно также использовать с этой целью описанную в § 2.3 реакцию окисления цис-диольных групп периодатом, приводящую к образованию двух альдегидных групп. По ним через образование оснований Шиффа и последующее восстановление боргидридом лития или натрия легко ввести по аминогруппам фрагмент, несущий химически активную группу.

Трифосфатную группу можно превратить в реакционноспособную циклическую триметафосфатную обработкой карбодиимидами.



Аденозин-5'-триметафосфат может служить аффинным реагентом, моделирующим ATP и способным осуществлять аффинное фосфорилирование аминогрупп остатков лизина в центре связывания.

Если трифосфатная группа ATP не имеет определяющего значения при взаимодействии ATP с биополимером, можно заменить ее на *п*-фторсульфонилбензоильный остаток. Производные аденозина и гуанозина, несущие такой остаток вместо трифосфатной группы, нашли широкое применение для аффинной модификации белков, одним из субстратов или эффектором которых является ATP или GTP.



При проведении аффинной модификации не всегда удается полностью исключить параллельную неспецифическую модификацию каких-либо других остатков. При модификации фермента присоединение остатка реагента может произойти вне активного центра фермента. Для того, чтобы выявить аминокислотный остаток в белке, модифицированный в активном центре, М. А. Грачевым с соавторами (Лимнологический институт СО РАН) был предложен подход, названный ими сверхселективным мечением. Основную методологию этого подхода можно проиллюстрировать работой авторов по сверхселективной модификации РНК-полимеразы. Для модификации использовали производное тринуклеотида XpdCpdGprC, где X – остаток N-метилимидазола. На первой стадии фермент модифицировали нерадиоактивным реагентом. Затем в реакционную смесь вводился [α-P^{32}] UTP. Та часть тринуклеотида, которая оказалась в районе активного центра фермента, элонгировалась и становилась меченой. Тринуклеотиды, оказавшиеся не в активном центре, элонгации не подвергались и оставались немечеными. Метка в этом

случае была обнаружена в β-субъединице фермента и идентифицирована как связанная с остатком лизина. Схема сверхселективного мечения приведена на рис. 80. Из приведенного описания видно, что предложенный метод предполагает возможность проведения двухстадийного процесса и что аффинная модификация не лишает фермент каталитической активности.

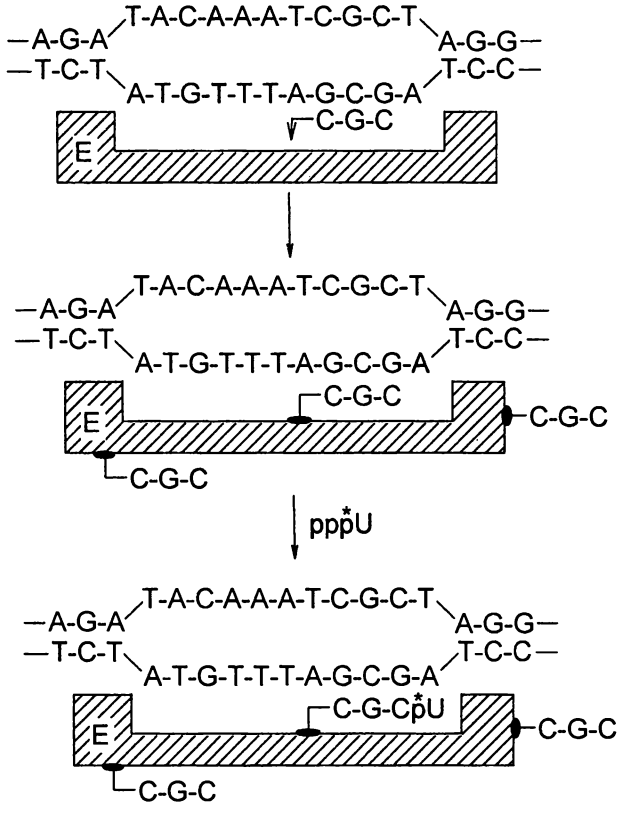


Рис. 80. Схема сверхселективного мечения РНК-полимеразы. Заштрихованный многоугольник Е – фермент. Звездочкой отмечен меченый остаток уридина. Черной шляпкой отмечены точки ковалентного связывания реагента с ферментом

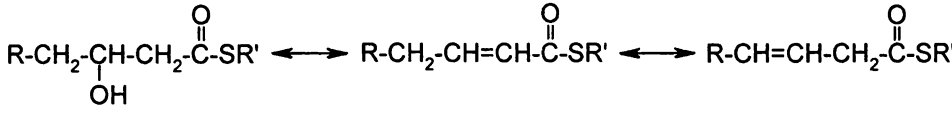
После проведения аффинной модификации белков интересно установить, по какому аминокислотному остатку прошла модификация. Естественно, что выявление точек модификации имеет смысл проводить с белком, первичная структура которого известна. Обычно эта задача решается в два этапа. На первом этапе одним из методов, рассмотренных в § 8.1, проводится специфическое расщепление модифицированного белка на фрагменты и устанавливается, в каком из полученных пептидов находится модифицированный оста-

ток. Если модификация проводилась с использованием радиоактивного реагента, то дальнейшему исследованию подлежит тот пептид, который оказался радиоактивным. Выявить модифицированный пептид можно также масс-спектрометрическим анализом. Ожидаемые массы всех образующихся при специфическом расщеплении белка пептидов естественно легко вычисляются, и в спектре масс довольно просто выявить измененный при модификации пептид.

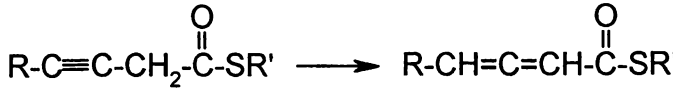
Поскольку химические свойства аффинного реагента известны, то можно определить, какие из аминокислотных остатков могли быть модифицированы. Если такой остаток является единственным, то можно считать, что задача решена. Если же модификация могла пройти по одному из нескольких способных к реакции остатков, то необходимо дальнейшее исследование модифицированного пептида. Это можно, в частности, сделать методом Эдмана (см. § 8.2). При использовании такой пошаговой процедуры при достижении модифицированного остатка расщепление по Эдману либо вообще не произойдет, либо получится аномальный, несвойственный никакой природной аминокислоте фенилтиогидантоин.

Своеобразным типом аффинной модификация является модификация ферментов реагентами-самоубийцами (suicide substrates). Эти реагенты, обладающие сродством к некоторому ферменту, сами по себе не обладают реакционной способностью, но под действием фермента переходят в химически активное соединение, которое может аффинно модифицировать фермент.

В качестве примера можно привести один из ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот, – дегидратазу β-гидроксиацилтиоловых эфиров, катализирующую реакцию



Поскольку на стадии изомеризации фермент осуществляет удаление протона от атома С, примыкающего к карбонильному атому углерода, он может осуществлять такой же процесс с атомом С β, γ-ацетиленовых тиоэфиров, в результате чего ацетиленовая связь изомеризуется в алленовый фрагмент.



Последний обладает алкилирующими свойствами и может модифицировать имидазольное кольцо остатка гистидина в активном центре фермента и тем самым инактивировать фермент.

Схема аффинной модификации в простейшем случае может быть записана в виде

$$P + X \Leftrightarrow PX \rightarrow PZ(K_x, k),$$

где P – модифицируемый биополимер, X – аффинный реагент, PX – их комплекс, PZ – продукт аффинной модификации, K_x – константа ассоциации мишени и реагента, k – константа скорости внутрикомплексной реакции.

Равновесие, характеризуемое константой ассоциации

$$K_x = \frac{[PX]}{[P][X]},$$

и уравнение материального баланса

$$p_0 = [P] + [PX] + [PZ],$$

где p_0 – полная концентрация модифицируемого фермента,

позволяют записать уравнение для кинетики накопления продукта в виде

$$\frac{d[PZ]}{dt} = \frac{kK_x[X](p_0 - [PZ])}{1 + K_x[X]}.$$

Следовательно, из данных по кинетике накопления PZ при нескольких концентрациях компонентов реакции можно определить параметры k и K_x, характеризующие скорость внутрикомплексной реакции и сродство аффинного реагента к мишени. Если реагент берется в достаточном избытке, то [X] можно заменить на начальную концентрацию реагента x_0, и уравнение превращается в кинетическое уравнение реакции первого порядка с кажущейся константой скорости $k_{каж}$:

$$k_{каж} = kK_x x_0 (1 + K_x x_0).$$

В присутствии природного лиганда или его структурного аналога Y аффинная модификация либо вообще не происходит, либо существенно замедляется, при этом Y является конкурентом по отношению к аффинному реагенту. В этом случае схему аффинной модификации для простейшего случая следует дополнить обратимой реакцией

$$P + Y \Leftrightarrow PY(K_Y).$$

Тогда выражение для $k_{каж}$ принимает вид

$$k_{каж} = \frac{kK_x x_0}{1 + K_x x_0 + K_Y y_0},$$

где y_0 – концентрация конкурирующего реагента.

Для реакции первого порядка выражение для концентрации PZ как функции времени имеет очень простой вид:

$$[PZ] = x_0\left(1 - \exp^{-k_{каж}t}\right)$$

и из кинетических кривых для накопления PZ легко определяется $k_{каж.}$, а из зависимости последней от x_0, при наличии конкурента также от y_0, легко определяются соответствующие константы ассоциации.

Применение аффинной модификации способствовало пониманию механизма функционирования рибосом. Главный химический процесс, происходящий на рибосомах, – это образование новых пептидных связей. Растущая полипептидная цепь при этом связана с одной молекулой тРНК, а очередной вступающий в образование новой пептидной связи аминоацильный остаток – с другой молекулой тРНК. Этот процесс может быть записан в виде

$$XCHR_1CO\text{-}\ldots\text{-}NHCHR_iCO\text{-}tRNA^{(i)} + NH_3^+CHR_{i+1}CO\text{-}tRNA^{(i+1)} \rightarrow$$

$$\rightarrow XCHR_1CO\text{-}\ldots\text{-}NHCHR_iCO\text{-}NHCHR_{i+1}CO\text{-}tRNA^{(i+1)} + tRNA^{(i)},$$

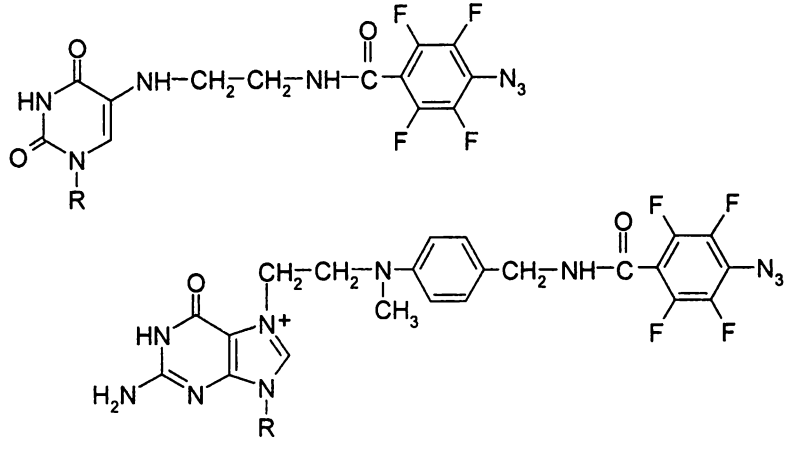
где X = H при синтезе у эукариот, и X = HCO у прокариот.

Участвующие в этом процессе две молекулы тРНК связаны нековалентно, но специфично со специальными участками рибосомы, обозначаемыми для пептидил-тРНК как P-сайт, а для аминоацил-тРНК как A-сайт. Освободившаяся от аминокислотного остатка тРНК, по-видимому, еще остается в контакте с рибосомой в выходном E-сайте. Отбор очередной аминоацил-тРНК для удлинения полипептидной цепи происходит при участии соответствующего кодона мРНК, и следовательно часть мРНК должна находиться в контакте с рибосомой.

Отбор очередной молекулы аминоцил-тРНК происходит с участием специального белкового фактора элонгации EF-1, с которым связана молекула GTP (у прокариот этот фактор называют Tu). Отбор начинается с образования комплекса рибосома·мРНК·аминоацил-тРНК·EF-1·GTP. Комплекс обеспечивает посадку аминоцил-тРНК в области A-сайта, причем этот процесс сопровождается гидролизом GTP до GDP и отщеплением EF-1·GDP от комплекса. После этого происходит перенос пептидного остатка на новую ами-

нокислоту с освобождением в свободном виде тРНК, которая перед этим была связана с пептидом. Однако при этом тРНК, несущая удлиненный пептид, остается в А-сайте, и для продолжения процесса необходимо ее перемещение вместе со связанным с нею кодоном в Р-сайт (*транслокация*). Это происходит с участием еще одного белкового фактора, EF-2 (в случае прокариот его называют фактором G), который также функционирует в виде комплекса EF-2·GTP. Транслокация сопровождается гидролизом GTP и отщеплением EF-2·GDP от рибосомы. Таким образом, рибосома на разных стадиях трансляции специфично взаимодействует с молекулами тРНК в А-, Р- и Е-сайтах, с мРНК, с факторами трансляции. Для установления механизма трансляции необходимо установить, с какими фрагментами рибосомной РНК и с какими рибосомными белками взаимодействуют перечисленные участники трансляции. Аффинная модификация позволяет локализовать все эти взаимодействия на разных этапах образования новой пептидной связи.

В качестве иллюстрации можно привести данные по локализации взаимодействий мРНК с рибосомами. Эти данные являются результатом систематических исследований, проводимых на рибосомах человека в лабораториях Г. Г. Карповой и А. Г. Веньяминовой в ИХБФМ СО РАН. Для аффинной модификации использовали синтетические олигорибонуклеотиды, в определенные участки которых вводился фотоактивный нуклеотид: U или G с введенной через спейсер соответственно по атому C5 и C7 фотоактивной тетрафторфенилазидогруппой.



На рис. 81 схематично приведены комплексы, в составе которых проводилась аффинная модификация реагентами на основе гексануклеотида UUUGUU, в один из первых четырех нуклеотидов которого вводилась фотоактивная группа. Комплексы подвергались УФ-облучению, после чего из них выделялась рибосомная РНК и определялось положение модифицированного нуклеотида (природа и номер в цепи рРНК). Идентифицировались также ри-

босомные белки, подвергавшиеся модификации. В комплексе (1) модифицировался нуклеотид G-1207, в комплексе (2) – G-961, в комплексе (3) – нуклеотиды A-1823 – A-1825. Из белков в наибольшей степени модифицировались в комплексе (1) S3 и S26, в комплексе (4) – S15.

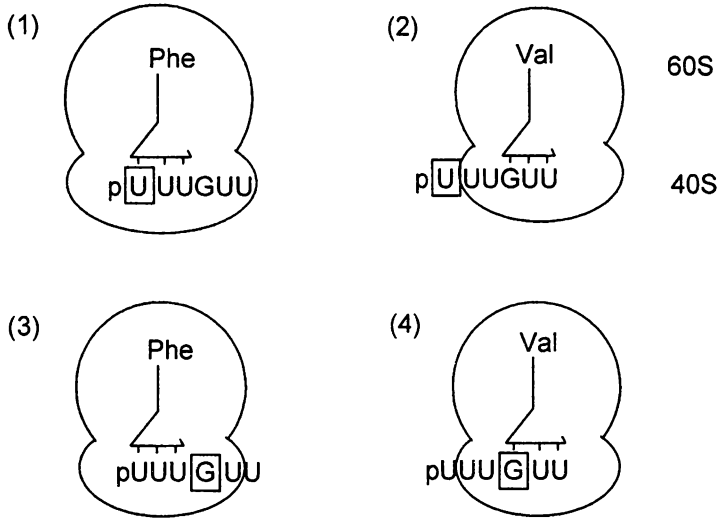


Рис. 81. Комплексы, в составе которых проводилась аффинная модификация реагентами на основе гексануклеотида UUUGUU. Ломаной линией символически изображена тРНК, расположенная в Р-сайте. На вершине подписана связанная с ее акцепторым концом аминокислота. Прямоугольником обведены нуклеотидные остатки, несущие фотоактивную группу

Приведенные, а также значительное число других данных, полученных в тех же коллективах, позволили им представить модель размещения мРНК на малой субъединице (рис. 82).

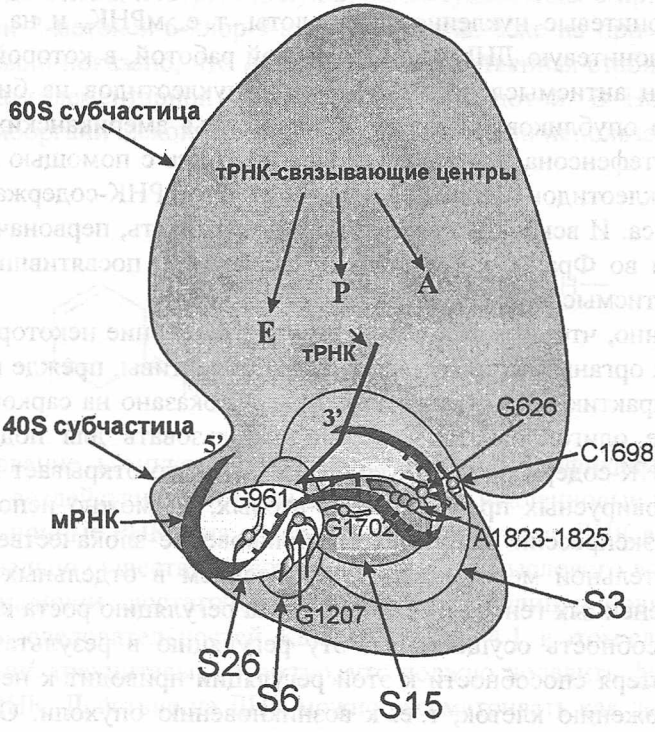


Рис. 82. Схема расположения мРНК относительно компонентов 80S рибосомы человека по данным сшивок с аналогами мРНК. Большие овалы – рибосомные белки, кружочки – нуклеотиды 18S рРНК

§ 12.3. Антисмысловые нуклеиновые кислоты и их аналоги

На сегодняшний день наиболее изученным типом высокоселективного взаимодействия между макромолекулами являются Уотсон – Криковские взаимодействия между взаимно комплементарными антипараллельными нитями нуклеиновых кислот. В случае произвольной однонитевой неструктурированной нуклеиновой кислоты к любому её участку можно в силу этого подобрать олигонуклеотид (в случае большого участка – нуклеиновую кислоту), который образует с ним дуплекс, что, скорее всего, должно существенно повлиять на свойства этого участка. Поскольку в последовательности нуклеотидов природных ДНК или РНК, как правило, заложен определенный биологический смысл, т. е. способность выполнять некоторую биологическую функцию, то такой олигонуклеотид может существенно повлиять на реализацию этой функции, вероятнее всего, подавить частично или полностью ее проявление. Поэтому такие олигонуклеотиды в настоящее время получили название *антисмысловых,* или антисенс(antisense) олигонуклеотидов,

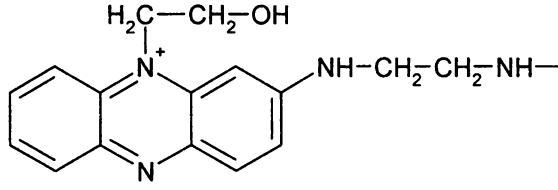
или нуклеиновых кислот. Антисмысловые олигонуклеотиды могут действовать на однонитевые нуклеиновые кислоты, т. е. мРНК, и на содержащие РНК или однонитевую ДНК вирусы. Первой работой, в которой был продемонстрирован антисмысловой эффект олигонуклеотидов на биологический объект, была опубликованная в 1978 году статья американских ученых Замечника и Стефенсона, которым удалось подавить с помощью антисмысловых олигонуклеотидов развитие в культуре клеток РНК-содержащего вируса саркомы Рауса. И вскоре после этого стали возникать, первоначально в России, США и во Франции, группы исследователей, посвятившие свою деятельность антисмысловой технологии.

Естественно, что возможность подавить проявление некоторой информации в живых организмах сулит огромные перспективы, прежде всего для медицинской практики. Во-первых, как и было показано на саркоме Рауса, антисмысловые олигонуклеотиды можно использовать для подавления размножения РНК-содержащих вирусов в клетках. Это открывает путь к созданию противовирусных препаратов. Во-вторых, их можно использовать для подавления экспрессии онкогенов. Возникновение злокачественных опухолей в значительной мере связано с появлением в отдельных нормальных клетках измененных генов, ответственных за регуляцию роста клеток и потерявших способность осуществлять эту регуляцию в результате некоторой мутации. Потеря способности к этой регуляции приводит к неконтролируемому размножению клеток, т. е. к возникновению опухоли. Соответствующие нормальные гены называют протоонкогенами, а мутировавшие гены, способствующие возникновению злокачественных опухолей, – онкогенами. Это открывает возможность создания на основе антисенс олигонуклеотидов противоопухолевых препаратов.

С точки зрения практического использования антисмысловых олигонуклеотидов особенно существенны две главные особенности таких препаратов: 1) любые олигонуклеотиды могут быть получены по единой технологии, т. е. в случае реализации этого принципа фактически можно организовать производство, пригодное для создания любых противовирусных и противоопухолевых препаратов; 2) в случае приспособления вируса или опухоли путем мутаций к воздействию определенного антисмыслового олигонуклеотида достаточно установить природу этой мутации и синтезировать антисмысловой олигонуклеотид к мутировавшему вирусу.

Одним из первых вопросов, вставших при развитии антисмысловой технологии, было исследование возможности повысить эффективность модификации путем упрочнения дуплексов, образуемых реагентами и мишенью. Первоначально этого удалось достичь присоединением к олигонуклеотиду полиароматических радикалов, которые за счет стекинга или других нековалентных взаимодействий повышали прочность дуплексов. Как описано в § 4.1, удобным критерием прочности дуплекса является его температура плавления. Первые исследования этого рода были выполнены во Франции

группой Клода Элена, который получил олигонуклеотиды с присоединенными остатками 2-метокси-6-хлор-9-аминоакридина. Уже на примере олиготимидилатов было показано, что имеет место существенная стабилизация комплексов с комплементарной полиаденилoвой кислотой. В Новосибирском институте биоорганической химии для этой цели были использованы остатки феназиния.



Использование комплементарно-адресованной модификации открывало перспективу воздействия только на однонитевые нуклеиновые кислоты, т. е. на информационные РНК и на содержащие однонитевые ДНК вирусы. Однако принципиально существует возможность антисмыслового воздействия на ДНК при наличии достаточно протяженных полипуриновых/полипиримидиновых последовательностей. Как описано в § 4.1, в этом случае возможно образование трехнитевых структур, что должно подавить функцию этого фрагмента ДНК. Действие на ДНК можно рассматривать как действие на гены, в связи с чем подход получил название *антигенного воздействия*, хотя это привело к смешению двух совершенно разнородных понятий – «антигенного воздействия» и «антиген» в иммунологии. В качестве примера экспериментального исследования, проведенного с целью антигенного воздействия на ДНК, можно привести воздействие олигопиримидина, построенного из 2'-аминоэтоксипиридиновых нуклеотидов, с участком ДНК клеток, специфично взаимодействующих с промотором РНК, программирующей синтез иммуноглобулина IgE. Ниже приведены структуры этого участка и использованного олигонуклеотида

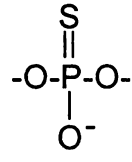
(5')...-CpCpApApGpApApCpApGpApGpApGpApApApApG-...(3')
(3')...-GpGpTpTpCpTpTpGpTpCpTpCpTpCpTpTpTpTpC-...(5')

(5')pTpTpCpTpTpCpTpCpTpCpTpCpTpTpTp(3')

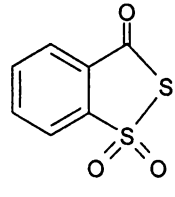
Приведенный дуплекс специфично связывает фактор транскрипции STAT6, ответственный за активацию транскрипции. При достаточной концентрации антигенного олигонуклеотида это связывание практически полностью подавлялось, в то время как в присутствии другого пиримидинового олигонуклеотида с несоответствующей мишени последовательностью такого эффекта не наблюдалось.

При попытках использовать образование триплексов для воздействия на ДНК при переходе к эукариотическим клеткам оказалось, что хромосомная ДНК экранирована от действия реагентов множеством белков. Эта проблема еще ждет своего решения.

Создание олигонуклеотидов, образующих дуплексы или триплексы, в том числе их производных, несущих реакционноспособные группы, сразу же сталкивается с новой серией проблем, когда от экспериментов с изолированными нуклеиновыми кислотами переходят к клеткам и тем более к целым организмам. Уже говорилось о сложности прохождения таких реагентов через клеточные мембраны. Серьезным осложнением является деградация олигонуклеотидов или олигонуклеотидных адресов под воздействием внутриклеточных, а в случае многоклеточных организмов – и внеклеточных нуклеаз (например, в плазме крови), которые повреждают адресующую часть реагента. Для преодоления этой трудности предложен ряд подходов, среди которых наиболее широко используемым в настоящее время является применение *фосфоротиоатных аналогов* олигонуклеотидов со структурой межнуклеозидного узла,



устойчивость которого к гидролизу межнуклеотидной связи существенно выше, чем в случае классических фосфодиэфиров. Такие мономеры получаются из тех же фосфамидитов, которые используются при химическом синтезе олигонуклеотидов (см. § 5.3), но вместо окисления они обрабатываются каким-либо донором атома серы. В качестве таких доноров предложено несколько реагентов, среди которых наиболее широко используемым является 1,2-бензодитиол-1,1-диоксид.



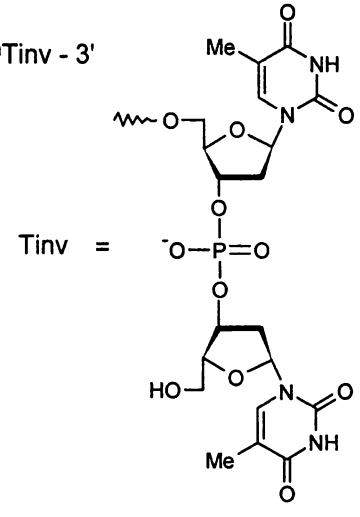
В настоящее время более перспективными представляются описанные в § 5.7 аналоги олигонуклеотидов, построенные из замкнутых нуклеотидов, из морфолиновых нуклеотидов и PNA-нуклеотидов.

Однако даже для воздействия на заведомо однонитевые информационные РНК исследователи столкнулись с тем, что часто мРНК имеет достаточно

сложную пространственную структуру и далеко не всегда склонна к образованию дуплексов с комплементарными олигонуклеотидами. Определенные надежды возлагаются на использование методов молекулярной селекции, позволяющих подобрать такие конструкции, которые будут обладать сродством не просто к определенной последовательности, но и к определенной пространственной структуре.

К антисмысловым воздействиям можно отнести и открытое в самом конце пошлого века явление *РНК-интерференции* (процесс подавления экспрессии гена при помощи малых молекул РНК). К этому времени уже были хорошо отработаны методы химического синтеза олигорибоолигонулеотидов и методы их получения путем транскрипции синтетических двунитевых дезоксирибонуклеотидов РНК-полимеразой фага Т7. Поэтому в последние десять лет начались активные исследования по подавлению экспрессии некоторых опухолеродных генов с помощью РНК-интерференции гена. В качестве примеров можно привести данные, полученные в ИХБФМ СО РАН в лаборатории В. В. Власова. Удалось с помощью синтезированных siRNA, направленных против фрагмента 697–715 третьего экзона гена *c-myc*, подавить экспрессию этого гена и подавить пролиферацию клеток эпидермоидной карциномы человека. Было также исследовано действие на экспрессию гена mdr siRNA, гомологичной участку 598–618 самого гена. Испытывалась как сама РНК, так и некоторые ее модификации, введенные для придания ей устойчивости к действию нуклеаз. Наилучшие результаты были получены с дуплексом

5' - AUCAUCCAUGGGGCUGGACU^{m}U^{m}Tinv - 3'
3' - GGUAGUAGGUACCCCGACCUG - 5'



содержащим на 3'-конце инвертированный фрагмент, в котором два остатка тимидилата соединены через остаток фосфата, связанного с двумя 3'-OH-группами, а два примыкающих остатка уридилата содержат 2'-OCH_3-группы.

Эффект оценивался по чувствительности клеток КВ-8-5 к противоопухолевому препарату винбластину. Уже при концентрации винбластина 5 нМ число выживших клеток составляло менее 50 % от контроля, а при концентрации 300 нМ было ниже 10 %.

§ 12.4. Установление областей контакта нуклеиновой кислоты. Футпринтинг

Среди многочисленных высокоселективных межмолекулярных взаимодействий, реализуемых в живой природе, важнейшим является взаимодействие белков с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами. Большое число ферментов представляет собой комплексы или ковалентные аддукты апоферментов с нуклеотидными кофакторами. Нуклеотидные фрагменты являются компонентами таких важнейших коферментов, как никотинамидные коферменты, NAD и NADP и кофермент А. Субстратом всех фосфотрансфераз и лигаз являются ATP и GTP. Естественно, все перечисленные низкомолекулярные соединения должны специфично взаимодействовать с апоферментами или ферментами.

Взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами играют определяющую роль практически во всех процессах, обеспечивающих умножение, репарацию и экспрессию генетической информации, а в большом числе случаев и регуляцию этих процессов. При репликации ДНК должна взаимодействовать с ДНК-полимеразой и рядом вспомогательных белков, при репарации – с белками, обеспечивающими все стадии этого процесса, при транскрипции – с РНК-полимеразой и факторами транскрипции. Для обеспечения трансляции должно произойти взаимодействие тРНК с соответствующими аминоацил-тРНК-синтетазами, а после присоединения аминокислот – взаимодействие аминоацил-тРНК с определенными сайтами рибосом, скорее всего, с определенными рибосомными белками. В составе самой рибосомы многие белки связаны с рибосомными РНК.

Естественно, что протяженные молекулы нуклеиновых кислот при образовании тех или иных специфических комплексов связываются с белками только некоторой частью нуклеотидов. Поэтому при изучении белково-нуклеиновых взаимодействий первый вопрос, встающий перед исследователями, – это выявление области контакта белков с нуклеиновой кислотой. Выявление области контакта нуклеиновой кислоты с некоторым белком может быть проведено путем химической модификации нуклеиновой кислоты. При этом нуклеотиды, находившиеся в области контакта с белком, остаются либо вообще немодифицированными, либо с резко пониженным по сравнению с остальными остатками уровнем модификации. Белок, закрывший фрагмент нуклеиновой кислоты, оставляет след или отпечаток своего присутствия. Этот подход получил название *футпринтинг* (отпечаток ноги).

Наиболее удобным для этой цели является использование химической модификации, приводящей к разрыву межнуклеотидных связей. В качестве примера можно привести работы, в которых использовался описанный в § 2.5 метод расщепления рибонуклеиновых кислот по фосфатам обработкой алкилнитрозомочевиной.

Следует обратить внимание на важную особенность химической модификации, которую нужно в максимально возможной степени принимать во внимание. Если модификация проводится так, что в основном затрагивается одна точка биополимера, то реагент заведомо имеет дело с биополимером с неповрежденной структурой и функцией. Вторая модификация проходит с уже модифицированным, т. е. поврежденным биополимером, что может приводить к искаженной информации. Однако определение единственной точки модификации при проведении множественной модификации требует очень чувствительного метода регистрации. В случае нуклеиновых кислот это достигается введением на один из концов нуклеиновой кислоты высокорадиоактивной метки. Чаще всего это делается с помощью полинуклеотидкиназы – фермента, катализирующего присоединение по 5'-концу [^{32}P]-фосфата с использованием [γ-^{32}P]АТР. Далее набор образовавшихся в результате щелочного расщепления фрагментов РНК разделяется с помощью гель-электрофореза, и по интенсивности соответствующих полос на радиоавтографе определяется степень модификации в каждой точке. В комплексе с ферментом часть полос, соответствующая точкам, защищенным от алкилирования, оказывается малоинтенсивной, что позволяет определить область контакта.

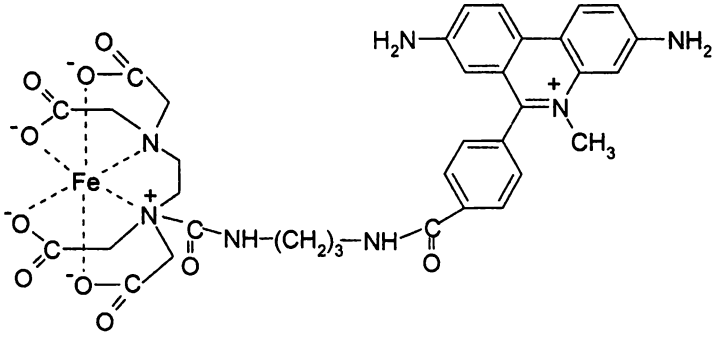
В последнее время для футпринтинга начали широко использовать ОН-радикалы, которые атакуют углеводные фрагменты как в одно-, так и в двунитевых участках ДНК. Происходящие при этом превращения, как правило, многостадийны и зависят от присутствия O_2. В главе 2 (см. § 2.3, рис. 16) приведена схема превращений остатка дезоксирибозы при отрыве атома Н в положении 4' в присутствии кислорода. Видно, что процесс заканчивается разрывом полинуклеотидной цепи. При наличии радиоактивной метки на одном из концов полинуклеотидного фрагмента с помощью гель-электрофореза легко определяется точка разрыва.

Радикалы OH· проще всего могут быть генерированы с помощью реактива Фентона – смеси соли Fe^{2+} и H_2O_2 по реакции

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+}OH + OH\cdot$$

Ионы железа берутся в виде комплекса с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Рекомендованы и более сложные соединения, например, коньюгат бромистого метидия и ЭДТА. В этом случае за счет интеркаляции метидия реагент оказывается достаточно прочно связан с ДНК, и образование свободных радикалов происходит вблизи ДНК, чем достигается большая эф-

фективность процесса. В силу небольшого размера радикалов локализация области контакта является достаточно точной.



Наряду с химическими методами для футпринтинга широко используют ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты. Но из-за большого размера «инструмента» ясно, что точность локализации области взаимодействия будет существенно ниже.

§ 12.5. Основные структурные элементы белков, ответственные за взаимодействия с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами. Цинковые пальцы

Систематический анализ комплексов белков с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами с установленной пространственной структурой этих комплексов или их фрагментов уже позволил выявить некоторые закономерности таких взаимодействий на уровне определенных мотивов, присутствующих в третичной структуре.

Простейшим мотивом белковой структуры, способным узнавать двунитевую ДНК, является мотив, состоящий из двух α-спиралей, связанных коротким однонитевым участком, обеспечивающим поворот одной спирали относительно другой. Этот мотив так и называют «спираль-поворот-спираль» (HTH, helix-turn-helix). В настоящее время он найден в структуре многих сотен белков прокариот и эукариот. С-концевой фрагмент полипептидной цепи, формирующий эту структуру, называют узнающей спиралью, поскольку он связан с соответствующим участком ДНК системой нековалентных взаимодействий и в соответствии со структурой этого участка различен для разных белков.

Некоторые белки, взаимодействующие с В-ДНК, могут образовывать структуру, представляющую собой мотив из двух α-спиральных фрагментов вместе с третьей узнающей спиралью, которая связывается с большой бороздкой ДНК. Эта структура получила название *гомеодомена.* Такие мотивы

в настоящее время выявлены в большом количестве при анализе установленных пространственных структур. Так, только среди белков дрозофилы найдено более 60 гомеодоменов.

У эукариот большое значение в белково-нуклеиновых взаимодействиях играют элементы пространственной структуры, получившие название *цинковых пальцев*. Общей чертой всех цинковых пальцев является наличие у них в определенных положениях четырех остатков цистеина или гистидина, которые координируют ионы цинка. Классической считается конструкция, в которой в качестве лигандов выступают два остатка цистеина и два остатка гистидина. В качестве примера на рис. 83 приведена структура цинкового пальца одного из белков лягушки. Один из белков с такой структурой принимает участие в активации транскрипции генов эукариотической рибосомной РНК.

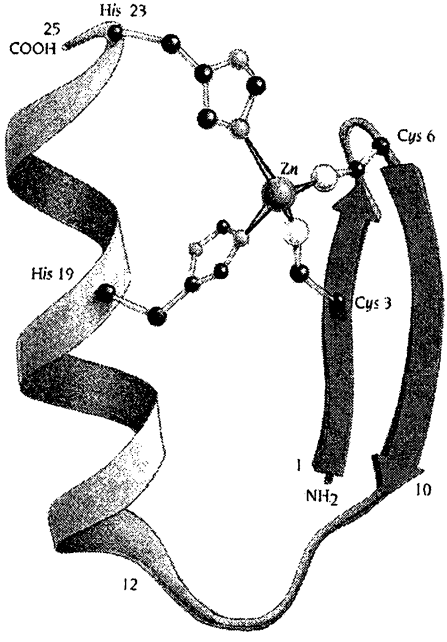


Рис. 83. Структура цинкового пальца одного из белков лягушки

Наряду с цинковыми пальцами, имеющими в качестве лигандов цинка два остатка цистеина и два остатка гистидина, обнаружены цинковые пальцы, имеющие в качестве лигандов четыре остатка цистеина или три остатка цистеина и один остаток гистидина. Первые встречаются у рецепторов тиреоидных гормонов, рецептора ретиноевой кислоты, рецептора витамина D3 и рецепторов ряда стероидных гормонов. Второй тип цинковых пальцев найден у некоторых белков ретровирусов.

Еще один мотив, существенный для белково-нуклеиновых взаимодействий, – *лейциновые застежки*. Они образованы двумя α-спиралями, на одной из внешних сторон которых преобладают гидрофобные аминокислоты, в первую очередь, остатки лейцина.

§ 12.6. Молекулярная селекция нуклеиновых кислот. Аптамеры

Благодаря способности ДНК к репликации и транскрипции открылась возможность создавать нуклеиновые кислоты с разными свойствами, в частности нуклеиновые кислоты, обладающие специфическим сродством к определенным низкомолекулярным соединениям или макромолекулам, к которым природные РНК или ДНК сродством не обладают. Это делается с помощью метода молекулярной селекции (SELEX, Systematic Evolution of Ligands by EXponentional enrichment).

Молекулярная селекция, которой посвящен настоящий раздел, по своему принципу похожа на обычную биологическую селекцию, в ходе которой из множества особей отбирают те, которые обладают желательными биологическими характеристиками, а затем проводят их размножение. При молекулярной селекции осуществляют отбор нуклеиновых кислот, обладающих желательными свойствами, а затем их размножают с помощью ПЦР (см. § 5.5). Проще всего объяснить принцип метода на примере создания нуклеиновых кислот, обладающих сродством к определенному низкомолекулярному лиганду или полимеру. В качестве материала для первичной селекции создают сложную смесь молекул нуклеиновой кислоты, среди которой могут оказаться и молекулы с нужным сродством. Это проводится путем введения в структуру молекул ДНК так называемой *рандомизованной последовательности*, т. е. фрагмента, структура которого у различных молекул неодинакова. Это достигается тем, что на некоторых шагах синтеза ДНК с помощью ДНК-синтезатора полимеразы в реакционную смесь вводят не один определенный синтон, а смесь всех четырех. На каждом этапе элонгации в разные растущие цепи будет случайно включаться один из четырех нуклеотидов. На рандомизованном участке длиной n нуклеотидов у разных молекул может оказаться любая из 4^n последовательностей. Среди образующегося множества молекул могут оказаться обладающие необходимым свойством. Провести первичный отбор нужных ДНК не представляет труда. Для этого смесь нуклеиновых кислот, содержащих рандомизованный фрагмент, пропускают через колонку, содержащую нерастворимый носитель, на который иммобилизован соответствующий лиганд. На колонке задержатся лишь молекулы, обладающие сродством к иммобилизованному лиганду. Основная масса исходного материала проходит через колонку, не задерживаясь. Изменением условий можно затем добиться, чтобы отдельно элюировались те нуклеиновые кислоты, которые обладают сродством к иммобилизованному лиганду. Эти нуклеиновые

кислоты, количество которых при первичной селекции, скорее всего, ничтожно мало, далее подвергаются амплификации. С этой целью по обоим концам рандомизованного фрагмента создаются определенные последовательности, которые используются для образования дуплексов с соответствующими праймерами. Полученный материал может быть подвергнут повторному циклу селекции. Такие амплифицированные ДНК называются *аптамерами*.

Если желательно получить РНК, обладающую интересующим нас сродством, это можно осуществить путем транскрипции ДНК, содержащей рандомизованную вставку. С такой РНК можно провести первичную селекцию и затем из отобранных РНК с помощью обратной транскрипции получить кДНК, которую можно подвергнуть амплификации. После проведения ПЦР полученная амплифицированная ДНК используется как матрица для транскрипции, в результате получается существенно увеличенное количество отселекционированной РНК. Для проведения транскрипции ДНК снабжается промотором для РНК-полимеразы. Чаще всего используется промотор для очень эффективно работающей РНК-полимеразы фага Т7. Хотя в целом процедура в случае селекции РНК получается более громоздкой, чем при селекции ДНК, но она обладает повышенной эффективностью, так как при транскрипции каждая ДНК-матрица может использоваться многократно. На одной молекуле ДНК с РНК-полимеразой фага Т7 можно получить сотни РНК-транскриптов. К настоящему времени уже удалось получить разнообразные ДНК- и РНК-аптамеры, обладающие сродством к таким молекулам, как АТР, некоторые аминокислоты, коферменты и кофакторы и другим лигандам, специфическое взаимодействие которых с нуклеиновыми кислотами в живой природе не наблюдалось. В частности, удается создавать аптамеры, обладающие определенной ферментативной активностью. Примеры создания таких аптамеров будут рассмотрены в связи с созданием рибозимов в § 16.5.

В связи с огромными возможностями, открываемыми аптамерами как в исследовательских целях, так и для создания новых медицинских препаратов, проводятся широкие исследования аптамеров, содержащих различные модифицированные нуклеозиды. Конечно, должны использоваться такие нуклеозиды, которые образуют трифосфаты, являющиеся субстратами ДНК-полимераз, поскольку важную роль при образовании специфических комплексов играет конформационная подгонка партнеров. Поэтому используемые аналоги должны в наименьшей мере препятствовать сворачиванию аптамера в нужную пространственную структуру. В связи с этим желательно использовать производные нуклеозидов, модифицированные по С-2' атому рибозы, С5 атому пиримидинов и С8 атому пуринов.

Глава 13. Биоорганическая химия углеводов

§ 13.1. Моносахариды. Номенклатура. Способы изображения

Моносахариды – это соединения, молекулы которых представляют собой неразветвленную цепочку из частично окисленных атомов углерода. При одном из этих атомов находится карбонильная, а при других – по одной гидроксигруппе. В соответствии с этим все моносахариды имеют брутто-формулу $C_nH_{2n}O_n$, т. е. состоят из n атомов углерода и n молекул воды, откуда и происходит название *углеводы*. Такое же название применяется и ко всем олиго- и полимерам, образованным из моносахаридов. Этой брутто-формуле соответствуют и такие низкомолекулярные соединения, как формальдегид CH_2O и гликолевый альдегид CH_2OHCHO. Однако обычно моносахаридами называют соединения с числом атомов С не ниже трех. В зависимости от числа углеродных атомов их называют триозами (n = 3), тетрозами (n = 4), пентозами (n = 5), гексозами (n = 6) и т. д. Моносахариды, молекулы которых содержат альдегидную группу, называют *альдозами*, а если они содержат кетогруппы – *кетозами*. При нумерации атомов углерода кетогруппе присваивается минимальный номер, т. е. у альдоз первый номер присваивается атому альдегидной группы, а у кетоз – крайнему атому, ближайшему к кетогруппе. Моносахариды, содержащие более девяти углеродных атомов, в природе не найдены.

Для исследования моносахаридов применяются в основном методы органической химии, и поэтому они традиционно изучаются в курсах органической химии. В природе моносахариды редко встречаются в свободном виде. В живых организмах они присутствуют в виде своих производных, чаще всего эфиров фосфорной кислоты, либо в составе полимерных сахаров. В свободном виде в значительных количествах в природе встречаются глюкоза, как в растениях, так и в животных, и фруктоза в плодах растений и меде.

Олигосахариды состоят из нескольких моносахаридных звеньев, связанных атомами кислорода. Низшие олигосахариды содержат 2–5 звеньев, высшие – 6–10. Они имеют сравнительно небольшую молекулярную массу и могут изучаться обычными методами органической химии.

Полисахариды – это полимеры моносахаридов, связанных через атом кислорода. Установление строения полисахаридов представляет собой сложную задачу, поскольку мономерные звенья моносахаридов полифункциональны и могут связываться между собой большим набором способов. Для исследования полисахаридов используют методы как традиционной органической химии, так и методы, характерные для химии полимеров. Полисаха-

риды составляют основную массу органического вещества планеты. Из них состоит большая часть растительного мира (~ 80–90 %).

Моносахариды, а следовательно олигосахариды и полисахариды, содержат большое число асимметрических атомов углерода. Вследствие этого стандартная номенклатура данных молекул является очень громоздкой. Поэтому у моносахаридов широко распространены тривиальные названия. Разные стереоизомеры сахаров могут существенно различаться по своим свойствам.

13.1.1. Проекционные формулы Фишера

Для изображения молекул с асимметрическими атомами углерода на плоскости применяется способ, предложенный Эмилем Фишером (1891 г.) *проекционные формулы Фишера*. Для наглядности можно рассмотреть проектирование на плоскость молекулы *глицеринового альдегида* $^1CHO\text{-}^2CH(OH)\text{-}^3CH_2OH$. Он содержит один асимметрический атом углерода ^2C, т. е. имеет два стереоизомера, которые обозначаются как D и L. На рис. 84 изображено проектирование D-изомера на горизонтальную плоскость.

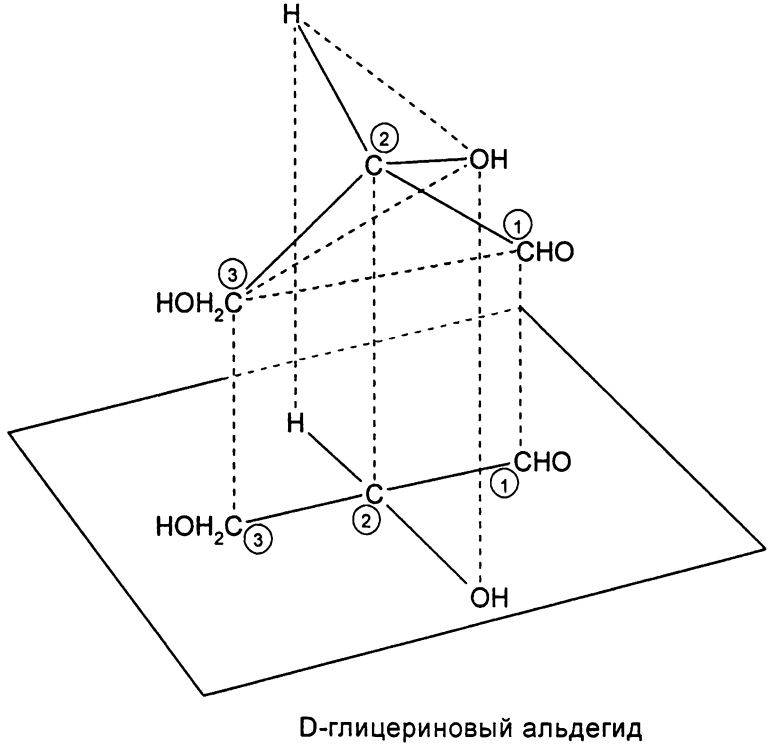
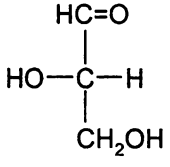


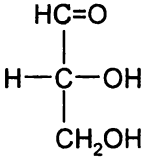
Рис. 84. Проекция по Фишеру молекулы D-глицеринового альдегида

Для проектирования цепь из трех атомов располагается так, чтобы плоскость, на которой лежат три атома С, была перпендикулярна горизонтальной плоскости, на которую осуществляется проектирование, и чтобы наименьший угол, образуемый этими тремя атомами, был обращен в сторону горизонтальной плоскости. Прямая, образованная пересечением этих плоскостей, на бумаге обычно изображается как вертикальная линия, на которой размещены эти три атома углерода. При этом атом ^{1}C располагается сверху. Тогда заместитель, находящийся справа от вертикальной плоскости, на которой располагается углеродная цепь, окажется справа от линии, а расположенный слева заместитель – слева.

Ниже представлены проекционные формулы Фишера изомеров глицеринового альдегида. Изомер, у которого в проекционной формуле группа ОН при асимметрическом атоме С располагается слева от вертикальной линии, называют L-изомером, а противоположный – D-изомером.



L-глицериновый альдегид



D-глицериновый альдегид

Для соединений с двумя асимметрическими атомами углеродную цепочку располагают в пространстве так, чтобы она представляла собой выпуклую ломаную линию (рис. 85). Концы этой линии помещают на горизонтальной плоскости, а выпуклую часть – на перпендикулярной плоскости. При проектировании выпуклая ломаная линия даст на плоскости вертикальную прямую линию, на верхнем конце которой располагается первый углеродный атом. При этом заместители, расположенные справа от плоскости, на которой лежат углеродные атомы, на проекции окажутся справа от вертикали, а находящиеся слева – слева.

Для соединений, содержащих более двух асимметрических атомов углерода, данный метод применяют последовательно ко всем парам атомов.

При таком проектировании перестановка двух заместителей при любом из асимметрических атомов С соответствует обращению конфигурации у данного атома углерода.

Проекционные формулы Фишера дают возможность изображать всю стереохимию моносахаридов. Они правильно отображают взаимоотношение стереоизомеров, но в то же время не дают четкого представления о взаимном пространственном расположении ОН-групп и других заместителей при соседних атомах углерода. Последнее существенно при рассмотрении реакций углеводов, протекающих при одновременном участии двух ОН-групп (§ 13.3).

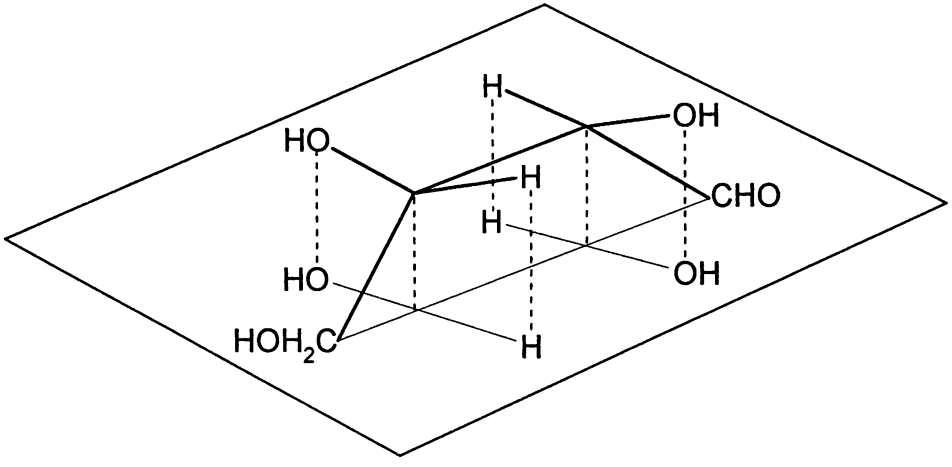
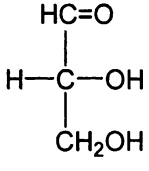


Рис. 85. Проектирование по Фишеру молекулы с двумя асимметрическими атомами С

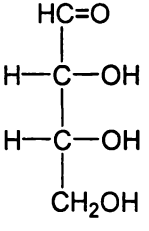
Моносахариды, которые теоретически могут быть получены из D-глицеринового альдегида путем последовательного удлинения его цепи в сторону альдегидной группы, независимо от конфигурации остальных атомов углерода, относят к D-ряду. Иначе говоря, если асимметрический атом углерода с наибольшим порядковым номером имеет ту же конфигурацию, что и D-глицериновый альдегид, то данный моносахарид относится к D-ряду. Аналогично могут быть определены моносахариды L-ряда.

13.1.2. Альдозы и кетозы

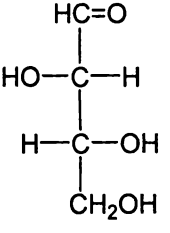
Ниже представлены проекционные формулы всех альдоз и кетоз D-ряда, содержащих не более шести атомов углерода, и их тривиальные названия.



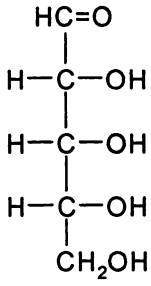
D-глицериновый альдегид



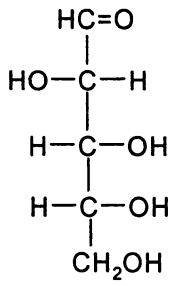
D-эритроза



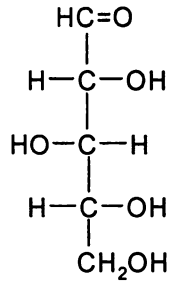
D-треоза



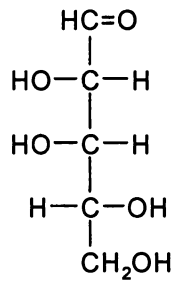
D-рибоза



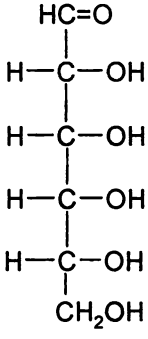
D-арабиноза



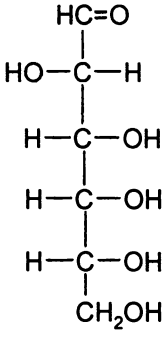
D-ксилоза



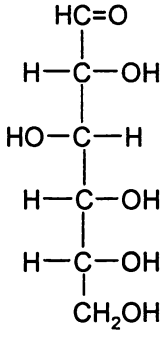
D-ликсоза



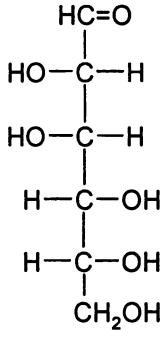
D-аллоза



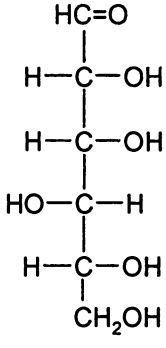
D-альтроза



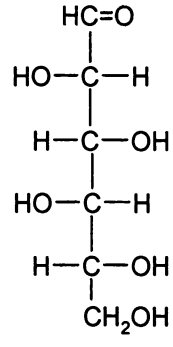
D-глюкоза



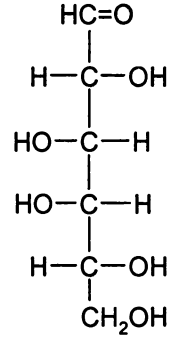
D-манноза



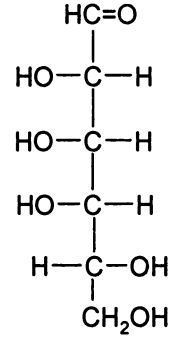
D-гулоза



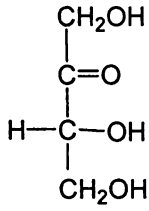
D-идоза



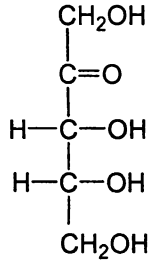
D-галактоза



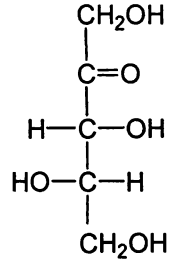
D-талоза



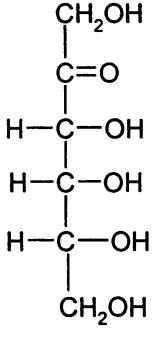
D-тетрулоза (она же эритрулоза)



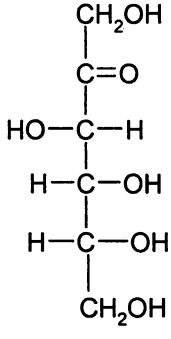
D-рибулоза



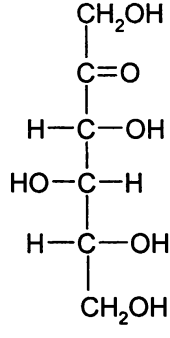
D-ксилулоза



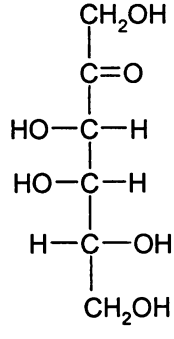
D-псикоза



D-фруктоза



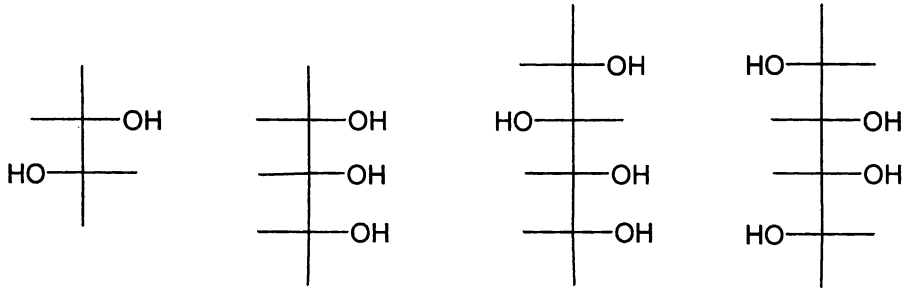
D-сорбоза



D-тагатоза

Из моносахаридов наиболее распространены в природе пентозы и гексозы, среди последних чаще всего встречаются D-глюкоза и D-фруктоза. Глюкоза присутствует во всех живых организмах, от вирусов до высших растений и животных, и входит в состав олиго- и полисахаридов, таких как сахароза, целлюлоза, крахмал, а также в состав смешанных биополимеров (гликопротеинов и протеогликанов). Среди гексоз часто встречаются также D-галактоза и D-манноза. Из пентоз чаще всего встречаются L-арабиноза и D-ксилоза, входящие в состав ряда полисахаридов и гликозидов, а также D-рибоза, входящая в состав полимерных цепей рибонуклеиновых кислот.

Тривиальные названия моносахаридов часто используются для обозначения конфигурации асимметрических атомов фрагментов молекул. Например, L-трео-, D-рибо-, D-глюко- и L-галакто- означают, что в молекуле имеются фрагменты



L-трео D-рибо D-глюко L-галакто

13.1.3. Циклические формы моносахаридов. Перспективные формулы Хеуорса

Карбонильные группы моносахаридов могут внутримолекулярно реагировать с одной из ОН-групп с превращением их соответственно в *циклические формы* – полуацетали и полукетали. При этом образуются шести- или пятичленные циклы. Первые называют *пиранозами*, а вторые – *фуранозами*. При образовании цикла в молекуле возникает новый хиральный атом С при атоме ^{1}С у альдоз и атоме ^{2}С у кетоз. Два стереоизомера, различающихся конфигурацией у этого атома, называют *аномерами*. Если конфигурация атомов ^{1}С у альдоз и ^{2}С у кетоз совпадает с конфигурацией атома С, определяющего отнесение моносахарида к D- или L-ряду, то это α-аномер, если не совпадает – то это β-аномер. На рис. 86 представлены структуры аномеров для пиранозных форм D- и L-глюкозы.

В итоге моносахарид может находиться в пяти изомерных формах – линейной, α- и β-пиранозной и α- и β-фуранозной формах. Эти пять форм могут находиться в равновесии. Изображение циклических структур в проекциях Фишера ненаглядно, поэтому их принято представлять в *перспективных формулах Хеуорса* (см. рис. 86), причем атом О цикла изображается как наиболее удаленный от наблюдателя. Связи между атомами С, образуемые атомами ^{2}С и ^{3}С, часто изображаются жирными линиями. Заместители, расположенные в формулах Фишера справа, т. е. находящиеся при углеродных атомах с D-конфигурацией, помещают под кольцом; сверху располагают заместители при атомах углерода с L-конфигурацией. Не входящий в цикл или «боковой заместитель», находящийся при атоме С-5 у пираноз и атоме С-4 у фураноз, располагается в формуле Хеуорса над плоскостью, если эти атомы имеют D-конфигурацию, и под плоскостью – если L-конфигурацию.

В растворе моносахариды существуют в различных таутомерных формах, находящихся в равновесии. Взаимное превращение α- и β-аномеров называется *мутаротацией*. Обычно равновесие сдвинуто в сторону α- и β-пираноз. Ниже приведены все таутомерные равновесия для D-глюкозы.

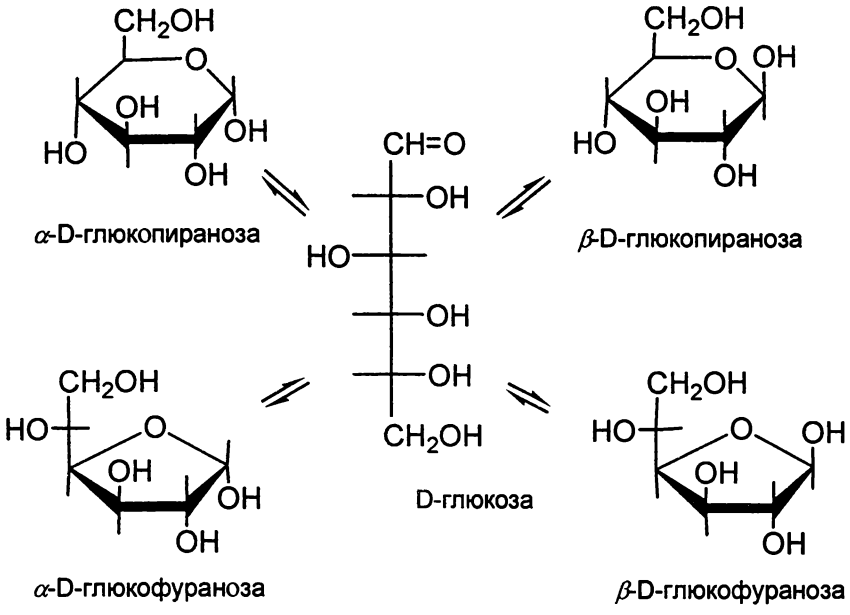
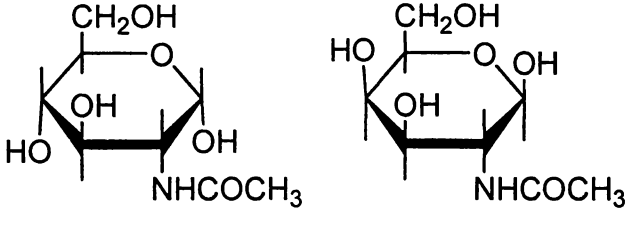
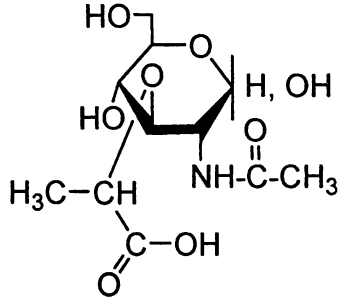


Рис. 86. Таутомерные формы D-глюкозы

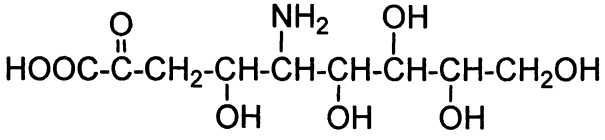
Наряду с моносахаридами в природе широко распространены, главным образом в виде компонент полисахаридов, амины, причем обычно аминогруппа находится при атоме ^2C и ацетилирована. Название этих ацетаминов происходит от названий соответствующих моносахаридов. Чаще всего в качестве компонентов полисахаридов встречаются *N-ацетилглюкозамин* и *N-ацетилгалактозамин.*



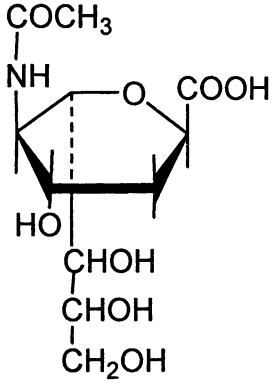
Из производных моносахаридов в природе, особенно в виде фрагментов олиго- и полисахаридов, широко распространены *N-ацетилмурамовая* (3-О-лак-тил-N-ацетилглюкозамин) и *нейраминовая* (2-кето-3,5-дидезокси-5-амино-4,6,7,8,9-пентагидроксинонановая) *кислоты.* Последняя является представителем группы распространенных природных соединений, которые называют *сиаловыми кислотами.*



N-ацетилмурамовая кислота



N-ацетилнейраминовая или сиаловая кислота



Остальные сиаловые кислоты отличаются набором заместителей при NH_2- и OH-группах.

13.1.4. Конформация фуранозных циклов

Система из пяти атомов помимо трех поступательных и трех вращательных имеет еще девять степеней свободы. Поэтому построить циклическую структуру с заданными длинами связей и углами между связями, т. е. с десятью заданными геометрическими параметрами, в общем случае нельзя. Пятичленные циклы, в том числе фуранозный, существуют вследствие того, что возможны отклонения значений валентных углов от оптимальных, свойственных аналогичным линейным структурам. Вариации этих отклонений в определенных пределах допускаются и для торсионных углов в цикле, в результате чего возможно существование нескольких конформаций. Качественно их принято характеризовать расположением атомов цикла относительно некоторой плоскости, определяющей общую ориентацию цикла. При этом можно представить себе 10 идеализированных конформаций, у которых четыре атома из пяти находятся в одной плоскости, а пятый выступает из неё либо в ту же сторону, что и CH_2-группа (*эндо-конформация*), либо в противоположную (*экзо-конформация*). Эти конформации имеют форму *конверта*.

Такие конформации обозначаются буквой Е (от англ. envelope – конверт). Все остальные мыслимые конформации таковы, что никакие четыре атома не находятся в одной плоскости. Их называют *твист-конформациями* (от англ. twist – скрученный) и обозначают буквой Т. В случае этих конформаций два любых соседних атома лежат по разные стороны от плоскости, образуемой тремя остальными атомами кольца. Отклонения от этой плоскости могут быть практически одинаковыми. В этом случае «твист»-конформацию рассматривают как симметричную. Номера выступающих атомов ставят справа от символа Т, причем верхний номер соответствует атому, занимающему экзо-положение, а нижний – атому в эндо-положении. Симметричная С-2'-экзо-С-3'-эндо-конформация при этом обозначается как T_3^2. Однако Т-конформация может быть и несимметричной. Это означает, что один из двух выступов существенно больше, чем другой. В этом случае номер атома, образующий малый выступ, ставится справа от символа Т. «Твист»-конформация с главным эндо-выступом С-3' и минорным выступом С-2'-экзо в этой символике будет записываться в виде $^3T_2$.

Любой переход между конформациями «конверта» можно представить себе как результат одного или нескольких перемещений, при каждом из которых пара соседних атомов постепенно изменяет свое положение относительно плоскости, образованной тремя остальными атомами фуранозного цикла. Суть перемещения заключается в том, что атом, выступающий из плоскости в исходной конформации «конверта», перемещается в одном направлении от этой плоскости, а соседний атом – в противоположном. Это перемещение заканчивается образованием новой конформации «конверта», причем в силу характера перемещения экзо-конформация переходит в эндо, а эндо-конформация – в экзо. Такой переход получил название *псевдовращение* (рис. 87).

В рамках концепции псевдовращения каждой конформации приписывается некоторый угол Р, при изменении которого от 0 до 360 градусов проходится весь набор конформаций. При этом значение 0 приписывается конформации, при которой атомы С-3' и С-2' в равной степени выступают из плоскости, образованной атомами С-1', С-4' и О-4', причем атом С-3' в ту же сторону, что и 5'-CH_2-группа, а атом С-2' – в противоположную. Такая конформация называется С-2'-экзо, С-3'-эндо. Она является промежуточной между С-2'-экзо, которой приписывают Р = 342 и С-3'-эндо с Р = 18. Дальнейшее увеличение угла Р соответствует взаимному перемещению атомов С-3' и С-4', причем через 36^0 достигается следующая Е-конформация, С-4'-экзо. Последующее увеличение Р связано со взаимным перемещением атомов С-4' и О-4' и т. д. В составе нуклеиновых кислот чаще всего встречаются С-2'-эндо- и С-3'-эндо-конформации, которым соответствуют значения углов псевдовращения 162 и 18.

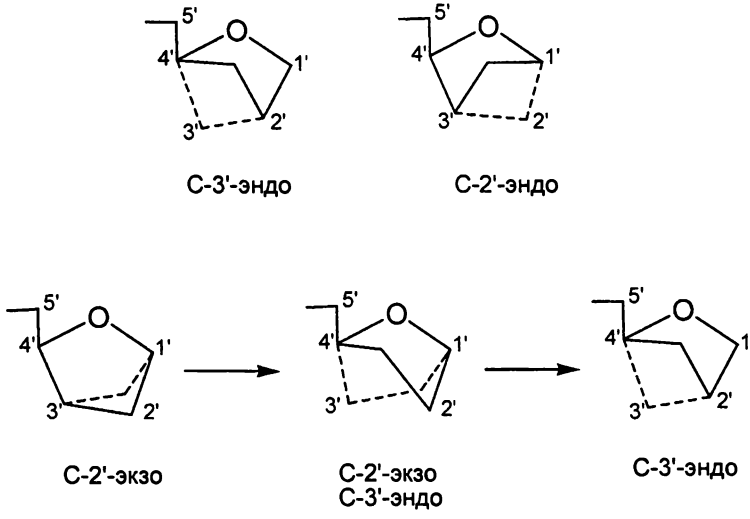


Рис. 87. Конформации полинуклеотидной цепи. Экзо- и эндо-конформации фуранозного цикла. Переход от С-2'-экзо- к С-3'-эндо-конформации

13.1.5. Конформация пиранозных циклов

Атомы пиранозного кольца обладают 18-ю степенями свободы, 6 из них приходятся на поступательные и вращательные. Если бы все шесть связей и шесть валентных углов в такой структуре были жестко фиксированы, то изменения торсионных углов были бы невозможны, и конформация такой системы была бы жестко фиксирована. Однако из-за возможных отклонений от стандартных значений углов и длин связей такие циклы существуют в нескольких конформациях. Типичными для шестичленных циклов являются *конформации «ванны»,* или «лодки», обозначаемые буквой В (от англ. boat – лодка) и *конформации «кресла»*, обозначаемые буквой С (от англ. chair – кресло) (рис. 88).

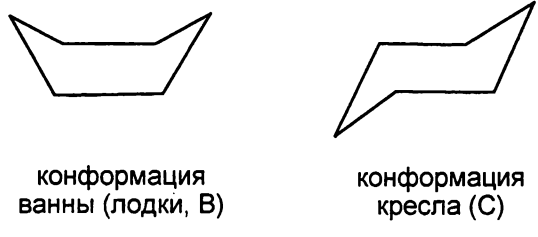
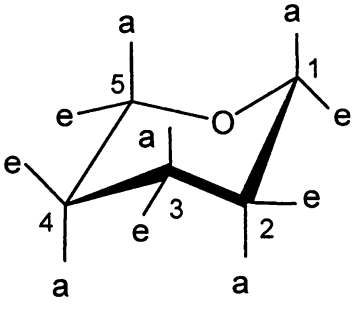


Рис. 88. Два основных типа конформаций пиранозного цикла

У пиранозных форм моносахаридов стерически более выгодными являются конформации «кресла». Две возможные конформации кресла обозначают как C1 (атом ^{1}C расположен под плоскостью, образованной атомами O, ^{2}C, ^{3}C и ^{5}C) и 1C (атом ^{1}C расположен над этой плоскостью). В некотором приближении каждую из пар связей, образуемых пятью атомами C, можно рассматривать как параллельную и перпендикулярную базовой плоскости. Направления этих связей называют соответственно экваториальным (*e*) и аксиальным (*a*).



Между соседними OH-группами действуют силы отталкивания между электроотрицательными атомами O. Предпочтительным является их экваториальное расположение, при котором они несколько более удалены друг от друга. Поэтому у моносахаридов преобладающей конформацией является та, у которой наибольшее число OH-групп расположено в экваториальном направлении. Например, у β-D-глюкозы преобладает конформация $^4C_1$ (или C1), поскольку у нее все пять заместителей находятся в экваториальном положении. В конформации же $^1C_4$ (или 1C) заместители находятся на более близком расстоянии друг к другу (рис. 89).

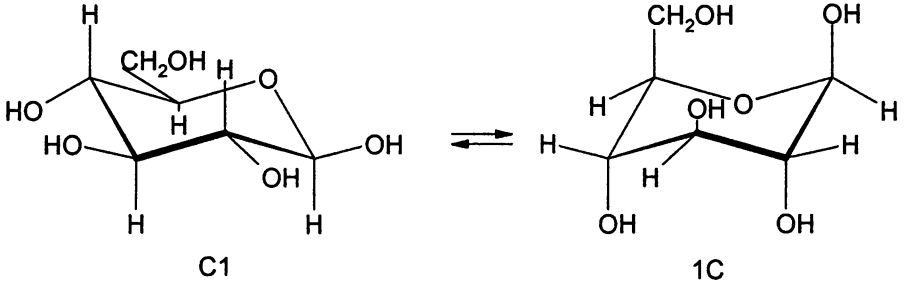
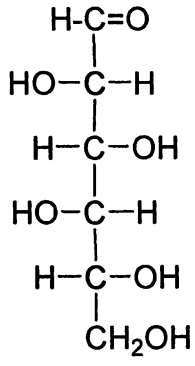
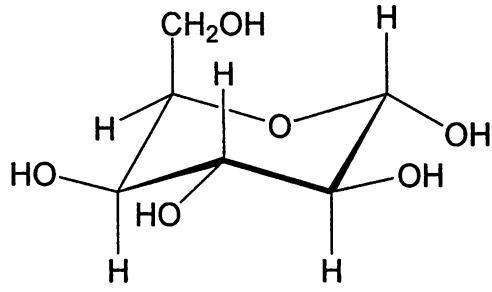


Рис. 89. Конформации C1 и 1C β-D-глюкозы

Наоборот, у α-D-идозы преобладает $^1C_4$ конформация (рис. 90), поскольку при этом все четыре OH-группы располагаются в экваториальном положении.



D-идоза



1C

Рис. 90. Конформация 1C α-D-идозы

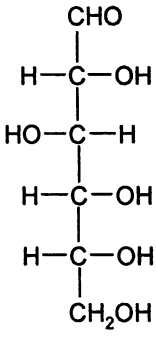
§ 13.2. Окисленные и восстановленные формы моносахаридов

Наряду с альдозами в природе встречаются их окисленные и восстановленные формы. Окисленные формы альдоз представлены производными, у которых альдегидная или концевая CH_2OH-группы превращены в карбоксильные. Первые называют *альдоновыми*, а вторые – *уроновыми кислотами*. Названия их обычно производят от соответствующих альдоз введением соответственно суффиксов «он» и «урон». Альдоновые кислоты лучше всего образуются при окислении альдоз бромом. Уроновые кислоты получаются путем каталитического окисления кислородом альдоз, защищенных по ^1C.

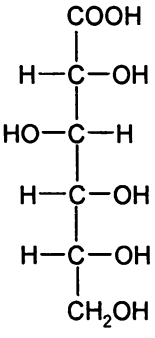
Дикарбоновые кислоты, образующиеся в результате окисления обеих групп при атомах ^1C и ^6C, называются *сахарными кислотами*, и их названия производятся от соответствующих альдоз введением суффикса «ар». Сахарные кислоты получаются при окислении альдоз азотной кислотой. Ниже в качестве примеров приведены структурные формулы *глюконовой*, *глюкуроновой* и *глюкаровой кислот*.

Одним из типов восстановленных форм альдоз являются производные, у которых альдегидная группа восстановлена до гидроксигруппы, т. е. они являются полиолами. Название полиолов обычно происходит от названия соответствующей альдозы с изменением окончания «оза» на «ит». Ниже в качестве примеров приведены структурные формулы D-изомеров *глюцита, маннита, рибита* и *ксилита*.

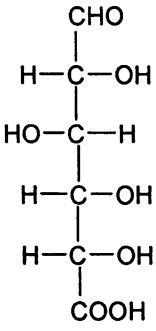
Для глюцита используется второе название – сорбит, которое происходит от кетозы сорбозы.



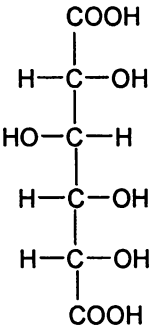
глюкоза



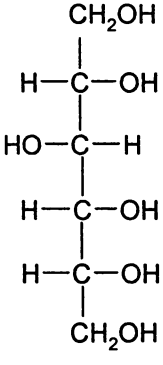
глюконовая кислота



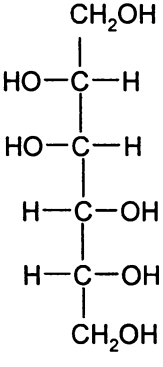
глюкуроновая кислота



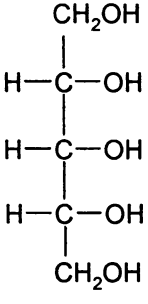
глюкаровая кислота



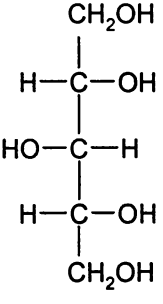
глюцит (сорбит)



маннит

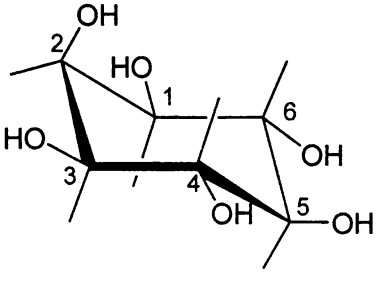


рибит



ксилит

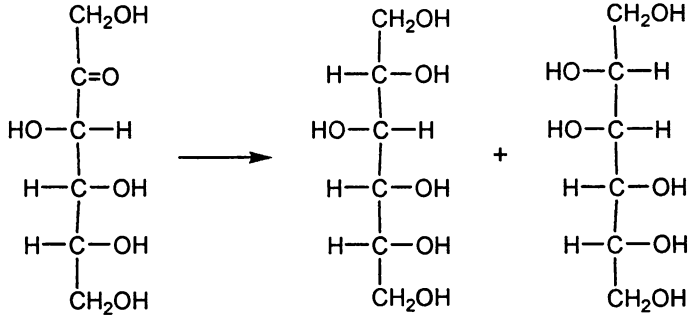
Некоторые полиолы входят в состав более сложных структур, например, рибит входит в состав флавиновых коферментов. В состав важного регулятора обмена веществ 1,4,5-трифосфоинозита входит циклический полиол *миоинозит*:



Миоинозит не является сахаром, так как не содержит в своей структуре карбонильной группы. Он представлен в своей предпочтительной конформа-

ции кресла с экваториальными заместителями во всех положениях, кроме второго углеродного атома, у которого гидроксил занимает аксиальное положение. Миоинозит оптически неактивен в связи с наличием плоскости симметрии, проходящей через второй и пятый углеродные атомы, однако асимметрично замещенные производные миоинозита обладают оптической активностью.

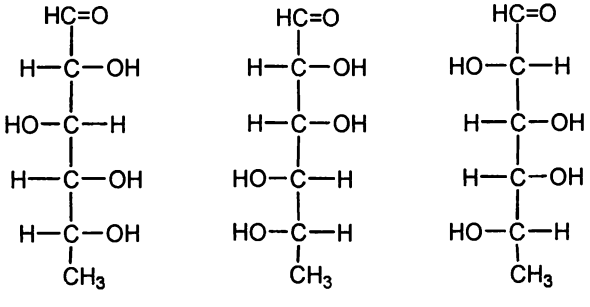
Полиолы получаются при мягком восстановлении карбонильных групп соответствующих моносахаридов, например, в водном растворе при реакции с боргидридами щелочных металлов. При восстановлении кетоз образуется два диастереоизомерных полиола. Например, при восстановлении D-фруктозы образуются D-глюцит и D-маннит:



D-фруктоза D-глюцит D-маннит

Второй тип восстановленных моносахаридов – дезоксимоносахариды, в которых восстановлена одна OH-группа. Важнейшим их представителем является *дезоксирибоза,* входящая в состав дезоксирибонуклеотидов и ДНК.

В состав ряда полисахаридов входят некоторые гексозы с восстановленной 6-гидроксигруппой, такие как *D-хиновоза* (6-дезоксиглюкоза), *L-рамноза* (6-дезоксиманноза) и *L-фукоза* (6-дезоксигалактоза).



D-хиновоза L-рамноза L-фукоза

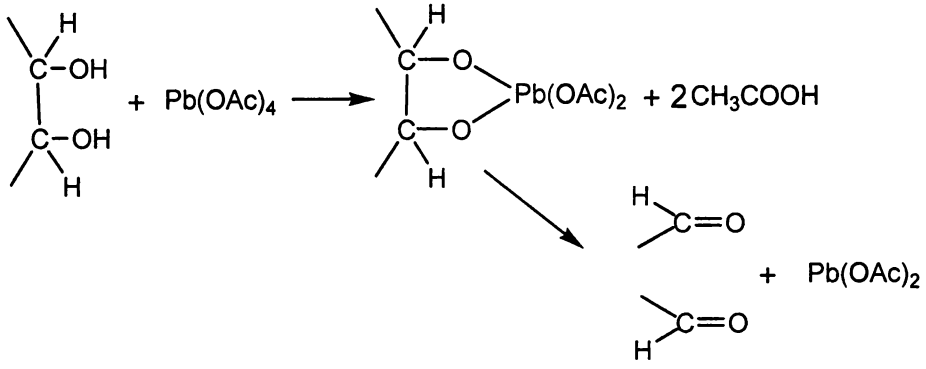
Два последних в природе преимущественно встречаются в виде L-изомеров.

§ 13.3. Другие превращения сахаров

Основными реакционными центрами сахаров являются карбонильная и гидроксигруппы. В линейных моносахаридах и их фрагментах гидроксигруппы не сильно отличаются по своей реакционной способности. В циклических моносахаридах резко выделяется по своим химическим свойствам ацетальная ОН-группа.

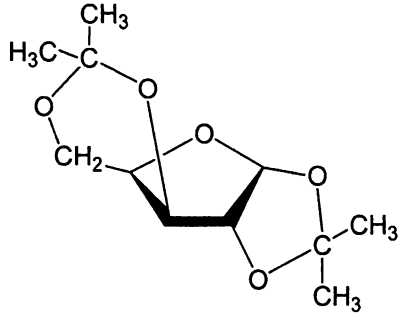
Одной из широко используемых реакций по ОН-группам сахаров, играющих, в частности, важную роль при установлении структуры олиго- и полисахаридов, является метилирование, которое может быть легко проведено с помощью йодистого метила или диметилсульфата в присутствии основания. Аналогичным путем могут быть получены другие простые эфиры, среди которых широкое применение в химии сахаров нашли бензиловые эфиры. В § 5.1 говорилось об использовании для защиты 5'-ОН-группы *п*-диметокситрифенилметильной защиты при синтезе олигонуклеотидов. В химии углеводов трифенилметильная группа (Tr) нашла широкое применение для селективной защиты первичных спиртовых групп. По ОН-группам легко проходит ацилирование ангидридами карбоновых кислот и галогенангидридами с образованием соответствующих сложных эфиров.

Благодаря наличию нескольких, в том числе соседних, ОН-групп для сахаров характерны реакции с одновременным участием двух гидроксигрупп. Одна из таких реакций уже была описана при рассмотрении реакций рибозного фрагмента рибонуклеозидов, рибонуклеотидов и олигорибонуклеотидов – окисление *цис*-диолов периодатом с расщеплением связи С-С и образованием двух альдегидных групп. Эта реакция наряду с метилированием широко используется при изучении структуры сахаров. При проведении реакции в органических растворителях в качестве окислителя используется тетраацетат свинца



Второй важной реакцией является взаимодействие диолов с карбонильной группой альдегидов и кетонов с образованием циклических ацеталей или кеталей. Ее наиболее широко используют для реакции с ацетоном и бензальдегидом.

Реакция с ацетоном проводится в ацетоновом растворе в присутствии сильной кислоты (серной или фосфорной) или хлористого цинка в качестве кислоты Льюиса, что приводит к циклическому кеталю – *изопропилиденовому* производному соответствующего диола. Как правило, при этом образуется пятичленный 1,3-диоксолановый цикл, реже – шестичленный *м*-диоксановый цикл. В качестве примера ниже приведена структура 1,2,3,5-ди-О-изопропилиден-D-ксилозы. Изопропилиденовый фрагмент, образованный 1,2-ОН-группами, содержит 1,3-диоксолановый цикл, а образованный 3,5-ОН-группами – *м*-диоксановый цикл.



Изопропилиденовый фрагмент легко подвергается кислотному гидролизу (кратковременный гидролиз в 1 %-ой минеральной кислоте или в разбавленной уксусной кислоте), и поэтому образование изопропилиденовых производных является удобной защитой при получении производных, в том числе при синтезе олиго- или полисахаридов.

В реакции с бензальдегидом образуется циклический ацеталь, обычно с шестичленным *м*-диоксановым циклом. Как и в случае реакции с ацетоном, процесс катализируется сильными кислотами и кислотами Льюиса. Образующиеся *бензилиденовые производные* легко гидролизуются в слабокислой среде. Поэтому бензилиденовая группа является удобной защитной группой для различных реакций полиолов, в том числе для синтеза олиго- и полисахаридов.

При получении циклических ацеталей и кеталей важную роль играет взаимное пространственное расположение ОН-групп, формирующих цикл. В реакции с ацетоном, при которой получается 1,3-диоксолановый цикл, участвуют практически только α-гликольные группы. При реакции с бензальдегидом, приводящей к образованию диоксанового цикла, предпочтительно реагируют гидроксигруппы в β-положении относительно друг друга.

При рассмотрении реакций по двум ОН-группам при двух соседних ато-

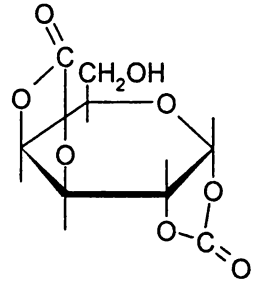
мах С следует помнить, что взаимное пространственное расположение этих групп не всегда правильно передается проекциями моносахаридов по Фишеру. В качестве примера можно привести структуру D-идозы в виде проекции по Фишеру и в виде конформации 1С (см. рис. 90).

При рассмотрении проекции по Фишеру может создаться впечатление, что ОН-группы при атомах ^{3}С и ^{4}С удалены один от другого, в то время как в виде 1С-конформации эти группы оптимально сближены.

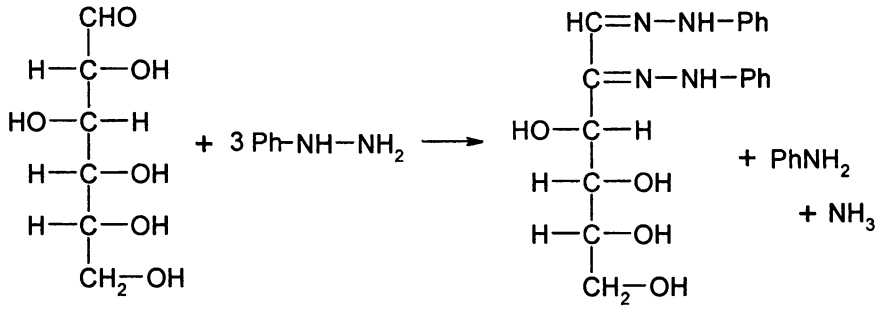
Как и по любым ОН-группам, по гидроксигруппам сахаридов проходит образование сложных эфиров с неорганическими и органическими кислотами. Из них в первую очередь следует сказать об эфирах с фосфорной кислотой, так как именно в этом виде в живой природе существуют многие моносахариды. Среди них центральное значение в метаболизме имеют глюкозо-1-, глюкозо-6-, фруктозо-1-фосфаты и фруктозо-1,6-дифосфат, являющиеся промежуточными соединениями в окислительной деструкции гликогена, обеспечивающей в итоге превращение ADP в ATP.

Ключевую роль в фиксации CO_2 при фотосинтезе играет рибулозо-1,5-дифосфат. Многостадийный процесс, приводящий к образованию новых молекул фруктозы, проходит с участием ряда промежуточных пентозофосфатов.

С двух- и многоосновными кислотами могут получаться циклические структуры с участием двух ОН-групп. Примером таких структур являются приведенные в § 2.1 нуклеозид-2',3'-циклофосфаты. Образование циклов характерно также для эфиров угольной кислоты. В качестве примера ниже приведена структура дициклокарбоната D-галактозы. При образовании циклических сложных эфиров важную роль играет взаимное расположение двух ОН-групп, участвующих в формировании цикла.



В открытой форме моносахариды содержат карбонильную группу и способны к различным реакциям, характерным для этих групп: с гидроксиламином они образуют оксимы, с гидразином и его монозамещенными производными – гидразоны. Наличие рядом с карбонилом ОН-группы придает им способность образовывать бис-гидразоны, которые называются *озазонами*. При этом одна молекула замещенного гидразина играет роль окислителя этой ОН-группы и восстанавливается до амина и аммиака, например:



В циклической форме моносахариды обладают ОН-группой при атоме ^{1}С альдоз, которая по своим свойствам существенно отличается от остальных ОН-групп. В частности, атом О цикла в результате индукционного эффекта сообщает дополнительную электронную плотность ОН-группе и облегчает реакции ее замещения. При этом образуются *гликозиды* соответствующих сахаров. Это большой класс как природных, так и получаемых синтетически соединений. Гликозидами являются нуклеозиды – основные компоненты нуклеиновых кислот, рассмотренные в § 1.3. Они относятся к N-гликозидам. Важнейшими представителями гликозидов являются О-гликозиды, у которых ОН-группа при аномерном атоме С замещена каким-либо гидроксилом сахара, что лежит в основе соединения остатков моносахаридов в олиго- и полисахаридах, рассматриваемых в следующем § 13.4.

Многочисленные применения в химии углеводов нашли *гликозилгалогениды*, у которых атом галогена (Br, Cl, I) связан с гликозидным атомом С. В силу высокой реакционной способности галогенидов по отношению к нуклеофильным, в том числе к ОН-группам на практике преимущественно применяются гликозилгалогениды с полностью закрытыми (обычно с полностью ацилированными) гидроксилами. В природе гликозилгалогениды не обнаружены. В химии углеводов они широко используются для синтеза различных производных. Для их получения можно применять насыщенные растворы соответствующих галогеноводородов в уксусной кислоте или ее смеси с уксусным ангидридом при комнатной температуре.

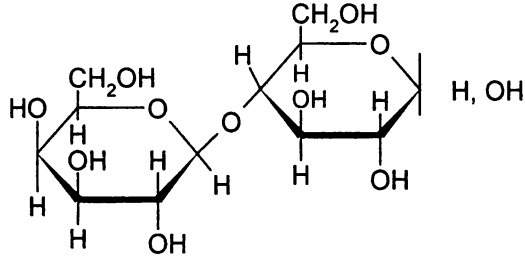
Гликозилгалогениды реагируют со спиртами с образованием О-алкилгликозидов. Это превращение известно как реакция Кенигса – Кнорра. Оно, в частности, нашло применение при синтезе олигосахаридов, который рассматривается в § 13.6.

§ 13.4. Олигосахариды и полисахариды

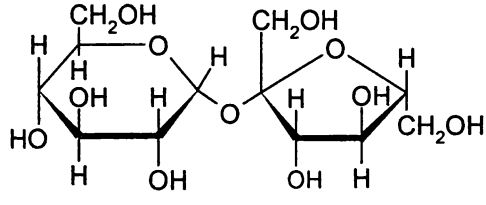
Олигосахариды получаются из моносахаридов в результате образования кислородного мостика между аномерным атомом С одного звена и одного из атомов С соседнего звена. Если это звено является конечным и его связь об-

разована одним из внутренних атомов С, то на конце олигосахарида оказывается полуацетальный гидроксил, который может восстанавливать некоторые ионы металлов переменной валентности, например, Cu^{2+} и Ag^{+} Такие олигосахариды называют *восстанавливающими*. Полуацетальная группа при этом превращается в карбоксильную.

В природе из олигосахаридов в свободном виде в основном встречаются дисахариды. Два из них – *мальтоза* и *лактоза* – представляют собой О-α-глюкопиранозил-(1→4)-D-глюкопиранозу и О-β-D-галактопиранозил-(1→4)-D-глюкопиранозу и являются восстанавливающими дисахаридами. Как видно из приведенных названий, в скобках в них указаны соединенные стрелкой номера атомов С, связанных кислородным мостиком, конфигурация аномерного центра и форма стереоизомера. Лактоза в основном встречается в молоке и поэтому часто называется молочным сахаром. Ниже в качестве примера для дисахаридов представлена ее структурная формула.



Два других дисахарида, *сахароза* – О-α-D-глюкопиранозил-(1→2)-β-D-фруктофуранозид



и *трегалоза* – О-α-D-глюкопиранозил-(1→1)-α-D-глюкопираноза, являются невосстанавливающими дисахаридами. Сахароза – это обычный пищевой тростниковый сахар. Трегалоза входит в состав лимфы насекомых.

Для сокращенной записи формул олиго- и полисахаридов используются трехбуквенные обозначения, приведенные в табл. 18.

При использовании сокращенной записи для моносахаридов обычно символами *p* или *f* отмечают, в какой форме – пиранозной или фуранозной – находятся моносахаридные фрагменты. Необходимо также отразить, какую стереохимическую конфигурацию имеет фрагмент, L- или D-, и в какой конфигурации, α или β, находится аномерный центр. В этой записи, например, лак-

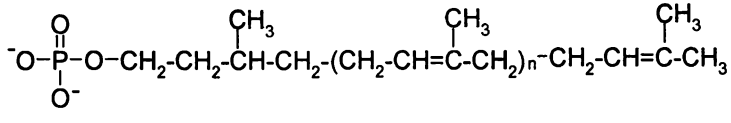
тоза запишется как β-D-Gal*p*-(1→4)-D-Glc*p*.

Таблица 18

Сокращенные символы для некоторых моносахаридов и их производных

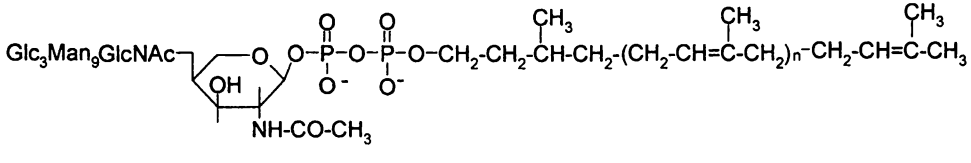
Полное название	Трехбукв. сокращение	Полное название	Трехбукв. сокращение
Глюкоза	Glu	Фукоза	Fuc
Галактоза	Gal	Рамноза	Rha
Манноза	Man	Глюкозамин	GlcN
Идоза	Ido	N-ацетилглюкозамин	GlcNAc
Фруктоза	Fru	Галактозамин	GalN
Рибоза	Rib	Глюкуроновая к-та	GlcUA
Ксилоза	Xyl	Галактуроновая к-та	GalUA
Арабиноза	Ara	Нейраминовая к-та	Neu

Сложные олигосахариды, состоящие каждый из нескольких различных моносахаридов, часто с разветвленной структурой, входят в состав гликопротеинов, рассматриваемых в § 13.5. Синтез этих олигосахаридов проходит на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Процесс связан с мембраной ЭПР благодаря тому, что на протяжении всего синтеза строящийся олигосахарид ковалентно связан с гидрофобным долихолфосфатом



n = 9 - 22

На рис. 91 представлена схема синтеза тетрадекасахарида, который переносится на остаток аспарагина гликозилируемого белка. Этот олигосахарид содержит остатки глюкозы, N-ацетилглюкозамина и маннозы. Он образуется в виде производного долихолпирофосфата, который является донором олигосахарида при образовании гликопротеина (см. следующий § 13.5).



n = 9 - 22

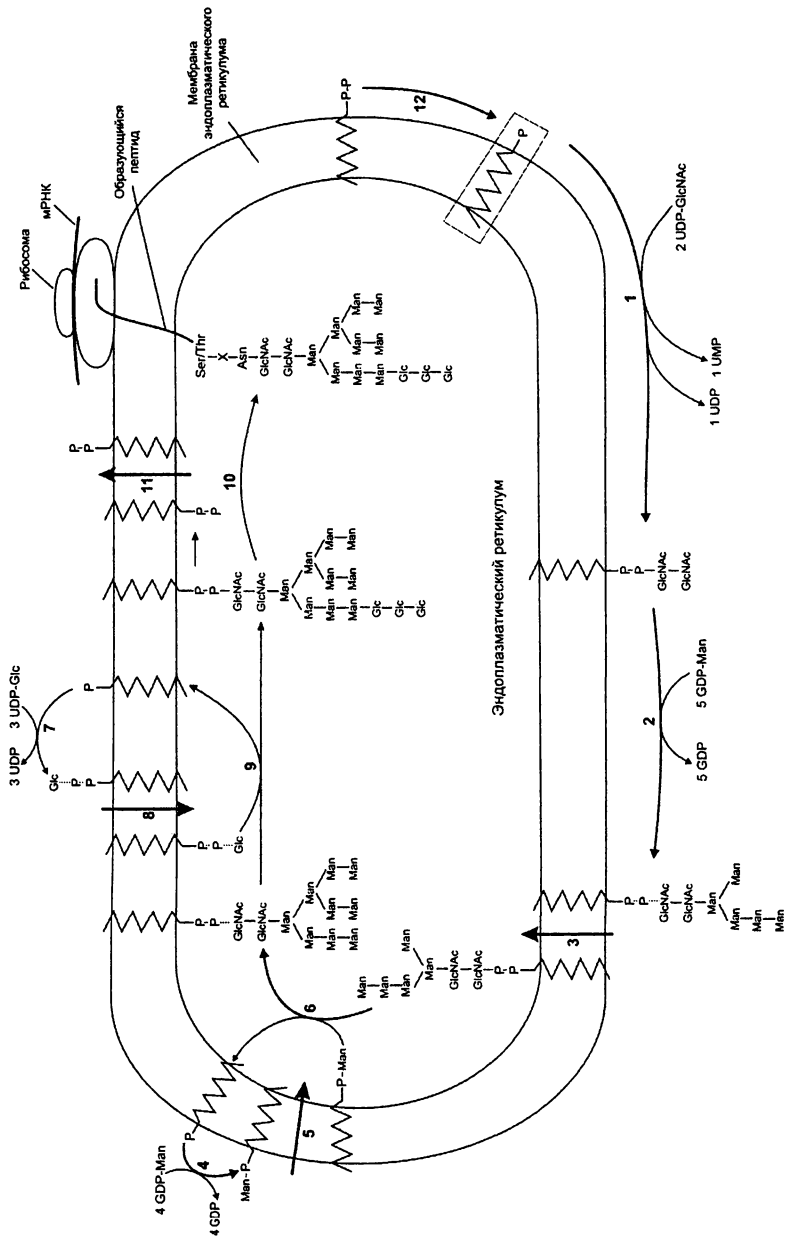
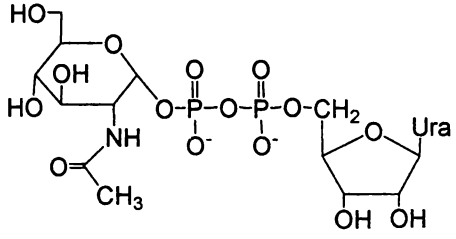
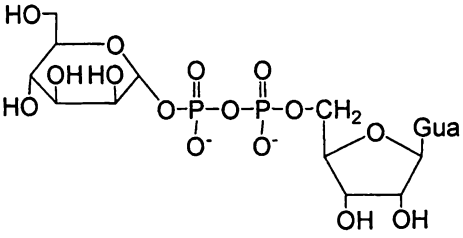


Рис. 91. Схема синтеза тетрадекасахарида на мембране эндоплазматического ретикулума и его переноса на белок. Волнистой чертой обозначены остатки долихола, стрелками – стадии транслокации долихолпирофосфата (*11*), его моносахаридов (*5*, *8*) и промежуточного гептасахарида (*3*), присоединения моносахаридов (*1*, *2*, *4*, *6*, *7*), транслокации с переносом моносахарида (*9*), переноса на белок (*10*), гидролиза пирофосфатной связи (*12*)

Процесс условно можно разделить на две фазы. Первая проходит на внешней стороне ЭПР. Донором гликозила являются соответственно уридиндифосфатацетилглюкозамин (UDP-N-AcGlc) и гуанозиндифосфатманноза (GDP-Man).



уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин



гуанозиндифосфатманноза

Первый остаток N-ацетилглюкозамина в виде монофосфата (с освобождением UMP) переносится на заякоренный в мембране остаток долихолфосфата. Далее на внешней стороне мембраны последовательно присоединяются еще один остаток N-ацетилглюкозамина, а затем пять остатков маннозы с освобождением на каждой стадии по одному остатку GDP. Все стадии протекают стереоспецифично и по определенным OH-группам моносахаридов. Так, связывание первого остатка N-AcGlc с остатком аспрагина гликозилируемого белка и второго остатка с первым запишется как β-GlcNAc-(1→4)-β-GlcNAc-(1→Asn), а связь второго и третьего остатков маннозы с первым, находящимся в точке разветвления, – как α-Man-(1→3)-Man и α-Man-(1→6)-Man.

После этого происходит транслокация заякоренного гептасахарида, который на внутренней стороне мембраны достраивается до тетрадекасахарида, причем донором моносахарида на этих стадиях является моносахариддолихолфосфаты. Последние образуются путем переноса гликозилов от GDP-Man и уридиндифосфатглюкозы (UDP-Glc) на заякоренный в мембране долихолфосфат.

Полисахариды могут быть построены из одного (гомополисахариды) или нескольких типов моносахаридов (гетерополисахариды). Полисахариды несут довольно разнообразные функции. Некоторые играют роль запасных полимеров, превращающихся по мере необходимости в соответствующие мономеры. Важнейшими примерами таких полисахаридов являются гликоген у животных и крахмал у растений. Другие полисахариды несут структурные функции. В первую очередь таковыми являются целлюлоза у растений и хитин у насекомых. У патогенных бактерий имеются специальные капсульные полисахариды, несущие защитные функции – они закрывают белки оболочки и таким способом предотвращают иммунный ответ инфицированного организма. Некоторые гетерополисахариды входят в состав основного вещества соединительной ткани, в которое погружены волокна коллагена.

Помимо тривиальных названий, для полисахаридов принята и системати-

ческая номенклатура, которая отражает название (или названия) моносахаридов, из которых построен полисахарид с заменой окончания «оза» на окончание «ан». Согласно этой номенклатуре целлюлоза называется D-глюканом, гетерополисахарид, построенный из остатков D-галактозы и D-маннозы, – D-галакто-D-манноглюканом и т. п. При использовании такой номенклатуры общее название полисахарид заменяется на термин *гликан*.

Гликоген является полимером, образованным остатками D-глюкозы, связанными атомом O α-^{1}C одного и ^{4}C соседнего остатка глюкозы. Примерно каждый 12-й остаток, наряду со связью с ^{4}C, образует вторую связь – с ^{6}C второго остатка глюкозы, т. е. цепь в этой точке разветвляется (в среднем, у каждого 8–12-го остатка глюкозы). Один из концов гликогена является восстанавливающим. В живых организмах этот конец цепи гликогена закрыт благодаря его соединению с белком *гликогенином*. Гликоген включается в метаболизм в результате процесса, катализируемого ферментом *гликоген-фосфорилазой* (КФ 2.4.1.1), в результате которого остатки глюкозы на невосстанавливающем конце гликогена ступенчато отщепляются в виде глюкозо-1-фосфата. Схема строения гликогена и реакции фосфоролиза приведена на рис. 92.

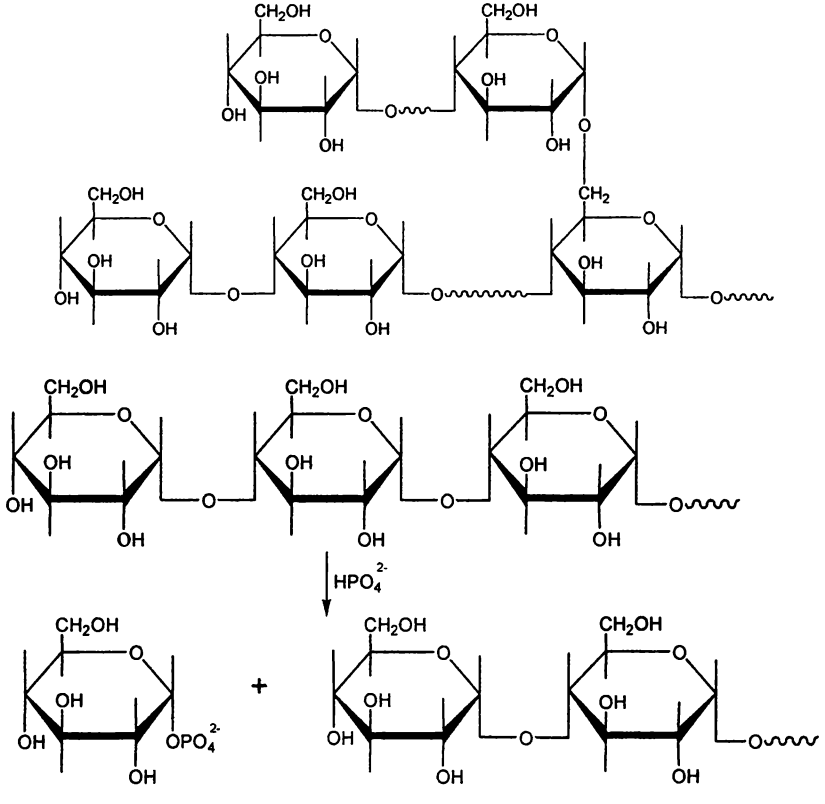


Рис. 92. Строение гликогена и реакции его фосфоролиза

Функциональным и структурным аналогом гликогена у растений является крахмал. *Крахмал* также построен из остатков D-глюкозы, связанных α-(1→4)-связями. Он составлен из двух компонентов – *амилозы*, являющейся линейным полимером, и *амилопектина*, имеющего многочисленные точки разветвления (примерно каждый 24–30-й остаток глюкозы, т. е. менее разветвлен, чем гликоген).

Целлюлоза является линейным (неразветвленным) полисахаридом, построенным из остатков глюкозы, связанных β-(1→4) связями. На земле в результате фотосинтеза ежегодно производится порядка $1{,}5 \times 10^{12}$ тонн целлюлозы.

Хитин является линейным полимером, образованным остатками N-ацетилглюкозамина, связанными, как и у целлюлозы, β-(1→4) связями. Он обеспечивает механическую прочность у многих насекомых (муравьи, жуки) и ракообразных.

Гликозаминогликаны представляют собой углеводную часть углеводсодержащих биополимеров гликозаминопротеогликанов или протеогликанов. Прежнее название гликозаминопротеогликанов – «мукополисахариды» (от лат. mucus – слизь) и «полисахариды». Гликозаминогликаны в составе протеогликанов входят в состав межклеточного вещества соединительной ткани, содержатся в костях, синовиальной жидкости, стекловидном теле и роговице глаза.

Одним из главных полисахаридов соединительной ткани является *гиалуроновая кислота*, которая образована чередующимися фрагментами глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Она является важным компонентом синовиальной жидкости, заполняющей области сочленения костей.

В состав основного вещества соединительной ткани входят также полисахариды, содержащие остатки серной кислоты, этерифицированные OH-группами моносахаридов. Главным из них является *хондроитинсульфат*, состоящий из повторяющихся тетрасахаридных фрагментов, имеющих структуру

$$\text{-}\beta\text{-GalNAc}(4\text{-}SO_3^-)\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcUA-}(1\rightarrow3)\text{-}$$

$$\text{-}\beta\text{-GalNAc}(6\text{-}SO_3^-)\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcUA-}(1\rightarrow3)\text{-}$$

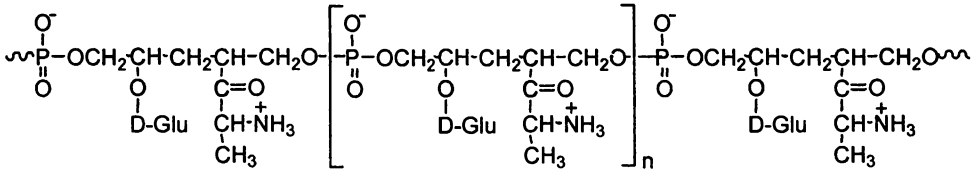
К числу гликозаминогликанов относится также важный компонент крови *гепарин*, который препятствует самопроизвольному ее свертыванию.

$$\text{-}\beta\text{-GlcUA}(2\text{-}SO_3^-)\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-Glc}(2\text{-}NHSO_3^-,6\text{-}SO_3^-)\text{-}$$

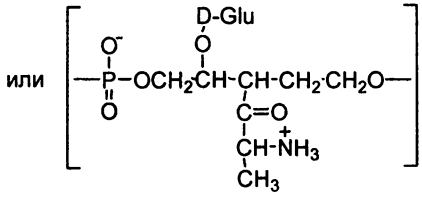
$$\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-GlcUA-}\alpha\text{-Glc}(2\text{-}NHSO_3^-,\ 6\text{-}SO_3^-)$$

Кроме того, к полисахаридам можно отнести и тейхоевые кислоты. Они представляют собой сложные полимеры, основой которых являются чере-

дующиеся остатки полиолов и фосфорной кислоты. Чаще всего в природе встречаются *тейхоевые кислоты*, спиртовым компонентом которых является глицерин или рибит. По ОН-группам в тейхоевых кислотах присоединены остатки аминокислот и моносахаридов. В качестве примера ниже приведена структура тейхоевой кислоты из микроорганизма *Bacillus subtilis,* к рибит-фосфатному остову которой присоединены остатки аланина и D-глюкозы



или



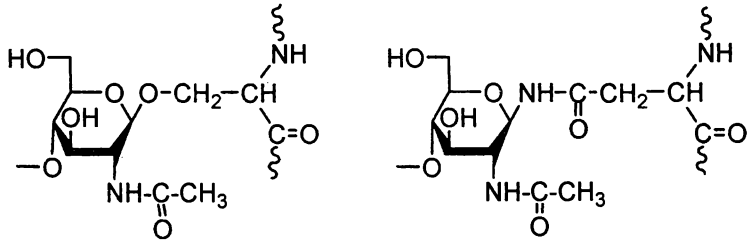
§ 13.5. Гликопротеины и протеогликаны

Сахара в живой природе встречаются не только в самостоятельном виде, но и в виде более сложных конструкций, в частности аддуктов с белками – гликопротеинов и полисахаридов, связанных с пептидами – протеогликанов.

Гликопротеины представляют собой производные белков, в которых к определенным остаткам аминокислот присоединены олигосахариды. Гликопротеинами являются многие белки внешней стороны плазматических мембран и большинство секретируемых белков.

Ферментативное присоединение олигосахаридов к белкам (*гликозилирование*) является одним из важнейших видов посттрансляционной модификации белков. Эта модификация обеспечивает локализацию белка внутри клетки. Обычно они связаны с амидной группой аспарагина или ОН-группами серина или треонина. Ниже приводятся структурные элементы этого соединения.

Гликопротеины часто содержат достаточно сложные олигосахариды, синтез которых происходит в эндоплазматическом ретикулуме. Схема синтеза одного из таких олигосахаридов рассмотрена в предыдущем § 13.4.



Огромное многообразие гликопротеинов обеспечивается последующим процессингом связанного с белком тетрадекасахаридного остатка, который обусловлен действием ряда гликозидаз и гликозилтрансфераз.

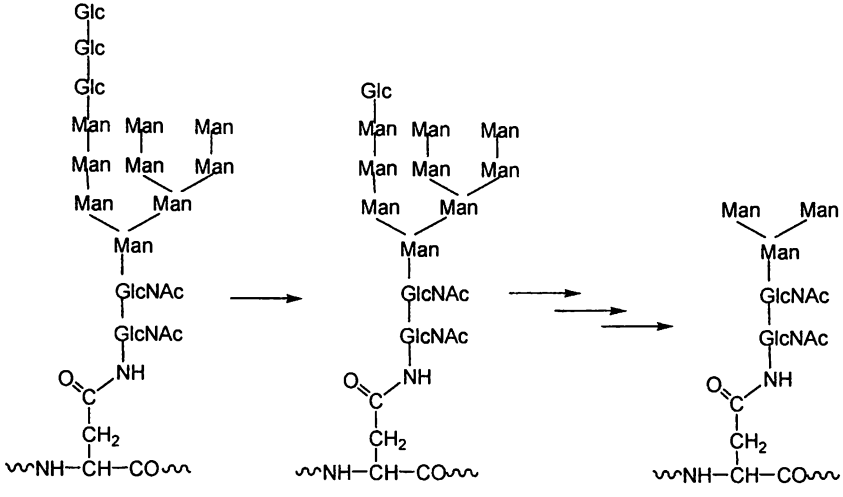


Рис. 93. Структура и первые стадии процессинга олигосахаридного фрагмента $Glc_3Man_9(GlcNAc)_2$ в составе гликопротеина. Моносахариды: Glc – глюкоза, GlcNAc – *N* – ацетилглюкозамин, Man – манноза

На рис. 93 представлена структура связанного тетрадекасахарида и продуктов первых стадий процессинга, катализируемого глюкозидазами I и II (К.Ф. 3.2.1.106), приводящими к отщеплению двух остатков глюкозы, и маннозидазами (К.Ф. 3.2.1.130), приводящими к отщеплению шести остатков маннозы. Образовавшийся после удаления двух остатков глюкозы гликопротеин, содержащий *N*-связанный додекасахаридный остаток, служит местом опознавания белками-шаперонами: *калнексином* и *калретикулином*, помогающими гликопротеину принять правильную пространственную структуру во время его перемещения от места синтеза на мембрансвязанных рибосомах во внутреннюю часть эндоплазматического ретикулума После отщепления третьего остатка глюкозы глюкозидазой эндоплазматического ретикулума

шапероны теряют сродство к ундекасахариду и диссоциируют из комплекса с гликопротеином. UDP-глюкоза:гликопротеин глюкозилтрансфераза (К.Ф. 2.7.8.19) переносит назад остаток глюкозы на ундекасахарид, что заставляет калнексин и калретикулин вступить в следующий этап рефолдинга гликопротеина. Таким образом осуществляется контроль за поддержанием функционально значимой структурной организации секретируемых гликопротеинов.

Если гликопротеин не будет свернут правильным образом в течение нескольких циклов дегликозилирования-регликозилирования, он переносится в цитозоль, где подвергается полиубиквитинилированию с помощью Е3-лигазы, являющейся составной частью системы деградации неправильно свернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме, и гидролизуется в протеасомах.

Правильно свернутый $Man_9(GlcNAc)_2N$-гликопротеин с помощью маннозидаз эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи теряет шесть остатков маннозы с образованием связанного с белком корового пентасахарида $Man_3(GlcNAc)_2$. Последний может присоединять с помощью различных гликозилтрансфераз всевозможные моносахариды, разнообразие которых характерно для эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. В результате этого число различных гликопротеинов измеряется десятками тысяч.

Присоединение углеводов к белкам (гликозилирование) чаще всего имеет информационное значение, нацеливая белки на определенные мишени, в одних случаях предопределяя его секрецию, в других – определяя локализацию белка в клетке или на клеточной мембране. Гликозилирование является многоступенчатым процессом, который начинается на внешней стороне эндоплазматического ретикулума, продолжается на его внутренней стороне и завершается в аппарате Гольджи.

Наличие на конце олигосахарида остатка сиаловой (ацетилнейраминой) кислоты определяет устойчивость клетки. Например, у эритроцитов наличие у мембранного белка гликофорина олигосахарида, оканчивающегося остатком сиаловой кислоты, предохраняет эритроцит от преждевременного разрушения, а удаление этого остатка специальным ферментом сиалидазой превращает его в «старый», подлежащий уничтожению эритроцит.

В качестве примера на рис. 94 приведен олигосахарид, присоединенный через связь с аминогруппой остатка аспарагина в иммуноглобулине (IgG) человека.

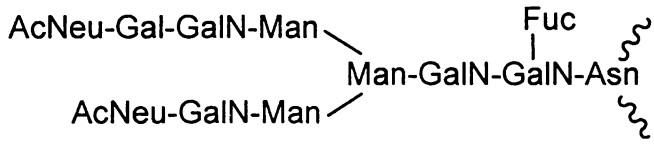


Рис. 94. Структура олигосахарида, связанного с человеческим иммуноглобулином

На этом примере видны некоторые черты, характерные для многих гликопротеинов: разветвленная структура олигосахарида, наличие остатков маннозы в точке разветвления, присутствие сиаловой кислоты на концах цепей, участие в структуре остатка галактозамина и фукозы.

Пептидогликаны распространены как компоненты клеточной стенки бактерий, которые представляют собой жесткие структуры, окружающие клетку и защищающие ее от разрушения под действием высокого внутреннего осмотического давления и от внешних воздействий. В качестве примера можно привести пептидогликан стенки бактерий кишечной палочки *Escherichia coli*. Он представляет собой сополимер чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных β(1→4) гликозидными связями. Каждый остаток N-ацетилмурамовой кислоты связан ^{3}C OH-группой с тетрапептидом, структура которого вместе с модифицированным им дисахаридным фрагментом приведена на рис. 95.

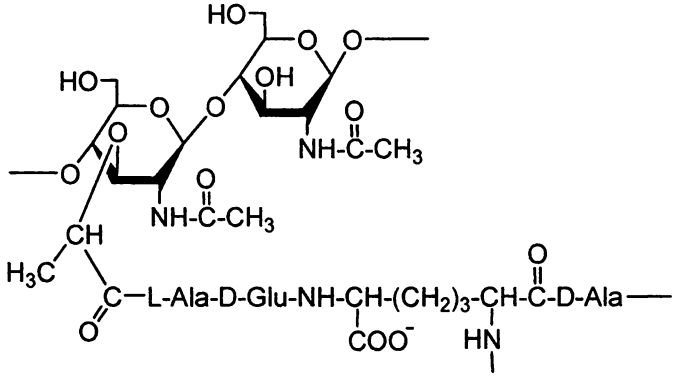


Рис. 95. Структура дисахаридного фрагмента, связанного с тетрапептидом

Как видно из приведенной структуры фрагмента, тетрапептид состоит из остатков L- и D-аланина, остатка D-глутамата и диаминопимелиновой кислоты. N-концевой L-аланин ацилирован карбоксильной группой N-ацетилмурамовой кислоты, входящей в состав полисахарида. Пептиды связаны между собой амидными связями, образованными аминогруппами остатков диаминопимелиновой кислоты одного и карбоксильными группами C-концевых остатков D-аланина соседнего тетрапептида. В итоге образуется сетка из этих пептидов, представленная на рис. 96.

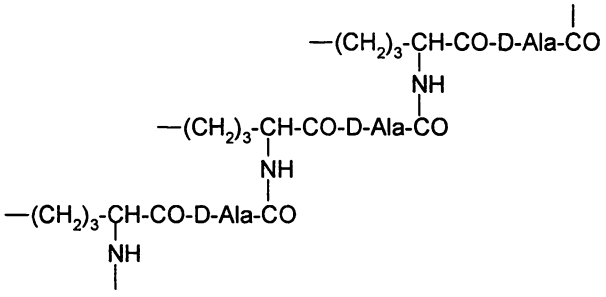


Рис. 96. Сетка из пептидов, образованных аминогруппами остатков диаминопимелиновой кислоты одного пептида и карбоксильными группами С-концевых остатков D-аланина соседнего тетрапептида

Следствием этого является сетчатая структура всего протеогликана, схематично изображенная на рис. 97.

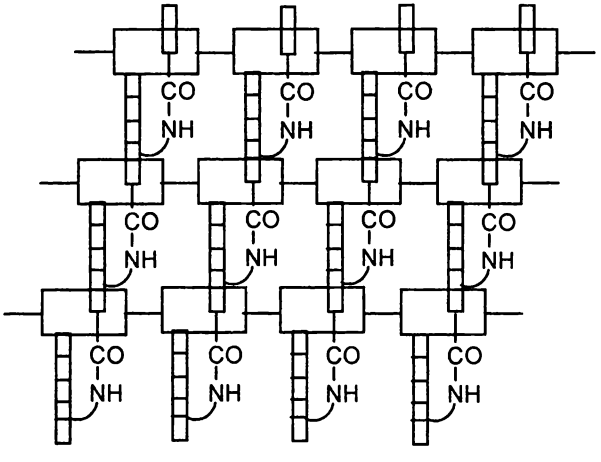


Рис. 97. Схема пептидогликана стенки бактерий кишечной палочки *Escherichia coli*. Белые прямоугольники изображают дисахаридные фрагменты, а узкие вертикальные прямоугольники – связывающие их между собой тетрапептиды

§ 13.6. Химический синтез олигосахаридов

В настоящее время наука не располагает данными о существовании гетерополисахаридов с достаточно протяженным уникальным чередованием мономерных звеньев подобно белкам и нуклеиновым кислотам. В то же время в природе существуют и выполняют важные биологические функции гетерополисахариды с регулярным чередованием олигосахаридных блоков. Такими, в частности, являются гепарин и хондроитинсульфат (см. § 13.4). В предыдущем § 13.5 приведены примеры олигосахаридов с уникальной структу-

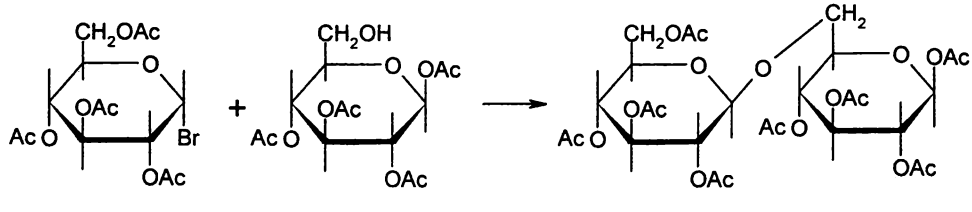
рой в составе гликопротеинов, которые играют важную роль в функционировании их белкового компонента. В связи с этим синтез гетероолигосахаридов представляет интерес для получения новых путем поликонденсации синтетических олигомеров. Интересным может оказаться синтез нерегулярных олигосахаридов определенной структуры для их присоединения к белкам для получения гликопротеинов с измененными биологическими функциями.

Поскольку в олиго- и полисахаридах мономерные звенья связаны гликозидной связью, то центральным вопросом для синтеза олиго- и полисахаридов является образование именно такого вида связи. Поэтому при соединении мономерных звеньев или их присоединения к наращиваемой цепи один из компонентов должен фигурировать как донор гликозила с защищенными ОН-группами, а второй – как акцептор гликозила, у которого защищены все ОН-группы, кроме одной определенной. Получение таких мономеров представляет собой нетривиальную задачу и требует в зависимости от выбранной группы акцептора специальных решений.

Так как *защитные группы* должны быть удаляемыми с одновременным сохранением образованной гликозидной связи, то чаще всего с этой целью используются ацильные группы, удаляемые в щелочной среде, и алкилиденовые группы, легко удаляемые в кислой среде или, в случае бензилиденовых групп, каталитическим гидрированием. Применение алкилиденовых защит имеет еще одной важное свойство – при этом защищаются сразу две гидроксигруппы.

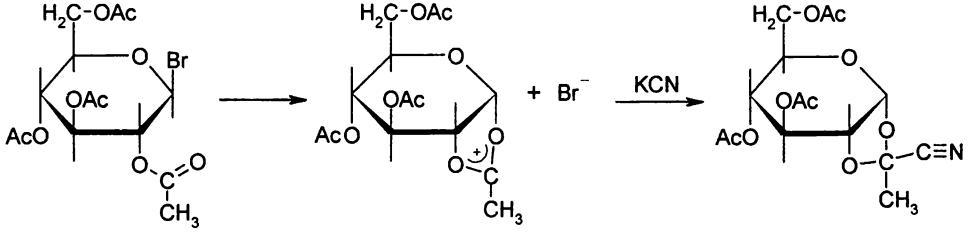
Относительно несложной задачей является получение акцептора гликозила с экспонированной 6-ОН-группой. С этой целью в моносахариде-акцепторе эта группа сначала защищается обработкой тритилхлоридом, который избирательно атакует первичную ОН-группу. Затем проацилируются все остальные ОН-группы, а тритильная защита с 6-ОН-группы селективно деблокируется кислотной обработкой. Сложнее обстоит дело с избирательным экспонированием гидроксилов в положениях 2, 3 и 4. Некоторые такие синтоны были получены. Например, описано получение α-метил-1,2,5,6-ди-О-изопропилиден-α-D-глюкофуранозы со свободным гидроксилом при ^{3}С.

Для образования гликозидных связей при синтезе олигосахаридов было предложено несколько методов. Первый основан на реакции Кенигса и Кнорра и представляет собой взаимодействие α-галогенида, защищенного по всем остальным ОН-группам, с соответствующим акцептором, например:

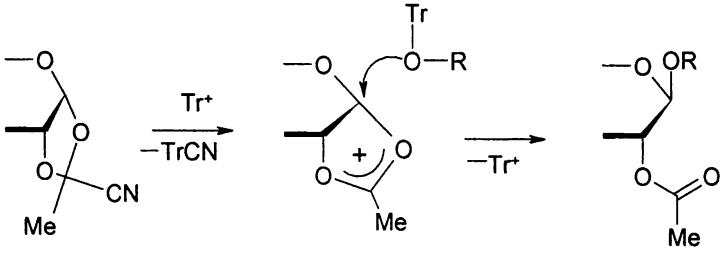


Процесс сопровождается обращением конфигурации, поэтому при использовании *цис*-галогенидов образуются дисахариды с *транс*-конфигурацией гликозидной связи по отношению к О-ацильной группе при атоме ^{2}C донора гликозила.

Однако основные достижения по синтезу олигосахаридов и их поликонденсации связаны с предложенным и разработанным академиком Н. К. Кочетковым методом *цианэтилиденовой конденсации*. Основой метода является реакция 1,2-цианэтилиденовых производных сахаров в качестве донора гликозила и тритил-ОН-группы акцептора. В зависимости от решаемой задачи все ОН-группы и донора, и акцептора должны быть блокированы временными (т. е. удаляемыми перед каждой очередной стадией) или постоянными (удаляемыми в конце синтеза) защитными группами. Цианэтилиденовые производные моносахаридов получаются из бромидов защищенных по всем ОН-группам мономеров обработкой цианидом калия или натрия. Образование их происходит через промежуточное образование диоксалениевого производного по схеме



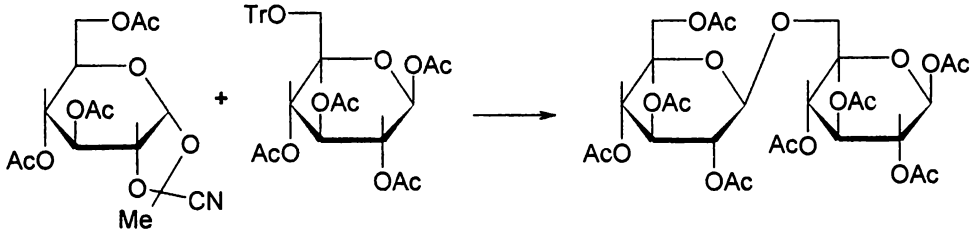
Цианэтилиденовые производные с полностью защищенными ОН-группами могут выступать в качестве доноров гликозила и в мягких условиях реагируют с монотритиловыми эфирами моносахаридов-акцепторов. У акцепторов одна, необходимая для присоединения гликозила, ОН-группа тритилирована, а остальные блокированы постоянными защитными группами. Реакция требует участия следовых количеств тритилхлорида как катализатора. Образование гликозидной связи проходит по схеме



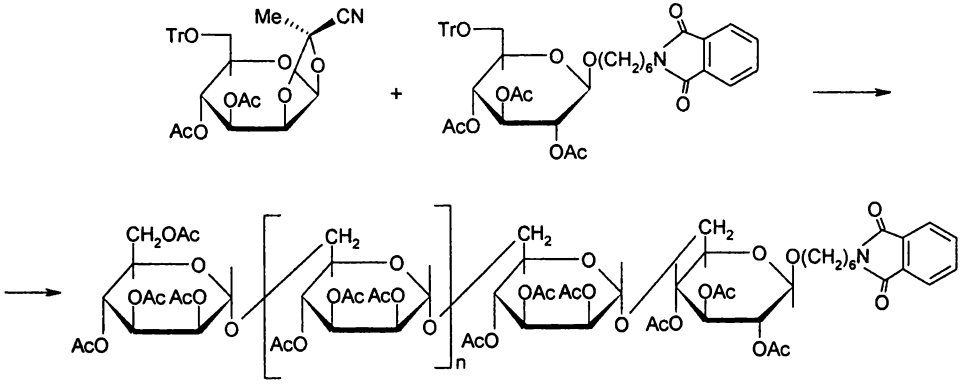
где ROH – моносахарид, акцептор гликозила.

В качестве примера ниже приводится синтез с помощью цианэтилидено-

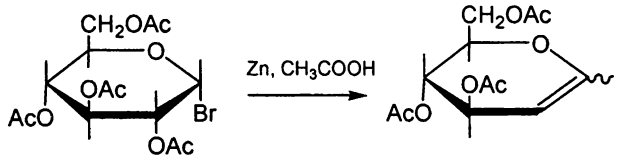
вой конденсации дисахарида O-β-D-(1→6)-глюкопиранозил-β-D-глюкопиранозы (защищенного по всем OH-группам).



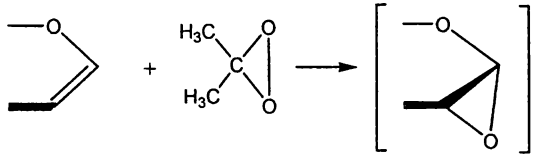
Производные, содержащие одновременно цианэтилиденовую группу и тритилированный гидроксил, могут использоваться для поликонденсации. В качестве примера можно привести поликонденсацию производного маннозы. Длину образующегося полимера можно регулировать тритилированным моносахаридом, не содержащим цианэтилиденовой группы. В приведенном примере в качестве терминатора использовалось тритилированное по 6-OH-группе производное глюкозы, содержащее фталимидогексильный остаток на 1-OH группе:



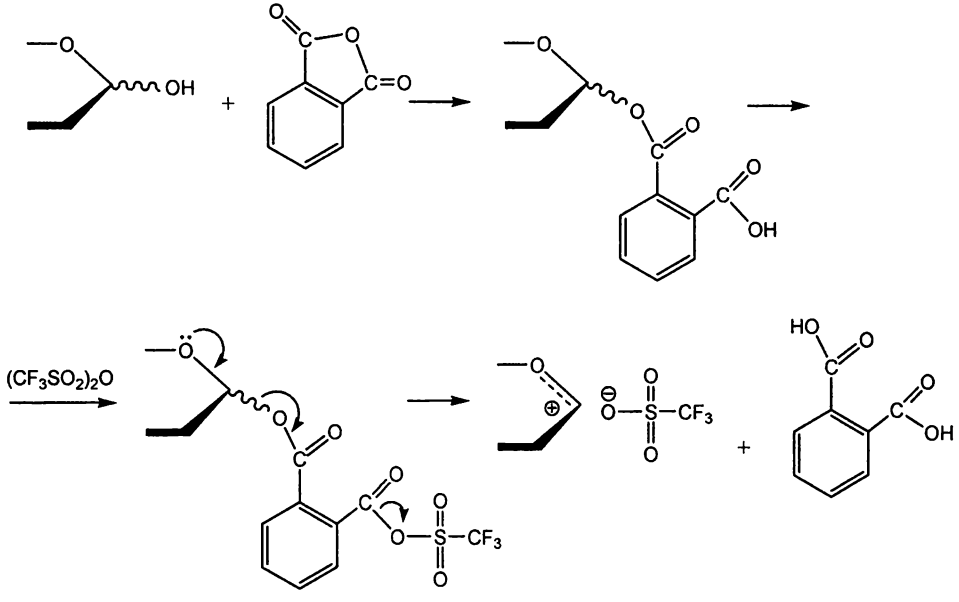
В дальнейшем было разработано много других типов доноров гликозила. Успешным оказалось использование в качестве гликозилирующих агентов гликалей моносахаридов, которые представляют собой 1,2-ненасыщенные сахара. Они могут быть получены восстановлением ацилгалогеноз, например, цинком в уксусной кислоте. В качестве примера можно привести реакцию получения гликаля глюкозы:



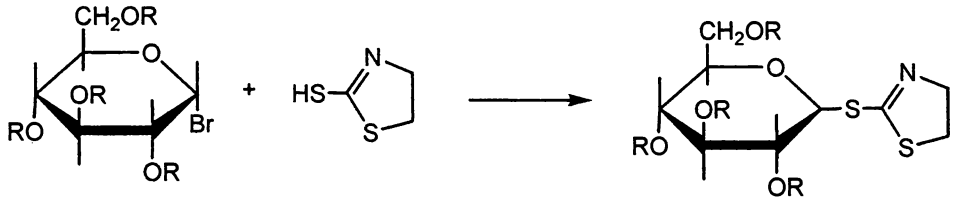
Активные производные гликалей образуются при действии на них 3,3-диметилоксирана:



Широко стало использоваться введение латентных заместителей по аномерному атому O с последующей активацией ангидридом *трифторметансульфокислоты,* ее солями (трифлатами) и сложными эфирами, приводящими к образованию оксокарбениевого иона, являющегося сильным донором гликозила. В качестве латентных предложен целый ряд заместителей, примером является использование фталевого ангидрида. Ниже приводится схема превращений.



В качестве подобной достаточно устойчивой латентной группы предложена тиотиазолил-группа, которая легко вводится в донорный гликозид путем обработки соответствующего гликозилгалогенида 2-тиазолинтиолом.



Наряду с синтезом в растворе широко используется твердофазный синтез олигосахаридов. Разрабатываются оба его варианта – с иммобилизованным донором и иммобилизованным акцептором. Описано успешное применение обоих методов образования гликозидных связей – введение латентных заместителей с их последующей активацией производными трифторметансульфоновой и использование гликалей с активацией диметилоксираном.

В качестве примера на рис. 98 приведена схема твердофазного синтеза олигомера галактозы с использованием иммобилизованного донора гликозила, содержащего концевой гликаль, который на каждой стадии элонгации активируется *диметилоксираном*. Выход на каждой стадии может достигать 90 %.

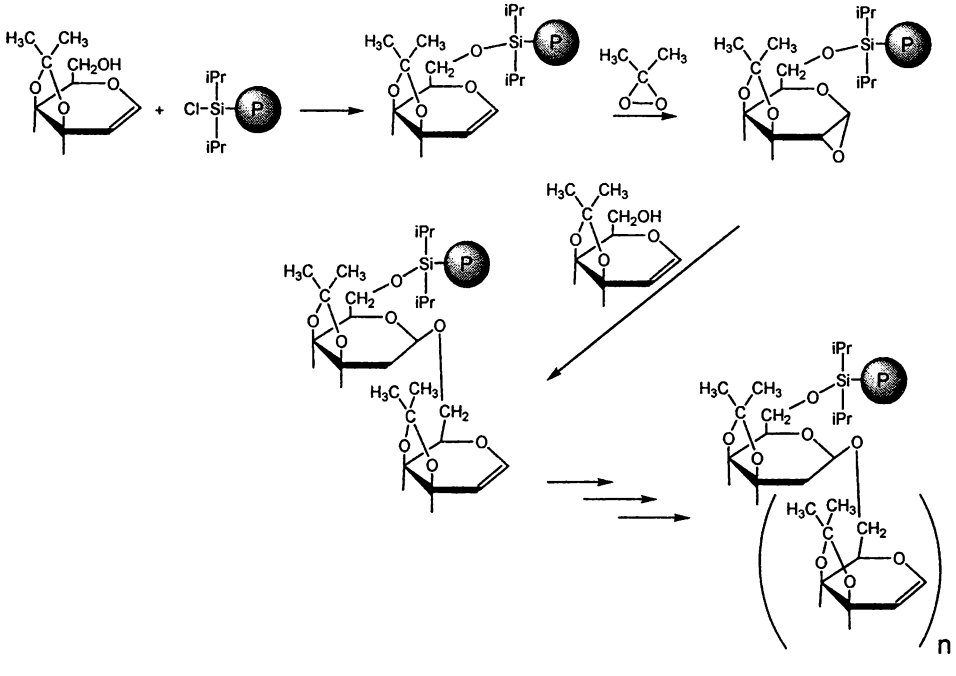
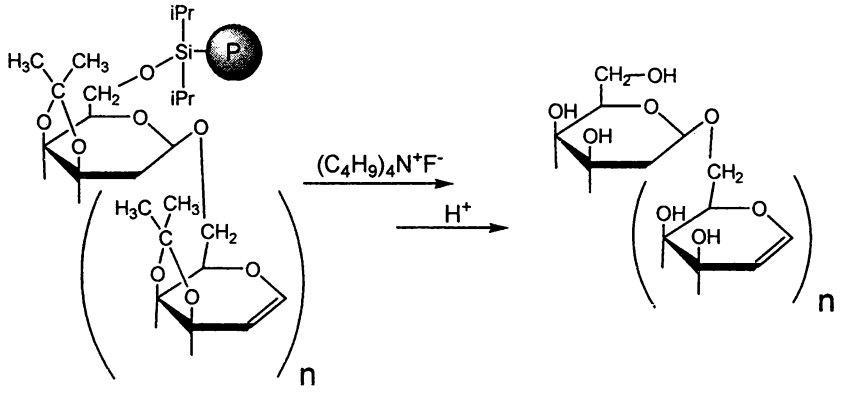


Рис. 98. Твердофазный синтез олигогалактозидов

Синтезированный олигомер снимается с носителя обработкой фторидом тетрабутиламмония.



Использование иммобилизованного акцептора можно проиллюстрировать получением большой серии дисахаридов, при котором на носителе (смола Меррифилда, предварительно обработанная аммиаком) за 6-ОН-группу был закреплен остаток глюкозы, бензилированный по 2- и 4-ОН-группам и метилированный по 1-ОН-группе (рис. 99). Для иммобилизации акцептора предварительно проводится сукцинилирование 6-ОН-группы ангидридом янтарной кислоты, после чего с помощью карбодиимида сукцинильный остаток соединяется с аминогруппой носителя. Приведенный на схеме акцептор гликозилируется по 3-ОН-группе.

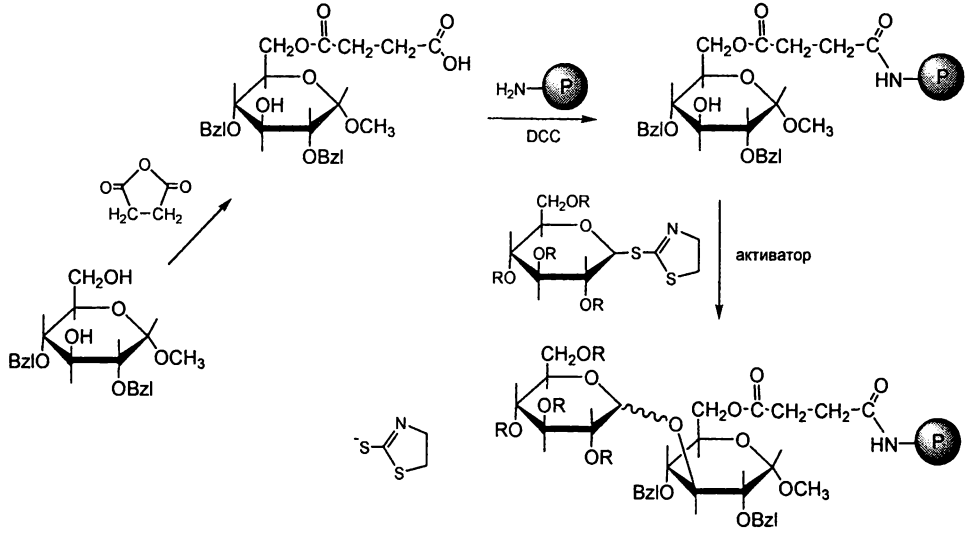


Рис. 99. Образование гликозидной связи с иммобилизованным акцептором гликозила. R – защиты 2-,3-,4- и 6-ОН-групп донора

С этим акцептором проводятся систематические исследования с различными донорами гликозила, различающиеся использованными защитными

и латентными группами и активирующими реагентами. Эти исследования показали наличие сильной зависимости от перечисленных факторов как выхода дисахарида, так и содержания в нем определенного типа аномера. Например, при использовании в качестве латентной группы донора остатка S-тиазола, если R – это бензоил (C_6H_5CO-), и трифлата серебра (AgOTf) в качестве активатора образование дисахарида вообще не зарегистрировано. В то же время при использовании в качестве активатора метилтрифлата получен дисахарид с выходом 80 %, причем целиком β-аномер. С тем же активатором, но аналогичным донором, у которого R – бензильный радикал (-$CH_2C_6H_5$), получена смесь равных количеств α- и β-аномеров.

Глава 14. Биоорганическая химия липидов

§ 14.1. Жирные кислоты – гидрофобные компоненты омыляемых липидов

Основными гидрофобными компонентами омыляемых липидов являются ацильные остатки высших алифатических монокарбоновых кислот, как насыщенных, так и содержащих одну или несколько двойных связей. Насыщенные природные жирные кислоты с общей формулой $CH_3(CH_2)_nCOOH$, как правило, имеют неразветвленную углеводородную цепь и содержат четное число атомов углерода. Последнее обусловлено механизмом их биосинтеза, который происходит путем ступенчатого наращивания двухуглеродными фрагментами CH_3CO с помощью ацетилированного кофермента А. Перечень основных встречающихся в природе насыщенных жирных кислот представлен в табл. 19.

Названия многих жирных кислот появились еще до установления их строения, и их тривиальные названия прочно утвердились в биохимической литературе. Из насыщенных кислот в природе наиболее распространены содержащие 16 и 18 атомов С *пальмитиновая* (гексадекановая) и *стеариновая* (октадекановая) *кислоты*.

Таблица 19

Наиболее широко распространенные в природе насыщенные жирные кислоты

Тривиальное название	Систематическое название	Число атомов углерода
масляная	*н*-бутановая	4
капроновая	*н*-гексановая	6
каприловая	*н*-октановая	8
каприновая	*н*-декановая	10
лауриновая	*н*-додекановая	12
миристиновая	*н*-тетрадекановая	14
пальмитиновая	*н*-гексадекановая	16
стеариновая	*н*-октадекановая	18
арахиновая	*н*-эйкозановая	20
бегеновая	*н*-докозановая	22
лигноцериновая	*н*-тетракозановая	24
церотиновая	*н*-гексакозановая	26
монтановая	*н*-октакозановая	28
милиссовая	*н*-триаконтановая	30

В омыляемых липидах широко распространены ненасыщенные жирные кислоты. Всего в составе природных омыляемых липидов найдено более сотни различных природных жирных кислот, отличающихся длиной углеводородной цепи, числом и положением двойных связей.

Для входящих в состав липидов ненасыщенных жирных кислот широко используется сокращенная аббревиатура в виде двух цифр, согласно которой первая цифра указывает число углеродных атомов, вторая – количество двойных связей. После этого в виде надстрочных индексов над буквой Δ цифрами указываются номера первых атомов С (отсчитываемые от карбоксильной группы), образующих двойную связь. Например, *арахидоновая кислота*:

$$CH_3\text{-}(CH_2)_4\text{-}(CH{=}CH\text{-}CH_2)_4\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH$$

запишется в этой аббревиатуре как $20{:}4(\Delta^{5c,8c,11c,14c})$, что означает кислоту, содержащую 20 углеродных атомов, имеющую четыре двойные связи, которые образованы между атомами 5 и 6, 8 и 9, 11 и 12, 14 и 15 соответственно. При номерах, указывающих положение двойных связей, буквами с или t обозначают конфигурацию относительно двойной связи цис- или транс-. Ряд важнейших представителей ненасыщенных жирных кислот приведен в табл. 20.

Таблица 20

Наиболее широко распространенные в природе ненасыщенные жирные кислоты и их аббревиатура

Тривиальное название	**Систематическое название**	**Сокращенное обозначение (аббревиатура)**
тарировая	октадецин-6-овая	$18{:}1(\Delta^{6a})$
олеиновая	октадецен-9-овая	$18{:}1(\Delta^{9c})$
элаидиновая	октадецен-9-овая	$18{:}1(\Delta^{9t})$
вакценовая	октадецен-11-овая	$18{:}1(\Delta^{11t})$
линолевая	октадекадиен-9-12-овая	$18{:}2(\Delta^{9c12c})$
крепениновая	октадецен-9-ин-12-овая	$18{:}2(\Delta^{9c12a})$
линэлаидиновая	октадекадиен-9,12-овая	$18{:}2(\Delta^{9t12t})$
α-линоленовая	октадекатриен-9,12,15-овая	$18{:}3(\Delta^{9c12c15c})$
календовая	октадекатриен-8,10,12-овая	$18{:}3(\Delta^{8t10t12c})$
элеостеариновая	октадекатриен-9,11,13-овая	$18{:}3(\Delta^{9c11t13t})$
каталповая	октадекатриен-9,11,13-овая	$18{:}3(\Delta^{9t11t13c})$
паринаровая	октадекатетраен-9,11,13,15-овая	$18{:}4(\Delta^{9c11t13t15c})$
арахидоновая	эйкозатетраен-5,8,11,14-овая	$20{:}4(\Delta^{5c,8c,11c,14c})$
эруковая	докозен-13-овая	$22{:}1(\Delta^{13c})$

Из ненасыщенных жирных кислот наиболее распространенными в природе являются моноеновые (содержащие одну двойную связь) жирные кислоты,

но достаточно часто встречаются и содержащие от двух до шести двойных связей.

Наряду с тривиальными названиями для жирных кислот используются и более развернутые рациональные названия. Например, линолевая кислота называется *цис,цис*-октадецендиен-9,12-овой. Применяется также запись, в которой положение двойной связи отсчитывается не от карбоксильного конца, а от последней метильной группы, обозначаемой ω. В этой записи линолевая кислота будет иметь аббревиатуру 18:2 *ω* 6,9.

Известны также кислоты с сопряженными двойными связями, например, *паринаровая кислота*, выделенная из тропического растения семейства бальзаминовых *impatiens balsamina,* имеющая аббревиатуру 18:4($\Delta^{9c,11t,13t,15c}$) или 18:4 *ω* 3c,5t,7t,9c с транс-конфигурацией двойной связи при атомах C^5 и C^7:

$$CH_3CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}CH{=}CH\text{-}CH{=}CH\text{-}CH{=}CH\text{-}(CH_2)_7\text{-}COOH$$

В зависимости от числа двойных связей и их положения, а также по отношению к карбоксильному концу различают олеиновый, линолевый и линоленовый типы структур. К олеиновому типу относят структуры состава

$$CH_3\text{-}(CH_2)_7\text{-}CH{=}CH\text{-}CH_2\text{-}(CH_2)_y\text{-}COOH$$

Простейшим представителем этого типа является *олеиновая кислота* (y = 6, октадецен-9-овая).

Линолевый тип представляет собой структуру

$$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CH\text{-}CH_2)_2\text{-}(CH_2)_y\text{-}COOH$$

Простейшим представителем этого типа является *линолевая кислота*, структура которой приведена выше (y = 6, октадекадиен-9,12-овая).

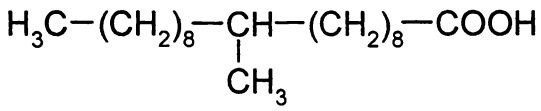
Линоленовый тип может быть записан в виде

$$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3\text{-}(CH_2)_y\text{-}COOH$$

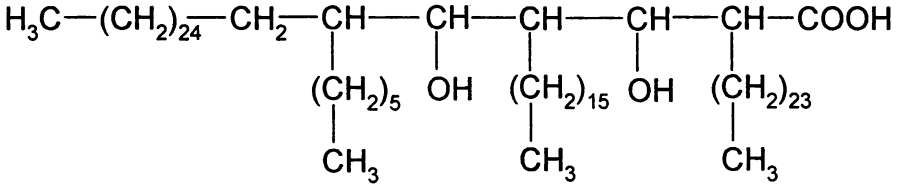
Простейшим представителем этого типа является *линоленовая кислота*, для которой y = 6 (октадекатриен-9,12,15-овая кислота).

$$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3\text{-}(CH_2)_6\text{-}COOH$$

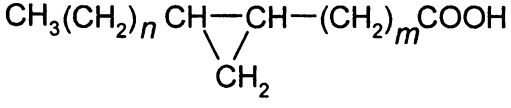
В бактериальных липидах достаточно широко представлены жирные кислоты, содержащие разветвленные углеводородные цепи. Так, из микобактерий туберкулеза человека выделена 10-метилоктадекановая кислота (*туберкулостеариновая*),



а также жирная кислота, содержащая 78 углеродных атомов, – *миколевая*:



Кроме того, в бактериях и растениях широко представлены жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо, общей формулой



Наиболее распространенным в природе является олеиновый тип жирных кислот. Например, содержание его в оливковом масле составляет 85 % от общего числа жирных кислот, входящих в него. Олеиновая кислота входит в состав липидов различных тканей и органов животных и человека. Линолевая и линоленовая кислоты находятся преимущественно в растениях.

Арахидоновая жирная кислота входит в состав фосфолипидной фракции, структурирующей клеточные мембраны практически всех клеток животного организма: фосфолипидов печени, почек, мозга, лимфатических желез. Ее содержание в тканях животных организмов колеблется от 0,2 до 22 %. Она является предшественником простагландинов.

Эйкозапентаеновая, докозагексаеновая, докозапентаеновая и докозатетраеновая кислоты избирательно локализуются в липидах отдельных органов и тканей животных (мозг, сердце и др.) в концентрациях долей процента. Что касается растений, то они содержат липиды во всех частях, причем пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты часто преобладают. Насыщенных жирных кислот в растениях содержится меньше, чем ненасыщенных. Хлоропласты растений особенно богаты α-линоленовой кислотой.

Полиненасыщенные жирные кислоты с двойными связями в положениях между 4 и 5, 5 и 6 или 6 и 7 атомами С, преимущественно в *цис*-форме, обнаружены в исключительно больших количествах в морских организмах, где они достигают 10–30 и даже 40 %. Встречаются также ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одновременно двойные и тройные связи.

Преобладающей конформацией насыщенных жирных кислот с неразветвленной углеводородной цепью является зигзагообразная структура.

Низшие жирные кислоты растворимы в воде, однако с увеличением длины цепи растворимость падает, и кислоты, содержащие 10 углеродных атомов и выше, практически нерастворимы в водных растворах. Жирные кислоты являются слабыми кислотами с pK_a, близкой к 5. Их температура плавления возрастает с увеличением длины цепи. Появление двойной связи существенно снижает температуру плавления, причем для *цис*-изомеров более, чем для *транс*-изомеров.

Идентификация жирных кислот, отщепляющихся при гидролизе сложных липидов, является одним из важнейших этапов установления их структуры. До недавнего времени это делалось по хроматографической подвижности кислот, которая существенно зависит от их молекулярной массы и наличия и числа кратных связей. В настоящее время для этого стала широко использоваться масс-спектрометрия.

Определение структуры высших жирных кислот обычно начинают с определения числа двойных связей, что выполняется путем исчерпывающего гидрирования в присутствии Pd или Pt или бромирования – по расходу водорода или брома. Исчерпывающее гидрирование приводит к соответствующей насыщенной кислоте. Так, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты включают при гидрировании 1, 2 или 3 моля H_2 и дают стеариновую кислоту.

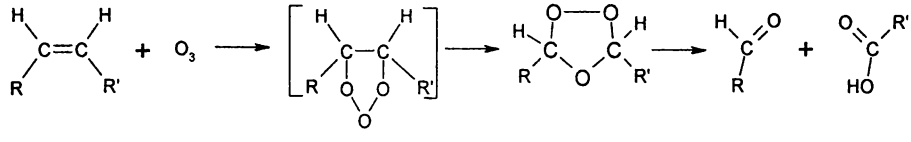
Положение двойной (или двойных) связи может быть установлено по продуктам расщепления по этим связям. Так, окисление жирной кислоты перманганатом калия приводит к образованию двух гидроксигрупп по каждому углероду двойной связи, по которым может быть проведено расщепление периодатом по реакции, описанной § 2.3.

$$R(CH_2)_mCH{=}CH\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH \Rightarrow$$

$$\Rightarrow R\,(CH_2)_mCH(OH)\text{-}CH(OH)\text{-}(CH_2)_n\text{-}COOH + IO_4^- \rightarrow$$

$$\rightarrow R(CH_2)_mCHO + HCO(CH_2)_nCOOH + IO_3^-$$

Определение продуктов расщепления позволяет локализовать исходное положение двойной связи. Для этой цели также широко используется *озонирование* – реакция по двойной связи с озоном. Образующийся при этом озонид далее распадается на альдегид RCHO и карбоновую кислоту R'COOH и аналогично R'CHO и RCOOH:



Разветвленные жирные кислоты при окислении хромовой кислотой расщепляются по точкам разветвления, что может быть использовано для определения этих точек.

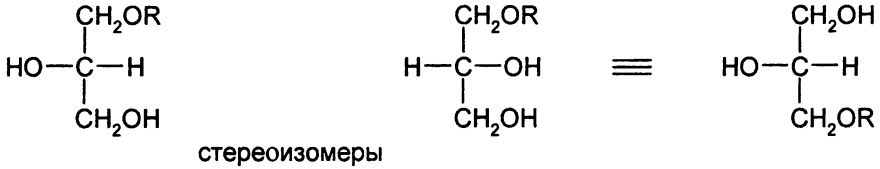
Наряду с жирными кислотами к числу гидрофобных компонентов липидов относятся менее распространенные длинноцепочечные высшие жирные спирты, которые входят в состав ряда нейтральных липидов и некоторых фосфолипидов. Спирты образуют простую эфирную связь с гидроксильной группой глицерина или других полиолов (алкильную -OAlk). Наиболее распространены спирты с четным числом углеродных атомов и неразветвленной цепью, как насыщенные, так и ненасыщенные. Основными представителями спиртов, входящих в состав липидов, являются гексадециловый (C16), октадециловый (C18) и октадецен-9-ол (олеиновый).

§ 14.2. Простые омыляемые липиды. Триацилглицерины. Алкильные производные жирных кислот. Воска

Природными простыми омыляемыми липидами являются этерифицированные жирными кислотами по OH-группам: глицерин, этиленгликоль, 1,2-пропан- и 1,3-бутандиолы. Из них в природе наиболее широко распространены *триацилглицерины*, представляющие собой нейтральные жиры или масла. Главное различие между маслом и жиром – это их агрегатное состояние при комнатной температуре: жиры являются твердыми телами, а масла – жидкостями. В жирах преобладают остатки насыщенных жирных кислот, а в маслах – ненасыщенных. По многим важнейшим свойствам к простым омыляемым липидам близки алкильные производные глицерина и диолов, которые, строго говоря, не являются омыляемыми липидами, поскольку простая эфирная связь не подвержена омылению.

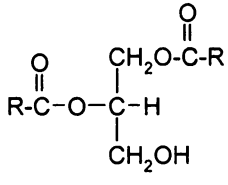
В липидах млекопитающих глицериды составляют 98 % и выше от общего количества липидов. В то же время в морских звездах содержится до 35 % от общего количества липидов производных гликоля с простой эфирной связью с насыщенными и ненасыщенными углеводородными остатками.

Молекула глицерина имеет ось симметрии и оптически неактивна, но при наличии в молекуле ацилглицерида ацильного или алкильного остатка только при одном из крайних атомов или двух разных остатков при обоих центральный атом углерода глицерина становится асимметрическим. В этих случаях возможно существование двух стереоизомеров:

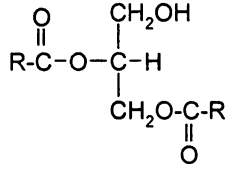


стереоизомеры
R - ацил или алкил

Для глицеридов принято использовать универсальную номенклатуру, предложенную IUPAC, которая основана на *стереоспецифической нумерации* (stereospecific numbering, обозначается символом sn). Согласно этой номенклатуре если в проекциях Фишера гидроксильная группа при атоме ^2C располагается слева от него, то углеродному атому, находящемуся над атомом ^2C, присваивается номер 1, а нижнему – 3. В соответствии с этим приведенные выше стереоизомеры являются 1-R и 3-R-sn-глицеридами. По данной номенклатуре при любых превращениях, не приводящих к обращению конфигурации асимметрического центра, за каждым углеродным атомом глицеринового скелета сохраняется жесткая нумерация, что и отражает неравноценность положений 1 и 3 при стереоспецифических реакциях. Недостатком данной номенклатуры является то, что она не выражает общепринятым способом принадлежность к оптическим изомерам с использованием префиксов D и L, а делает это указанием места расположения заместителя у C^1 и C^3 Например, D-1,2-диацилглицерид при использовании этой номенклатуры является 2,3-диацил-sn-глицеридом.

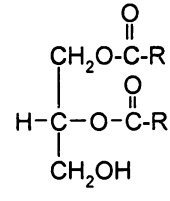


sn, 1,2-диацилглицерид
(L-1,2-диацилглицерид)



2,3-диацил-sn-глицерид

≡



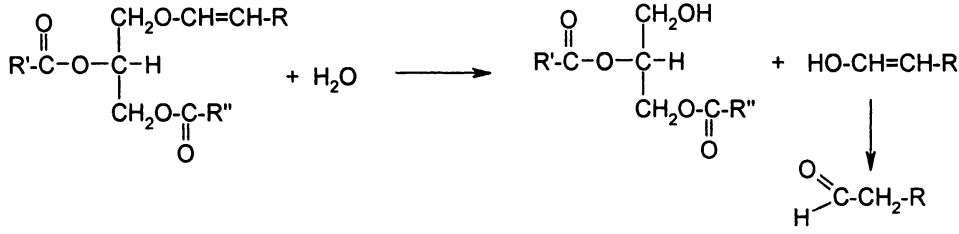
(D-1,2-диацилглицерид)

Хиральный углеродный атом, дающий образование энантиомеров, приводит к существованию при наличии трех разных ацильных остатков 12 различных соединений, в том числе шести пар энантиомеров. При наличии даже всего двух различных заместителей существует шесть триацилглицеринов, в том числе три пары энантиомеров.

Природные триацилглицериды делятся на четыре типа по степени ненасыщенности входящих жирных кислот: тринасыщенные GS3, динасыщенные GS2U, мононасыщенные GSU2 и ненасыщенные GU3 (где G – остаток глицерина, S – остаток насыщенной жирной кислоты, а U – остаток ненасыщенной жирной кислоты).

Наряду с триацилглицеридами во многих живых организмах содержатся простые эфиры диацилглицеридов (алкилдиацилглицериды). Простые эфиры диацилглицеридов с ненасыщенным алифатическим спиртом, содержащим двойную связь между α и β углеродными атомами, имеют *цис*-конфигурацию, т. е. являются цис-1-О-(алкен-1-ил)-2,3-диацил-sn-глицеридами. Они называются нейтральными *плазмалогенами.* Из них при гидролизе в кислой

среде помимо двух жирных кислот образуется ненасыщнный спирт плазмал, который претерпевает перегрупировку в альдегид.



Иногда встречаются плазмалогены, содержащие две алкенильноэфирные группы.

К простым липидам также относят *воска*, широко распространенные в природе и входящие в состав защитного покрытия листьев растений, птичьих перьев, насекомых и морских организмов. Они обладают водоотталкивающими свойствами. Воска являются эфирами обычно одноатомных длинноцепочечных кислот и длинноцепочечных спиртов.

В качестве примера можно привести *пчелиный воск*, являющийся сложным эфиром одноатомного мирисцилового спирта, содержащего 30 атомов углерода, и пальмитиновой кислоты:

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{28}\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_{14}CH_3$$

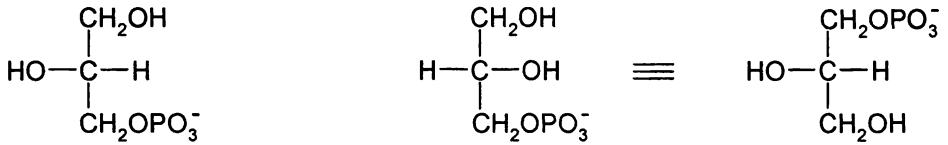
Из черепной полости кашалота выделен воск – *спермацет*, который отличается от пчелиного воска тем, что вместо мирисцилового в него входит цетиловый спирт:

$$C_{16}H_{31}\text{-}O\text{-}C(O)\text{-}(CH_2)_{14}CH_3$$

§ 14.3. Сложные липиды

К сложным относят разнообразные липиды, содержащие наряду с гидрофобными компонентами гидрофильные остатки. Они представлены в живой природе двумя основными группами соединений – фосфоглицеридами, которые являются производными фосфатидной кислоты, и сфинголипидами, являющимися производными сфингазина и церамидов.

Структурной основой первой группы сложных липидов является глицерофосфат. Он может существовать в виде двух оптических изомеров – sn-глицеро-3-фосфата и sn-глицеро-1-фосфата

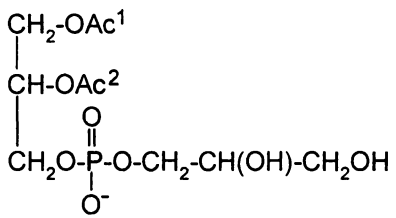


sn-глицеро-3-фосфат (L-1) или sn-глицеро-1-фосфат (D-3)

Фосфоглицериды и их производные широко представлены в растениях и животных и в значительно меньшей мере у бактерий. 1,2-Ди-О-ацил-*sn*-глицеро-3-фосфаты являются важными структурными компонентами биологических мембран и предшественниками большого числа других играющих важную биологическую роль липидов.

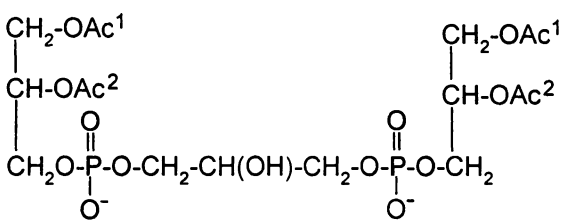
В мягких щелочных условиях, достаточных для гидролиза сложноэфирной связи глицеринового фрагмента с жирными кислотами, гидролиз фосфоэфирной связи в фосфатидной кислоте и ее производных проходит в незначительной степени. Поскольку в этих условиях происходит миграция остатка фосфата, образуется смесь жирных кислот и 3- и 2-изомеров глицерофосфата.

К фосфоглицеридам относятся и *фосфатидилглицерин,*



представляющий собой производное фосфатидной кислоты, у которой имеется еще один остаток глицерина, присоединенный к гидроксилу фосфорной кислоты (1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфо-1'-sn-глицерин). Он является одним из самых распространенных фосфолипидов бактерий.

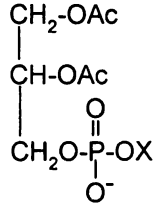
К фосфоглицеридам относятся и так называемые *кардиолипины*, представляющие собой дифосфатидилглицерин, в состав которого входит уже три молекулы глицерина [бис-(1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)1',3'-глицерин].



В значительных количествах он содержится в сердечной мышце и митохондриях животных, однако найден также в растениях и некоторых бактериях. При гидролизе фосфатидной кислоты, фосфатидилглицерина и дифосфатидилглицерина образуется смесь одних и тех же продуктов в разном соотношении.

Наконец, к фосфолипидам также относятся полярные плазмалогены, содержащие при ^{1}C атоме глицерофосфата не ацильную, а алкен-1-ильную группу (т. е. липиды с простой эфирной связью).

В природе фосфатидные кислоты встречаются в основном в виде производных



где Ac – ацильные остатки жирных кислот, X = $NH_2CH_2CH_2$- (*фосфатидилэтаноламин*), $(CH_3)_3N^+CH_2CH_2$- (*фосфатидилхолин*), $NH_2CH(COOH)CH_2$- (*фосфотидилсерин*), инозитол (*фосфатидилинозитол*) и другие соединения. К остатку инозитола могут быть присоединены еще дополнительные фосфатные остатки или остатки сахара. Полный гидролиз таких производных осуществляется в кислой среде. В частности, из фосфатидилхолина в этих условиях образуется холин.

Второй большой группой сложных липидов являются сфинголипиды. Это существенные структурные компоненты мембран растений и животных, в особенности нервной ткани. Основой их структуры являются аминоспирт сфингозин:

$$CH_3(CH_2)_{12}\text{-}CH{=}CH\text{-}CH(OH)\text{-}CH(NH_2)\text{-}CH_2OH$$

или его аналог с гидратированной двойной связью (*сфинганин*):

$$CH_3(CH_2)_{12}\text{-}CH(OH)\text{-}CH(OH)\text{-}CH(OH)\text{-}CH(NH_2)\text{-}CH_2OH$$

Последний обычно встречается в составе сфинголипидов растений и поэтому часто называется фитосфингозидом. В сфинголипидах аминогруппа, как правило, ацилирована какой-либо длинноцепочечной жирной кислотой, т. е. сфинголипиды являются церамидами. Наряду со сфингозином, содержащим 18 атомов C, в составе сфинголипидов встречаются аминоспирты другого размера с числом атомов C в пределах 12–22 атомов. Поэтому в об-

щем случае структуру аминоспиртов животного происхождения можно записать в виде

$$RCH{=}CHCH(OH)CH(NH_3^+)CH_2OH$$

для спиртов животного происхождения или

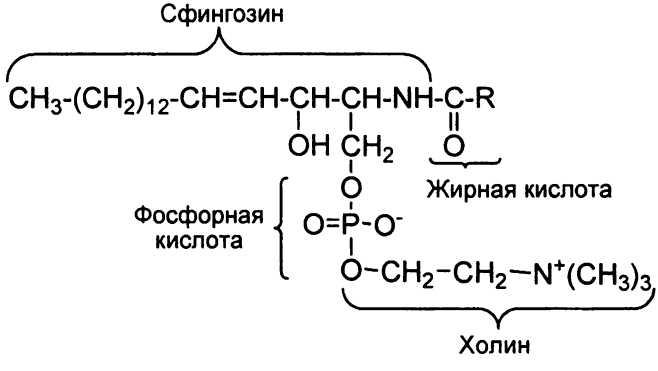
$$RCH_2CH(OH)CH(OH)CH(NH_3^+)CH_2OH$$

в случае их растительного происхождения, где R – насыщенный алкильный радикал, содержащий 7–17 атомов С.

Среди жирных кислот, присутствующих в сфинголипидах, в основном обнаруживаются насыщенные, такие как пальмитиновая, стеариновая, и моноеновые кислоты.

Важной группой сфинголипидов являются фосфорсодержащие сфинголипиды, у которых первичный гидроксил этерифицирован остатками фосфорной кислоты со связанными с ней различными азотистыми соединениями, чаще всего с холином. При их гидролизе в эквимолекулярном соотношении по одному компоненту образуются жирная кислота, двухатомный аминоспирт, азотистое соединение и одна молекула фосфорной кислоты.

Наиболее широко распространенным фосфорсодержащим сфинголипидом является *сфингомиелин*,

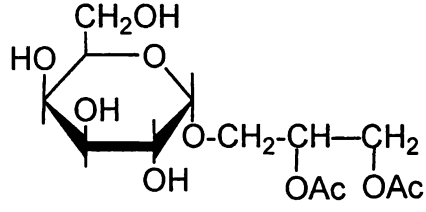


в значительных количествах присутствующий в головном мозге. Его также много в эритроцитах и почках.

Сфингомиелины более устойчивы к мягкому щелочному и кислотному гидролизу по сравнению с глицерофосфолипидами, на этом свойстве основаны и методы их разделения. Сфингомиелины, в отличие от глицерофосфолипидов, не являются универсальными компонентами нервных клеток и появляются в составе нервной ткани лишь на определенной ступени эволюционного развития нервной системы. У высших позвоночных (млекопитающих) их содержание составляет 10–12 % от общей суммы липидов, у низших –

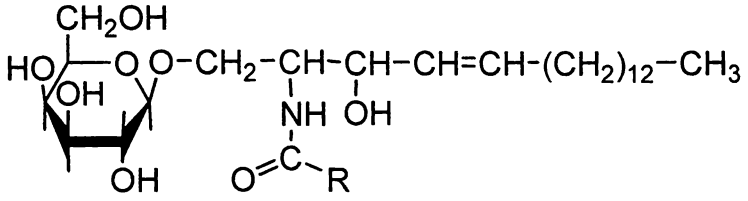
1–2 %, и они совсем отсутствуют у моллюсков и червей. Интересные изменения наблюдаются в содержании сфингомиелинов в процессе развития организма: появляются как в мозге, так и в миелиновых оболочках к началу процесса миелинизации, а затем их количество начинает расти. Причем с возрастом изменяется жирнокислотный состав сфингомиелинов мозга. В раннем возрасте преобладает стеариновая кислота, затем ее доля уменьшается за счет более длинных жирных кислот С22–С26, особенно нервоновой 24:1(Δ^{14c}).

В обеих группах сложных липидов важными представителями являются гликолипиды – липиды, содержащие остаток моно-, ди- или трисахарида, соединенного гликозидной связью с первичной оксигруппой остатка глицерина (гликозилдиацилглицериды) или сфингозина (гликосфинголипиды или гликозилцерамиды). Они впервые были выделены из хлоропластов водорослей и высших растений и чаще всего содержат остатки галактозы и высоконенасыщенных жирных кислот.

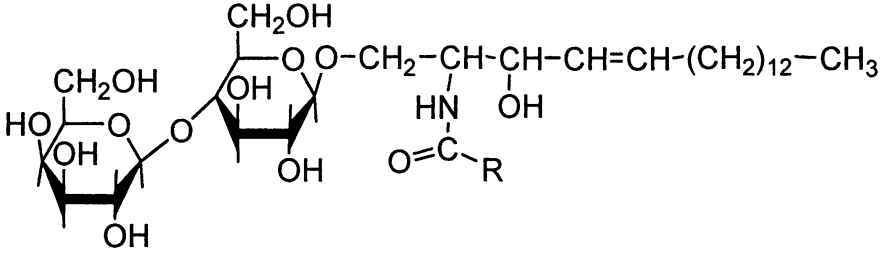


Гликозилдиацилглицериды впервые были выделены из мозговой ткани животных. Дальнейшие исследования показали, что они широко распространены в растительном и животном мире в составе наружных клеточных мембран. Дигликозилдиацилглицериды найдены у ряда грамположительных бактерий. Так, различные штаммы стафилококков содержат GlcGlc-глицериды, а пневмококки – Glc-Gal-глицериды. В их состав входят в основном остатки насыщенных и 2-гидроксиалкановых кислот. Существует несколько классов гликосфинголипидов: цереброзиды, церамидолигогексозиды, сульфатиды, ганглиозиды.

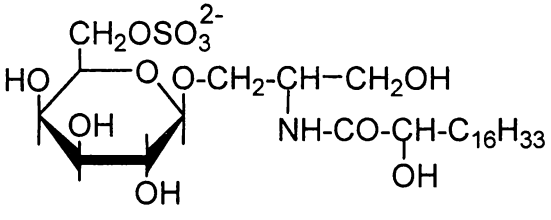
Цереброзиды (моногликозилцерамиды) впервые были обнаружены в мозге и отсюда получили свое название. При их гидролизе образуется смесь в соотношении 1:1:1 сфингозинового основания, жирной кислоты и гексозы (чаще всего галактозы), т. е. они являются 1-О-(β-D-галактопиранозил)-2-N-ацилсфингазинами, отличающимися только жирными кислотами, которыми ацилирована NH_2-группа. Их называют в соответствии с названиями этих жирных кислот. Например, *нервон* содержит при атоме N остаток *нервоновой кислоты* $CH_3(CH_2)_{13}CH{=}CH(CH_2)_7COOH$. Аналогично *цереброн* содержит остаток *цеброновой* кислоты $CH_3(CH_2)_{21}CHOHCOOH$ *оксинервон* – остаток оксинервоновой кислоты $CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_{12}CHOHCOOH$ и *керазин* – остаток лигноцериновой кислоты.



Сходной с группой цереброзидов являются *церамидолигогексозиды*, в которых углеводная часть молекулы представляет собой не один, а несколько остатков с 1→4 гликозидными связями, чаще всего церамиддигексозы и церамидтригексозы с сахарами галактозой и глюкозой. В качестве примера можно привести церамиддисахарид, содержащий в качестве дисахарида лактозу *цитолипин Н,* который был выделен из эпидермальной карциномы человека и представляет собой смесь β-лактозидов различных церамидов.



Следующей группой гликосфинголипидов являются *сульфатиды* – сульфаты цереброзидов, содержащие остаток серной кислоты. В качестве примера можно привести выделенный из растений сульфохинавозилдиглицерид:



Из-за наличия остатка сильной кислотной группировки сульфатиды легко образуют соли. Возможно, этим солям принадлежит определенная роль в процессе транспорта ионов через мембрану. Показано, что при наследственном заболевании – сульфатидном липидозе (метахроматической лейкодистрофии) – происходит нарушение образования миелиновых оболочек, и содержание сульфатидов в сером и белом веществе мозга возрастает в 3–4 раза.

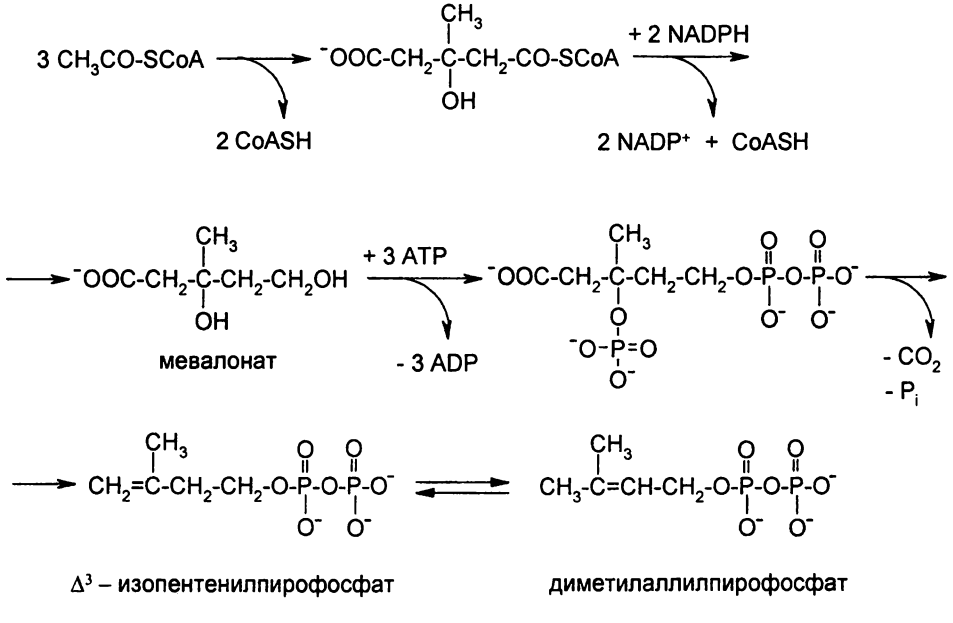
Наиболее сложными по химическому строению гликосфинголипидами являются *ганглиозиды.* Они представляют собой гликозилцерамиды, в углеводную часть молекулы которых наряду с гликопиранозой входят один или

более остатков сиаловой кислоты. Ганглиозиды содержатся в составе коры головного мозга и других клеток центральной нервной системы, в мембранах эритроцитов, почках, селезенке.

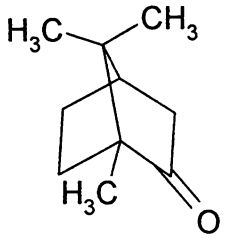
Ганглиозиды существенно различаются между собой по составу и строению. Как правило, из жирных кислот они содержат стеариновую. Размеры сфингозинового основания часто варьирует. Так, для коры головного мозга характерно наличие длинноцепочечных сфингозиновых оснований состава С20 – 4-эйкозасфенгенина и эйкозасфинганина. В зависимости от содержания одного, двух или трех остатков сиаловой кислоты различают моносиало-, дисиало- и трисиалоганглиозиды. Молекулярная масса ганглиозидов колеблется от 1500 до 3000. Для установления структуры ганглиозидов используются методы, типичные для химии гетерополисахаридов – перйодатное окисление, метилирование с последующим гидролизом.

§ 14.4. Неомыляемые липиды

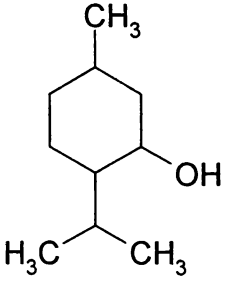
Неомыляемые липиды в основном являются продуктами превращения *изопентенилпирофосфата* и *диметилаллилпирофосфата*. Эти соединения образуют многочисленные продукты конденсации, состоящие из нескольких изопреновых фрагментов, и их часто называют изопреноидами. Эти два метаболита образуются, как и жирные кислоты, т. е. как омыляемые липиды, из ацетилкофермента А, но через промежуточное образование *мевалоновой кислоты*, ее декарбоксилирование и пирофосфорилирование.



Эти производные можно рассматривать как активированные изопрены. Простейшими продуктами превращения этих соединений являются терпены, построенные из двух изопреновых фрагментов. Такие соединения, очень разнообразные по своей структуре, квалифицируют как *монотерпены*. В качестве примеров ниже приводятся структурные формулы таких широко используемых в медицине и парфюмерной промышленности монотерпенов, как камфора и ментол.



камфора



ментол

Широко представлены в природе соединения, молекулы которых содержат более двух изопреновых фрагментов. Соединения, содержащие три изопреновых фрагмента, называют *сесквитерпенами.* Ряд этих соединений содержится в различных эфирных маслах и бальзамах. К сесквитерпенам относятся некоторые гормоны насекомых (ювенильные гормоны, влияющие на их метаморфоз) и многие другие вещества, обладающие биологической активностью. Сесквитерпены образуются исходя из фарнезилпирофосфата:

$$(CH_3)_2C{=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCH_2O\text{-}P_2O_6^{3-}$$

Простейший представитель этого семейства веществ – спирт *фарнезол*, найденный в эфирном масле цветущей липы:

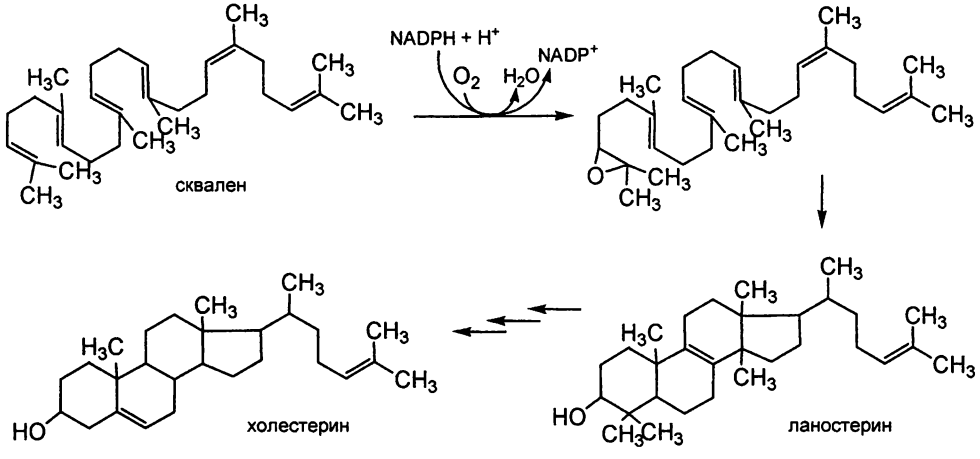
$$(CH_3)_2C{=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCH_2OH$$

Из четырех изопреновых фрагментов состоят дитерпены. К их числу относится спирт фитол, входящий в состав молекулы хлорофилла, витамина А и токоферолов (§ 18.5).

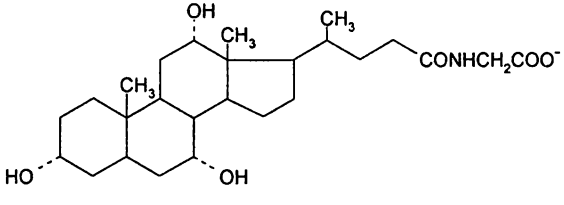
Изучение структуры терпенов, пути их химического синтеза и химические превращения являются предметом раздела органической химии, известного как химия природных соединений, и в курсе биоорганической химии не рассматриваются.

Изопреноидные фрагменты являются частью большого числа витаминов, приведенных в § 18.5: A_1, E, K, Q.

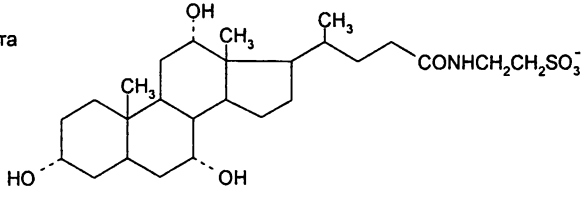
Важнейшей группой неомыляемых липидов являются стероидные гормоны. Все они образуются из активированных изопренов. Первой стадией образования этих соединений является превращение шести молекул активированного изопрена в углеводород *сквален*. Он подвергается окислению, катализируемому сквален монооксигеназой (1.14.99.7), и далее циклизуется с образованием *ланостерина*. Последний через ряд промежуточных стадий превращается в *холестерин*:



Помимо стероидных гормонов, пергидрофенантренциклопропановая структура лежит в основе витаминов группы D. Кроме того, эта структура является основой желчных кислот, вырабатываемых печенью и вводимых через желчные протоки в двенадцатиперстную кишку, где они способствуют эмульгированию жиров, что существенно облегчает их пищеварние. Основными желчными кислотами являются *гликохолевая* и *таурохолевая кислоты*.



гликохолевая кислота



таурохолевая кислота

Глава 15. Биологические мембраны

§ 15.1. Основные функции и принципы строения биологических мембран

Важнейшими элементами строения всех живых организмов являются биологические мембраны. Основу их строения составляют гидрофобные конструкции, образованные двумя слоями фосфолипидов, обращенными друг к другу гидрофобными фрагментами (остатками длинных жирных кислот) и экспонированными в окружающую среду или к соседней клетке своими гидрофильными головками. Толщина мембраны составляет около 6 нм.

Биологические мембраны, помимо механического отделения содержимого клетки от внеклеточной среды и клеточных органелл от цитоплазмы, выполняют еще несколько не менее важных функций, выполняемых встроенными в мембраны белками. Белки могут быть заякорены в мембрану присоединенными к белкам остатками жирных кислот или пронизывать мембрану. В последнем случае обычно находящийся внутри мембраны участок белка существует в виде α-спирали. Этот участок должен быть построен преимущественно из остатков аминокислот, имеющих гидрофобные алифатические боковые радикалы (валина, лейцина, изолейцина, пролина, метионина) или гидрофобных остатков ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина). У живых организмов широко представлены мембранные белки, пронизывающие мембрану несколько раз. В качестве примера на рис. 100 приведена схема расположения в мембране белка родопсина, отвечающего за восприятие зрительного сигнала, а также аминокислотные остатки одного из спиральных участков.

Наиболее функционально значимые органеллы – клеточное ядро, митохондрии и хлоропласты – окружены двойной мембраной. Внутренняя мембрана в этом случае имеет одну поверхность, обращенную к основному содержимому органеллы, а вторую – к межмембранному пространству.

Внутреннее содержимое митохондрий называется матриксом. В матриксе проходят основные процессы, обеспечивающие окисление глюкозы и жирных кислот (цикл трикарбоновых кислот), приводящие к превращению окисленной формы никотинамиддинуклеотида (NAD^+) в восстановленную (NADH).

У хлоропластов внутренняя мембрана ограничивает область, называемую стромой. В этой области находятся основные структурные единицы, в которых происходит поглощение света и преобразование световой энергии в химическую. Эти структуры, называемые *тилакоидами,* отделены от остальной части стромы специальной мембраной. В остальной части стромы находятся

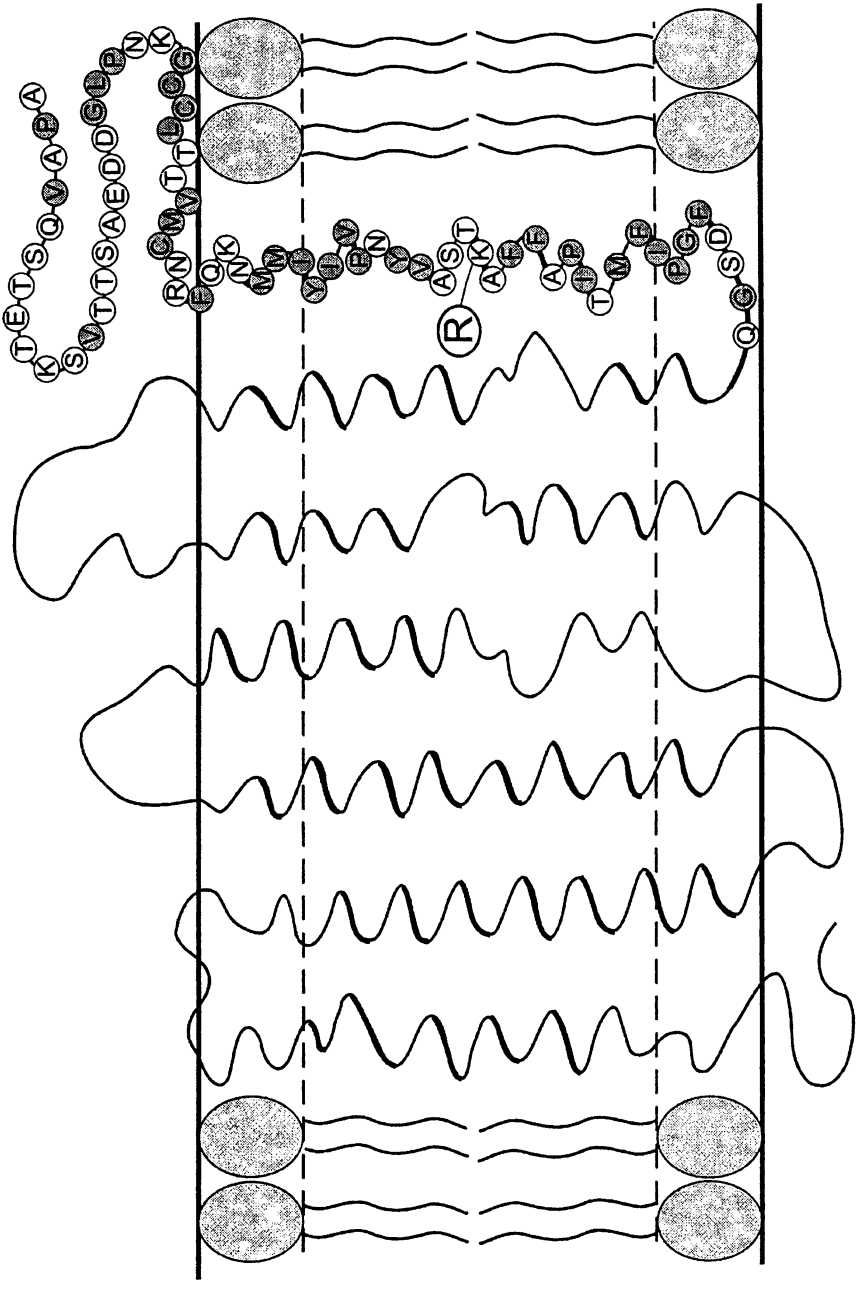
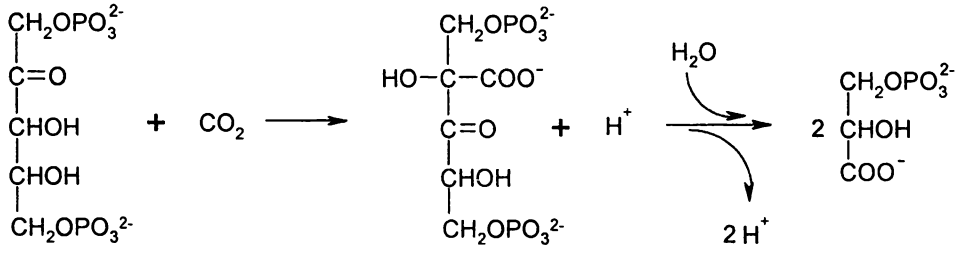


Рис. 100. Схема расположения в мембране белка родопсина. Приведены аминокислотные остатки на С-конце белка. Гидрофобные остатки выделены жирными кружками. R – связанный с остатком лизина ретиналь

ферменты, обеспечивающие темновую стадию фотосинтеза – фиксацию CO_2 рибулозо-1,5-дифосфатом, катализируемую карбоксилазой рубиско, и превращение его в две молекулы глицеральдегид-3-фосфата.



За этим следует сложная цепочка превращений (цикл Кальвина), приводящая к включению фиксированного остатка CO_2 в строящуюся молекулу гексозы и регенерации израсходованного при фиксации CO_2 рибулозо-1,5-дифосфата. Полную схему цикла Кальвина можно найти в любом учебнике по биохимии.

На внутренней мембране митохондрий и на мембране тилакоидов происходит образование градиента концентрации протонов, за счет которого в итоге происходит фосфорилирование ADP с образованием ATP. Подробнее вопрос будет рассмотрен в § 15.4.

§ 15.2. Мембранные рецепторы

Важнейшей функцией мембранных белков является прием сигналов, поступающих к клетке из окружающей среды и от других клеток и органов того же организма. Сигналом в большинстве случаев являются специальные вещества, в первую очередь гормоны (гл. 17). Помимо гормонов, у достаточно высокоразвитых организмов, обладающих зрением, в качестве сигнала имеется электромагнитное излучение (свет). Восприятие сигналов осуществляется специфическими для каждого вида сигнала вмонтированными в мембрану белками-рецепторами. Первичным актом при получении гормонального сигнала является образование комплекса сигнального вещества со специфическим белком-рецептором. При поглощении света первичным актом является переход рецептора в возбужденное состояние. Взаимодействие с рецептором является пусковым механизмом для включения цепи, передающей в итоге сигнал определенной физиологически значимой исполнительной системе. Число рецепторов и число систем передачи сигналов и включаемых ими биологических функций весьма велико, ниже будут приведены лишь отдельные примеры. Рассмотрение таких систем является прерогативой физиологии.

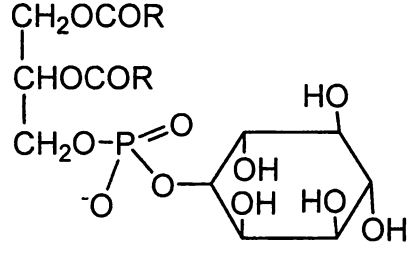
Наиболее широко представлен механизм передачи сигнала, основанный на функционировании так называемых *G-белков*. Эти белки заякорены на внутренней стороне мембраны. Их название отражает способность связывать

гуаниловые нуклеотиды – GDP и GTP. В комплексе с GDP G-белки неактивны. При образовании комплекса рецептора со специфичным лигандом происходит взаимодействие комплекса с G-белком, в результате чего последний приобретает способность к быстрому обмену GDP на GTP. В комплексе в результате GTP белок становится активным – приобретает способность активировать трансмембранный фермент аденилатциклазу, которая катализирует превращение ATP в цикло-AMP. cAMP является вторичным посредником – эффектором специальных протеинкиназ, и его образование приводит к фосфорилированию определенных белков, которые в дальнейшем аллостерически активируют следующие белки – соответствующие протеинкиназы, т. е. модифицируют ряд уже синтезированных ферментов (например, фосфорилазы, липазы) и не обладающих ферментативной активностью белков (например, гистоны, белки рибосом, мембранные белки). Таким путем стимулируются многочисленные метаболические и физиологические процессы, такие как гликогенолиз, липолиз, синтез белков на рибосомах, проникновение через мембрану, образование простагландинов (внутриклеточных регуляторов), которые синтезируются и действуют практически во всех клетках человеческого организма.

Действие активной формы G-белка не является длительным, как это вообще характерно для компонентов, участвующих в приеме и передаче сигналов. Белок обладает умеренной ГТФазной активностью, т. е. катализирует превращение связанного GTP в GDP, возвращая G-белок в неактивную форму. Накопившееся количество молекул cAMP гидролизуется с помощью специфичной фосфодиэстеразы до AMP, который не обладает эффекторным действием.

В случае некоторых рецепторов, например, в случае приема зрительного сигнала, аналогичным образом включается не аденилатциклазная, а гуанилатциклазная система, т. е. роль вторичного посредника играет cGMP.

Второй тип рецепторов представлен трансмембранными белками, усиливающими вхождение в клетку ионов Ca^{2+} – другого гормонального посредника, увеличение внутриклеточной концентрации которого, возможно, обусловлено распадом фосфатидилинозитола – фосфолипидного компонента плазматических мембран.

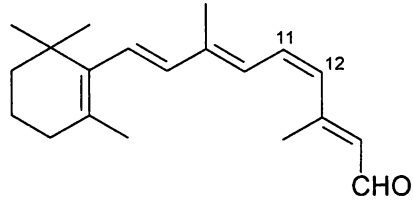


Эти пути действия гормонов могут реализоваться независимо друг от друга, но, вероятнее всего, в реальных условиях тесно взаимосвязаны.

Другой важнейший путь трансмембранного проведения и усиления гормонального эффекта – подключение в качестве посредника ионов Ca^{2+}, эффективно входящего в клетку через специальные кальциевые каналы. Механизмом, запускающим последующие действия ионов Ca^{2+}, является его взаимодействие с белком *кальмодулином,* имеющим 4 места связывания ионов кальция. В то же время кальмодулин может связывать ионы Mg^{2+} с константой связывания на три порядка ниже, чем в случае ионов Ca^{2+}, и, вероятно, в клетке, не стимулированной гормоном, белок находится преимущественно в неактивной тетрамагниевой форме. В кальмодулине также имеется необычная аминокислота триметиллизин. В цитозоле он находится в фосфорилированном состоянии, а с мембранными белками связывается в дефосфорилированной форме. При нарастании концентрации ионов Ca^{2+} до 10^{-5} М, стимулируемом гормоном, кальмодулин связывает ионы кальция и в активированном виде взаимодействует с разными типами клеточных белков-рецепторов, усиливая в результате ряд эффектов. При этом группа эффектов направлена также на изменение концентрации cAMP в клетке.

Другим важным эффектом в отдельных тканях является активация гуанилатциклазы, катализирующей превращение GTP в cGMP, в случае, когда посредником в действии гормона является cGMP, который реализует свои эффекты путем активации cGMP-зависимых протеинкиназ, что в свою очередь обуславливает падение внутриклеточного уровня Ca^{2+}

Восприятие света происходит в результате действия специального рецептора – родопсина, который является комплексом белка опсина и 11-*цис*-ретиналя, связанного своей альдегидной группой с ε-аминогруппой остатка лизина опсина. Первичным результатом поглощения фотона родопсином является изомеризация 11-*цис*-ретиналя



в полностью *транс*-ретиналь. Этот процесс возбуждает нервный импульс. Поскольку структура полностью *транс*-ретиналя не соответствует конформации активного центра белка опсина, ретиналь от него отщепляется. Далее полностью *транс*-ретиналь снова изомеризуется в исходный 11-*цис*-ретиналь, который вновь связывается с опсином, образуя родопсин.

§ 15.3. Транспортные белки мембран

Транспорт веществ через мембрану связан с прохождением переносимого вещества через гидрофобный слой. Через этот слой путем диффузии могут проходить только молекулы небольшого размера, такие как O_2, CO_2. H_2O. Единственным препятствием в этих случаях является необходимость этим молекулам перед переносом избавиться от сольватной оболочки, которая восстанавливается после возвращения их в водное окружение. Пересекают этот слой также достаточно большие по размеру гидрофобные молекулы, например, молекулы стероидов. Такие перемещения происходят при наличии разности концентраций переносимого вещества по обе стороны мембраны путем простой диффузии в направлении меньшей концентрации. Остальные процессы переноса происходят при непосредственном участии специальных, связанных с мембраной белков.

Переход через мембрану требует определенной затраты энергии. В ряде случаев достаточно разности концентраций переносимого вещества в окружающей среде и внутри клетки. Примером такого переноса является перенос глюкозы из плазмы крови, где ее концентрация составляет величину порядка 5 мМ, в цитоплазму активно потребляющих ее эритроцитов. Перенос осуществляется с помощью трансмембранного белка *глюкозопермеазы* с молекулярной массой 45 кДа, пептидная цепь которого 12 раз пересекает плазматическую мембрану. Механизм действия этой пермеазы, равно как и других транспортных белков, можно представить себе как взаимодействие молекулы переносимого вещества с расположенным на наружной стороне мембраны рецептором и как вызванное этим взаимодействием конформационное превращение белка, приводящее к переносу связанного вещества на внутреннюю часть мембраны, и диссоциация комплекса с переходом вещества в цитоплазму. В случае переноса ионов превращение белка может происходить без изменения разности зарядов между окружающей средой и цитоплазмой, если одновременно осуществляется компенсирующий перенос других заряженных частиц. Такой процесс называется антипортом. У эритроцитов антипорт происходит с анионами HCO_3^-. Конечным продуктом окисления органических соединений в тканях является CO_2. Далее эта частица должна поступить в легкие, откуда выдыхается. Перенос CO_2 от тканей в легкие осуществляется током крови в виде HCO_3^-, который растворим в плазме крови лучше, чем CO_2. Образование аниона из CO_2 катализируется ферментом карбоангидразой, находящимся в эритроцитах. Поэтому этот анион должен дважды пересечь плазматическую мембрану эритроцитов – в тканях после его образования в эритроцитах для введения в плазму и в легких для его превращения в выдыхаемую CO_2. Этот перенос осуществляется одновременно с пересечением мембраны в противоположном направлении анионами Cl^-. Эти переносы осуществляются трансмембранным белком, пептидная цепь которого 12 раз пересекает плазматическую мембрану эритроцитов. Анионный обмен с помощью этого белка не требует затраты энергии.

Примером переноса, требующим затраты энергии в виде гидролиза одной макроэргической связи в АТР, является Na^+,K^+-зависимая АТФаза, рассмотренная в § 15.4, с помощью которой осуществляется перенос двух ионов K^+ из окружающей среды в клетку и трех ионов Na^+ в противоположном направлении. Этот перенос создает трансмембранный электрический потенциал (потенциал покоя).

Второй возможный механизм может заключаться в существовании или образовании специального канала, по которому может произойти диффузия подлежащих переносу молекул из окружающей среды в клетку.

Перенос метаболитов через мембраны в ряде случаев осуществляется с помощью специальных белков-переносчиков, которые присоединяют метаболит с одной стороны и отдают его с другой стороны мембраны. Например, перенос жирных кислот, находящихся в цитоплазме в виде ацилированного кофермента А, в митохондриальный матрикс, где происходит их окислительная деструкция, осуществляется из цитоплазмы с помощью специального переносчика *карнитина* (3-гидрокси-4-триметиламинобутановая кислота).

$$CoA\text{-}SCO(CH_2\text{-}CH_2)_xCH_3 + (CH_3)_3N^+\text{-}CH_2CH(OH)CH_2COO^- \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons CoA\text{-}SH + (CH_3)_3N^+\text{-}CH_2CH(O\text{-}CO(CH_2\text{-}CH_2)_xCH_3)CH_2COO^-$$

У эукариот гликолиз происходит в цитоплазме, цикл трикарбоновых кислот осуществляется в митохондриальном матриксе, а цепь переноса электронов вмонтирована во внутреннюю мембрану митохондрий. Поэтому для использования восстановительных эквивалентов двух молекул NADH, образовавшегося в цитозоле, эти два эквивалента должны быть перенесены из цитоплазмы на внутреннюю мембрану митохондриального матрикса. Однако митохондриальные мембраны для достаточно гидрофильного NADH непроницаемы. Поэтому выработан специальный механизм переноса, заключающийся в промежуточном превращении NADH с потерей его восстановительных эквивалентов в соединение, способное пересечь мембрану и затем в матриксе частично или полностью воспроизвести эти эквиваленты. Такой механизм получил название *челночного*. Для переноса восстановительных эквивалентов через внутреннюю мембрану существует два механизма. В обоих участвуют специальные ферменты.

Один из них состоит в восстановлении диоксиацетонфосфата с помощью цитоплазматической дегидрогеназы до фосфоглицерата по реакции

$$CH_2OHCOCH_2OPO_3^- + NADH \leftrightarrow CH_2OHCHOHCH_2OPO_3^- + NAD^+$$

Образовавшийся в цитозоле фосфоглицерат способен пересекать мембрану и в матриксе с помощью митохондриальной глицерол-3-фосфат дегидрогеназы восстанавливаться до дигидроксиацетонфосфата. Этот фермент является флавопротеидом, и в его составе FAD окисляет фосфоглицерат до дигидроксиацетонфосфата с образованием $FADH_2$, который передает два атома H убихинону в составе комплекса III.

$$CH_2OHCHOHCH_2OPO_3^- + FAD \Leftrightarrow CH_2OHCOCH_2OPO_3^- + FADH_2$$

В этом случае два электрона попадают в ЦПЭ, минуя комплекс I, в результате чего не происходит образования двух молекул ATP, которые могли бы образоваться при восстановлении NADH в комплексе I. Этот челночный механизм у высших животных действует в скелетных мышцах и в мозге.

Второй, более сложный, челночный механизм функционирует в печени, почках и сердце. Он состоит в восстановлении оксалоацетата до малата с помощью цитоплазматической *малатдегидрогеназы* в реакции с NADH

$$COO^-\text{-}CO\text{-}CH_2COO^- + NADH \rightarrow COO^-\text{-}CHOH\text{-}CH_2COO^- + NAD^+$$

Малат может пересечь мембрану с помощью специальной системы транспорта малата и α-кетоглутарата. В матриксе происходит обратная реакция с образованием NADH, что означает возвращение, но уже в матриксе, двух восстановительных эквивалентов. Оксалоацетат по реакции, катализируемой соответствующей аминотрансферазой,

$$^-OOCCOCH_2COO^- + {}^-OOCCH(NH_3^+)CH_2CH_2COO^- \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow {}^-OOCCH(NH_3^+)CH_2COO^- + {}^-OOCCOCH_2CH_2COO^-$$

путем переаминирования с глутаматом превращается в аспартат. Образовавшийся α-кетоглутарат может переходить из матрикса в цитоплазму с помощью уже упомянутой транспортной системы. Образовавшийся аспартат может проходить через мембрану из матрикса в цитоплазму с помощью вмонтированной в мембрану системы для переноса аспартата и глутамата. В цитоплазме аспартат с помощью реакции переаминирования переводится в оксалоацетат, который, тем самым, регенерируется. В отличие от челночного механизма, основанного на переносе глицерол-фосфата, перенос в этом случае не сопровождается потерей восстановительных эквивалентов.

§ 15.4. Трансмембранные потенциалы

Гидрофобные мембраны непроницаемы для ионов. Поэтому концентрации ионов по разные стороны мембраны могут различаться. Это приводит к тому что между разделяемыми мембраной фазами возникает разность потенциалов. Эта разность составляет несколько десятков милливольт. Однако в силу малой толщины мембраны это приводит к огромной величине градиента потенциала. Например, при толщине мембраны 6 нм и разности в 60 мВ градиент потенциала составит 10^5 В/см. Разность потенциалов между двумя сторонами мембраны называется *трансмембранным потенциалом.* Этот потенциал у разных клеток и организмов лежит в пределах от –40 до –90 мВ.

Существование этого потенциала в основном обусловлено двумя процессами. Один из них связан с перемещением в мембране ионов K^+ и Na^+, а второй – с перемещением протонов.

Для нормального функционирования большинства клеток необходимо повышенное, по сравнению с окружающей средой, содержание ионов K^+ и пониженное содержание ионов Na^+ Это достигается за счет присутствия в плазматической мембране специального фермента – Na^+,K^+-зависимой АТФазы, который катализирует гидролиз пирофосфатной связи в аденозинтрифосфате (ATP) сопряженно с переносом при каждом акте гидролиза двух ионов K^+ из окружащей среды в клетку и встречного переноса трех ионов Na^+. В результате этого переноса внутренняя часть клетки оказывается отрицательно заряженной по отношению к окружающей среде, т. е. возникает трансмембранный потенциал.

С существованием этого потенциала непосредственно связано функционирование нервной системы. Передача нервного импульса происходит в результате перемещающегося вдоль аксона локального повышения потенциала, который в этом случае называется *потенциалом действия.* Это повышение потенциала достигает нескольких десятков милливольт.

Еще более широкую роль в жизнедеятельности эукариотических организмов играют вмонтированные в мембраны комплексы ферментов, катализирующие создание разности концентраций протонов по разным сторонам мембраны. У аэробных организмов эта разность создается за счет многоступенчатого окисления восстановленного NADH молекулярным кислородом. У растений она создается за счет энергии поглощенного света. Согласно хемиоосмотической теории Митчелла (Peter Mitchel) эта разность концентраций обеспечивает протекание термодинамически неблагоприятного присоединения ортофосфата к β-фосфату ADP с образованием ATP, т. е. обеспечивает окислительное или фотосинтетическое фосфорилирование.

Разность концентрации протонов на внутренней митохондриальной мембране возникает в результате функционирования трех комплексов, вмонитрованных в мембрану. В комплексе I осуществляется окисление NADH, образовавшегося в матриксе в результате ступенчатого окисления до CO_2 и воды ацетильного остатка в ацетилированном коферменте А. Сам $CoASCOCH_3$ об-

разуется в матриксе в результате окисления ряда органических соединений, в первую очередь глюкозы и жирных кислот. Окислителем в комплексе I является убихинон (кофермент Q, см. гл. 18), далее обозначаемый как Q (в окисленном состоянии). Суммарное уравнение реакции:

$$NADH + Q + H^+ \rightarrow NAD + QH_2$$

В комплексе III восстановленный кофермент Q окисляется цитохромом с (в окисленной форме, CytFeIII) по реакции:

$$QH_2 + 2\ CytFeIII \rightarrow Q + 2\ CytFeII + 2H^+$$

В комплексе IV восстановленный цитохром с окисляется кислородом с образованием молекулы воды по уравнению

$$4\ CytFeII + O_2 + 4H^+ \rightarrow 4\ CytFeIII + 2H_2O$$

В работе трех перечисленных вмонтированных в мембрану комплексов участвуют два переносчика, перемещающиеся в пределах мембраны – кофермент Q, который должен курсировать между комплексами I и III, и цитохром с, который должен курсировать между комплексами III и IV.

Все три процесса в нормально функционирующих комплексах сопряжены с переносом протонов через мембрану из матрикса на внутреннюю сторону внутренней митохондриальной мембраны, в результате образуется градиент концентрации протонов через мембрану, причем внутренняя сторона мембраны заряжается положительно относительно матрикса и, следовательно, имеет более низкое значение pH, чем матрикс.

Благодаря наличию градиента концентрации протонов система обладает некоторым запасом свободной энергии, который используется в реакции фосфорилирования ADP монофосфатом, т. е. в образовании ATP. Это осуществляется еще одним вмонтированным во внутреннюю митоходндриальную мембрану комплексом – *АТФ-синтазой*. Данный комплекс является многосубъединичным и при выделении распадается на два фактора – F_o и F_1.

Первый из них пронизывает мембрану и формирует канал для перемещения протонов. Последний связан с мембраной через взаимодействие с F_o и по субъединичному составу может быть записан как $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. На β-субъединицах расположены сайты связывания ATP. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют представить следующий механизм образования ATP, который основывается на существовании трех конформаций. Одна из них, L- (loose, неплотная), способна связывать ADP и фосфат. За этим связыванием следует переход конформации L в конформацию T (tight, стиснутая). В такой конформации в активном центре происходит фосфорилирование ADP. По-видимому, сильное взаимодействие с белком делает этот процесс, в растворе характеризуемый значительным повышением свободной энергии, термодина-

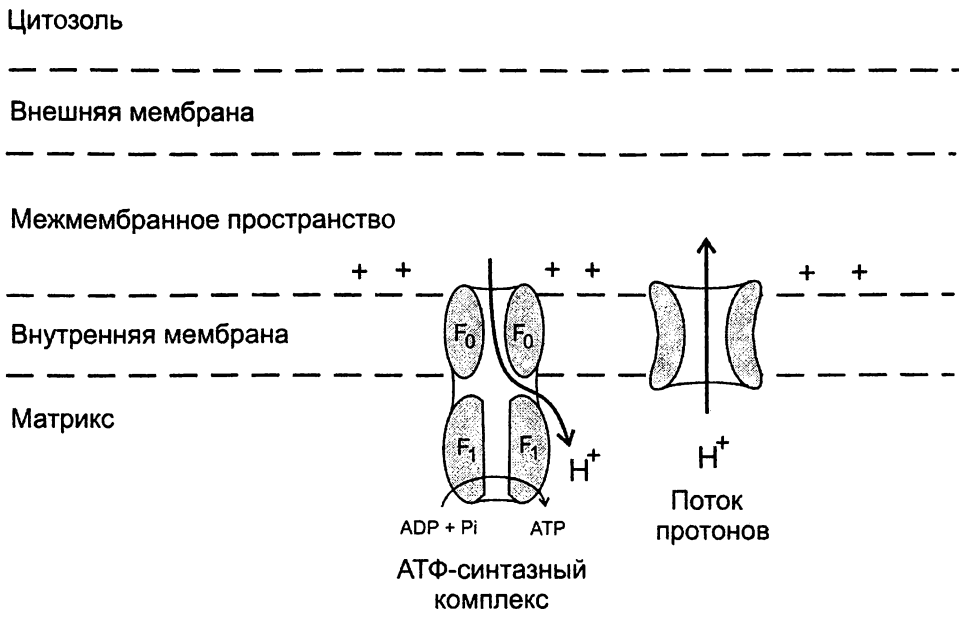


Рис. 101. Схема функционирования АТФ-синтазного комплекса

мически возможным, но при этом ATP остается связанным с активным центром белка. Затем происходит переход белка в О-конформацию (open, открытая), при которой резко ослабляется связь с ATP и становится возможным диссоциация ATP и последующее присоединение новой пары ADP и фосфат. Скорее всего, именно конформационный переход, приводящий к освобождению ATP, вызывается переходом протона по градиенту, образовавшемуся в цепи переноса электронов.

Глава 16. Химия ферментов

§ 16.1. Ферментативный катализ

Ни одно химическое превращение в живых организмах не происходит без участия специальных катализаторов – ферментов (энзимов). В подавляющем большинстве случаев ферменты являются либо белками, либо комплексами белков со специальными *кофакторами* – ионами металлов или специальными сложными органическими молекулами (простетическими группами). В этом случае белковую часть фермента называют апоферментом. Апоферменты сами по себе каталитически неактивны и становятся активными лишь в комплексе с кофактором. Для осуществления реакции, катализируемой ферментом, необходимым условием является образование комплекса фермента с субстратом (или с субстратами, если их несколько). Этот комплекс образуется в результате многоточечного взаимодействия некоторых групп в составе субстратов с определенными аминокислотными остатками белка, т. е. в результате узнавания субстратов белком. Некоторые из этих остатков могут принимать участие в осуществлении самого каталитического процесса. Естественно, что далеко не все аминокислотные остатки, формирующие фермент или апофермент, принимают непосредственное участие в узнавании субстратов и каталитическом превращении. Совокупность остатков, непосредственно участвующих в этих процессах, называется *активным центром фермента.* В формировании активного центра ферментов, функционирующих как комплекс апофермента с кофактором, принимает участие сам кофактор.

Значительная группа реакций, катализируемых ферментами, использует в качестве субстратов специальные соединения, общие для значительного числа сходных по механизму реакций. Важнейшие из них: 1) ATP – универсальный донор фосфата в реакциях фосфорилирования; 2) S-аденозилметионин – донор метильных групп в подавляющем большинстве реакций метилирования; 3) кофермент А, донор ацильных групп во всех реакциях ацилирования; 4) никотинамидные и флавиновые коферменты в огромном числе окислительно-восстановительных процессов (§ 16.3). Такие субстраты обычно квалифицируют как *коферменты.* Обращает на себя внимание тот факт, что у всех перечисленных коферментов имеется остаток аденозина, который непосредственного участия в каталитическом акте не принимает. По-видимому, этот остаток необходим для опознавания коферментов активными центрами соответствующих ферментов.

Установление структуры активного центра фермента является главной задачей биоорганической химии ферментов. В ее решении наибольшую роль

играет рентгеноструктурный анализ (РСА) ферментов и их комплексов с субстратами и промежуточными соединениями. Поскольку этим методом устанавливается структура в кристалле, т. е. не в условиях, наиболее благоприятных для функционирования ферментов, то интенсивно исследуется их структура в растворе методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Однако разрешающая способность ЯМР существенно меньше, чем РСА, и при современном состоянии техники метод может применяться для не очень больших белков и белковых комплексов.

В качестве примера можно привести структуру активного центра тирозил-тРНК-синтетазы из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* в комплексе с промежуточным соединением – тирозиладенилатом (рис. 102). Этот фермент катализирует присоединение тирозина к специфичной к нему тРНК для последующего введения этой аминокислоты в строящиеся полипептидные цепи. Промежуточной реакцией в этом процессе является реакция тирозина с АТР с образованием тирозиладенилата по реакции

$$\text{Tyr} + \text{PPP-Ado} \rightarrow \text{Tyr-P-Ado} + \text{pp}_i\,(\text{неорганический пирофосфат})$$

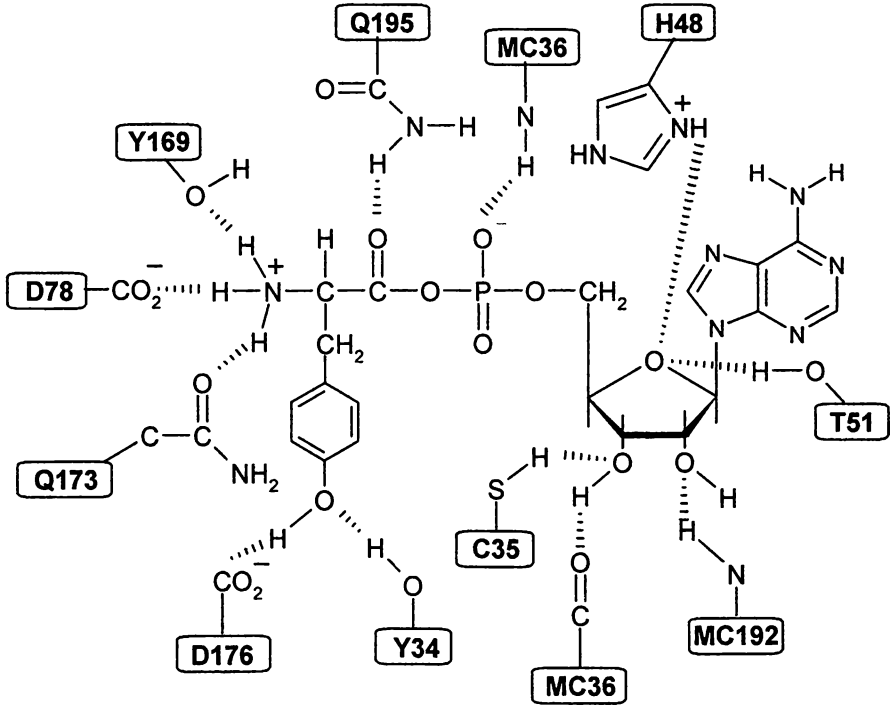


Рис. 102. Структура активного центра тирозил-тРНК-синтетазы в комплексе с промежуточным соединением – тирозиладенилатом. МС – остатки главной цепи (main chain)

На рис. 102 приведены номера аминокислотных остатков, участвующих в образовании промежуточного продукта с боковыми радикалами остатков гистидина, глутамина, тирозина, аспартата, цистеина, треонина, N-H и C=O группами главной цепи (main chain, MC). Разнообразие взаимодействий даже для одного фермента свидетельствует о том, что описать все типы возможных взаимодействий, обеспечивающих специфичность, не представляется реальным.

Широкое применение в установлении значения отдельных остатков аминокислот в функционировании ферментов нашел *сайт-направленный мутагенез*. Метод состоит в направленной замене в исследуемом ферменте аминокислотного остатка (сайта, site – место), предположительно участвующего в узнавании или каталитическом превращении субстрата, на другой остаток, неспособный к участию в этих процессах. Такую замену можно осуществить, если имеется в распоряжении ген, кодирующий исследуемый фермент, и встроенный в способную к размножению и экспрессии структуру, например, плазмиду. Ген можно встроить в кольцевую ДНК вируса или плазмиды, как это описано в § 5.6, которую можно размножить и экспессировать в клетке хозяина. В качестве необходимого для репликации синтетического праймера используется олигонуклеотид, содержащий последовательности нуклеотидов, фланкирующие в гене кодон заменяемой аминокислоты, и сам кодон, измененный в соответствии с планируемой заменой. Экспрессия приводит к мутантному ферменту. Сохранение, изменение или исчезновение каталитической активности у измененного фермента свидетельствует о степени участия замененного аминокислотного остатка в каталитической активности фермента. Например, для выяснения функции определенного остатка гистидина, который часто входит в состав активных центров фермента, в праймере, содержащем кодирующий этот остаток гистидина кодон CAU или CAC; последний может быть заменен на один из кодонов CCX, кодирующих Leu. Остаток лейцина не может функционально заменить остаток гистидина, имидазольное кольцо которого обычно участвует в каталитическом процессе.

Метод сайт-направленного мутагенеза находит широкое применение также для установления роли отдельных аминокислотных остатков в выполнении других многочисленных функций белков. В частности, введение реакционноспособных аминокислотных остатков в определенные точки белка, например цистеина, позволяет вводить в эти точки различные репортерные группы.

Фермент может содержать несколько активных центров, на которых происходит несколько последовательных каталитических превращений субстрата. Среди таких ферментов особенно примечательными являются ферменты с *качающейся ножкой*, позволяющей связанному субстрату доставать последовательно разные активные центры.

Одним из примеров такого фермента может служить синтаза жирных кислот, комплекс белков (у эубактерий) или один полифункциональный белок (у эукариот, в том числе у человека), содержащий несколько активных цен-

тров, катализирующих последовательное наращивание двууглеродными фрагментами углеродного скелета жирной кислоты. Растущая цепь углеродного остатка на протяжении всего процесса связана тиоэфирной связью с SH-группой остатка фосфопантотенеина

$$-OPO_2^{-}-O-CH_2-C(CH_3)_2-CHOH-CO-NH-(CH_2)_2-CO-NH-(CH_2)_2-SH,$$

который ковалентно присоединен фосфоэфирной связью к остатку серина ацил-переносящего белка (ACP – acyl-carrier potein). Ножка содержит большое число σ-связей и поэтому обладает высокой гибкостью. Это позволяет ацильному остатку попеременно перемещаться между активными центрами, катализирующими последовательные стадии биосинтеза жирных кислот из ацетильных остатков. Первичным источником ацетильных групп являются ацетилированный кофермент А, $CoAS-COCH_3$ – основной продукт катаболизма сахаров, жиров и ряда аминокислот. Ацетильный остаток карбоксилируется и образовавшийся малонильный остаток переносится от кофермента А на ACP по реакции

$$CoAS-COCH_2COO^{-} + ACP \rightarrow ACPS-COCH_2COO^{-} + CoASH.$$

Далее начинается рост углеводородной цепочки, который осуществляется четырьмя каталитическими процессами, приводящими к последовательному удлинению цепочки двууглеродными фрагментами, непосредственным донором которых является связанный с ACP малонильный остаток.

$$1)ACP-SCOCH_2COO^{-} + ACP-SCOCH_2R \rightarrow$$

$$ACP-SCOCH_2COCH_2R + ACPSH + CO_2$$

где R – растущий в ходе синтеза жирной кислоты углеводородный радикал.

$$2)\ ACP-SCOCH_2COCH_2R + NADPH \rightarrow$$

$$\rightarrow ACP-SCOCH_2CHOHCH_2R + NADP^{+}$$

$$3)\ ACP-SCOCH_2CHOHCH_2R \rightarrow ACP-SCOCH=CHCH_2R$$

$$4)\ ACP-SCOCH=CHCH_2R + NADPH \rightarrow$$

$$\rightarrow ACP-\ COCH_2CH_2CH_2R + NADP^{+}$$

Каждая из этих реакций естественно проходит с участием своего активного центра, расположенного либо на разных полипептидных цепях (у эубактерий), либо на одном полифункциональном белке (эукариоты, в том числе у человека).

Качающаяся ножка АСР должна попеременно в определенном порядке доставить фрагмент $COCH_2R$ в четыре активных центра для прохождения всех последовательных превращений.

Как правило, активный центр окончательно формируется уже после взаимодействия с субстратом, который индуцирует эффективное соответствие набора групп белка, участвующих в связывании субстрата, с группами субстрата. Это положение, впервые сформулированное Даниэлем Кошландом (D. E. Koshland) и известное как принцип «индуцированного соответствия», находит все большее подтверждение по мере развития исследований начальной фазы ферментативного процесса методами быстрой кинетики. По-видимому, этот принцип касается и других случаев узнавания лигандов молекулами биополимеров.

В настоящее время уже выявлено несколько тысяч различных химических реакций, катализируемых ферментами. Подчеркнем, что речь идет о числе различных реакций (биохимических процессов), а не о числе ферментов. Последнее значительно выше, так как ферменты из разных биологических источников, катализирующие одни и те же реакции, могут существенно отличаться по своей первичной структуре. Например, такой небольшой фермент млекопитающих, как панкреатическая рибонуклеаза, построенная в случае бычьего фермента из 125 аминокислотных остатков, варьирует от одного вида к другому в пределах нескольких десятков аминокислотных остатков. Естественно, что ряд остатков, формирующих активный центр фермента, сохраняется среди всего множества вариантов одинаковых по своей функции ферментов. Остальные аминокислотные остатки формируют пространственную структуру, сохраняя взаимное расположение групп, формирующих активный центр фермента, что может быть обеспечено большим числом различных способов.

Простейшая схема односубстратной ферментативной реакции предполагает обратимое связывание субстрата с ферментом и дальнейшее протекание процесса, как реакции первого порядка, внутри образовавшегося комплекса. После короткого начального периода образования и установления индуцированного соответствия в комплексе фермента и субстрата скорости образования комплекса, его обратной диссоциации и превращения в комплексе субстрата в продукты реакции приблизительно уравновешиваются, и реакция вступает в квазистационарный режим. Если обозначить константы скоростей прямого и обратного комплексообразования как k_1 и k_{-1}, а константу скорости внутрикомплексной реакции как k_2, то уравнение, описывающее зависимость скорости реакции V от концентрации субстрата s, можно в квазистационарном приближении записать как

$$V = \frac{k_2[E]}{1 + \frac{K_M}{s}},$$

где K_M – *константа Михаэлиса*, равная $(k_{-1} + k_2)/k_1$, а [E] – концентрация фермента. Эта зависимость является гиперболической, и при достаточно высокой концентрации субстрата скорость достигает предельного значения $V_{max} = k_2[E]$, которое называют максимальной скоростью. Поэтому уравнение для зависимости скорости реакции от концентрации субстрата может быть записано в виде

$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{s}}.$$

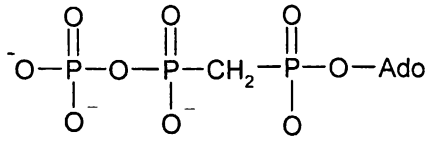
Это соотношение называют *уравнением Михаэлиса – Ментен*. Для двухсубстратных реакций и процессов, у которых вторая стадия является обратимой, уравнение имеет более сложный вид. С такими уравнениями можно познакомиться в специальных курсах, посвященных кинетике ферментативных реакций.

Если константа скорости диссоциации комплекса фермент-субстрат существенно выше, чем внутрикомплексного превращения ($k_{-1} >> k_2$), то константа Михаэлиса становится приблизительно равной отношению k_{-1}/k_1, т. е. равной константе диссоциации комплекса фермент-субстрат. В этом случае константу Михаэлиса можно рассматривать как величину, характеризующую сродство субстрата к ферменту.

Параметры, определяющие скорость ферментативной реакции, зависят от таких факторов окружающей среды, как температура, ионная сила раствора и pH среды.

На скорость ферментативной реакции может влиять присутствие некоторых специальных веществ, которые могут или тормозить (ингибировать), или ускорять (активировать) фермент. Среди подобных веществ мы ограничимся рассмотрением важнейших, к числу которых следует отнести конкурентные ингибиторы и аллостерические ингибиторы или активаторы фермента.

Конкурентные ингибиторы обладают сходством по своей структуре с каким-либо субстратом фермента и поэтому конкурируют с субстратом за связывание с активным центром. В то же время у них отсутствует какая-либо связь, которая должна подвергаться химическому превращению, катализируемому этим ферментом. Следовательно, молекулы такого ингибитора связываются с активным центром фермента, но за этим не следует какого-либо превращения. Типичным, широко используемым в различных исследованиях конкурентным по отношению к ATP ингибитором является аналог ATP,



в котором атом O, участвующий в образовании макроэргической связи между атомами α-P и β-P, заменен на CH_2-группу. В этом соединении присутствуют все основные структурные элементы ATP, которые могут участвовать в специфических взаимодействиях с активными центрами многочисленных ферментов, катализирующих реакции с участием ATP. Однако по связи P-CH_2-P не может проходить гидролиз, который обеспечивает благоприятную термодинамику сопряженного процесса. Поэтому приведенный аналог называют негидролизумым аналогом ATP.

Аллостерические ингибиторы, или активаторы, – это соединения, которые, связываясь со специальным центром фермента, находящимся вне его активного центра, существенно влияют на его активность, либо подавляя (*аллостерические ингибиторы*), либо существенно ее усиливая (*аллостерические активаторы*). В этом случае какого-либо структурного сходства между субстратом и ингибитором не требуется, что и подчеркивается словом «аллостерический».

Чтобы ориентироваться во множестве происходящих у живых организмов биохимических превращений, необходима определенная систематика. Таковая была создана Международным союзом по биохимии (International Union of Biochemistry, IUB). Изложение ее основных принципов дается в курсах по биологической химии и не является предметом биоорганической химии. Для дальнейшего изложения нашего курса достаточно сказать, что все ферменты разделены на шесть классов:

1) оксидо-редуктазы, катализирующие различные окислительно-восстановительные реакции;

2) трансферазы, катализирующие перенос отдельных групп от одной молекулы к другой;

3) гидролазы, катализирующие многочисленные реакции гидролиза;

4) лиазы, катализирующие негидролитическое расщепление молекул, сопровождающееся образованием новой двойной связи;

5) изомеразы, катализирующие различные процессы изомеризации;

6) синтетазы или лигазы, катализирующие реакции синтеза, сопровождаемые расщеплением одной из макроэргических связей у ATP или GTP.

Каждый класс разделен по типу катализируемых реакций на подклассы, а последние – на подподклассы. В связи с этой классификацией каждому виду катализируемых реакций присвоен цифровой шифр, состоящий из четырех разделенных точками цифр, показывающих номер класса, номер подкласса, номер подподкласса и порядковый номер фермента в данном подподклассе.

Поскольку систематическое описание ферментов или групп ферментов является предметом биохимии, а не биоорганической химии, эта классификация будет использоваться лишь эпизодически по мере рассмотрения отдельных представителей необъятного числа ферментов с позиции задач, решаемых биоорганической химией.

§ 16.2. Белки как кислотно-основные и нуклеофильные катализаторы

Большое число ферментов катализируют реакции, которые сводятся к перемещению нескольких протонов в пределах одной молекулы субстрата или их перераспределению между несколькими молекулами. Такие процессы должны происходить с помощью кислотно-основного катализа, осуществляющегося с участием кислых или основных остатков самого белка. При этом в одном направлении такой остаток функционирует как кислота, а в противоположном – как сопряженное основание. Обозначая рядом с трехбуквенным символом аминокислоты только участвующую в переносе протона группу, можно записать следующие основные сопряженные пары кислота-основание: Asp-COOH/Asp-COO^-, Glu-COOH/Glu-COO^-, Tyr-OH/Tyr-O^-, Cys-SH/Cys-S^-, Lys-NH_3^+/Lys-NH_2, His-ImH^+/His-Im, где Im – имидазол. В качестве примера такого фермента можно привести *панкреатическую рибонуклеазу*, которая катализирует гидролиз фосфодиэфирных связей в РНК. Промежуточным соединением в этом процессе является внутримолекулярная переэтерификация, результатом которой является замена связи фосфорильного остатка с 5'-OH-группой нуклеозида на связь с 2'-OH-группой предшествующего нуклеозида, что приводит к разрыву полинуклеотидной цепи и образованию циклофосфата. За этим следует гидролиз циклофосфата с образованием 3'-концевого фосфата (рис. 103).

Как видно из рис. 103, на первой стадии должно произойти удаление протона от 2'-OH-группы и присоединение протона к 5'-OH-группе. В первом процессе акцептором протона является непротонированное имидазольное кольцо остатка гистидина, а во втором донором протона служит протонированное кольцо имидазола другого остатка гистидина. На второй стадии остатки гистидина меняются ролями.

Как показывает установленное методом рентгеноструктурного анализа строение *активного центра панкреатической рибонуклеазы*, наряду с двумя непосредственно участвующими в каталитическом процессе остатками гистидина в активном центре находятся некоторые другие остатки, обеспечивающие необходимую ориентацию субстрата в активном центре (рис. 104).

Рис. 103. Схема гидролиза фосфодиэфирных связей в РНК, катализируемого панкреатической рибонуклеазой

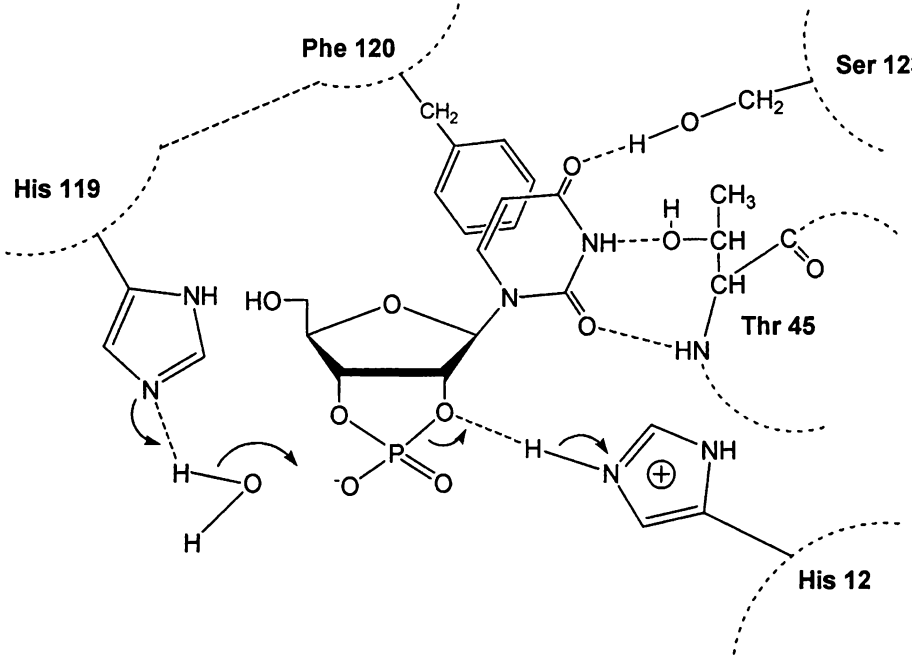


Рис. 104. Активный центр панкреатической рибонуклеазы с расположенным в нем уридин-2′,3′-циклофосфатом

Вторая группа ферментов, у которых катализ осуществляется без участия специальных кофакторов самой полипептидной цепью, – это *нуклеофильные катализаторы*. При этом типе катализа в ходе реакции происходит образование промежуточного соединения (интермедиата), в котором некоторый фрагмент субстрата ковалентно связывается с определенным аминокислотным остатком белка.

Классическим примером ферментов, функционирование которых происходит по механизму нуклеофильного катализа, являются так называемые *сериновые протеазы*. Главными компонентами активного центра этих ферментов выступают остаток серина, остаток аспартата и находящийся между ними остаток гистидина. Имидазольное кольцо последнего частично или полностью оттягивает протон ОН-группы серина, в результате чего существенно повышается его нуклеофильность, что способствует атаке по СО-группе расщепляемой пептидной связи. В результате ацильный остаток N-концевого фрагмента расщепляемого субстрата (белка или пептида) атакуется нуклеофильным атомом О с разрывом пептидной связи и образованием ацилфермента и свободного С-концевого фрагмента. На второй стадии действия сериновых протеаз ацилфермент гидролизуется с освобождением N-концевого фрагмента гидролизуемого белка или пептида. Схему процесса можно записать в виде

$$R_1\text{-CO-NH-}R_2 + \text{HO-E} \rightarrow R_1\text{-CO-O-E} + NH_2\text{-}R_2$$

$$R_1\text{-CO-O-E} + H_2O \rightarrow R_1\text{-COOH} + \text{HO-E},$$

где HO-E – сериновая протеаза, HO – гидроксигруппа остатка серина, входящего в активный центр фермента.

Специфические взаимодействия атакующего ацильного остатка с другими компонентами активного центра определяют селективность протеазы. Основным участком, определяющим ее специфичность, является специальный карман, фиксирующий расщепляемую связь в определенном расположении относительно каталитической триады Asp-His-Ser. В случае трипсина на задней части этого кармана имеется отрицательно заряженный остаток аспартата, поэтому относительно каталитического центра фиксируются положительно заряженные боковые радикалы, и трипсин преимущественно расщепляет пептидные связи, образованные СО-группой лизина и аргинина. Другой представитель сериновых протеаз – пищеварительный фермент химотрипсин. Он катализирует расщепление по остаткам гидрофобных аминокислот валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, тирозина и триптофана. У сериновой протеазы эластазы карман частично закрыт остатком валина, поэтому фермент преимущественно катализирует расщепление пептидных связей, образованных такими аминокислотами, как глицин и аланин.

К нуклеофильным катализаторам относится группа ферментов, интермедиатами которых являются продукты присоединения переносимого нуклеотидного остатка к атомам N боковых радикалов лизина и гистидина. Примером такого фермента является ДНК-лигаза – один из главных ферментов процесса репликации ДНК. Этот фермент, как уже описано в § 1.5, катализирует соединение фрагментов Оказаки, образующихся при синтезе дочерней ДНК на запаздывающей нити. Суммарный процесс может быть записан уравнением

$$(pN)_m\text{-}OH + pN(pN)_n \rightarrow (pN)_{(m+n+1)}$$

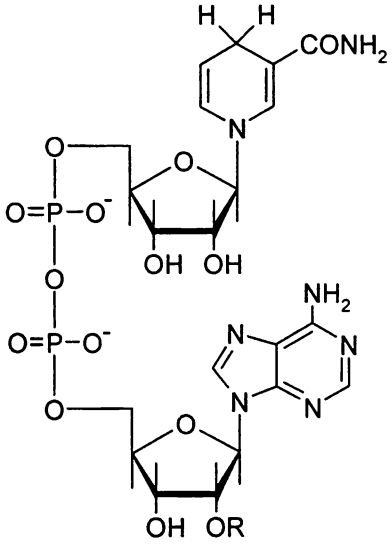
Первый из соединяемых фрагментов можно рассматривать как акцептор, а второй – как донор нуклеотидильного остатка. Непосредственная реакция фосфата донора с OH-группой акцептора с образованием новой фосфодиэфирной связи термодинамически неблагоприятна. Для того, чтобы она могла пройти, необходимо активировать фосфат. В случае ДНК-лигаз это достигается превращением фосфата в ангидрид с остатком pA. Донором такого остатка в случае фермента из эукариот и вирусов является ATP, который при этом превращается в ADP. У бактерий донором является NAD^+ (§ 16.3). Было показано, что образование ковалентного фермент-субстратного интермедиата ингибируется пиридоксальфосфатом, альдегидная группа которого может взаимодействовать с ε-аминогруппой остатка лизина. Данный факт свидетельствовал об участии остатка лизина в реакции аденилирования. Сайт-направленный мутагенез человеческого фермента показал, что при замене Lys568 в активном центре на His или Arg фермент становится неактивным и теряет способность аденилироваться, что свидетельствует о роли этого остатка лизина как сайта аденилирования.

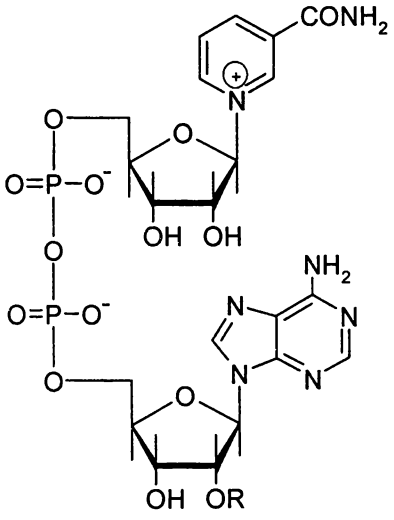
§ 16.3. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции

Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные процессы, относятся к классу *оксидоредуктаз*. Большинство реакций, катализируемых оксидоредуктазами, обратимы. Поэтому, для того чтобы дать название ферменту, приходится выбирать определенное направление, с тем чтобы рассматривать один из компонентов как окислитель, а второй – как восстановитель. Оксидоредуктазы катализируют многочисленные и весьма разнообразные по типу реакции.

Окислителями спиртов и альдегидов являются в подавляющем большинстве случаев никотинамидные коферменты – *никотинамидадениндинуклеотид* (NAD^+) и его производное с фосфорилированной 2'-OH-группой аденилового фрагмента – никотинамидадениндинуклеотид-фосфат ($NADP^+$).

Восстановителями являются соответствующие восстановленные формы NADH и NADPH.





восстановленная форма

NADH R = H

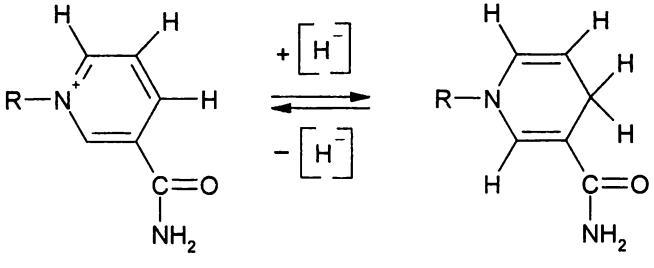
NADPH R = PO_3^{2-}

окисленная форма

NAD^+ R = H

$NADP^+$ R = PO_3^{2-}

Ферменты, катализирующие эти реакции, называют *дегидрогеназами*. Как правило, они не содержат каких-либо дополнительных кофакторов. В реакциях, катализируемых этими ферментами, происходит перенос гидрид-иона от молекулы субстрата на NAD^+ или $NADP^+$ (прямая реакция) и от NADH или NADPH на субстрат (обратная реакция).

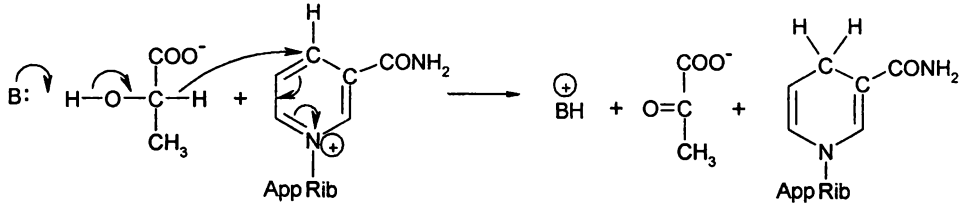


(чтобы не загромождать схему, приведен лишь непосредственно участвующий в окислительно-восстановительном процессе никотинамидный фрагмент кофермента).

В качестве простейшего примера можно привести фермент *лактатдегидрогеназу* (КФ 1.1.1.27), катализирующую окисление лактата (аниона молочной кислоты) до пирувата (аниона пировиноградной кислоты). С использованием символики, приведенной на предыдущей схеме, стехиометрическое уравнение этой реакции записывается в виде

$$H_3C-\underset{\underset{OH}{|}}{CH}-COO^- + NAD^+ \longrightarrow H_3C-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-COO^- + NADH + H^+$$

или в виде структурных формул с указанием переносимых пар электронов:



Буквой B обозначен остаток аминокислоты фермента, на который переносится протон от субстрата. К дегидрогеназам относится ряд ключевых ферментов метаболизма углеводов и жирных кислот.

Важная группа реакций, катализируемых дегидрогеназами, – это дегидрирование $-CH_2-CH_2-$групп до $-CH=CH-$. Такими реакциями являются реакция окисления сукцината до фумарата (одна из реакций в цикле трикарбоновых кислот) и одна из четырех стадий окисления фрагментов $-CH_2-CH_2-$ в остатках жирных кислот. Последние окисляются будучи соединенными с коферментом А (CoASH), структура которого приведена в § 18.2. Одной из стадий окисления является превращение

$$CoAS-CO-CH_2-CH_2-(CH_2CH_2)_{n-2}-CH_3 \rightarrow$$

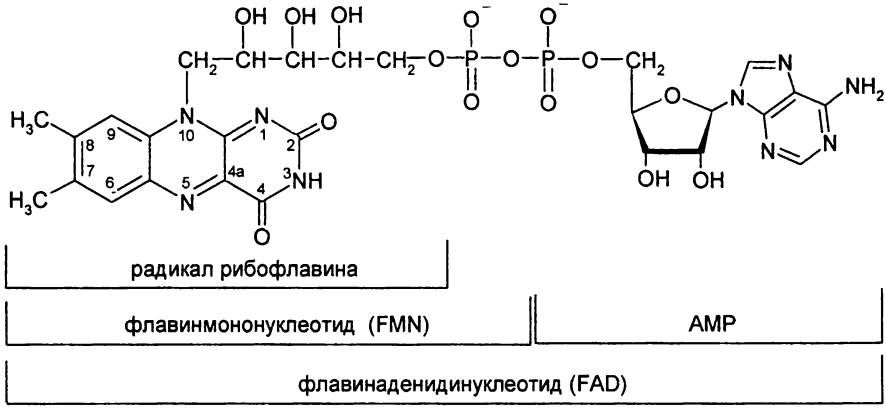
$$\rightarrow CoAS-CO-CH=CH-(CH_2CH_2)_{n-2}-CH_3$$

где n – число атомов С в остатке жирной кислоты.

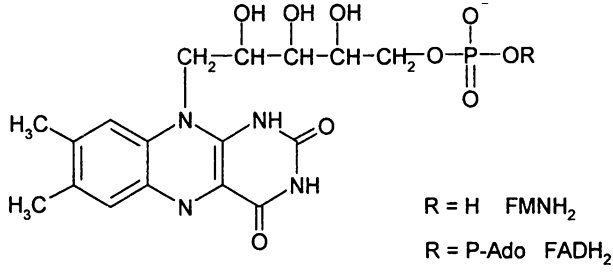
Термодинамически осуществление такого процесса с использованием в качестве окислителя никотинамидных коферментов неблагоприятно. Это видно из сопоставления величин редокс-потенциалов пары $NAD^+/NADH$ ($E^{0'} \approx -0{,}3$ В) и пары $^-OOCCH=CHCOO^-/^-OOCCH_2-CH_2COO^-$ (фумарат/сукцинат $E^{0'} \approx 0{,}03$ В). Следовательно, перепад редокс-потенциала для превращения

$$^-OOCCH_2-CH_2COO^- + NAD^+ \rightarrow {}^-OOCCH=CHCOO^- + NADH$$

составляет –0,33 В, что соответствует увеличению свободной энергии на 31,8 кДж/моль (1 В = –96,5 кДж/моль). Поэтому окисленная форма никотинамидного кофермента не может окислять -CH_2-CH_2-группы. Это же относится и к аналогичной стадии окисления жирных кислот. Непосредственным окислителем в реакции дегидрирования фрагмента -CH_2-CH_2- является изоаллоксазиновый остаток флавинового кофактора. Ниже приводится структура двух основных флавиновых кофакторов в окисленной и восстановленной формах.



окисленные формы



восстановленные формы

Для флавиновых кофакторов значения $E^{0'}$ существенно выше, чем для никотинамидных коферментов, но все же являются отрицательным (–0,12 В для свободного кофактора). Поэтому FMN может непосредственно окислять NADH, но для дегидрирования фрагмента -CH_2-CH_2- его окислительного потенциала недостаточно. В связи с этим в обеих системах дегидрирование -CH_2-CH_2-фрагментов осуществляет кофермент Q (гл. 18). Ферменты, катализирующие дегидрирование, являются флавопротеидами, флавиновые кофакторы которых осуществляют промежуточный перенос электронов в реакции

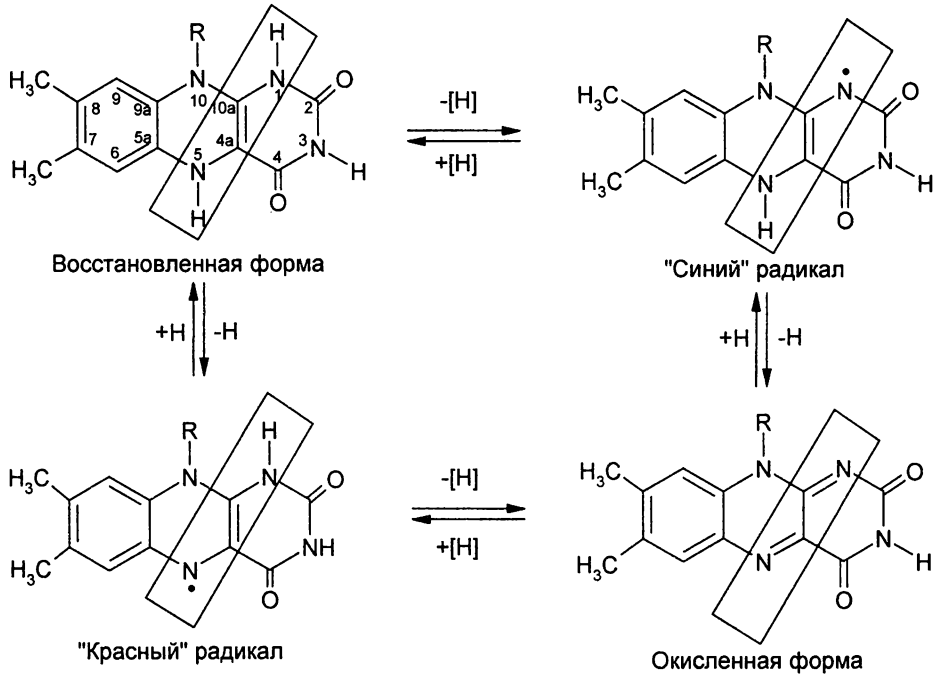
$$-CH_2-CH_2- + CoQ \rightarrow -CH=CH- + CoQH_2$$

Следует отметить, что применение термина «нуклеотид» к флавиновым кофакторам не вполне корректно, поскольку эти соединения не содержат в функциональной части гетероциклов, характерных для нуклеотидов. Кроме того, во флавиновых нуклеотидах вместо рибозы присутствует фрагмент пятиатомного спирта рибита. Более правильными названиями являлись бы флавинмонофосфат и флавинадениндифосфат. Аналогично не совсем правильно называть никотинамидные коферменты динуклеотидами. Однако эта терминология в биохимии прочно прижилась, и вводить в настоящем учебном пособии новую, более точную с точки зрения органической химии, терминологию нецелесообразно.

В отдельных случаях флавиновые кофакторы бывают ковалентно связанными с апоферментом. Однако в большом числе случаев функционируют ферменты, представляющие собой комплексы с апоферментом, в котором компоненты связаны нековалентными взаимодействиями.

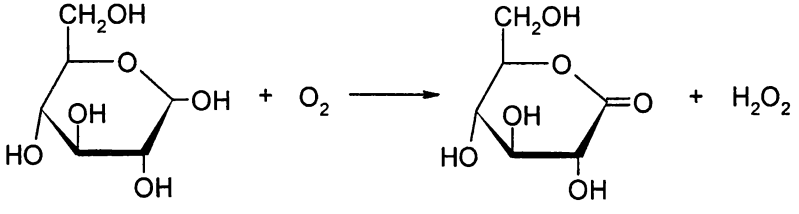
Характерным свойством флавиновых нуклеотидов является их способность к одноэлектронному окислению или восстановлению с образованием семихинонных радикалов из 7,8-диметил-изоаллоксазина. Возможны две структуры таких радикалов, содержащих неспаренный электрон на атомах ^5N или ^1N. Структуры всех радикальных форм кофакторов хорошо изучены на модельных системах, в основном на 1-алкил-изоаллоксазинах. Благодаря характерным окраскам окисленной, восстановленной и свободнорадикальных форм этих соединений они достаточно легко выявляются в ферментах и полиферментных системах. Так, радикал с неспаренным электроном на атоме ^1N имеет синюю окраску ($\lambda_{max} \approx 580$ нм), тогда как радикал с неспаренным электроном на атоме ^5N – красную окраску ($\lambda_{max} \approx 470$ нм). На схеме (см. ниже) изображены структуры этих радикалов. Прямоугольником выделен фрагмент 7,8-диметил-изоаллоксазина, подвергающийся изменению в процессе окисления-восстановления флавиновых кофакторов; буквой R обозначена остальная часть молекулы.

Вторая большая группа оксидоредуктаз – оксигеназы, катализирующие реакции, в которых окислителем является O_2. Эти ферменты разделяются на три основные подгруппы: оксидазы, монооксигеназы и диоксигеназы. К *оксидазам* относят ферменты, которые катализируют окисление субстратов, сопровождающееся переносом двух атомов H на O_2 с образованием H_2O_2. *Монооксигеназы* катализируют реакции, в которых один из атомов кислорода молекулы O_2 включается в субстрат, а второй входит в состав образующейся молекулы воды. *Диоксигеназы* катализируют включение в молекулу субстрата обоих атомов кислорода (при этом исходная молекула может распадаться на две). Все три перечисленные группы ферментов содержат один или несколько кофакторов, являющихся непосредственными участниками окисли-



тельно-восстановительного процесса. В настоящее время известно более сотни оксигеназ, которые являются флавопротеидами, в ряде случаев металлофлавопротеидами.

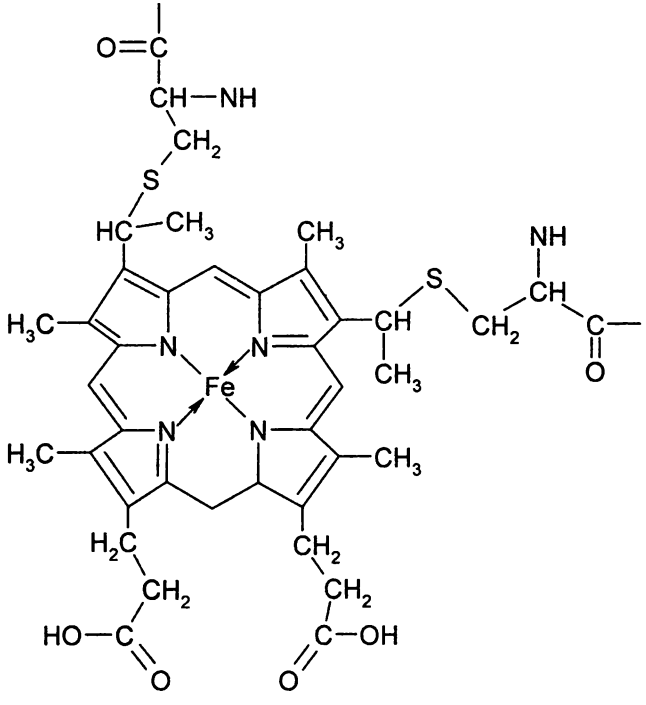
В качестве примера фермента оксидазы можно привести широко используемую для анализа глюкозы глюкозооксидазу, катализирующую реакцию:



В этом случае анализируется образующийся пероксид водорода.

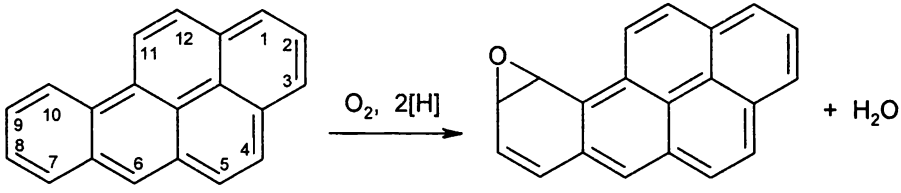
Вторая чрезвычайно важная подгруппа оксидоредуктаз – монооксигеназы, которые катализируют окисление различных субстратов молекулярным кислородом в присутствии доноров электронов, таких как NADH, NADPH, восстановленных флавинов и др., выступающих в качестве кофакторов. При этом один атом O молекулы кислорода внедряется в субстрат, а другой входит в состав образующейся молекулы воды.

Монооксигеназы в большинстве случаев являются *гемопротеидами*, т. е. содержат в качестве кофакторов молекулу гема. Гем – широко распространенный в живой природе кофактор. Он представляет собой комплекс ионов железа (II) или (III) с порфирином, соответственно ферро- или ферригем. В § 6.2 приведена структура свободного гема, который является кофактором гемоглобина и миоглобина. В ковалентно связанном с белком виде он входит в состав цитохрома с, подвижного переносчика электронов на последнем этапе в цепи переноса электронов на O_2 при окислительном фосфорилировании. Ковалентная связь образуется между винильными группам гема и двумя остатками цистеина белка

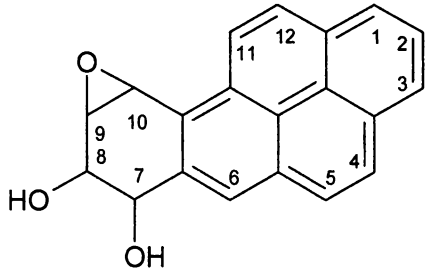


Монооксигеназы очень важны для поддержания жизнедеятельности живых организмов. Это связано с тем, что все живые организмы, являясь открытыми системами, поглощают из окружающей среды разнообразные химические вещества (пищу, воду, воздух и все, что в них содержится). Среди этих веществ находятся и такие, которые не представляют питательной ценности и не могут быть использованы данным организмом. Если это слаборастворимые в воде липофильные органические соединения, то они с трудом выводятся из клетки и могут накапливаться, вызывая токсические эффекты. За такими веществами в настоящее время закрепилось название *ксенобиотики* (от греч. χενωσ – чуждый). Практически во всех организмах, начиная от бактерий и кончая человеком, существуют ферментативные системы детоксика-

ции подобных веществ. Результатом действия таких систем является превращение липофильных веществ в гидрофильные, которые выводятся из организма. Аналогичные ферментные системы принимают участие и в метаболизме эндогенных липидных веществ: стероидов, простагландинов и др. Ключевыми ферментами этих систем являются гемопротеиды *цитохромы P450*. Примером реакции, катализируемой цитохромом P450, является гидроксилирование бензо[а]пирена:



Образующийся из 9,10-эпоксибензо[а]пирена под действием эпоксигидролазы его метаболит 7,8-дигидрокси-9,10-окси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен является канцерогенным веществом:



Цитохромы P450 представляют собой суперсемейство более чем 500 гемсодержащих ферментов с молекулярной массой 50–60 кДа, играющих важную роль в окислительных превращениях ксенобиотиков и на некоторых стадиях метаболизма. На сегодняшний день уже известно более 200 тысяч субстратов этих ферментов, присутствующих в клетках всех живых организмов от бактерий до млекопитающих, включая человека.

Характерным свойством железопорфиринов является интенсивная полоса в электронном спектре в области 400 нм – полоса Соре. У цитохромов, содержащих нековалентно связанный гем типа *b*, максимум в спектре поглощения комплекса с молекулой CO находится на 420 нм. Комплекс цитохрома P450 с молекулой CO имеет аномальное положение полосы Соре на 450 нм, откуда и происходит название этого цитохрома. Причина спектральных особенностей P450, по-видимому, связана со спецификой аксиальных лигандов железа.

Железопорфириновые комплексы в первом приближении имеют октаэдрическую конфигурацию. Порфириновое кольцо имеет плоское строение.

Если его расположить в системе декартовых координат в плоскости, образованной осями x-y, то пятый и шестой лиганды расположатся вдоль оси z. В гемопротеидах пятым лигандом служит остаток аминокислоты. В цитохроме P450 это остаток цистеина, а в гемоглобине – остаток гистидина. Ту сторону гема, с которой располагается остаток аминокислоты, принято называть дистальной (ближней). В шестое положение с проксимальной (дальней) стороны гема происходит присоединение других лигандов.

Fe(III) имеет электронную конфигурацию d^5 *Спиновое состояние* железа в составе гема может быть низкоспиновым (s=1/2, low spin LS) или высокоспиновым (s=5/2, high spin HS), в зависимости от расщепления орбиталей в кристаллическом поле лигандов. Если это расщепление мало, то заполнение d-орбиталей происходит по правилу Гунда, и на каждой из d-орбиталей находится по одному электрону с образованием высокоспинового состояния. При большой величине расщепления образуется низкоспиновое состояние.

В нормальном состоянии P450 содержит низкоспиновое Fe(III). Это свидетельствует о том, что окружение гема содержит несколько молекул воды, одна из которых координирована с ионом железа с дистальной стороны гема. При этом ион железа находится в плоскости гема.

На рис. 105 представлена наиболее принятая в настоящее время схема каталитического действия цитохрома P450.

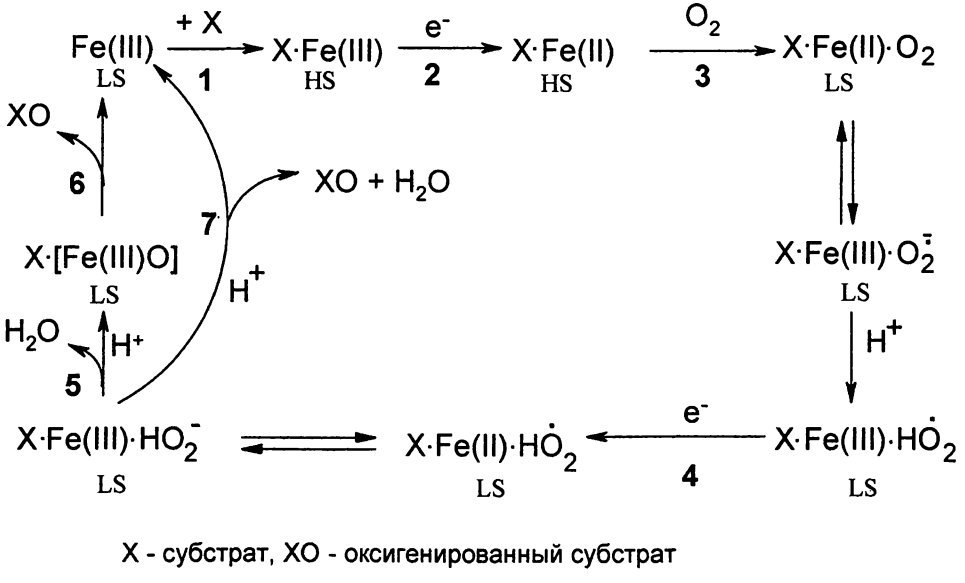


Рис. 105. Наиболее принятая в настоящее время схема каталитического действия цитохрома P450

На первой стадии происходит связывание субстрата в цитохроме P450 в аксиальном положении с вытеснением молекулы воды с образованием ком-

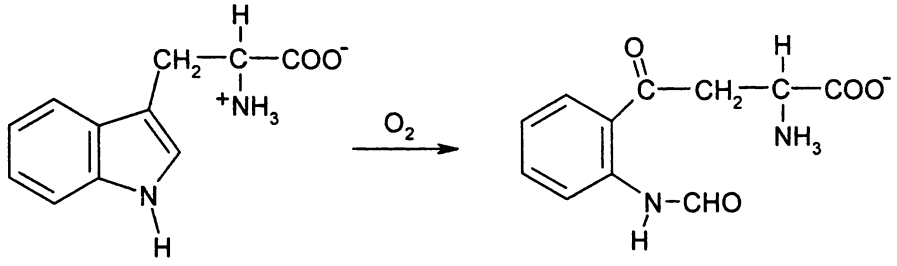
плекса XFe(III), где X – окисляемый субстрат. Объемный лиганд вытесняет также несколько примыкающих к H_2O-лиганду молекул воды. Например, при связывании камфоры удаляется шесть молекул воды. Изменение кристаллического поля, создаваемого лигандным окружением, способствует переходу Fe(III) в высокоспиновое состояние. При этом понижается редокс-потенциал цитохрома P450, что облегчает последующее восстановление Fe(III) до Fe(II).

На второй стадии происходит первое восстановление с помощью флавопротеида, катализирующего перенос электрона от соответствующего восстановителя, чаще всего NADPH. В результате Fe(III) восстанавливается до Fe(II) с образованием XFe(II).

На третьей стадии происходит образование достаточно прочного комплекса с кислородом ($K_d = 0{,}6 \times 10^{-6}$ M), в котором железо переходит в низкоспиновое состояние. В образовавшемся комплексе $XFe(II)(O_2)$, по-видимому, происходит обратимое внутримолекулярное окисление, в результате чего образуется частица $XFe(III)(O_2^-)$, которая участвует во второй реакции восстановления (четвертая стадия). В результате образуется частица $XFe(III)(O_2^{2-})$. Поскольку лиганды, содержащие кислород, могут протонироваться, то на третьей стадии с Fe(II) может быть связан HO_2, а на четвертой стадии с Fe(III) может быть связан перекисный анион HO_2^-.

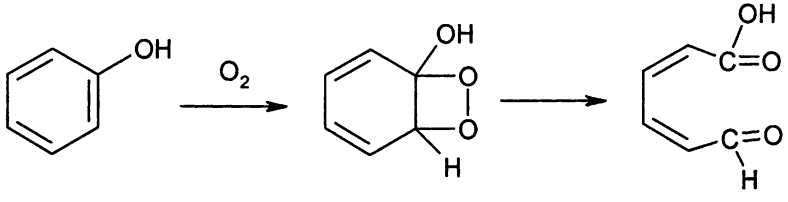
Образование этих частиц существенно для протекания пятой химической стадии, являющейся первым этапом на пути к разрыву связи O-O, необходимой для оксигенирования субстрата. Этот разрыв должен происходить значительно легче, чем аналогичный разрыв в исходной молекуле O_2. Действительно, энергия разрыва связи в O_2 составляет 460 кДж/моль, в HO_2 - 276, а в H_2O_2 – 213 кДж/моль. В результате столь существенного ослабления связи O-O энергия активации реакций, катализируемых цитохромом P450, является достаточно низкой. Она лежит для разных цитохромов в пределах 40–70 кДж/моль. При гетеролитическом разрыве связи O-O с участием двух протонов образуется молекула воды, а субстрат оказывается связанным с частицей [Fe(V)=O], т. е. образуется комплекс X[Fe(V)=O]. В этом комплексе проходит оксигенирование с регенерацией Fe(III) и образованием продукта оксигенирования XO. Поскольку в этом случае на молекулу субстрата переносится частица, эквивалентная синглетному атомарному кислороду, изоэлектронная карбену и нитрену, то эта частица в литературе получила название «оксена», а изложенный выше механизм – «оксеноидным».

Диоксигеназы катализируют реакции окисления молекулярным кислородом, в которых оба атома кислорода внедряются в субстраты. При этом акцептором кислорода может являться как одна молекула субстрата, так и две, одной из которых может быть NADH или NADPH. При окислении L-триптофана до L-N-формилкинуренина оба атома кислорода внедряются в субстрат:



Реакция катализируется триптофан-2,3-диоксигеназой. Этот фермент содержит в своей структуре ферригем.

Диоксигеназы в качестве кофакторов могут содержать гемы или ионы железа негемовой природы, а также ионы меди. В качестве механизма реакции окисления обсуждаются как оксеноидный, так и неоксеноидный, например, присоединение молекулы кислорода в системе сопряженных двойных связей. В частности, диоксигеназы пирокатехаза и триптофанпирролаза катализируют превращение ароматических соединений (обычно фенолов и индолов) в соединения с раскрытым кольцом, которые содержат оба атома кислорода, каждый из которых присоединен к атомам углерода разрываемой С-С-связи:



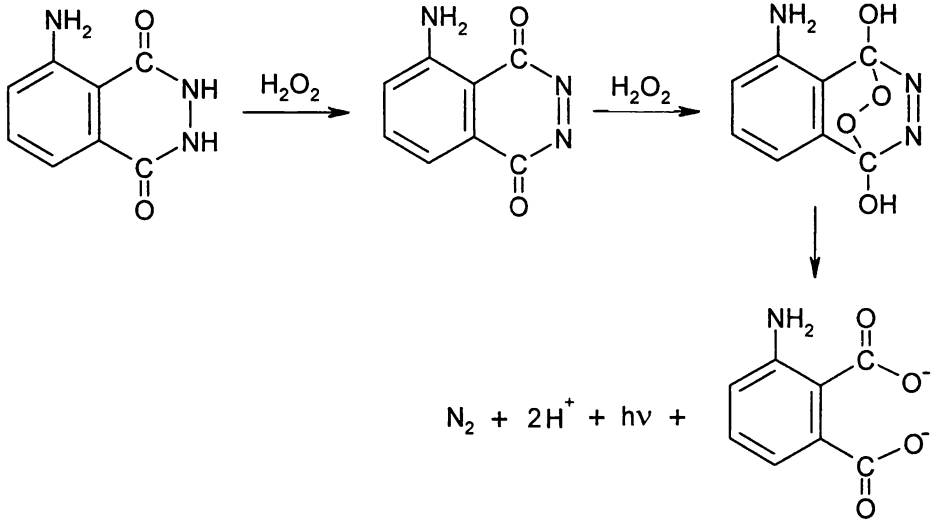
К группе гемопротеиновых ферментов относятся также *пероксидазы*, которые катализируют реакцию:

$$XH_2 + H_2O_2 \rightarrow X + 2H_2O$$

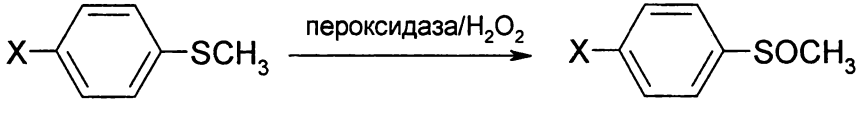
где XH_2 – субстрат, служащий в реакции донором электронов, а пероксид-водорода – акцептором. Пероксидазы содержатся как в растительных, так и животных тканях. Среди растений их особенно много в соке фигового дерева и в корне хрена. В ходе реакции происходит двухэлектронное окисление субстрата и восстановление двух атомов кислорода в пероксиде водорода из состояния окисления (-1) до (-2) в образующихся молекулах воды.

Реакция, катализируемая пероксидазой хрена (HRP – horse radish peroxidase), используется для количественного определения пероксида водорода, выделяющегося в реакции окисления глюкозы кислородом, катализируемой глюкозооксидазой. В этом методе пероксидаза катализирует окисление

люминола (циклического дигидразида 3-аминофталевой кислоты) с образованием 3-аминофталата, часть молекул которого образуется в электронно-возбужденном состоянии, испускающем кванты света с длиной волны 480 нм, что регистрируется с помощью специальных приборов – люминометров.



Пероксидазы способны также проводить оксигенирование определенных субстратов, внедряя в субстрат атом кислорода. Например, такой процесс имеет место при окислении *п*-замещенных тиоанизолов:



X = H, CH_3, CN, NO_2 и другие заместители

§ 16.4. Химия кофакторов некоторых лиаз, трансфераз и лигаз

В настоящее время механизмы каталитических процессов, лежащие в основе функционирования кофакторов, установлены для нескольких групп ферментов. В одну из таких групп входят ферменты, в работе которых в качестве кофактора участвуют пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат (осуществляющие *пиридоксалевый катализ*). Они принимают участие в реакциях переаминирования, в которых субстратами являются две L-α-аминокислоты и соответствующие им α-кетокислоты, причем аминокислота

превращается в кетокислоту, а кетокислота – соответственно в аминокислоту. Стехиометрическое уравнение реакции записывается в виде

$$NH_3^+\text{-}CHR'\text{-}COO^- + CHR''\text{-}CO\text{-}COO^- \rightarrow$$

$$\rightarrow NH_3^+\text{-}CHR''\text{-}COO^- + CHR'\text{-}CO\text{-}COO^-$$

Константа равновесия этой реакции близка к единице, т. е. реакция обратима. Пиридоксальфосфат, структура которого приведена в § 18.2, в неработающем состоянии в ферментах переаминирования альдегидной группой образует альдимин (основание Шиффа) с ε-аминогруппой остатка лизина апофермента. На рис. 106 представлен механизм первой стадии действия фермента, установленный для аспартатаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи.

Исходный конъюгат (*1*) апофермента с пиридоксальфосфатом образует комплекс (*2*) с субстратом, в котором происходит перенос протона от α-NH_3^+-группы субстрата на атом N альдимина. Перенос происходит через промежуточное связывание протона ионизованной гидроксигруппой, связанной с ароматическим кольцом пиридоксальфосфата. Депротонированная α-NH_2-группа субстрата в комплексе (*3*) атакует атом C альдиминной группы, в результате чего фрагмент R-CH-COO^- субстрата оказывается ковалентно связанным с кофактором (*4*). Создаются благоприятные условия для переноса протона от α-C фрагмента на ε-NH_2-группу апофермента (*4*). В результате образуется карбанион (*5*), в котором отрицательный заряд делокализован между атомами C кофактора α-C фрагмента. Перенос протона на C^- кофактора приводит к стабилизации кетиминной формы фрагмента, который реагирует с молекулой воды и превращается в кетимин (*6*), который в свою очередь гидролизуется с превращением остатка пиридоксальфосфата в пиридоксаминфосфат (*7*) (см. § 18.2) и образованием свободной кетокислоты (*8*). Последнее означает, что не происходит полной регенерации простетической группы, т. е. процесс не является каталитическим в полном смысле этого слова. В то же время процесс, описываемый приведенной схемой, характеризуется высокой специфичностью и большой скоростью, характерными для каталитических процессов. Он становится таковым, если одновременно с α-аминокислотой присутствует α-кетокислота, отличная от (*8*), которая может пройти в обратном направлении всю цепочку превращений, представленных на рис. 106. При этом образуется новая α-аминокислота, а пиридоксаминфосфат превратится в пиридоксальфосфат, т. е. каталитический цикл замкнется.

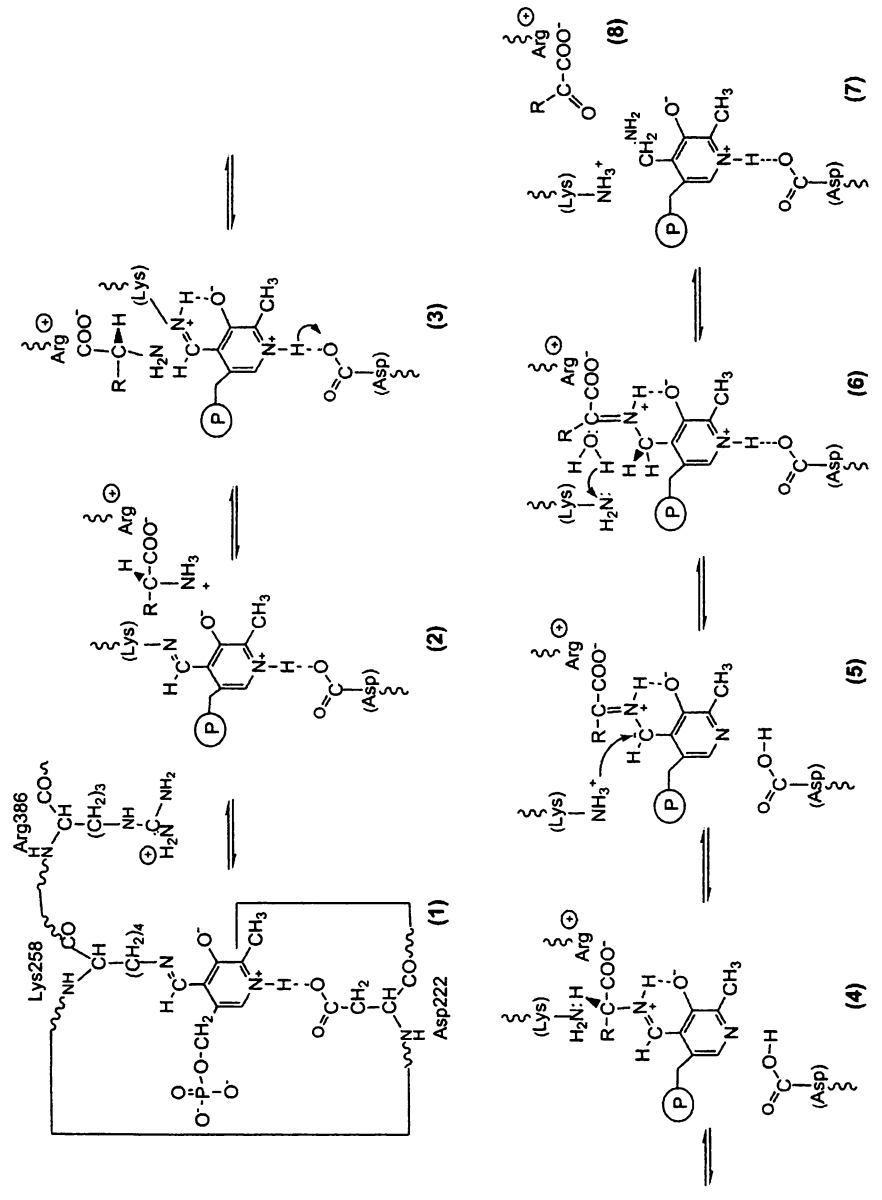


Рис. 106. Механизм первой стадии действия фермента, установленный для аспартатаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи

В реакции переаминирования могут участвовать различные пары аминокислот и соответствующих кетокислот. Однако в большом числе случаев одной из пар является пара глутаминовая/α-кетоглутаровая кислоты. Реакции переаминирования играют важную роль в метаболизме аминокислот.

Пиридоксальфосфат является кофактором и многих других ферментов, среди которых следует упомянуть катализаторы декарбоксилирования аминокислот, приводящие к образованию соответствующих аминов. Уравнение катализируемых реакций можно записать в виде

$$NH_3^+\text{-}CHR\text{-}COO^- \rightarrow CH_2R\text{-}NH_3^+ + CO_2.$$

Важным кофактором, входящим в состав некоторых ферментов, катализирующих *декарбоксилирование α-кетокислот*, является тиаминпирофосфат, структура которого приведена в § 18.2. На рис. 107 представлена схема декарбоксилирования пирувата при участии тиаминпирофосфата.

Процесс приводит либо к превращению пирувата в ацетальдегид по суммарной реакции

$$CH_3COCOO^- \rightarrow CH_3CHO + CO_2,$$

либо к присоединению остатка CH_3CO к атому серы дисульфидного мостика липоата с образованием тиоацетильного фрагмента. Последний является донором ацетила при образовании ацетилированного кофермента А, который вводит ацетильные остатки в цикл трикарбоновых кислот и в биосинтез жирных кислот. Основное участие в реакции декарбоксилирования принимает тиазольное кольцо кофактора. В реакции оно участвует в виде карбаниона, причем атом С последнего атакует атом С кетогруппы субстрата.

Важной реакцией является *карбоксилирование* (присоединение CO_2). Кофактором этой реакции в ряде случаев является биотин, структура которого приведена в § 18.2. Биотин связан ковалентно с апоферментом через остаток валериановой кислоты. Реакция карбоксилирования будет рассмотрена на примере карбоксилирования пирувата (рис. 108), которая приводит к образованию оксалоацетата, одного из участников цикла трикарбоновых кислот. Карбоксилирование проходит сопряженно с гидролизом ATP до ADP.

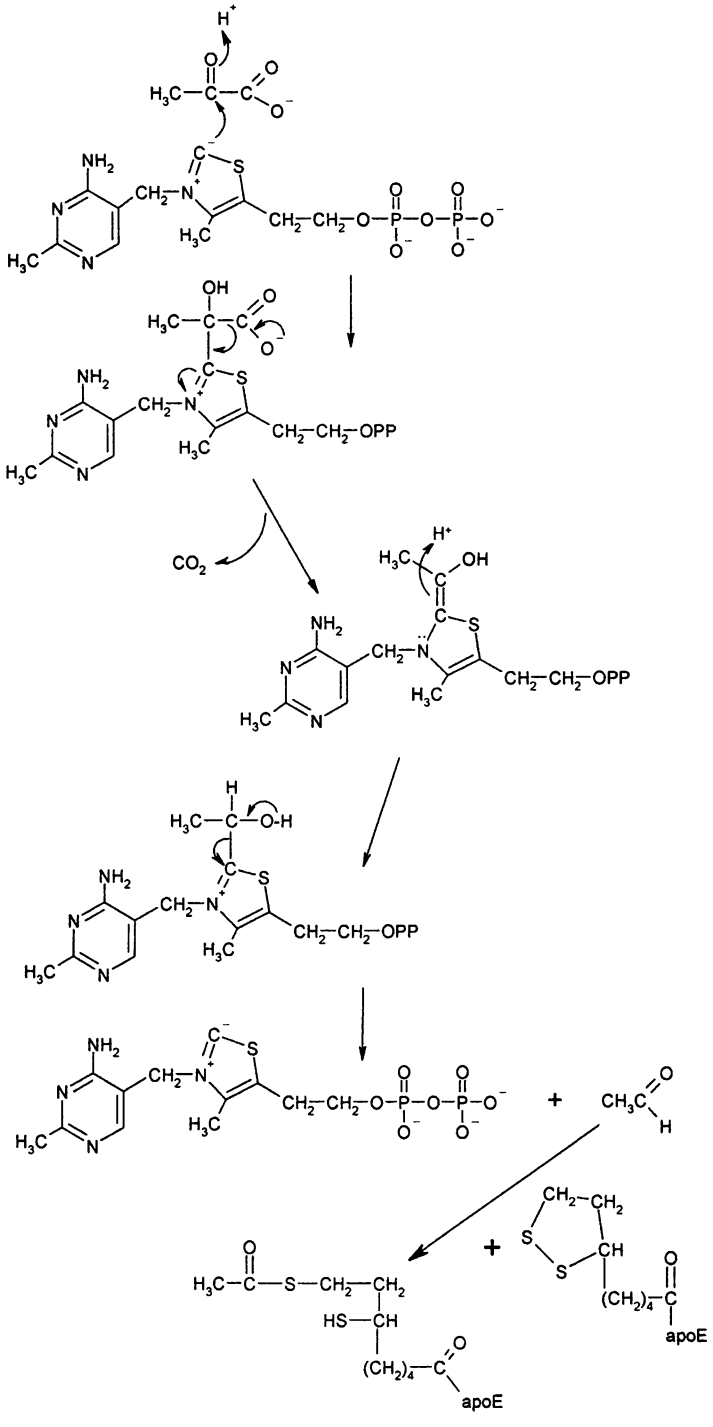


Рис. 107. Схема декарбоксилирования пирувата, катализируемого пируватдекарбоксилазой (КФ 4.1.1.1), содержащей в качестве кофактора тиаминпирофосфат

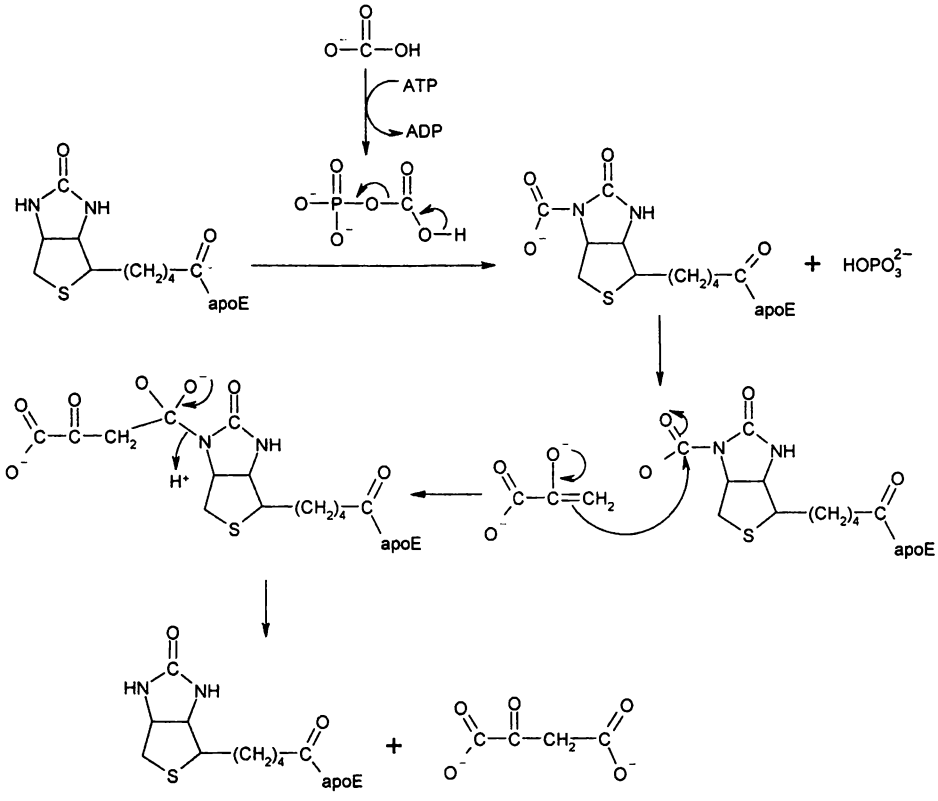


Рис. 108. Схема карбоксилирования пирувата, катализируемого пируваткарбоксилазой (КФ 6.4.1.1)

Субстратами этой реакции являются пируват, бикарбонат-анион и АТР. Реакция начинается с фосфорилирования бикарбоната с образованием смешанного ангидрида угольной и фосфорной кислот. За этим следует перенос остатка CO_2 на один из атомов N фрагмента мочевины биотина. В таком виде фермент катализирует перенос CO_2 на метильную группу пирувата.

§ 16.5. Рибозимы

В начале восьмидесятых годов произошло одно из наиболее неожиданных событий в развитии биохимии – было найдено, что в природе существуют катализаторы, лишенные белка и состоящие только из РНК. До этого существовало убеждение, основанное на огромном множестве биохимических данных, что обязательным, а в большом числе случаев единственным компонентом всех ферментов является белок. Открытие каталитических функций РНК было осуществлено в начале 80-х годов XX века двумя группами исследователей. Первая из них под руководством Томаса Чека (Cech) занималась

исследованием сплайсинга (см. § 1.8) предшественника рибосомной РНК малой субъединицы рибосом одноклеточного эукариота *Tetrahymena thermophilus*. На примере этого предшественника Чек показал, что в его сплайсинге никакие белки не участвуют, т. е. происходит самосплайсинг, и действующим началом в этом процессе является РНК. В клетке процесс не является каталитическим, поскольку происходит в каждом предшественнике всего один раз. Но происходит он с достаточно большой скоростью и высокой селективностью, строго по определенным точкам, разделяющим интрон от двух смысловых участков предшественника. Иными словами, процесс несет в себе важнейшие черты ферментативного процесса. Таким образом, родилось представление, что РНК-предшественник является ферментом, образованным молекулой РНК.

Одновременно каталитические свойства РНК были обнаружены в работах Сиднея Альтмана (S. Altman) в исследованиях, посвященных процессингу предшественника тРНК. В первичном транскрипте гена тРНК на 5'-конце присутствует несколько дополнительных нуклеотидных остатков, удаление которых является необходимым условием превращения предшественника в зрелую тРНК, способную участвовать в биосинтезе белка на рибосомах. Это удаление осуществляется специальной нуклеазой, получившей название «РНКаза Р». Последняя оказалась нуклеопротеидом, но было обнаружено, что его каталитическая субъединица не содержит белка и может функционировать самостоятельно, хотя и менее эффективно, чем в присутствии белковой компоненты.

Для молекул РНК, способных катализировать химические превращения, был введен термин «*рибозим*». За открытие рибозимов Чеку и Альтману была присуждена Нобелевская премия.

Структуру фрагмента РНК, содержащего интрон, можно представить в виде

$$.....pX_{i-1}pX_ipY_1pY_2...pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}....$$

где символом **X** обозначены нуклеозидные остатки, входящие в состав экзона, а символом **Y** – остатки в составе интрона. Номера обозначают положение соответствующего нуклеозида в экзоне и интроне. Число **m** обозначает число нуклеотидных остатков в интроне.

Сплайсинг предшественника РНК из *Tetrahymena thermophila* происходит по схеме

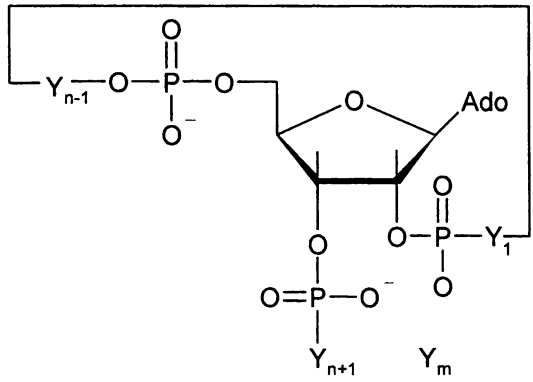
$$\begin{gathered}(p)X_1...pX_{i-1}pX_ipY_1pY_2.....pY_{m-1}pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}...+G \rightarrow \\ ..GpY_1pY_2...pY_{m-1}pY_mpX_{i+1}pX_{i+2}... + (p)X_1.....pX_{i-1}pX_i... \\ \text{(I)} \qquad\qquad\qquad\qquad \text{(II)}\end{gathered}$$

$$(I) + (II) \rightarrow Gp\ Y_1pY_2.....pY_{m-1}pY_m + (p)\ X_1...pX_{i-1}pX_ipX_{i+1}pX_{i+2}...$$

Согласно этой схеме в процессе в качестве субстрата участвует гуанозин. На первой стадии сплайсинга происходит переэтерификация: вместо фосфоэфирной связи первого нуклеотида интрона с предшествующим нуклеотидом экзона образуется связь интрона с остатком гуанозина. Однако отщепившийся экзон, даже не будучи связан ковалентно с остальной частью предшественника, остается вблизи этой части и участвует во второй стадии, также представляющей собой реакцию переэтерификации. При этом вместо связи между последним нуклеотидом интрона и следующим за ним нуклеотидом экзона происходит воссоединение последнего с концом фрагмента, отщепившимся на первой стадии. В итоге интрон выщепляется в виде производного, содержащего дополнительный остаток гуанозина на 5'-конце. Интроны, вырезаемые из пре-мРНК по такому механизму, получили название интронов группы I. Они были обнаружены у ряда организмов в ядрах, митохондриях и хлоропластах.

Дальнейшие исследования показали, что вырезанные интроны обладают каталитическим действием. Одним из первых детально изученным является интрон, вырезанный из пре-рРНК *Tetrahymena thermophila*, который в результате нескольких последовательных превращений укорачивается на 19 нуклеотидов с 5'-конца и превращается в рибозим, способный осуществлять большое число каталитических актов. Этот рибозим обычно называют L-19 IVS (intervening sequence, лишенная 19 нуклеотидов). Он ускоряет гидролиз поли(С) в 10^{10} раз по сравнению с самопроизвольным.

Второй тип вырезания интронов был впервые обнаружен при изучении сплайсинга митохондриальных пре-мРНК. В этом случае сплайсинг начинается со внутримолекулярной переэтерификации, при которой связь 5'-фосфата первого нуклеотидного остатка интрона с 3'-ОН-группой последнего остатка экзона заменяется на связь с 2'-ОН-группой одного (определенного) из внутренних остатков аденозина интрона. Возникает структура, в которой этот внутренний аденозин связан тремя фосфодиэфирными связями с участием всех его ОН-групп с соседями слева и справа и с 3'-концевым фосфатом интрона. Эту структуру можно представить в виде



После этого происходит соединение экзонов и выщепление интрона в виде структуры типа лассо (lariat)

$$pX_{i-1}\,pX_i\,pY_1pY_2 \quad pA. \quad .pY_m\,pX_{i+1}\,pX_{i+2}\,. \longrightarrow$$

$$\longrightarrow \quad pX_{i-1}\,pX_i \;+\; \overbrace{pY_1pY_2 \quad pA.}^{5'\longrightarrow 2'} \quad .pY_m\,pX_{i+1}\,pX_{i+2}\,.$$

$$\longrightarrow \quad pX_{i-1}\,pX_i\,pX_{i+1}\,pX_{i+2} \;+\; \overbrace{pY_1pY_2 \quad pA.}^{5'\longrightarrow 2'} \quad .pY_m$$

Такие интроны получили название интронов группы II. Они характерны для митохондрий грибов и растений и составляют большую часть интронов хлоропластов.

Описанные типы рибозимов осуществляют вырезание интронов. Однако описан и детально изучен другой тип рибозимов, которые катализируют расщепление полирибонуклеотидных цепей. Такие рибозимы обнаружены в составе молекул вироидов и вирусоидов. Молекулы этих инфекционных РНК обычно образуются в виде длинных цепей, представляющих собой тандем из нескольких инфекционных молекул РНК. В этих случаях функция рибозима состоит в расщеплении этих цепей на функционально активные молекулы РНК. При этом образуются 2',3'-циклофосфат и свободная 5'-ОН-группа. В состав вироидов и вирусоидов входит два основных типа рибозимов.

Один тип представлен *шпилечными рибозимами* (рис. 109).

Шпилечные рибозимы встречаются как компоненты «минус» РНК инфекционных агентов. Они состоят из четырех двунитевых фрагментов. Между спиральными участками попарно находятся однонитевые участки, соединенные петлями, в основном консервативные. Точка, по которой происходит расщепление, находится в первой петле. Между вторым и третьим двунитевыми фрагментами имеется сгиб, в результате которого первый и последний фрагменты пространственно сближены.

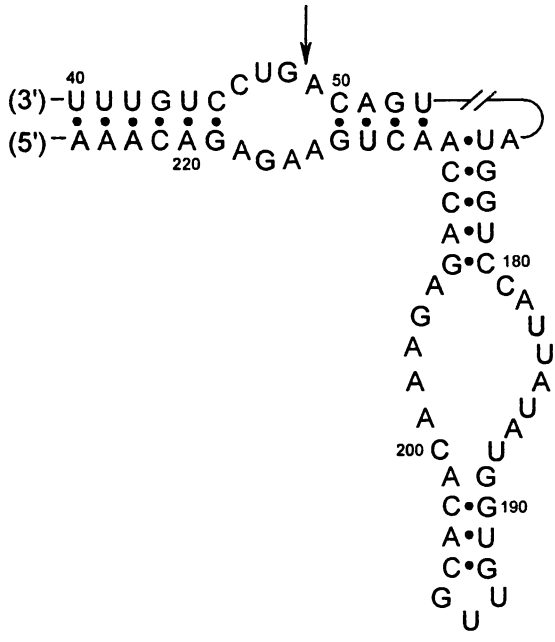


Рис. 109. Шпилечный рибозим, входящий в состав минус-цепи сателлита вируса кольцевой пятнистости табака. Стрелкой указана расщепляемая межнуклеотидная связь. Нумерация ведется от 3'-конца

Наиболее изучены рибозимы, функционально активная часть которых представлена в виде вторичной структуры, имеющей сходство с головкой молотка (*hammerhead*). В отличие от шпилечных рибозимов, они являются компонентами «плюс» РНК частиц вироидов и вирусоидов (сателлитов вирусов). На рис. 110 представлена структура рибозима, входящего в состав сателлита вируса преходящей полосатости люцерны.

Как видно из рис. 110, рибозим hammerhead содержит три дуплекса, причем между дуплексами II и Ш находится однонитевая последовательность, формирующая функционально активную структуру. На стыке дуплексов I и III находится остаток С, после которого проходит каталитическое расщепление. У данного рибозима расщепление происходит по фрагменту UCU, у некоторых других hammerhead рибозимов – по фрагменту UCA. Такие рибозимы широко исследуются, поскольку могут быть достаточно легко синтезированы и позволяют получать различные модифицированные формы, например, заменять некоторые рибонуклеотидные остатки на дезоксирибонуклеотидные. В связи с этим для удобства описания различных замен предложена специальная система нумерации нуклеотидных остатков.

Согласно этой системе каждому нуклеотидному остатку присваивается два номера. Первый из них присваивается всем остаткам, которые входят в однонитевые (но не петлевые) участки или являются основанием дуплек-

сов. Номер 1 присваивается нуклеотиду, следующему за расщепляемым остатком С. Далее отсчет ведется по часовой стрелке. Второй номер присваивается нуклеотидам дуплекса в порядке удаления от основания так, что вторые номера у комплементарных нуклеотидов совпадают. В петлях вводится своя нумерация, причем первый номер обозначается как L1 и L2 для первой и второй петель (loop – петля). Для иллюстрации этих правил на рис. 110 остатки нуклеотидов снабжены номерами.

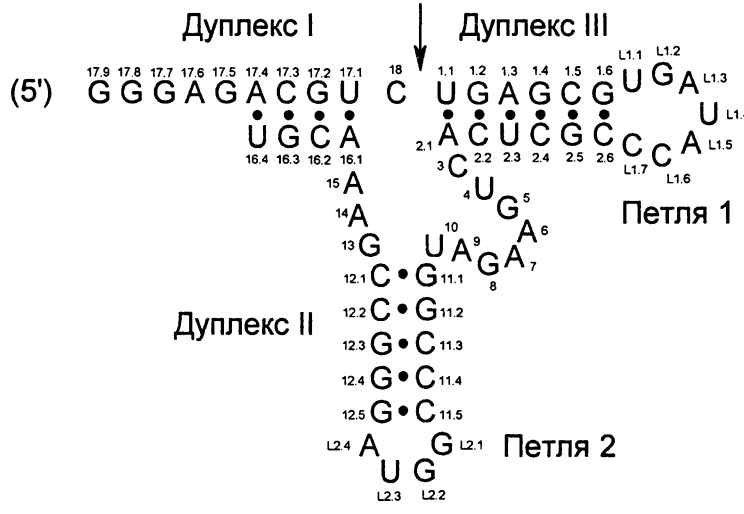


Рис. 110. Рибозим типа головки молотка, входящий в состав сателлита вируса преходящей полосатости люцерны

Важная особенность шпилечных и hammerhead рибозимов состоит в том, что двойные спирали в них замкнуты петлями, не играющими роли в функционировании рибозима. Поэтому по этим петлям можно провести расщепление, разрезав, таким образом, исходный рибозим на две части, которые можно разделить хроматографически или электрофорезом. В сумме эти части составляют функционально активный фермент, у которого расщепление проходит по той же фосфоэфирной связи, что и в случае нативного рибозима. Ту половину, в которой находится эта связь, можно рассматривать как субстрат, а вторую – как рибозим. Если отделить молекулу субстрата от рибозима, то последний можно использовать для расщепления новой молекулы субстрата, т. е. процесс становится истинно каталитическим. В качестве примера на рис. 111 представлена структура того же hammerhead рибозима, что и на рис. 110, но расщепленного по петле 1.

Аналогично может быть получен каталитически активный рибозим из шпилечного фермента.

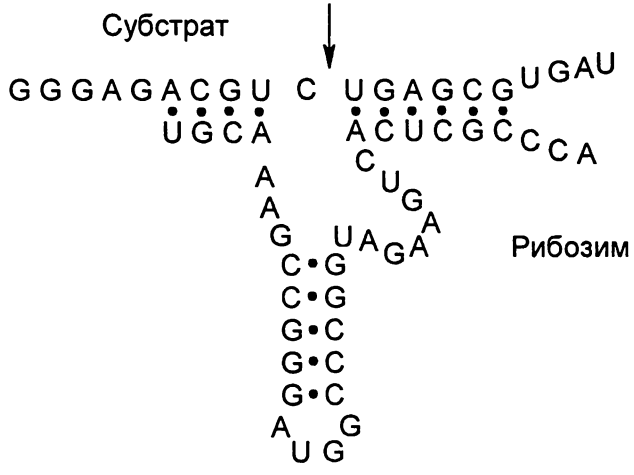


Рис. 111. Структура сателлита рибозима вируса преходящей полосатости люцерны с расщепленной петлей между дуплексами III и II

Кроме перечисленных типов, описано еще несколько представителей рибозимов. В начале раздела уже было сказано о полирибонуклеотиде, входящем в состав рибонуклеазы Р, катализирующей гидролитическое отщепление от 5'-конца предшественников тРНК нескольких избыточных нуклеотидов, что необходимо для их превращения в функционально активную тРНК.

Свойствами рибозима, кроме того, обладает РНК вируса гепатита δ. Получены также данные, что при биосинтезе белков на рибосомах последние функционируют как рибозим.

Открытие рибозимов стимулировало целый ряд исследований с целью выяснения возможности катализировать реакции другого типа с помощью РНК-катализаторов. Так как структурные мотивы, обладающие каталитическими свойствами, оказались довольно разнообразными, для их выявления был широко использован метод селекции *in vitro*, рассмотренный в § 12.6.

Открытие рибозимов вызвало серьезный интерес у ученых, занятых вопросами происхождения жизни. До открытия рибозимов, когда преобладала точка зрения, что катализаторами могут быть только белки, возникал вопрос: что же появилось раньше – нуклеиновые кислоты, которые были необходимы для передачи из поколения в поколение информации, или белки, которые могли катализировать различные необходимые для развития жизни реакции, в том числе и реакции синтеза новых молекул нуклеиновых кислот, необходимые для сохранения и реализации информации. С открытием рибозимов появилась возможность предположить, что жизнь началась с нуклеиновых кислот, которые наряду с информационной функцией могли служить и катализаторами некоторого набора биохимических процессов. Белки могли появиться на более поздних этапах эволюции.

В частности, должны были существовать рибозимы, катализирующие образование новых молекул нуклеиновых кислот, без чего невозможно размножение генетического материала. Поэтому некоторые исследователи, работающие над созданием рибозимов разной специфичности, задались целью получить рибозимы, способные к образованию новых межнуклеотидных связей. В качестве успешной попытки можно привести пример создания рибозима, способного соединять в полинуклеотидах ОН-группу одного олигонуклеотида и α-фосфатный остаток нуклеозидтрифосфата, находящегося на 5'-конце второго олигонуклеотида. Схема эксперимента приведена на рис. 112.

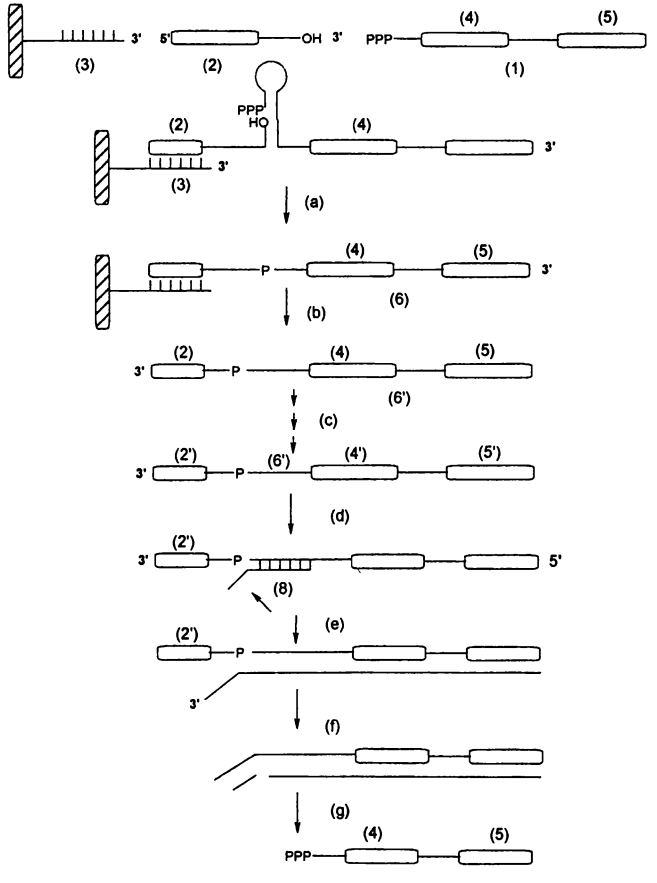


Рис. 112. Схема создания рибозима, катализирующего образование межнуклеотидных связей. Цифры без штрихов относятся к молекулам РНК, со штрихами – к молекулам ДНК

Исходная конструкция состояла из двух молекул РНК (1) и (2). РНК (1) была объектом селекции и служила донором фосфата для образуемой новой фосфодиэфирной связи. РНК (2) с 3'-концевой ОН-группой служила акцеп-

тором фосфатного остатка и могла быть связана с олигонуклеотидом (3), комплементарным 5'-концу РНК (2), иммобилизованным на нерастворимом носителе. РНК (1) содержала рандомизованную последовательность (4), (в описываемой работе 230 нуклеотидов) и 3'-концевую последовательность (5) определенной структуры, необходимую при последующей процедуре амплификации для связывания одного из праймеров. Молекулу (1) получали транскрипцией соответствующей ДНК, снабженной промотором для транскрипции, с помощью РНК-полимеразы фага Т7. В соответствии с механизмом инициации транскрипции на ее 5'-конце присутствовала трифосфатная группа. РНК (1) и (2) были сконструированы так, что образовывали шпильку, в которой 3'-концевая ОН-группа РНК (2) и трифосфатная группа РНК (1) были сближены. Это создавало благоприятные стерические условия для протекания реакции (**a**) между этими группами с образованием межнуклеотидной связи, сопровождающейся отщеплением пирофосфата. Но, кроме того, для протекания реакции с ощутимой скоростью необходимо было участие катализатора. У РНК (1) среди ее рандомизованных фрагментов оказались структуры, способные катализировать образование межнуклеотидной связи. С их участием происходило образование конъюгатов (**6**), 5'-конец которых составляла молекула (2), и он, тем самым, отличался от 5'-конца не вступивших в реакцию РНК (1). Это дало возможность отделить от них конъюгаты (**6**) путем сорбции на иммобилизованном олигонуклеотиде (3). Этим проводился отбор (селекция) рандомизованных последовательностей олигорибонуклеотидов, обладающих желаемой каталитической активностью. Отобранные конъюгаты десорбировались с носителя (повышением температуры или резким уменьшением ионной силы раствора, стадия (**b**)). Десорбированная РНК (6) подвергалась обратной транскрипции, и полученная кДНК (6') амплифицировалась с использованием ДНК-праймеров, комплементарных 5'-концу РНК (2) и 3'-концу РНК (1) (стадия (**c**)). кДНК и соответственно полученные при амплификации ее многочисленные копии содержали в 3'-концевой части последовательность, кодирующую подвергнутую селекции РНК (1).

Для повторения цикла селекции нужно было путем транскрипции воссоздать РНК (1), но уже прошедшую первую селекцию. Чтобы создать матрицу для такой транскрипции, на стадии (**d**) к ДНК (6') добавлялся праймер (8), состоящий из одной из нитей промотора Т7 РНК-полимеразы и участка, кодирующего 5'-конец РНК (1). Путем репликации этой конструкции на стадии (**e**) получалась частично двунитевая ДНК со свисающим (2') фрагментом. Ее амплификация на стадии (**f**) приводила к двунитевой ДНК, содержащей промотор Т7 РНК-полимеразы и последовательность, кодирующую РНК (1), прошедшую селекцию на каталитическую активность. Транскрипция этой структуры на стадии (**g**) приводила к большому числу молекул РНК (1), но уже предварительно отобранных в результате проведенной процедуры селекции. Образовавшиеся рибозимы можно было далее использовать для повторной селекции. Таким образом был получен рибозим, осуществлявший соеди-

нение РНК (1) и (2) с константой скорости 8 $ч^{-1}$, в то время как с олигонуклеотидами, не подвергавшимися молекулярной селекции, эта величина составляла $3x10^{-6}ч^{-1}$.

Как уже указывалось выше, в природе рибозимы встречаются в качестве фрагментов РНК. В последние годы было установлено, что катализаторы могут быть образованы и в виде молекул ДНК. Такие рибозимы были получены методом молекулярной селекции. Они получили название *ДНК-зимов.* В настоящее время наиболее исследованы два вида ДНК-зимов, катализирующих расщепление РНК. Они обозначаются 8-17 и 10-23. Цифрами указаны раунд амплификации и номер отобранного после этого раунда клона. На рис. 113 приведены каталитические ДНК-мотивы и расщепляемые РНК-фрагменты.

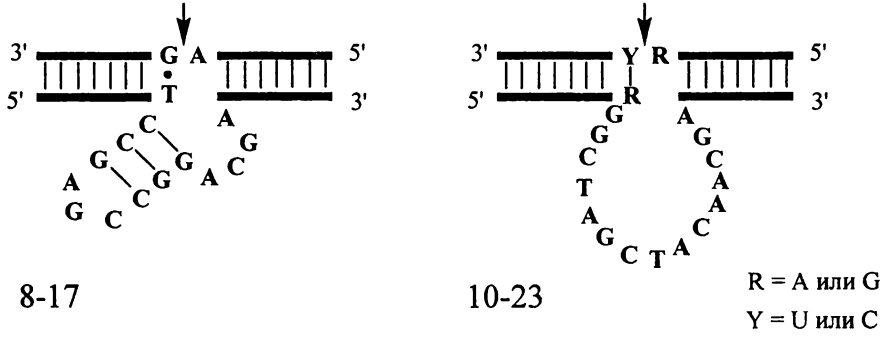


Рис. 113. ДНК-зим (нижняя цепь) комплементарно связывается с РНК-субстратом (верхняя цепь). Расщепление происходит по сайтам, указанным стрелкой

Селекция проводилась с использованием специальной олигонуклеотидной конструкции, содержащей на 5'-конце остаток биотина B, иммобилизованный на носителе, содержащем стрептавидин (рис. 114).

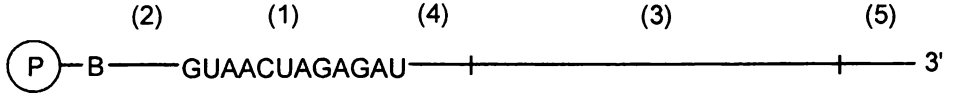


Рис. 114. Полинуклеотидная конструкция для селекции ДНК-зима

Конструкция содержит рибоолигонуклеотид (1), связанный с биотином спейсером (2), рандомизованный ДНК-фрагмент (3) и два олигодезоксирибонуклеотида (4) и (5) для связывания праймеров при последующих раундах амплификации. Те последовательности во фрагменте (3), которые обладают РНКазной активностью, расщепляют РНК-фрагмент и переводят полученные олигонуклеотиды в раствор. Далее они могут амплифицироваться и использоваться в следующем раунде селекции.

Глава 17. Гормоны

§ 17.1. Эндокринная регуляция физиологических процессов. Гормоны и вторичные посредники

В здоровых многоклеточных организмах сбалансированно во времени и в пространстве протекают все запрограммированные биохимические процессы. Делятся клетки, создаются популяции функционально дифференцированных клеток, формируются высокоспециализированные ткани, транслируются образовавшиеся информационные РНК, протекают многочисленные метаболические процессы. Клетки взаимодействуют друг с другом. Живые организмы функционируют в непрерывно изменяющихся условиях и должны реагировать на эти изменения. Для согласованной работы как клеток, так и всего организма в целом должны существовать процессы управления всей поступающей информацией, а также сигнальные вещества, управляющие этими процессами. Все это определило появление разнообразных форм организации межклеточных взаимодействий и механизмов передачи информации или в конечном счете регуляции жизнедеятельности организма, что привело к появлению соединений, выполняющих функции сигнальных веществ, передающих самую разнообразную информацию.

В ходе эволюции в организмах животных сформировались две основные системы, отвечающие за установление строгого порядка, позволяющего сохранить организованность протекающих процессов и целостность живого организма. Это нервная и эндокринная системы.

Основные вопросы, касающиеся формирования и функционирования нервной системы, находятся вне компетенции биоорганической химии и являются предметом физиологии. Некоторые сведения о нервной системе кратко даны в разд. 6.2.2.

Эндокринная система состоит из эндокринных желез (желез внутренней секреции), вырабатывающих специальные вещества, которые разносятся с током крови и лимфы по всему организму и воздействуют на процессы, протекающие в соответствующих органах. Такими специальными веществами, которые играют роль сигналов, посылаемых в определенных физиологических состояниях организма к соответствующим органам-мишеням, но сами не принимают участия в метаболических процессах, являются *гормоны* (от греч. γορμαο – побуждаю к действию).

Эндокринная система большинства позвоночных представлена следующими железами: гипоталамус, гипофиз, надпочечники, поджелудочная железа, щитовидная и околощитовидная железы, половые железы, эпифиз, тимус.

Почки, печень и желудочно-кишечный тракт также содержат клетки, которые можно отнести к эндокринным.

Чтобы действие любого гормона было ограничено во времени, для каждого из них существуют определенные системы, прекращающие их действие.

Химическая структура установлена для всех известных гормонов. По химической природе гормоны можно разделить на три основных класса: стероидные гормоны, гормоны – производные аминокислот и белково-пептидные гормоны. В зависимости от химического строения гормоны могут быть водорастворимыми или жирорастворимыми.

Водорастворимые гормоны не могут пересекать плазматическую мембрану, они связываются на плазматической мембране клеток-мишеней со специфическими рецепторами, вмонтированными в мембрану, и запускают образование *вторичных посредников* (*медиаторов*), которые обеспечивают действие гормонов в клетке (первичный посредник – сам гормон). Среди таких посредников в первую очередь следует назвать *циклический аденозин монофосфат* (cAMP) и *циклический гуанозин монофосфат* (cGMP) (структурные формулы приведены в § 2.1). Эти нуклеотиды опосредуют действие большинства гормонов и нейромедиаторов: пептидных, полипептидных и белковых, а также катехоламинов, гистамина, ацетилхолина и других и регулируют их синтез и секрецию. Под контролем циклических нуклеотидов находятся многие метаболические процессы. Они участвуют в экспрессии генов, росте, дифференцировке и пролиферации клеток. Ускоряя или замедляя перенос ионов через биологические мембраны, циклические нуклеотиды влияют на электрическую активность клетки, на ее сократимость, изменяют свойства сократительных белков и белков цитоскелета, влияя таким образом на подвижность клеток. Важными вторичными посредниками являются также диацилглицерин и 1,4,5-инозиттрифосфат.

§ 17.2. Гормоны – производные аминокислот

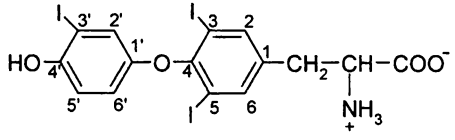
Известны гормоны – производные двух аминокислот – L-тирозина и L-триптофана. Как видно, природа пошла по пути построения сигнальных веществ из готовых предшественников, синтезируемых в живом организме и имеющихся в достаточном количестве, при этом соблюдаются два их основных принципа – многообразие и экономичность.

На основе тирозина построены главные гормоны щитовидной железы. Эта железа является единственным органом, в котором происходит синтез органических соединений, содержащих иод. Фиксация йодидов крови и окисление их до элементарного иода происходит в щитовидной железе при участии пероксидазы (гем-содержащего белка К.Ф. 1.11.1.8) и H_2O_2, катализирующей химическое превращение

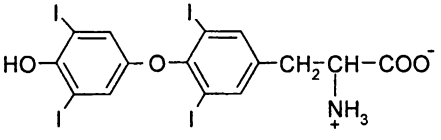
$$H_2O_2 + 2I^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O + I_2$$

Далее элементарный иод (а возможно, и I^+) немедленно реагирует с фенольным кольцом тирозина (в некоторых случаях с имидазольным кольцом гистидина) в составе белка *тиреоглобулина*. Тиреоглобулин содержит около 120 остатков тирозина и служит запасной формой *тиреоидных гормонов*, освобождающихся в результате протеолиза белка.

В основе химического строения тиреоидных гормонов лежит тирониновое ядро, состоящее из двух связанных кислородным мостиком молекул L-тирозина, содержащее 3 или 4 атома йода. Это *3,5,3'-трииодтиронин (Т3)* и *тироксин (3,5,3',5'-тетраиодтиронин, Т4)* – гормоны, обладающие наиболее широким спектром действия.

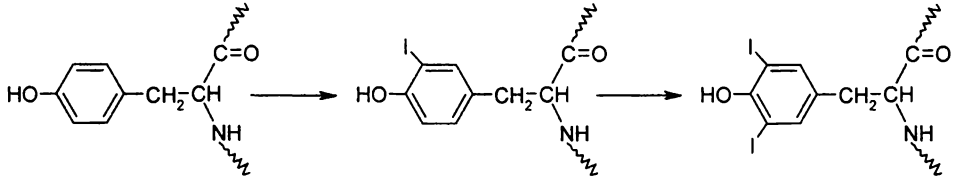


трииодтиронин (Т3)



тетраиодтиронин (Т4)

При их синтезе первоначально в составе белковой молекулы тиреоглобулина образуются моно- и дииодтирозины.



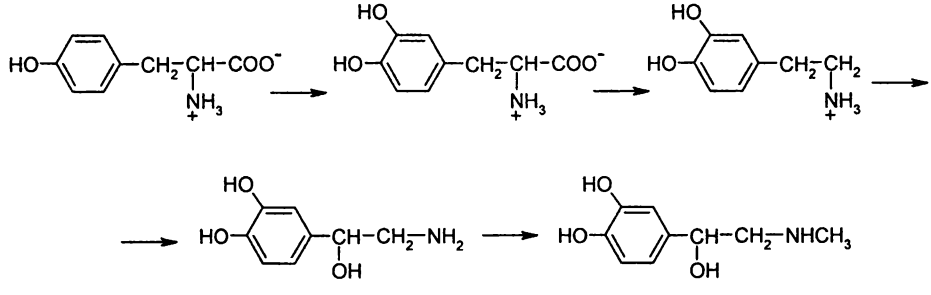
Эффекты тиреоидных гормонов возрастают с повышением их концентрации в крови и в значительной мере зависят от соотношения между Т3 и Т4. При этом Т3 значительно активнее Т4. Тироксин может превращаться в трииодтиронин вне щитовидной железы. Под их контролем находится ряд важнейших биохимических процессов, осуществляющих регуляцию белкового, углеводного, липидного и водно-солевого обмена, энергетические процессы в клетке, рост и дифференцировку клеток и развитие организма. Тироксин и его аналоги способны взаимодействовать с клеточными мембранами, митохондриальными кристами, ядерными компонентами и структурными элементами эндоплазматического ретикулума. Гормоны щитовидной железы, по-видимому, свободно проникают в ядро и там связываются со своими специфическими рецепторами.

В реализации гормонального эффекта тиреоидных гормонов в настоящее время все большее значение придается образующимся при деиодировании высокоактивным I^+ и I^-. Существовало даже мнение, что гормоны щитовидной железы являются лишь носителями (транспортерами) иода – возможно,

самостоятельного специфического регулятора обменных процессов в клетке. Процесс деиодирования тиреоидных гормонов постепенно приводит к полному удалению свободного иода, который быстро окисляется в йодид и экскретируется с мочой.

Тиреоидные гормоны вызывают изменение активности многих ферментов, участвующих в биосинтезе белка, и некоторых других, например, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, т. е. стимулируют метаболические процессы.

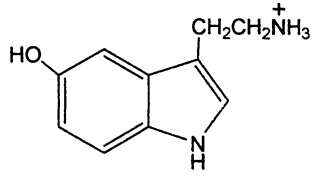
Мозговое вещество надпочечников продуцирует два главных гормона стресса – катехоламины *адреналин* и *норадреналин*, производные 3,4-дигидроксифенилэтиламина, исходным соединением для которых также является тирозин. Образование этих гормонов начинается с дополнительного гидроксилирования фенольного кольца тирозина. Образовавшийся 3,4-дигидроксифенилаланин декарбоксилируется с образованием *дофамина* [2-(3,4-дигидроксифенил)этиламина]. Гидроксилирование 2-метиленовой группы дофамина приводит к норадреналину, а метилирование аминогруппы последнего – к адреналину.



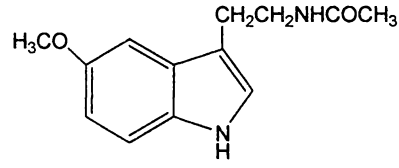
Действие катехоламинов вызывает два ряда эффектов: быстрые и медленно развивающиеся (определяемые как α- и β-адренергические), опосредованные мембранными α- и β-рецепторами, представляющими собой белки, несколько раз пронизывающие мембрану. Адреналин и норадреналин взаимодействуют с внутримембранными липофильными аминокислотными остатками. Именно эти гормоны ответственны за перестройку метаболических процессов, направленную на мобилизацию жизненных ресурсов при стрессах: поставляют жирные кислоты – основные энергетические молекулы для мышечной активности, глюкозу – источник энергии для мозга, понижают концентрацию инсулина. Эти гормоны проводят перестройки многих сложных процессов: увеличивают частоту и силу сердечных сокращений, повышают снабжение всех органов кислородом и т. д.

Модификация аминокислоты триптофана приводит к синтезу *мелатонина* – гормона эпифиза и ряда периферических органов. По химической структуре это N-ацетил-5-метилгидрокситриптамин.

В ходе синтеза непосредственным предшественником мелатонина является *серотонин* – 5-гидрокситриптамин, негормональное производное триптофана, однако обладающее разнообразным биологическим действием. Он является регулятором сна и имеет отношение к болевым ощущениям при воспалительных процессах.



серотонин



мелатонин

§ 17.3. Белково-пептидные гормоны

Белково-пептидные гормоны – наиболее многочисленные по физиологическим функциям и по числу секретирующих их желез, как правило, образуются путем процессинга (последующего внерибосомального превращения) белковых предшественников. Такие белки-предшественники называются прогормонами. В большинстве случаев первоначально синтезируются предшественники прогормонов – *препрогормоны*. Приставкой «пре» обозначают наличие у синтезируемого предшественника на N-конце специальной сигнальной последовательности, с помощью которой определяется внутриклеточная локализация прогормона. Некоторые гормоны и нейромедиаторы могут образовываться из общего белкового предшественника. Это играет важную роль в проявлении их биологического действия, так как индукция или репрессия синтеза белкового предшественника приводит к усилению или подавлению синтеза ряда гормонов. Например, из гормона β-липотропина, состоящего из 91 аминокислотного остатка, образуется по крайней мере 6 пептидных гормонов, состоящих из аминокислотных остатков липотропина 1-58, 41-58, 61-91, 61-77, 61-76 и 61-65.

В поджелудочной железе происходит синтез пептидного гормона *инсулина* (строение человеческого гормона приведено на рис. 75, глава 10).

Этот гормон стимулирует превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат, который далее превращается в гликоген – основное депо глюкозы у животных. Таким способом регулируется уровень глюкозы в кровяном русле. Избыток глюкозы приводит к тяжелому заболеванию – диабету, который до открытия инсулина уносил бесчисленное количество жизней. Открытие инсулина в 1922 году Фредериком Бантингом и введение в медицинскую практику еже-

дневных инъекций инсулина больным диабетом было одним из самых выдающихся достижений практической медицины.

Противоположный процесс – усиление фосфорилирования гликогена с образованием глюкозо-6-фосфата – стимулируется другим полипептидом – *глюкагоном*, который является 29-звенным линейным пептидом. Человеческий гормон имеет структуру

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A G D F V G W L M D T

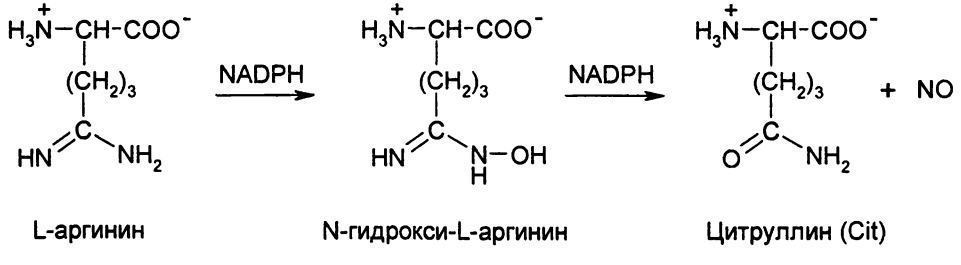
Как видно, большинство соединений, участвующих в процессах регуляции в качестве гормонов или медиаторов, имеют довольно сложную химическую структуру. Но в последнее десятилетие произошло важное событие: выяснилось, что такая простая по своему химическому строению молекула, как *окись азота* (NO), является соединением, функционирующим в центральной и вегетативной нервной системе. Она непрерывно продуцируется ферментативным путем в организме животных и человека. Стало ясно, что NO имеет универсальное значение для биосистем. За исследование биологической роли NO в 1998 году группе ученых во главе с Р. Фурчготтом, была присуждена Нобелевская премия по биологии и медицине

§ 17.4. Гормональные функции окиси азота

Окись азота образуется из концевого атома азота гуанидиновой группы аминокислоты L-аргинина под действием специфического NADPH-зависимого фермента NO-синтазы через промежуточный интермедиат N-гидрокси-L-аргинин, который взаимодействует с молекулярным кислородом и приводит к образованию *цитруллина* (Cit) и окиси азота.

Суммарное уравнение катализируемой NO-синтазой реакции включает 5-электронное ($N^{3-} \rightarrow N^{2+}$) окисление атома азота аргинина, сопряженное с окислением NADPH.

$$2Arg + 3NADPH + 4O_2 + 3H^+ \rightarrow 2Cit + 2NO + 3NADP^+ + 4H_2O$$



Окись азота ядовита, поскольку обладает неспаренным электроном, т. е. является свободным радикалом, и поэтому высоко реакционноспособна. NO оказалось соединением, относящимся к принципиально новой группе нейромедиаторов, отличающихся от всех известных ранее. Вещество, считавшееся ядом, оказалось незаменимым компонентом в функционировании организма человека и животных. Доказано, что NO вызывает в клетках-мишенях активацию гуанилат-циклазы, катализирующей превращение GTP в циклогуанилат. Уникальность этого медиатора состоит в том, что он синтезируется по мере надобности и, выделяясь из клетки, диффундирует в соседние нейроны. Связываясь со своим внутриклеточным рецептором – атомом железа гема в активном центре гуанилатциклазы, NO вызывает конформационные изменения в этом ферменте и его активацию, ведущую к увеличению концентрации внутриклеточной cGMP. Последний стимулирует фосфорилирование ряда белков клетки.

Увеличение концентрации cGMP – главный механизм, лежащий в основе эффекта сосудорасширяющего действия NO при сердечно-сосудистых нарушениях (при приеме нитроглицерина образуется именно окись азота, являющаяся действующим началом, приводящим к расслаблению мышц).

Нейромедиаторные свойства NO исследовались на рецепторах глутамата, обладающих особенно высоким сродством к N-метил-D-аспартату. Глутамат обеспечивает синаптическую передачу нервного импульса на уровне рецепторов, вызывая открытие ионных каналов, через которые ионы Ca^{2+} проходят внутрь клетки, где связываются с белком кальмодулином, который в свою очередь активирует NO-синтазу.

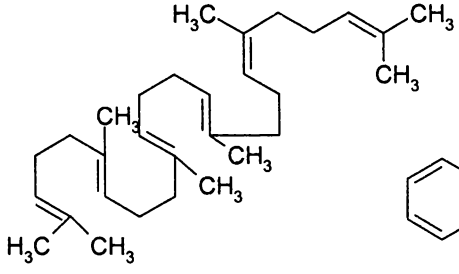
Таким образом, окись азота – это небольшое короткоживущее соединение, участвующее в регуляции многих жизненно важных процессов, таких как контроль сосудистого тонуса, функционирование тромбоцитов, неспецифический иммунный ответ, и являющееся важнейшим нейромедиатором.

§ 17.5. Стероидные гормоны

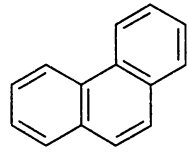
Вторая группа по механизму действия – это жирорастворимые, т. е. гидрофобные, гормоны. После секреции они связываются с транспортными белками крови и транспортируются к соответствующим органам. Далее свободный гормон за счет своей гидрофобности может попасть в различные клетки, но только в клетке-мишени связывается со своим рецептором, находящимся в цитоплазме или ядре. Связывание гормона с внутриклеточным рецептором вызывает определенное действие, которое и составляет гормональный ответ. Эта группа гормонов представлена *стероидными гормонами*, которые образуются из холестерина (см. § 14.4). Они относятся к неомыляемым липидам.

Структурной основой молекул всех стероидных гормонов является циклопентанпергидрофенантреновая система (как правило, модифицированная), содержащая четыре кольца с тремя нелинейными сочленениями, т. е. являю-

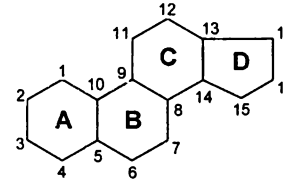
щаяся полициклическим соединением, производным тритерпена сквалена – общего предшественника всех стероидных гормонов. Кольцам этой системы присвоены обозначения A, B, C и D, а атомам этой системы – определенные номера.



сквален

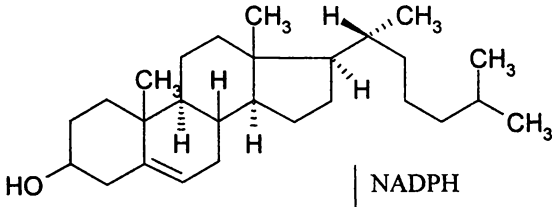


фенантрен



эстран (пергидроциклопентанофенантрен)

Как уже говорилось, благодаря своей липофильности стероидные гормоны, секретируемые клетками эндокринных желез, легко проходят через плазматические мембраны и свободно проникают внутрь клеток. Синтез стероидных гормонов осуществляется из общего липидного предшественника холестерина, структура которого приведена в § 14.4. Большая его часть содержится в эндокринных железах в форме эфиров с жирными кислотами в виде липидных капель, локализованных в цитоплазме. Эти липидные капли представляют собой депо холестерина, откуда он может быть мобилизован с помощью специфических ферментов. Биосинтез стероидных гормонов осуществляется сложной многостадийной ферментативной системой последовательных реакций гидроксилирования (ферменты гидроксилазы или оксидазы) и дегидрогенизации. Эта система приводит к образованию минералокортикоидов (альдостерон) – гормонов, поддерживающих водно-солевой баланс, и глюкокортикоидов (кортикостерон и кортизол), способствующих протеканию глюконеогенеза, т. е. синтезу глюкозы из продуктов катаболизма углеводов, а также к андрогенам и эстрагенам – мужским и женским половым гормонам. Лимитирующим этапом биосинтеза всех стероидных гормонов является переход холестерина в митохондрии, и его превращение в *прегненолон* с практически полным отщеплением боковой цепи в виде изокапронового альдегида.

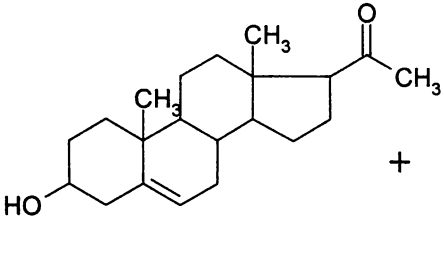


холестерин (C27)

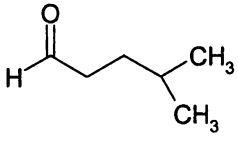
NADPH
O_2

NADPH
O_2

лиаза



+

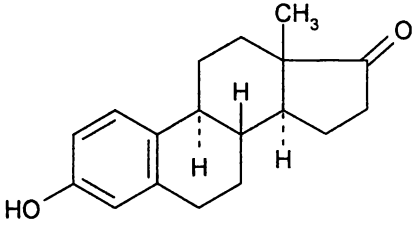


Δ^5–прегненолон

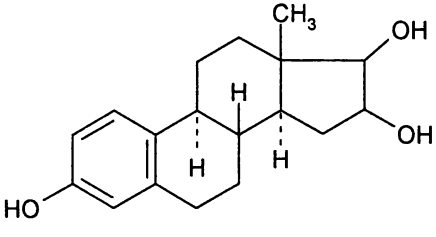
изокапроновый альдегид

Установление строения холестерина было завершено в 1934 году, а в 1951 году Роберт Вудворд осуществил химический синтез холестерина, включающий 45 стадий, что окончательно подтвердило его структуру.

Главные женские половые гормоны – эстрагенные гормоны *эстрон* и *эстрадиол*. У них кольцо А имеет ароматическую структуру и 3-β-OH группу, а также гидрокси- или кетогруппы в положении 17. Наиболее активным гормоном является эстрадиол.



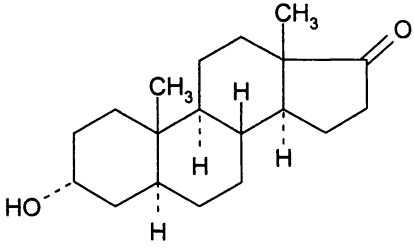
Эстрон



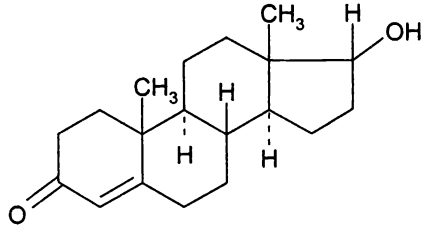
Эстрадиол

Андрогенные гормоны (от греч. ανδροξ – мужской) *андростерон* и *тестостерон* – главные мужские половые гормоны, в структуре которых в по-

ложении 3 и 17 находятся гидрокси- и кетогруппы. Введение в организм таких соединений при нарушении гормонального обмена приводит к восстановлению вторичных половых признаков, а их недостаток – к атрофии скелетной мускулатуры и другим расстройствам и нарушениям метаболизма.

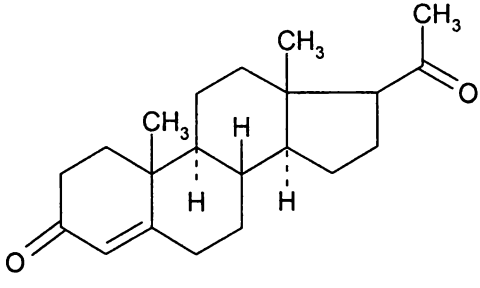


Андростерон



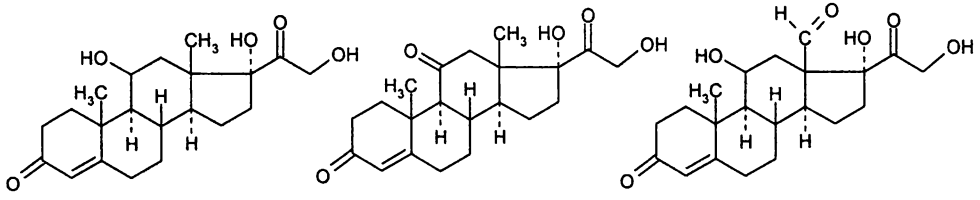
Тестостерон

Прогестерон – представитель гестагенных стероидных гормонов или прогестинов – связан с функцией яичников, необходим для зачатия и нормального протекания беременности.



Δ^4-прогестерон

Кортикоиды – гормоны коры надпочечников, абсолютно необходимые для жизни высших животных, участвуют в регуляции обмена углеводов и белков. Для них характерна кетогруппа в положении 3, двойная связь между 3 и 4 углеродными атомоми в А-кольце и гидроксиацетоновый остаток в положении 17, а также кето- или гидроксигруппа в положении 11. Кортикоиды представлены двумя группами. Это глюкокортикоиды (*кортизол, кортизон* и др.), принимающие участие в регуляции углеводного обмена. При нарушении их функции развивается сахарный диабет, нарушается метаболизм гликогена. И вторая группа – минералокортикоиды, одним из представителей которых является *альдостерон*, участвующий в регуляции водно-минерального обмена.



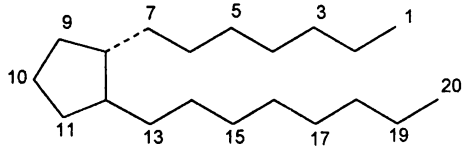
Кортизол Кортизон Альдостерон

Получен также целый ряд синтетических аналогов стероидных гормонов, проявляющих гормональную активность и являющихся лекарственными препаратами.

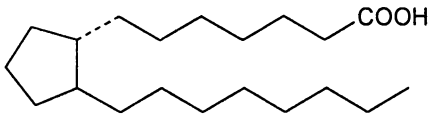
§ 17.6. Простагландины

Среди представителей внутриклеточных регуляторов исключительно важную роль играют *простагландины*. Свое название они получили в связи с тем, что открывший их в семенной жидкости Ульф фон Эйлер считал, что они образуются в предстательной железе (prostatic gland). Впоследствии они были обнаружены почти во всех тканях млекопитающих, и было установлено, что они обладают широким спектром физиологического действия: снижают кровяное давление, стимулируют гладкую мускулатуру кишечника и матки, вызывают воспалительные процессы и повышение температуры. Установление структуры и осуществление ферментативного синтеза простагландинов ускорило биологические испытания этих соединений и доказательство их роли как внутриклеточных гормонов.

Было показано, что они синтезируются во всех органах и тканях из арахидоновой кислоты – ненасыщенной жирной кислоты, содержащей 20 углеродных атомов, в результате действия ферментативной системы, осуществляющей сложный многостадийный процесс. Природные простагландины можно рассматривать как производные гипотетического углеводорода простана или соответствующей ему *простановой кислоты*:



простан



простановая кислота

Они отличаются между собой главным образом положением двойной связи и кислородсодержащих заместителей в циклопропановом кольце. Их различают латинскими буквами и находящимися при них индексами.

Первичной реакцией образования простагландинов является одновременное присоединение к арахидоновой кислоте двух молекул кислорода, образование эндоперекиси, изомеризация углеродного скелета и восстановление гидроперекисной группы до гидроксигруппы с образованием лабильного промежуточного простагландина H (PGH). Фермент эндопероксидпростагландинсинтаза (EC 1.14.99.1) или H-синтаза (PGH-синтаза) катализирует как реакцию циклооксигенирования, так и реакцию восстановления гидроперекисной группы. Конечным продуктом этой реакции является простагландин H. Образование же простагландинов той или иной структуры осуществляется на следующем этапе под действием органоспецифических ферментов, превращающих PGH в специфический для данного органа простагландин. Схема процесса и структуры некоторых образующихся из PGH простагландинов представлены на рис. 115.

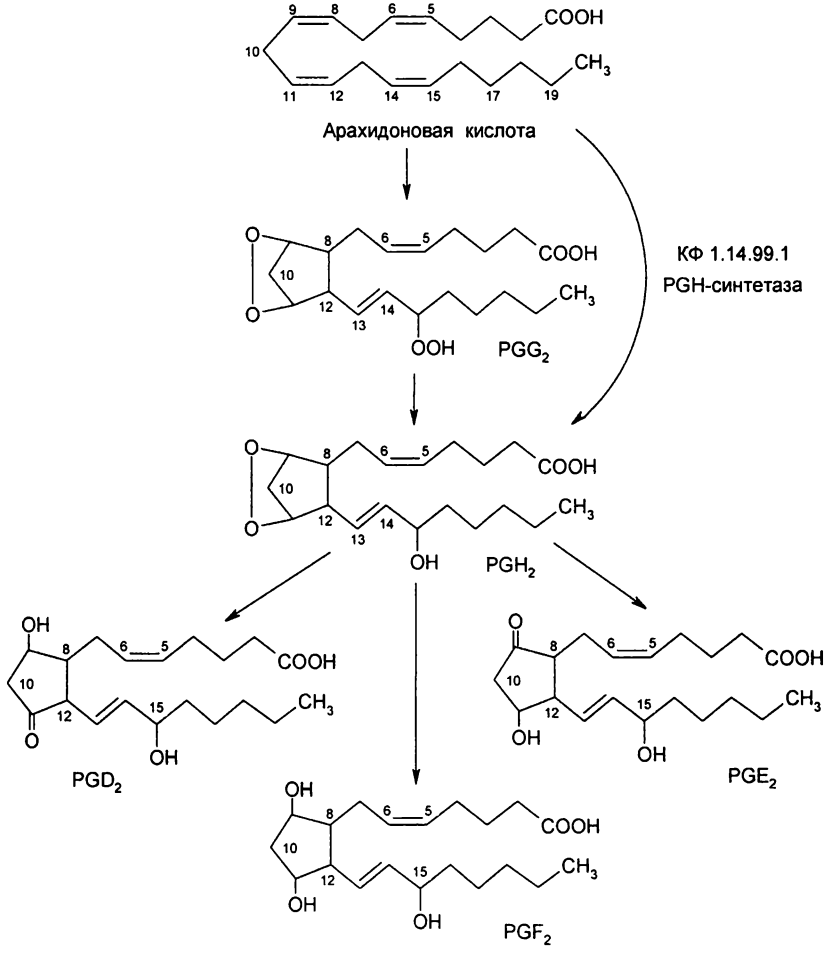


Рис. 115. Схема синтеза простагландинов в клетках животных и человека

Глава 18. Витамины

§ 18.1. Витамины и их биологическое значение

Основными органическими питательными веществами для многоклеточных животных, в том числе и человека, являются белки, жиры и углеводы. Белки, как продукты питания главным образом необходимы как источники аминокислот, из которых по программам, заданным потребляющим их организмом, строятся все необходимые ему белки. Окисление жиров и углеводов является основным процессом, обеспечивающим энергетические потребности организма. Систематическое поступление этих веществ в достаточных количествах – необходимое условие роста, развития и функционирования организмов.

Но кроме этих веществ животным организмам в небольших количествах требуются некоторые другие низкомолекулярные вещества, не использующиеся в качестве источника энергии и не являющиеся структурными компонентами различных тканей и органов. К числу таких веществ относится большая группа соединений, объединяемых под общим названием витамины.

Витамины – это низкомолекулярные соединения, необходимые для нормального протекания метаболизма в очень малых количествах. Некоторые из них у ряда животных могут в достаточном количестве производиться самими организмами или присущей им микрофлорой. Но в большинстве случаев они должны поступать с пищей.

Как по структуре, так и по выполняемым функциям витамины чрезвычайно разнообразны, и термин носит собирательный характер. Одной из основных функций витаминов является их роль как коферментов (коферментами обычно называют субстраты, общие для некоторой достаточно широкой группы ферментов), кофакторов или их предшественников. Есть витамины, выполняющие строго специфическую функцию, например, витамин А, участвующий в восприятии светового сигнала.

В зависимости от растворимости в различных полярных и неполярных растворителях витамины делятся на водорастворимые и жирорастворимые. В пределах каждой из этих групп витамины различают, присваивая им буквенные обозначения латинского алфавита и снабжая дополнительно цифровыми индексами.

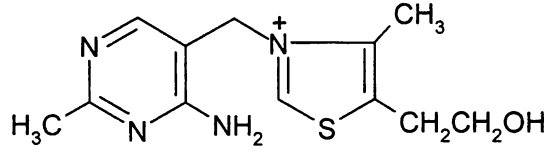
Недостаточное поступление или полное отсутствие в пище некоторых витаминов, нарушение их всасывания или транспорта приводит к негативному изменению протекания биохимических и физиологических процессов, в результате развиваются различные заболевания – *авитаминозы*. Заболевания, обусловленные поступлением водорастворимых витаминов в чрезмерно больших количествах, встречаются редко, поскольку большинство водорас-

творимых витаминов быстро выводится из организма. В то же время избыточное потребление жирорастворимых витаминов (особенно витаминов A и D) может оказаться опасным для жизни.

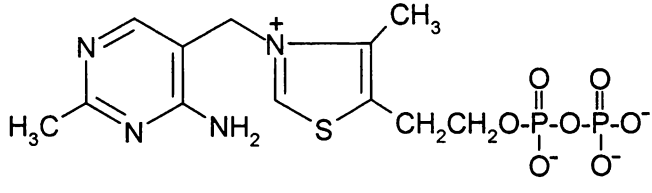
Серьезные проблемы вызывают заболевания, связанные с генетическими нарушениями обмена и функций витаминов. Таким образом, встают вопросы диагностики и лечения различных нарушений обмена и функций витаминов. Открытие витаминов сыграло исключительную роль в профилактике и лечении многих заболеваний.

§ 18.2. Витамины как кофакторы, коферменты и их предшественники

Первым витамином, выделенным в кристаллическом виде, был *тиамин* или *витамин* B_1, молекула которого представляет собой замещенные пиримидиновое и тиазоловое гетероциклы, соединенные метиленовым фрагментом:



Действующей в организме формой является не сам тиамин, а *тиаминпирофосфат*, называемый также кокарбоксилазой:



Он образуется по реакции тиамина с ATP:

Тиамин + ATP → тиаминпирофосфат + AMP

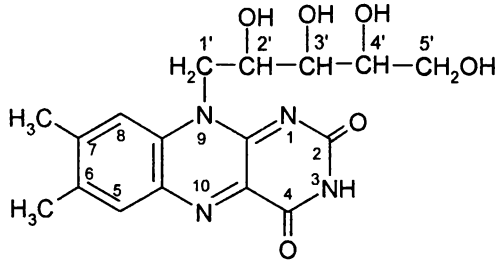
Тиаминпирофосфат – кофактор ферментов, катализирующих реакции окислительного декарбоксилирования α-кетокислот (пирувата и α-оксоглутарата). Механизм окислительного декарбоксилирования, катализируемый тиаминпирофосфат-зависимыми ферментами, рассматривался нами в § 13.4. При декарбоксилировании образуется ацильный остаток, который связывается с атомом серы *липоевой кислоты* (6,8-дитиооктановая кислота),

$$HSCH_2\text{-}CH_2\text{-}CH(SH)\text{-}(CH_2)_5\text{-}COOH$$

которая является кофактором фермента декарбоксилазы и квалифицируется как *витамин N*. Липоевая кислота, строго говоря, является витамином для дрожжей, ряда других микроорганизмов и простейших. Высшие животные способны ее синтезировать. Липоевая кислота в декарбоксилазах ковалентно связана своей карбоксильной группой с аминогруппой остатка лизина апофермента.

Излишнее накопление пирувата и α-оксоглутарата, образующихся при катаболизме углеводов, крайне вредно для организма. В XIX и начале XX века в Юго-Восточной Азии широкое распространение получило заболевание бери-бери (от сингальского beri – слабость), для которого характерны неврологические расстройства и сердечная недостаточность. Болезнь связана с тем, что очищенный (полированный) рис – основной продукт питания в регионе – беден тиамином. Аналогичное заболевание развивается и у домашних кур, получающих в пищу полированный рис. Включение в рацион питания экстракта рисовой шелухи приводит к выздоровлению, так как оболочка риса содержит тиамин. Свежее мясо, молоко и овощи также богаты витамином B_1. При бери-бери содержание пирувата и α-оксоглутарата в крови превышает норму, а транскетолазная активность эритроцитов снижена. Бери-бери иногда встречается при остром истощении у алкоголиков. Оптимальная потребность в витамине B_1 составляет 1,5–2 мг в сутки. Организм человека практически не в состоянии откладывать его про запас, в связи с чем необходимо получать его каждый день.

Витамин B_2 – рибофлавин, в структуру которого входит D-рибитильное производное сложного трициклического соединения *изоаллоксазина* (флавина):



рибофлавин

Рибофлавин легко подвергается обратимому окислению-восстановлению, так как может присоединять два атома водорода к атомам азота N^1 и N^{10}. Это свойство лежит в основе его функционирования в качестве кофактора ферментов оксидаз, механизм действия которой рассматривается в § 16.3. Функциональными производными витамина B_2 являются флавиновые нуклеотиды: монофосфорный эфир рибофлавина (FMN, *флавинмононуклеотид*), а также пирофосфорный ангидрид FMN и аденозинмонофосфата (FAD, *флавинадениндинуклеотид*), которые образуются по реакциям:

Рибофлавин + ATP → Рибофлавин-5'-фосфат (FMN) + ADP

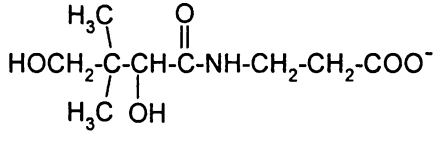
FMN + ATP → FAD + pp_i,

где pp_i – неорганический пирофосфат.

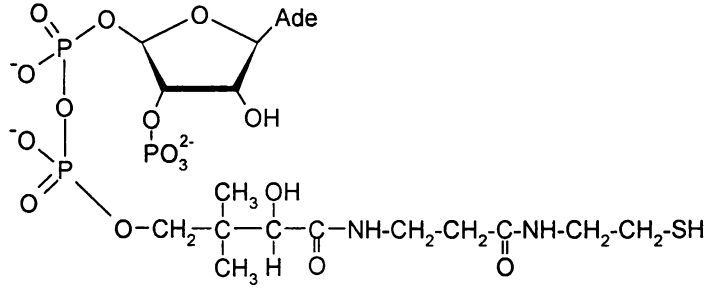
Рибофлавин широко распространен в животных организмах. Основными источниками его являются молоко, печень, яйца и мясо. Достаточно высокие концентрации рибофлавина имеются также в овощах, дрожжах и семенах злаков. Дополнительно он поступает в организм за счет деятельности кишечной микрофлоры.

Чаще всего недостаточность витамина B_2 наблюдается у беременных женщин, растущих детей и людей в состоянии стресса. При недостатке витамина обычно в первую очередь развиваются заболевания кожи (себорея, псориаз), появляются трещины в углах рта, начинается воспаление слизистой оболочки рта, поражение сетчатки и роговой оболочки глаз, а затем проявляется ряд заболеваний кроветворной системы и желудочно-кишечного тракта, мышечная слабость и остановка роста у молодых организмов. Для профилактики авитаминоза и сохранения здоровья человеку требуется потреблять 2–4 мг витамина B_2 ежедневно.

Витамин B_3, или *пантотеновая кислота*, представляет собой α-γ-дигидрокси-β-β'-диметилбутирил-β-аланин:



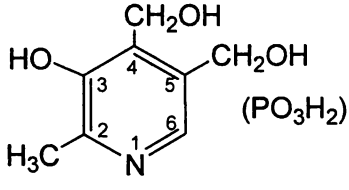
Пантотеновая кислота является частью важнейшего участника процессов ацилирования – *кофермента А* (CoA), в состав которого входят также остатки фосфорилированного по 3'-OH-группе аденозиндифосфата и β-меркаптоэтиламина:



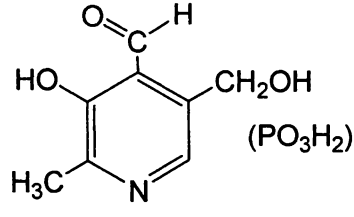
кофермент А

Обычно сокращенно этот кофермент записывают как CoASH, поскольку он функционирует в виде производных, ацилированных по SH-группе. Так, наиболее широко участвующее в метаболизме ацетильное производное записывают как $CoASCOCH_3$. В животных организмах имеется ферментативная система синтеза CoASH из пантотеновой кислоты с участием аденозинтрифосфата (ATP) и цистеина. Кофермент А занимает одно из центральных мест в метаболизме липидов.

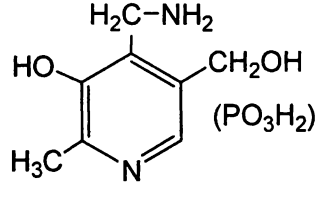
Витамин B_6 объединяет группу соединений – *пиридоксин, пиридоксаль* и *пиридоксамин*. Кофакторные функции выполняют фосфорилированные производные пиридоксаля и пиридоксамина. Известно большое число пиридоксалевых ферментов, катализирующих реакции переноса аминогруппы от аминокислоты на α-кетокислоту, реакции декарбоксилирования с образованием соответствующих аминов и ряд других процессов во всех живых организмах. Механизм пиридоксалевого катализа более детально описан в § 16.4.



пиридоксин (фосфат)



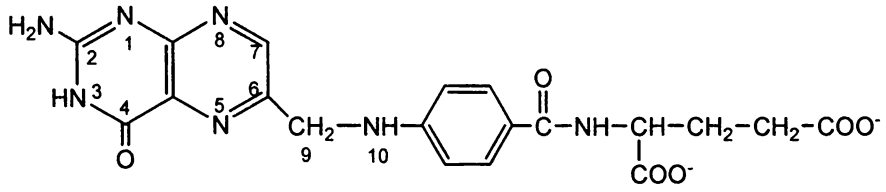
пиридоксаль (фосфат)



пиридоксамин (фосфат)

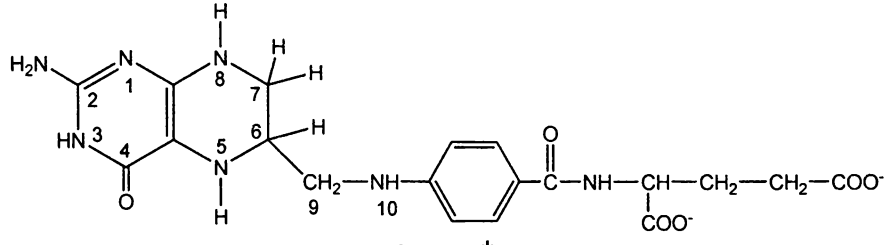
Витамин B_6 содержится практически во всех продуктах питания животного и растительного происхождения, его потребность составляет 0,5–2 мг в сутки. Недостаточность этого витамина у человека возникает редко и обусловлена нарушением его метаболизма, повышенным потреблением белковой пищи, этанольной интоксикацией, туберкулезом.

Витамин B_9, – птероилглутаминовая, или *фолиевая кислота* состоит из гетероциклического соединения птеридина, *п*-аминобензойной кислоты (также являющейся витаминоподобным фактором, B_x или H_1) и L-глутаминовой кислоты:



фолиевая кислота

Фолиевая кислота переходит в свою активную форму – 5,6,7,8-тетрагидрофолиевую кислоту или ее соль *тетрагидрофолат* (THF) при восстановлении птеридинового кольца:



тетрагидрофолат

Это восстановление осуществляется ферментом фолатредуктазой, содержащим в качестве кофермента NADPH.

Тетрагидрофолат способен присоединять по атомам азота N^5 и N^{10} или в виде мостика, связывающего эти атомы, одноуглеродные фрагменты в различных степенях окисления. Поэтому тетрагидрофолат является переносчиком метильной ($-CH_3$), метиленовой ($-CH_2-$), метенильной ($-CH=$), формильной ($-CHO$), формимино ($-CH=NH$) групп в многочисленных синтезах аминокислот и нуклеозидов

Главным процессом, в результате которого THF «заряжается» одноуглеродным фрагментом, является реакция с серином, в результате которой образуется метилентетрагидрофолат и глицин:

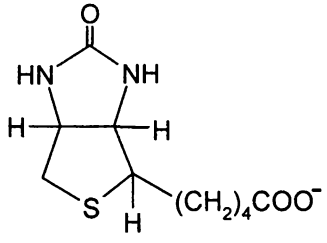
$$HOCH_2CH(NH_3^+)COO^- + THF \rightarrow$$

$$\rightarrow N^5,N^{10}\text{-}CH_2\text{-}THF + NH_3^+CH_2COO^- + H_2O$$

Хотя фолиевая кислота вырабатывается кишечной флорой, ее недостаточность считается наиболее распространенным случаем гиповитаминоза. Ею часто страдают бедные и престарелые люди, а также беременные женщины и новорожденные. Это приводит к гиперхромной анемии, потере веса и общей слабости. В больших количествах фолиевая кислота содержится в зеленых листьях овощей, печени, дрожжах и в мясе, однако при кулинарной обработке пищи она может разрушаться.

В медицине фолиевая кислота применяется для борьбы с заболеваниями кроветворной системы, особенно при анемиях или лучевой болезни, так как она участвует в процессах гемопоэза. При росте злокачественных опухолей (лейкозы, лейкемии) происходит интенсивный синтез нуклеиновых кислот, поэтому для лечения этих заболеваний применяются антагонисты фолиевой кислоты (антивитамины B_9) – аминоптерин и аметоптерин, способные снижать активность фолатредуктазы и тем самым угнетать синтез нуклеотидов и митоз.

Витамин Н (биотин, биос II) представляет собой бициклическое соединение, содержащее в одном кольце фрагмент мочевины, а в другом – атом серы и остаток валерьяновой кислоты, присоединенный к атому углерода цикла:



Биотин является кофактором, карбоксильная группа которого связана амидной связью с ε-аминогруппой одного из остатков лизина апофермента. С участием биотина происходят реакции карбоксилирования различных субстратов, сопряженные с гидролизом АТР, например, карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата, рассматриваемое в § 16.4. Недостаточность этого витамина проявляется при чрезмерном потреблении яичного белка, содержащего белок *авидин*, способный очень прочно связывать биотин (константа связывания порядка 10^{14} M^{-1}) с образованием нерастворимого и нерасщепляющегося в желудочно-кишечном тракте комплекса, что препятствует усвоению биотина. Следует отметить, что в некоторых микроорганизмах имеется белок, аналогичный авидину, с необычно высоким сродством к биотину – *стрептавидин*. В силу этого он нашел очень широкое аналитическое применение в биоорганической химии.

§ 18.3. Витамин B_{12}

Самый сложный по химической структуре – *витамин B_{12}* (*оксикобаламин, антианемический фактор, фактор кроветворения*). За установление его структуры методом рентгеноструктурного анализа Дороти Ходжкин получила Нобелевскую премию (1964 г.).

Молекула витамина B_{12} состоит из трех частей разной химической природы. Первой, планарной, частью молекулы витамина B_{12} является циклическая корриновая система, которая содержит четыре восстановленных пиррольных

кольца, связанных между собой в α-положении тремя одноуглеродными фрагментами и одной прямой C_α-C_α-связью. В центре макроцикла в качестве хелатируемого иона металла находится катион кобальта, который может иметь степень окисления +1, +2 и +3. В пиррольных кольцах имеются заместители – метильные, ацетиламидные и пропионамидные группы. Планарная группа витамина B_{12} является хромофором, вследствие чего его кристаллы окрашены в рубиново-красный цвет, а водные растворы – в светло-сиреневый.

Вторая, перпендикулярная к первой, группа представляет собой α-3'-фосфорибозил-5,6-диметилбензимидазол, один из атомов азота имидазольного кольца которого связан координационной связью с атомом кобальта.

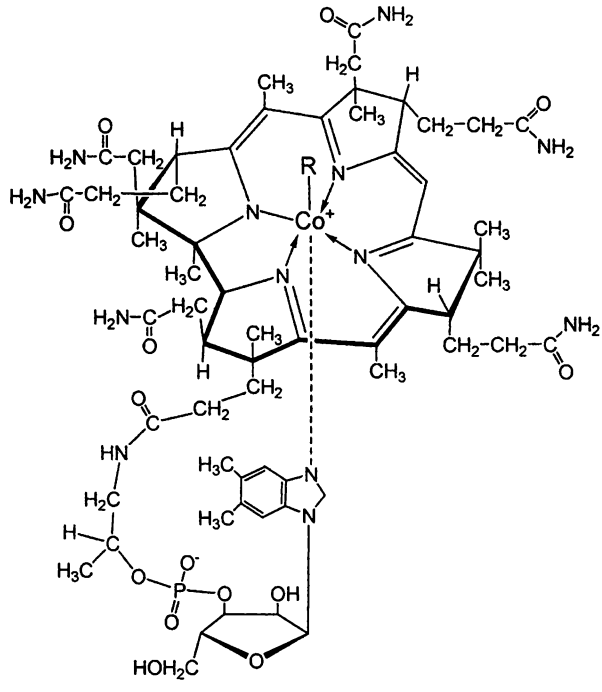
Третья часть – радикал R, в витамине B_{12} (оксикобаламине) это ион OH^- В этом виде витамин в качестве кофактора не участвует и должен присоединить вместо OH^- 5'-аденозильный остаток. Выделяется витамин в виде цианкобаламина, в котором $R = C{\equiv}N^-$ В коферменте 5'-аденозильный остаток соединен с атомом кобальта необычной кобальт-углеродной связью.

В 1970 г. на международном симпозиуме по химии природных соединений в Риге было сообщено о синтезе витамина B_{12}, выполненном совместно группами в Кембридже и Цюрихе. Для синтеза потребовались усилия 99 химиков из 19 стран и 11 лет кропотливого труда.

В организме оксикобаламин превращается в кобаламид с помощью трех последовательных ферментативных реакций. Сначала ион Co^3 в оксикобаламине восстанавливается с помощью NADH до Co^{2+}, затем до Co^{1+}, после чего происходит перенос 5'-дезоксиаденозильной группы от ATP.

К ферментам, использующим в качестве кофактора производные витамина B_{12}, относятся метилмалонил-CoA-мутаза, катализирующая изомеризацию связанного с CoA остатка метилмалоновой кислоты в остаток янтарной кислоты; метилтрансфераза, катализирующая перенос метильной группы от N^5-метилтетрагидрофолата на атом S гомоцистеина с образованием метионина, и некоторые другие.

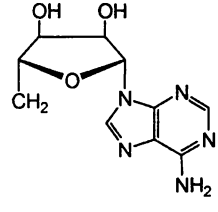
Следует отметить, что витамин B_{12} является единственным витамином, синтез которого осуществляют исключительно микроорганизмы, в особенности анаэробные бактерии. Ни растения, ни животные этой способностью не обладают. Человеку витамин B_{12} полностью поставляется микробной флорой. Суточная потребность для взрослого человека составляет 3 мкг. Недостаток его, обычно связанный с нарушением всасывания через стенку кишечника, приводит к развитию злокачественной анемии. Помимо нарушения кроветворной функции, при дефиците B_{12} наблюдается расстройство деятельности нервной системы. Это заболевание было впервые вылечено скармливанием больным богатой кобаламином полусырой печени.



Витамин B_{12} (оксикобаламин) R = OH

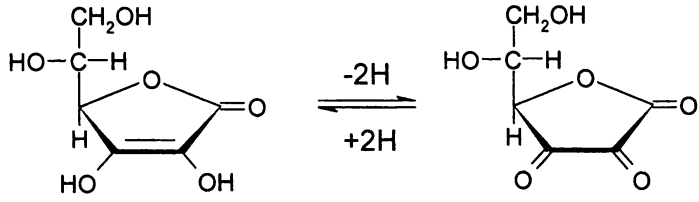
Цианкобаламин R = CN

Кофермент B_{12} (кобамамид) R =



§ 18.4. Витамин С (аскорбиновая кислота)

Одним из важнейших витаминов является *витамин С (аскорбиновая кислота)*, который представляет собой γ-лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. Важнейшим свойством этой кислоты является способность двустадийно переносить два электрона через образование семихинонного ион-радикала как промежуточного продукта между полностью восстановленной и полностью окисленной формами.



Эта способность L-аскорбиновой кислоты легко передавать электроны лежит в основе ее участия в окислительно-восстановительных процессах. Будучи самым сильным восстановителем живого организма, она участвует во многих биохимических процессах транспорта электронов, а образующаяся при этом дегидроаскорбиновая кислота легко восстанавливается обратно специальной редуктазой. Благодаря этому свойству витамин С может взаимодействовать со многими коферментами и кофакторами оксидоредуктаз, такими как NAD, FAD, цитохромы, а также с внутриклеточным восстановителем глутатионом.

Биологические функции витамина С чрезвычайно разнообразны. Одной из них является его участие в формировании коллагена – главного белка соединительной ткани. Важной особенностью этого белка является наличие большого количества гидроксилированных аминокислот – гидроксипролина и гидроксилизина (см. § 7.4). Аскорбиновая кислота является непосредственным гидроксилирующим агентом при их образовании в составе соответствующих белковых предшественников. Нарушение гидроксилирования коллагена приводит к цинге. Это заболевание уносило сотни жизней в крестовых походах и в полярных экспедициях, когда в пище отсутствовало достаточное количество аскорбиновой кислоты.

Аскорбиновая кислота может выступать в качестве гидроксилирующего агента при превращении дофамина в норадреналин и триптофана в 5-гидрокситриптофан. Она участвует также в обмене липидов и ряде других реакций.

Аскорбиновая кислота играет важную роль в защите гемоглобина эритроцитов от окисления и превращения его в метгемоглобин (окисленный гемоглобин, в котором железо находится в трехвалентной форме, неспособной переносить кислород). Аскорбиновая кислота способна непосредственно восстанавливать метгемоглобин, окисляясь при этом в дегидроаскорбиновую кислоту, которая затем восстанавливается сульфгидрильной формой глутатиона. Окисленный глутатион (дисульфидная форма пептида) в дальнейшем восстанавливается с помощью NADH.

Аскорбиновая кислота способствует восстановлению трехвалентного железа в двухвалентное, которое легче всасывается в кишечнике. Всасывание железа обусловлено способностью белка апоферритина связывать Fe^{2+} и превращаться в ферритин, что требует наличия аскорбиновой кислоты и ATP.

Имеются данные о том, что для поступления витамина С в клетки важен переход его в дегидроаскорбиновую кислоту. Последняя диффундирует через

клеточную мембрану без энергетических затрат, в клетке же она быстро восстанавливается в аскорбиновую кислоту. Поэтому есть основания считать, что транспортной формой витамина С является дегидроаскорбиновая кислота.

Наличие витамина С в продуктах питания необходимо для человека и животных из отряда приматов, морской свинки и некоторых других. У представителей этих видов отсутствуют ферменты глюкуроноксидаза и гулоноксидаза, катализирующие биосинтез аскорбиновой кислоты из углеводов. Остальные животные и, вероятно, все растения могут синтезировать ее из глюкозы.

Витамин С – один из наиболее широко распространенных в природе витаминов. Главным его источником являются свежие овощи и фрукты, но довольно много его и в животных тканях. Суточная потребность в витамине С составляет 75 мг, однако некоторые исследователи (например, дважды Нобелевский лауреат Лайнус Полинг) склонны считать, что желательны существенно большие дозы вплоть до 1–1,8 г ежедневно.

В медицине аскорбиновая кислота применяется не только для лечения цинги, но и при геморрагических диатезах, кровотечениях, ряде инфекционных и иммунных заболеваний, для нормализации липидного обмена при атеросклерозе, усиленном физическом и умственном напряжении, простуде, а также при химиотерапии рака.

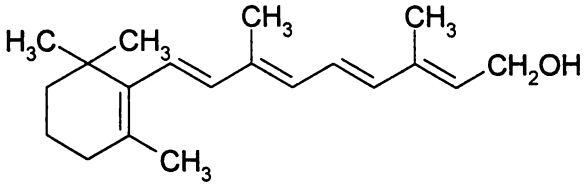
§ 18.5. Жирорастворимые витамины

Большая группа витаминов представлена жирорастворимыми веществами. К ним относятся витамины A, D, E и K, представляющие собой маслянистые, плохо растворимые в воде вещества. В их основе лежат остатки пятиуглеродного углеводорода *изопрена:*

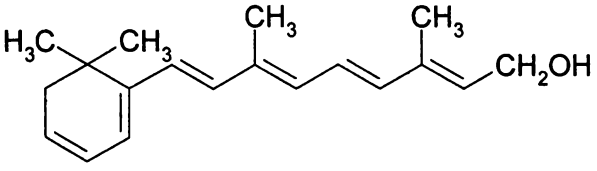
$$CH_2{=}C(CH_3){-}CH{=}CH_2$$

Жирорастворимые витамины могут запасаться в организме в больших количествах, поэтому их отсутствие в пище не проявляется на физиологическом уровне в течение достаточно долгого времени.

Витамин А (*ретинол, аксерофтол, антиксерофтальмический фактор*) известен в трех формах: витамин A_1, выделяемый из печени морских рыб; A_2, выделяемый из печени пресноводных рыб, и 11-*цис*-изомер витамина A_1 (*неовитамин* А). По химическому строению они представляют собой шестичленные ненасыщенные циклы, связанные с углеводородным радикалом, построенным из нескольких изопреновых единиц:



Ретинол (витамин A_1)



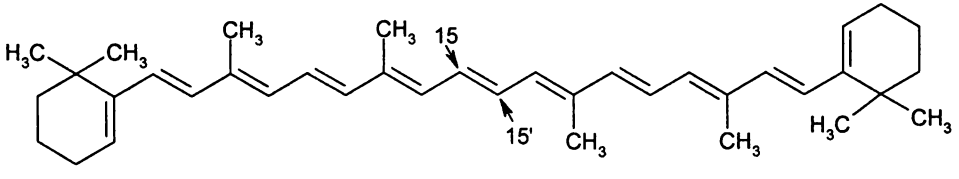
Витамин A_2

Витамин A_1 является полностью *транс*-ретинолом, витамин A_2 – дегидроретинолом. В организме группа $-CH_2OH$ витамина A_1 легко окисляется до альдегидной группы, т. е. ретинол превращается в ретиналь. Последний в живых организмах существует в виде 11-*цис*- и полностью *транс*-ретиналя и дегидроретиналя. Наиболее подробно выяснена роль витамина А в функции восприятия светового сигнала (см. § 15.1). Он также участвует в процессах функционирования клеточных мембран.

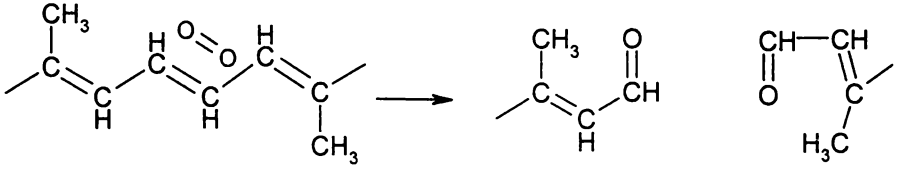
Витамин А содержится в основном в продуктах животного происхождения в виде эфиров уксусной, пальмитиновой или глюкуроновой кислот.

Основными его источниками в растениях являются желто-красные овощи, в которых витамин А присутствует в виде предшественников – *каротинов*, впервые выделенных из моркови. Известны три типа каротинов: α, β и γ, отличающиеся друг от друга по химическому строению.

Наибольшей биологической активностью обладает β-каротин,



при окислительной деструкции которого в организме образуются две молекулы витамина А:

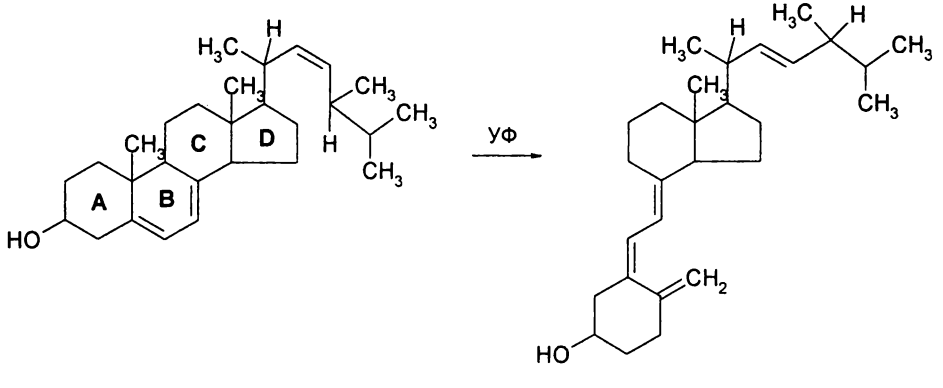


У α- и γ-каротинов одно из шестичленных колец имеет структуру, отличную от структуры витамина A_1, и молекулы этих каротинов при расщеплении дают лишь одну молекулу ретиналя. Суточная потребность в витамине А составляет 2–5 мг β-каротина. Витамин А накапливается в организме в печени, в норме у человека содержится около 20 мг витамина на 100 г ткани. Недостаток ретинола в пище особенно опасен для детей, так как он практически отсутствует у новорожденных. У взрослых ретинол способен накапливаться в печени в значительных количествах.

При гиповитаминозе А в первую очередь страдает зрение и проявляются специфические заболевания: ксерофтальмия (сухость роговой оболочки глаза) и нарушение темновой адаптации – ночная («куриная») слепота; уменьшается устойчивость к инфекциям. У молодых растущих организмов происходит также остановка роста, особенно костей, перерождение эпителиальных клеток («жабья кожа»), клеток надпочечников, эпителия семенников, повреждение тканей центральной нервной системы.

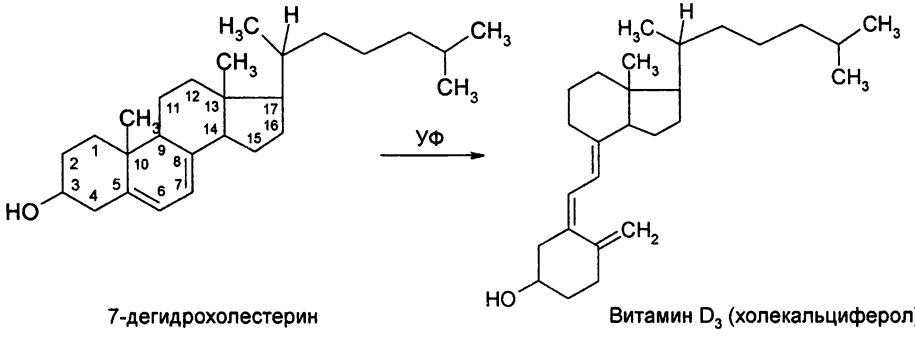
Следует отметить, что гипервитаминоз А тоже приводит к ряду опасных заболеваний, в частности, к ломкости костей. Особенно много витамина А содержится в печени рыб и млекопитающих, обитающих в Арктике. Некоторые исследователи Арктики даже погибали после того, как съедали печень полярного медведя, в которой содержится большое количество витамина А.

Существует несколько соединений, отличающихся по химическому строению и по биологической активности, которые относят к *витаминам D* (*кальциферол*, антирахитичный витамин). В первую очередь это витамины D_2 и D_3. В настоящее время известно еще 4 витамина D (D_4-D_7), но их активность значительно ниже. Предшественником витамина D_2, *эргокальциферола*, является *эргостерин* (первоначально названный витамином D_1), в основе которого лежит та же кольцевая система циклопентанпергидрофенантрена, которая является основой стероидных гормонов. Под действием УФ-облучения эргостерин превращается через ряд промежуточных соединений в эргокальциферол в результате разрыва связи между атомами C^9 и C^{10} В-кольца.



эргостерин Витамин D_2 (эргокальциферол)

Предшественником витамина D_3 (*холекальциферола*) является 7-дегидрохолестерин, при УФ-облучении которого образуется витамин D_3:

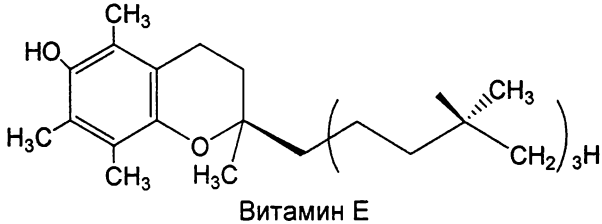


7-Дегидрохолестерин присутствует в коже человека, и для его превращения в витамин D_3 достаточно солнечного облучения, так что суточная потребность в витамине D взрослого человека (7–12 мкг) легко удовлетворяется. Следует отметить, что дозы витамина D свыше 1,5 мг в день крайне токсичны.

Витамины D являются предшественниками стероидных гормонов: 1α-*гидроксихолекальциферола*, 1α,25-*дигидроксихолекальциферола* и других, которые образуются при гидроксилировании витаминов в печени и почках животных и человека. Эти гормоны регулируют всасывание Ca^{2+} в кишечнике, гомеостаз Ca^{2+} в крови, обмен кальция и фосфата, приводящий к построению нормальной костной и отчасти мышечной ткани.

Суточная потребность в витамине D для детей составляет 10–25 мкг в зависимости от возраста, физиологического состояния и соотношения солей фосфора и кальция в рационе. При гипо- или авитаминозе D у детей развивается *рахит*, проявляющийся в размягчении и деформации костей из-за недостаточности в них кальция. Заболевание связано не с нехваткой кальция в пище, а с недостатком гормонов. На ранних стадиях болезни лечение витамином D может исправить деформацию, однако на более поздних стадиях она становится необратимой. При недостаточном воздействии солнечных лучей на кожу необходимо поступление витамина D с жиром печени рыб, где его содержится больше всего, или со сливочным маслом, молоком, яйцами.

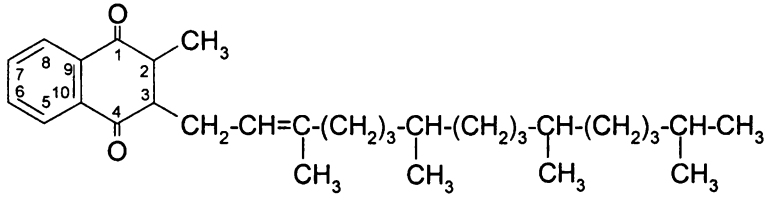
Исследование процесса размножения животных привело к открытию *витамина E*, или *α-токоферола*. Молекула витамина состоит из ароматического кольца и длинной изопреноидной боковой цепи:



Витамин E

На сегодняшний день выделено из растительных масел, а также синтезировано химическим путем 7 различных токоферолов, отличающихся друг от друга числом и расположением метильных групп в бензольном кольце, но все они проявляют значительно меньшую биологическую активность, чем α-токоферол. Токоферолы синтезируются только в растениях. Они содержатся главным образом в зернах пшеницы и риса, маслах (подсолнечном, кукурузном и др.), в зеленых растениях (салат, шпинат). У животных недостаток витамина Е приводит к бесплодию, поражению миокарда и других мышечных тканей, сосудистой и нервной систем. Рекомендуемая ежедневная доза α-токоферола для человека – 10–30 мг. Важнейшей установленной функцией витамина Е является защита полиненасыщенных жирных кислот в липидах мембран от окисления кислородом, которая происходит благодаря способности фенольного гидроксила восстанавливать образующийся пероксидный радикал.

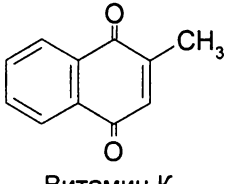
Витамины К – это большая группа витаминов коагуляции или антигеморрагических витаминов (геморрагия – заболевание, связанное с низкой скоростью свертывания крови). К витаминам К относятся соединения структуры 1,4-нафтохинона с изопреноидными боковыми цепями различной длины в положении 3 кольца. Витамин K_1, или *филлохинон* – это производное 2-метил-1,4-нафтохинона, содержащее в положении 3 20-углеродный фитильный радикал:



Витамин K_1 (филлохинон)

Группа витаминов K_2 *(менахиноны)* представляет собой ту же структуру, но содержит боковую цепь длиной от 4 до 9 изопреновых единиц.

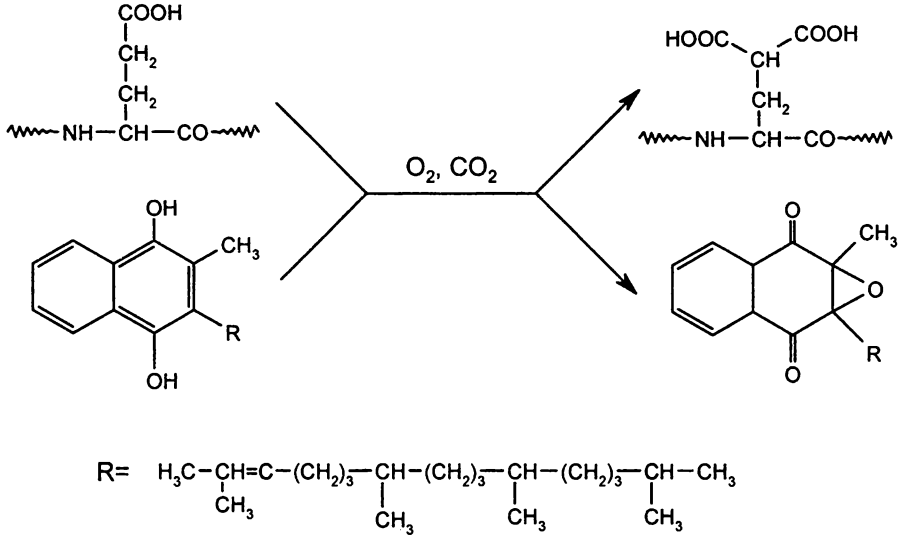
Кроме природных витаминов K_1 и K_2, получено большое число их синтетических аналогов, часто обладающих более высокой биологической активностью. К их числу относится витамин K_3, который вообще лишен боковой цепи:



Витамин K_3

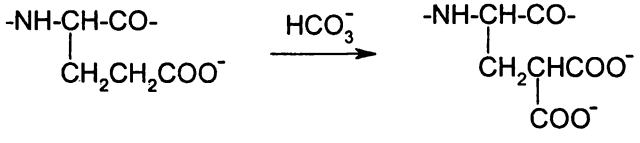
Витамин K_3 является промежуточным продуктом метаболизма остальных витаминов К.

В процессе свертывания крови важную роль играет *карбоксилирование* остатков *глутамата* белка тромбина, ответственного за образование тромба. Реакция катализируется филлохиноном и проходит по механизму, представленному на схеме ниже.



В реакции участвует O_2, по-видимому, служащий источником образования OH^-, который, образуясь вблизи γ-С-Н-связи, облегчает отрыв протона, необходимый для присоединения молекулы CO_2.

Витамины группы К необходимы человеку прежде всего для нормализации или ускорения процесса свертываемости крови. Они участвуют в реакции карбоксилирования остатков глутамата белка плазмы крови *протромбина* с образованием γ-карбоксиглутамата,



который лучше, чем сам глутамат, связывает ионы Ca^{2+}

Это способствует активации протромбина и отщеплению его N-концевого фрагмента, содержащего Ca^{2+}-связывающие участки, с образованием белка *тромбина.* Тромбин является ферментом, превращающим *фибриноген* в *фибрин* – нерастворимый волокнистый белок, способствующий формированию кровяного сгустка.

Витаминами К богаты растительные продукты, особенно зеленые части растений. Для человека потребность в нем определяется величиной порядка

2 мг в сутки, он синтезируется микрофлорой кишечника. Гиповитаминоз К обычно бывает только у новорожденных, у взрослых людей он может быть обусловлен либо дисбактериозом, вызванным применением антибиотиков и сульфамидных препаратов, либо плохим всасыванием из-за недостаточной выработки его эмульгатора – желчи. Витамин К дают новорожденным, а также больным до и после операций на печени или желчном пузыре для поддержания нормального уровня протромбина в крови. Очень большие дозы витамина К токсичны.

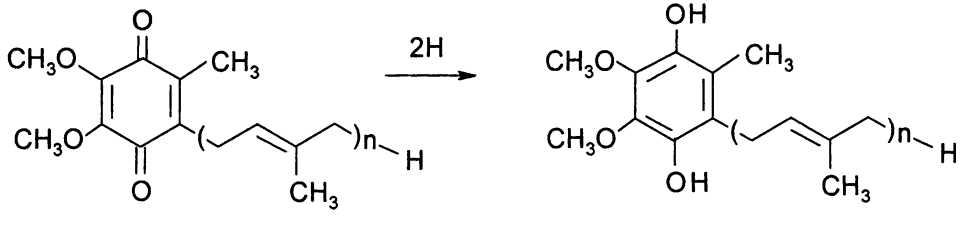
§ 18.6. Витаминоподобные вещества

Нередко к витаминам относят соединения, которые не подпадают под данное в начале раздела определение, поскольку иногда они должны присутствовать в пище в больших, а не в микроколичествах, и принимают непосредственное участие в процессах метаболизма или в формировании клеточных структур. Некоторые из них могут синтезироваться в организме, но не всегда количество их достаточно. Такие вещества называют *витаминоподобными*.

Под названием *витамин F* условно объединяются ненасыщенные кислоты: олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая (см. табл. 20 в § 14.1). Люди должны получать их с пищей, поскольку у млекопитающих нет ферментов, способных катализировать образование двойной связи между девятым и десятым атомами углерода. Основным их источником являются растительные масла, рыба, птица.

Важными витаминоподобными соединениями являются *коферменты Q*, или убихиноны, называемые также *витаминами Q* (Q_6-Q_{10}, цифровой индекс означает количество изопреноидных звеньев в боковой цепи).

Коферменты Q могут находиться в окисленной и восстановленной форме, благодаря чему они участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, в том числе в цепи переноса электронов.



CoQ CoQH$_2$

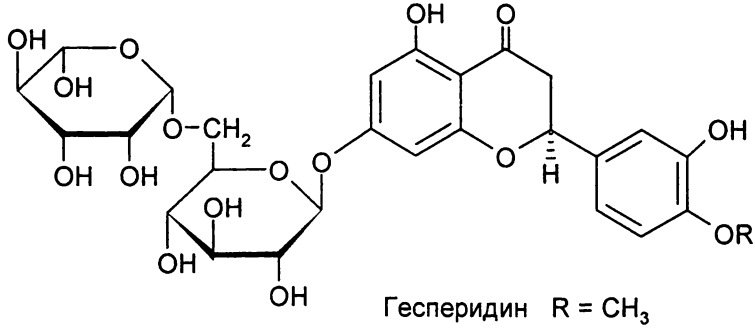
Эти соединения синтезируются микроорганизмами, растениями и животными, а также и в организме человека, но при голодании у детей возникает анемия или изменения в костном мозге, которые снимаются введением убихинонов. Они применяются также в медицине для стимуляции митохондрий миокарда при сердечно-сосудистых заболеваниях и мышечной дистрофии. Подобно токоферолу, но более эффективно, они предотвращают перекисное окисление ненасыщенных липидов.

Витамином B_{13} часто называют *оротовую кислоту* (4-карбоксиурацил), которая является предшественником пиримидиновых нуклеотидов. Она синтезируется из аспартата. Потребность в ней довольно велика (1–1,5 г в сутки). Калиевая соль оротовой кислоты широко используется в медицине при лечении нарушений белкового обмена, для нормализации функций печени, при инфарктах миокарда и других сердечно-сосудистых заболеваниях, а также при длительном применении стероидных гормонов и для ускорения адаптации к гипоксии; кроме того, она является анаболиком.

Витамин B_8, *миоинозит (инозит, биос I, липотропный фактор*, см. § 13.2), широко распространен в тканях животных и растений и необходим для нормального развития животных.

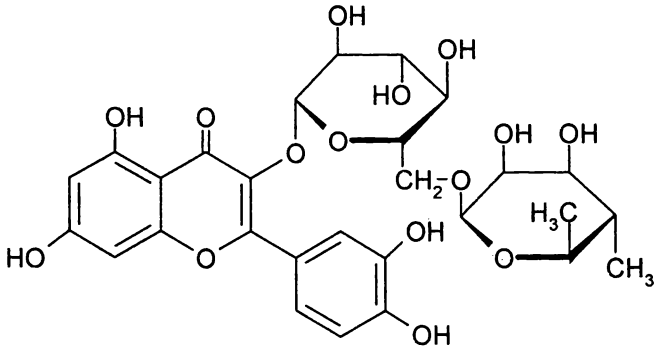
Его недостаток вызывает у мышей алопецию (плешивость), а также дисфункцию нервной системы и желудочно-кишечного тракта. Он принимает участие в окислении жирных кислот. Одна из наиболее важных его функций – использование в синтезе внутриклеточного медиатора – фосфатидилинозитдифосфата. Суточная потребность в нем – около 1 г.

Под витамином Р понимают группу веществ, относящихся к флавоноидам – фенольным соединениям растительного происхождения. Важнейшими из них являются *кверцетин*, *рутин, гесперидин, эриодиктин* и *катехин*. Все они обладают широким спектром биологической активности, в том числе являются антиоксидантами. Эти витамины способны частично снимать остроту авитаминоза С, уменьшая проницаемость и ломкость капиллярных кровеносных сосудов.



Гесперидин R = CH_3

Эриодиктин R = H



Рутин

Кверцетин

Катехин

Они используются при лечении поражений кровеносных сосудов, диатезов, гипертонии, кори, скарлатины, сыпного тифа и т. д.

Из приведенных, далеко не исчерпывающих данных о функциях витаминов видно, что они играют исключительно важную роль в жизнедеятельности животных организмов. Открытие витаминов и введение их в медицинскую практику является одной из важнейших вех в становлении современной медицины.

Глава 19. Антибиотики

§ 19.1. Общие представления об антибиотиках. Принципы их классификации

Антибиотиками называют природные вещества, выделяемые из ряда низших организмов, которые, не обладая токсичностью к их продуцентам, в малых концентрациях избирательно подавляют рост и размножение определенных групп микроорганизмов, а значит, обладают способностью подавлять патогенные микроорганизмы, являющиеся возбудителями различных заболеваний. Первый антибиотик – пенициллин – был открыт в 1928 году А. Флемингом (A. Fleming, Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1945 г.). Флеминг показал, что один из штаммов гриба *Penicillium notatum*, попавший в культуру стафилококков, вызывает их лизис. Позднее были обнаружены штаммы, в 1000 раз более производительные, например, штамм P. Chrysogenum, с которым еще во время войны работала советский микробиолог Зинаида Виссарионовна Ермольева (1898 – 1974). Применение пенициллина во время Второй мировой войны для борьбы с сепсисом сохранило жизнь тысячам раненых и ознаменовало начало новой эры в развитии медицины. В 1945 г. были установлены структуры бензилпенициллина и ряда других антибиотиков этой группы.

Огромные успехи в лечении гнойных заболеваний индуцировали активный поиск новых антибиотиков. В настоящее время выявлено множество антибиотиков, установлена их структура и создано большое число производных, обладающих таким же или даже более эффективным биологическим действием.

Пенициллин, полученные на его основе производные и целый ряд других антибиотиков подавляют размножение микроорганизмов, нарушая процессы образования клеточной стенки или функционирования мембран. Эту группу антибиотиков используют для борьбы с многочисленными бактериальными инфекциями (§§ 19.2, 19.3).

По различию мишеней, на которые действуют бактерицидные антибиотики, их разделяют на *грамположительные* и *грамотрицательные*. Классификация микроорганизмов по этому признаку был введена еще в конце XIX века датским биологом Грамом, и эти группы отличаются способностью окрашиваться анилиновыми красителями. Эти две группы бактерий отличаются в первую очередь толщиной клеточной стенки. У грамотрицательных микроорганизмов клеточная стенка состоит из 1–2 слоев пептидогликана, который составляет порядка 10 % объема клеточной стенки. Однако у них имеется еще дополнительная внешняя мембрана. У грамположительных микроорга-

низмов клеточная стенка состоит из большого числа слоев пептидогликана, составляющего порядка 30–70 % клеточной стенки. Поэтому грамположительные бактерии при промывании окрашенного препарата спиртом не теряют свою окраску, а грамотрицательные – обесцвечиваются.

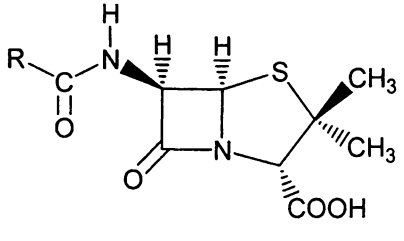
Наряду с этим найдена значительная группа антибиотиков, которые воздействуют на определенные стадии биосинтеза белков и нуклеиновых кислот. Поскольку эти процессы существенны при размножении вирусов и при интенсивном делении клеток, то такие антибиотики могут блокировать развитие вирусной инфекции и неограниченное размножение клеток, в том числе, при росте опухолей (§§ 19.4, 19.5).

Одна из основных проблем при применении антибиотиков для подавления размножения патогенов (вирусов, микроорганизмов и опухолевых клеток) связана с возникновением у них *резистентности* к определенным антибиотикам. Для интенсивно размножающихся клеток, как правило, характерна высокая частота мутаций, некоторые из которых могут привести к потере чувствительности к антибиотику. Поэтому при действии антибиотика подавляется размножение нормальных клеток, но продолжается интенсивное размножение мутантных, нечувствительных к антибиотику, в результате чего лечение становится неэффективным. В этих случаях единственным выходом является смена антибиотика.

Наряду с использованием в терапевтических целях многие антибиотики нашли применение как тонкий инструмент исследования важнейших биологических макромолекул (§ 19.4).

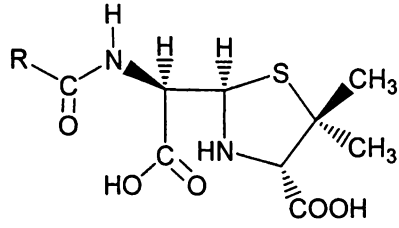
§ 19.2. Антибиотики, ингибирующие синтез бактериальной клеточной стенки

Первый из открытых антибиотиков был пенициллин (бензилпенициллин, пенициллин G). Пенициллины, относящиеся по химическому строению к β-*лактамам*, синтезируются в грибах родов *Penicillium*, *Cephalosporium*, актинобактериях *Streptomyces*, *Nocardia*, бактериях рода *Pseudomonads*. Они содержат в своей структуре 4-членное кольцо – β-лактам. В пенициллинах – это β-лактамтиоазолидиновая система (система пенама), имеющая строго необходимую для биологической активности конфигурацию:



Пенициллин G: R = $C_6H_5CH_2$,
Пенициллин V: R = $C_6H_5OCH_2$

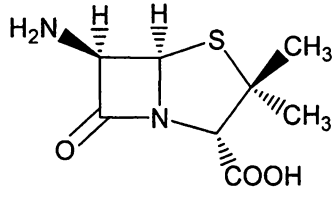
Пенициллины – нестабильные соединения, в щелочной среде происходит расщепление β-лактамного кольца с образованием биологически неактивной *пенициллоиновой кислоты*:



Эта же реакция происходит под действием β-лактамаз, выделенных из устойчивых к пенициллинам штаммов микроорганизмов. Резистентность также может возникать в результате появления в штаммах-мишенях ферментов – ацетилтрансфераз, фосфотрансфераз и аденилтрансфераз, катализирующих специфическую химическую модификацию антибиотика, приводящую к его инактивации.

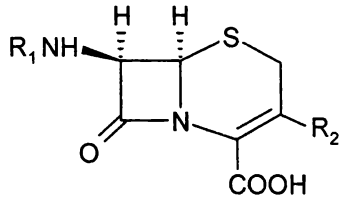
В связи с распространением резистентных штаммов микроорганизмов пенициллины G и V в 1970-х годах практически утратили свое терапевтическое применение.

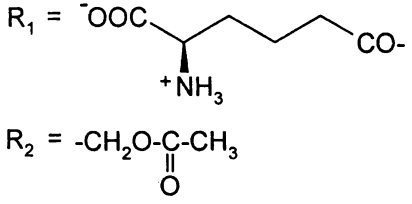
Были разработаны химические и ферментативные методы отщепления остатка фенилуксусной кислоты от бензилпенициллина с образованием *6-аминопенницилановой кислоты*

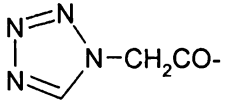
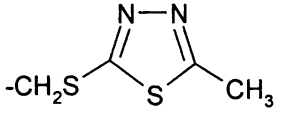


Путем её ацилирования было получено значительное число различных полусинтетических пенициллинов, имеющих, по сравнению с исходным пенициллином, большую активность и устойчивость к β-лактамазам и более широкий спектр действия.

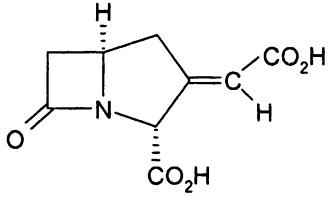
Из экстракта микроорганизма *Cephalosporium acremonium* был выделен антибиотик *цефалоспорин С*, содержащий бициклическую структуру. Сам антибиотик не нашел широкого практического применения, но на его основе были синтезированы производные, обладающие активностью по отношению к резистентным к пенициллинам штаммам бактерий. Наиболее интересны из них *цефазолин, цефацетрил и цефаклор*:



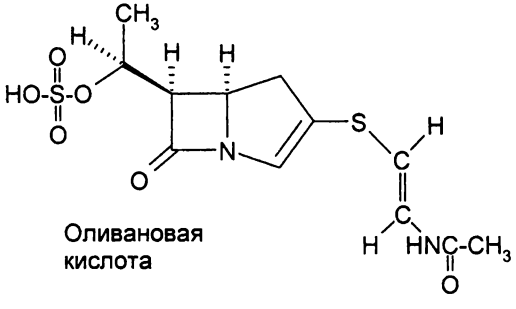


	R_1	R_2
Цефазолин		
Цефацетрил	$N{\equiv}C\text{-}CH_2CO\text{-}$	$-CH_2O\text{-}\underset{\underset{O}{\parallel}}{C}\text{-}CH_3$
Цефаклор	$C_6H_5\underset{\underset{NH_2}{\mid}}{C}HCO\text{-}$	Cl

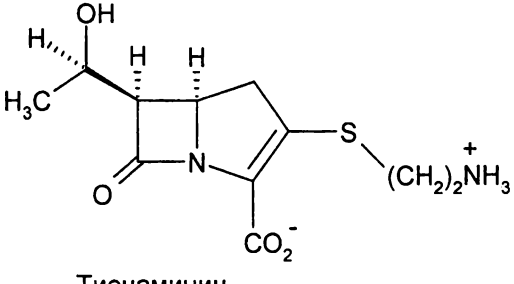
В настоящее время известны и другие β-лактамные антибиотики, содержащие бициклические системы: *клавулановая* и *оливановая кислоты*, *тиенамицин* и *аспареномицины А-С*:



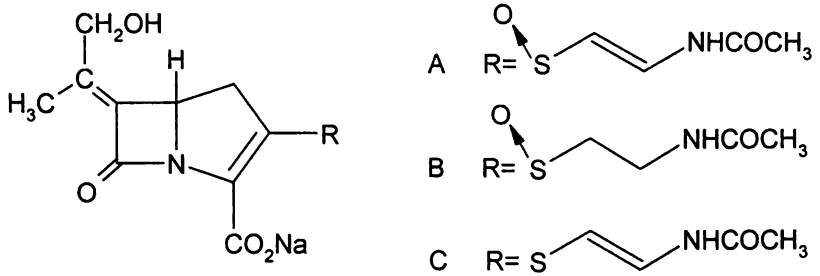
Клавулановая кислота



Оливановая кислота

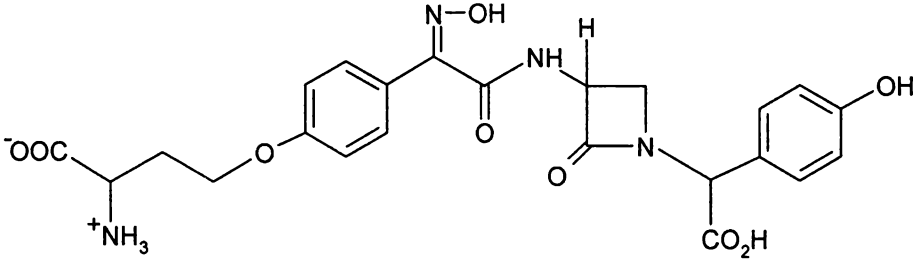


Тиенамицин

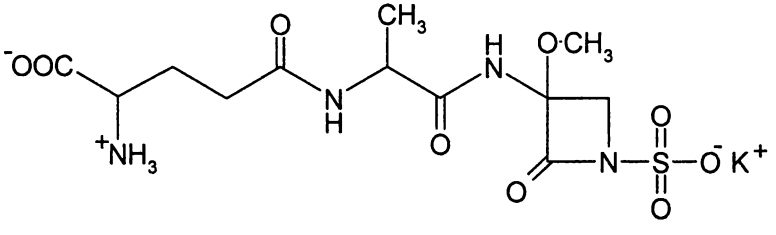


Аспареномицины

Наличие бициклической системы не является обязательным для проявления β-лактамными соединениями биологической активности. Были открыты моноциклические структуры, например, *нокардицин А* и *сульфазецин*.



Нокардицин А

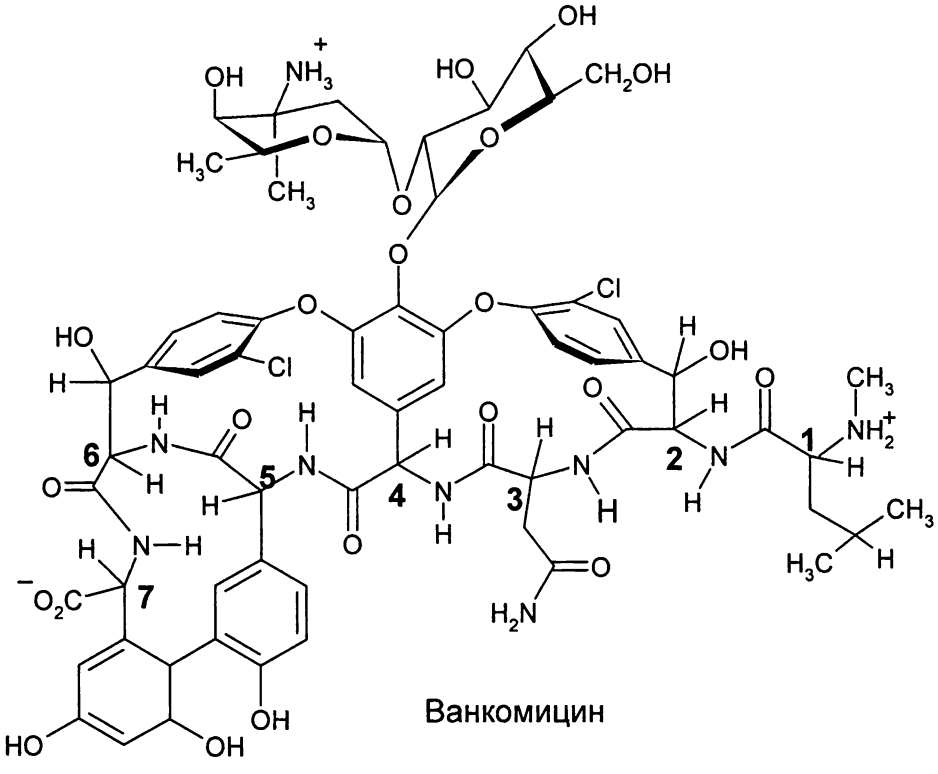


Сульфазецин

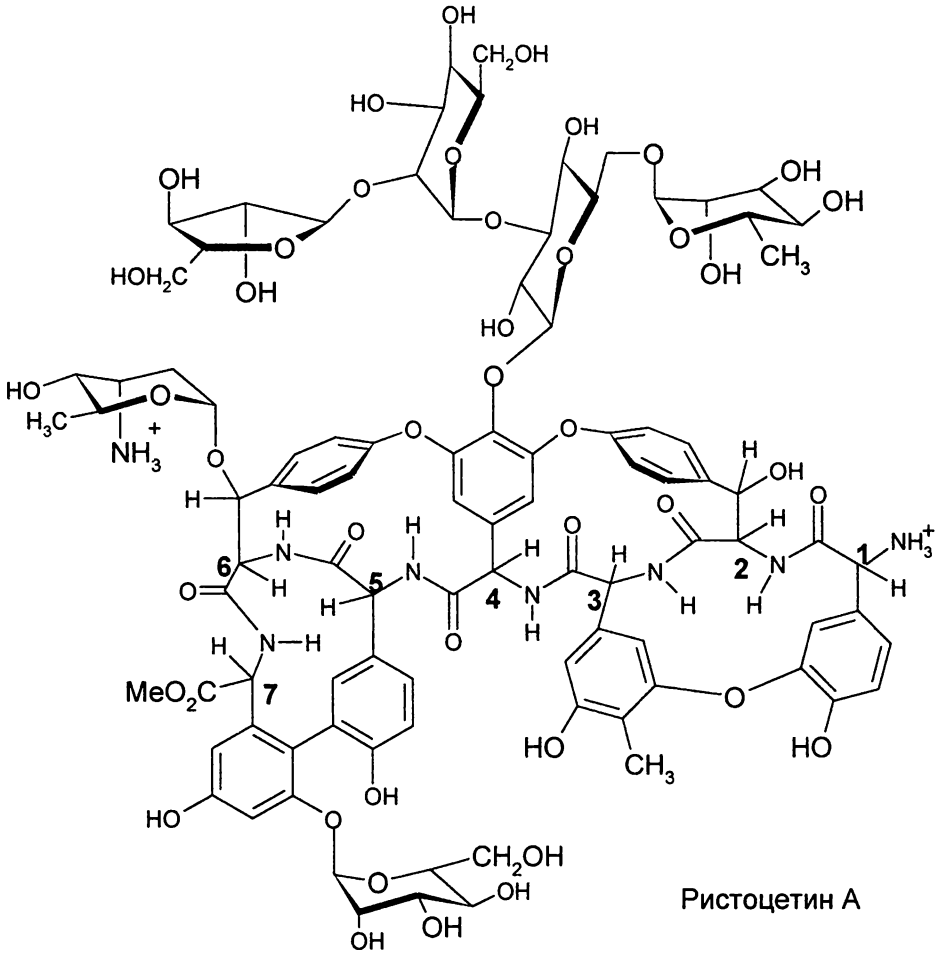
β-Лактамные антибиотики активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Они являются ингибиторами синтеза бактериальной клеточной стенки, поскольку подавляют активность различных ферментов, участвующих в синтезе клеточной стенки, в то же время не действуют на грибы, клеточные стенки которых не содержат пептидогликана.

Предложено несколько механизмов, объясняющих действие β-лактамных антибиотиков. Один из них заключается в подавлении активности транспептидаз – ферментов, катализирующих образование пептидных сшивок между полисахаридными цепями пептидогликанов. Это ингибирование, возможно, осуществляется благодаря структурному сходству β-лактамов с D-аланил-D-аланином – субстратом транспептидазной реакции.

Гликопептидные антибиотики – это соединения молекулярной массой 1400–2000 Да, в которых углеводы связаны с линейным *гептапептидом*, содержащим другие заместители, образующие замкнутые в циклы структуры. Первым антибиотиком этой группы был открыт *ванкомицин*. Он синтезируется микроорганизмами *Amycolatopsis orientalis*.



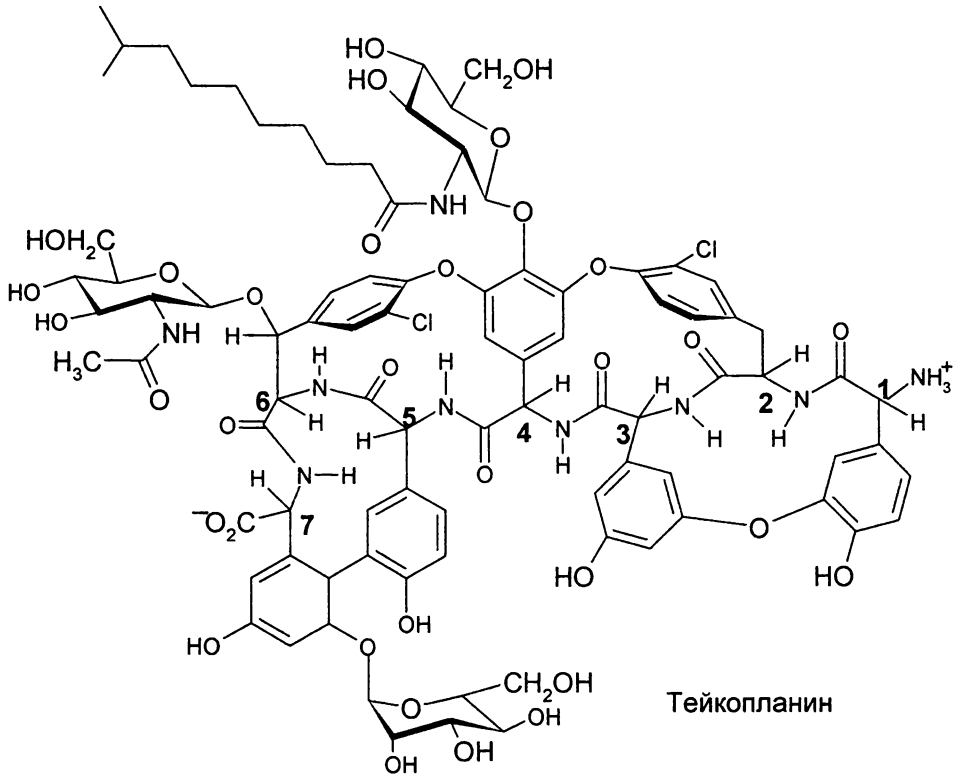
Позднее были открыты антибиотики *ристоцетин А* и *тейкопланин*.



Ристоцетин А

Установление столь сложных структур этих антибиотиков стало возможным только после широкого введения в практику органической химии метода ЯМР.

Все известные гликопептидные антибиотики содержат пептидный остов, состоящий из семи аминокислот. Если их пронумеровать от 1 до 7 от N- к С-концу, то окажется, что остатки 4 и 5 всегда построены из р-гидрокси-фенилглицина. Остатки 2 и 6 – из тирозина, тогда как остаток 7 – это 3,5-дигидроксифенилглицин. Во многих антибиотиках остатки 1 и 3 – алифатические аминокислоты. Например, остаток 1 – это N-метиллейцин, а остаток 3 – аспарагин (см. ванкомицин). С другой стороны, оба эти остатка могут являться ароматическими аминокислотами, как в случае ристоцетина А и тейкопланина. При этом остаток 1 – это *р*-гидроксифенил-глицин, а остаток 3 – 3,5-дигидроксифенилглицин (также *р*-метилированный в случае ристоцетина А). Когда остатки в аминокислотах 1 и 3 ароматические, они могут быть соединены друг с другом. Во всех случаях стереохимические конфигурации α-С-атомов аминокислот 1 и 7 были определены как *R,R,S,R,R,S,S*.



В табл. 21 приведены аминокислотные остатки, образующие гептапептиды, входящие в состав трех антибиотиков ванкомициновой группы. Нумерация аминокислотных остатков приведена на структурах антибиотиков.

Другие структурные особенности, которые варьируются в разных антибиотиках этой группы, включают атомы хлора в ароматических кольцах остатков 2 и/или 6 (в ванкомицине и тейкопланине); β-гидроксильные группы в остатках 2 и/или 6 (в ванкомицине и ристоцетине) и остатки сахара, присоединенные к боковым цепям аминокислоты 4 (во всех рассмотренных выше антибиотиках), аминокислот 6 и 7 (в ристоцетине и тейкопланине).

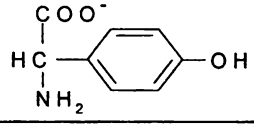
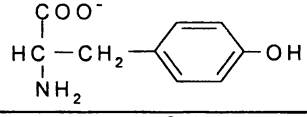
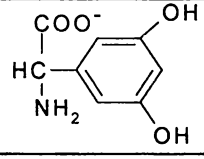
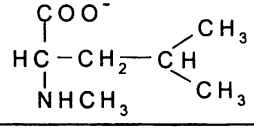
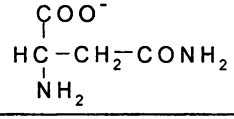
Антибиотики этой группы обладают высокими лечебными свойствами. При большой токсичности для человека они имеют сильное бактерицидное действие в отношении грамположительных микроорганизмов, в том числе устойчивых к другим антибиотикам. Важной особенностью гликопептидов является крайне медленная адаптация к ним микроорганизмов.

В то же время антибиотики этой группы обладают нежелательными побочными действиями (тромбоцитопения, нефротоксичность, некроз тканей в месте введения), что ограничивает их применение в медицине. Применяются они в случае особо серьезных, вызванных бактериями заболеваний (тяжелые пневмонии, сепсис и др.), не поддающихся лечению другими лекарственными средствами. Эти антибиотики вводят внутривенно капельным спо-

собом, так как они не всасываются из желудочно-кишечного тракта, а при внутримышечном введении вызывают болезненные инфильтраты.

Таблица 21

Боковые заместители, образующие гептапептид в ванкомицине, ристоцетине и тейкопланине

Остаток аминокислоты	Химическая структура
p-гидроксифенилглицин	
тирозин	
3,5-дигидроксифенилглицин	
N-метиллейцин	
аспарагин	

В 1969 году, еще до установления структуры ванкомицина, было известно, что этот антибиотик образует комплекс с гликопептидным (мукопептидным) предшественником. Данный пептид является интермедиатом в процессе биосинтеза бактериальной клеточной стенки (рис. 116).

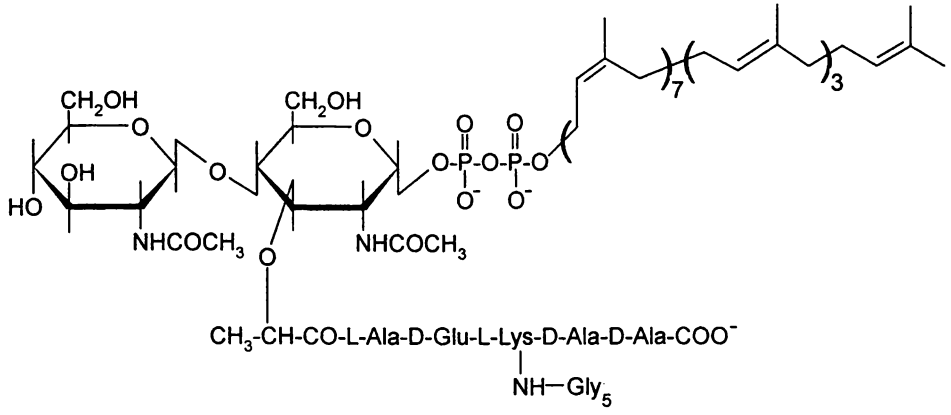


Рис. 116. Структура мукопептидного предшественника синтеза пептидогликана у бактерий *S. aureus*

Бактериальная стенка синтезируется на внешней стороне клетки в две стадии (рис. 117). Сначала остатки дисахаридов с подвешенным пептидом доставляются из цитоплазмы наружу клетки (**А**), где связываются друг с другом ферментом трансгликозидазой (**Б**). Затем для обеспечения механической прочности эти длинные полисахаридные цепи сшиваются через пептидные остатки ферментом транспептидазой (**В**). Этот фермент узнает последовательность D-Ala-D-Ala на конце пептидной цепи, отщепляет С-концевой аланин и связывает оставшийся остаток с N-концом мостиковой пептидной цепи соседнего олигосахаридного фрагмента.

Ванкомицин, как и ристоцетин, воздействует на пептидогликан-синтезирующую систему, специфично связываясь с последовательностью L-Lys-D-Ala-D-Ala боковой цепи одного из связанных с мембраной промежуточных продуктов синтеза пептидогликана.

Константы связывания этих антибиотиков с мукопептидным предшественником в водном растворе при комнатной температуре равны ~10^6 M^{-1}. Основной вклад вносят следующие нековалентные взаимодействия:

- связывание карбоксилат-аниона С-концевого D-аланина с тремя амидными NH-группами остатков 2, 3 и 4 в адсорбционном кармане антибиотика;
- образование двух амид-амидных водородных связей между пептидом и антибиотиком;
- гидрофобное взаимодействие между метильными группами пептида и углеводородными фрагментами антибиотика.

Оценка энергии этих взаимодействий показывает, что первый вклад является главным (20–30 кДж/моль). В отсутствие пептида между NH-концами диполей трех CONH-групп существует отталкивание. В присутствии пептида они предпочтительнее взаимодействуют с отрицательно заряженным концевым карбоксилатом, чем с молекулами воды.

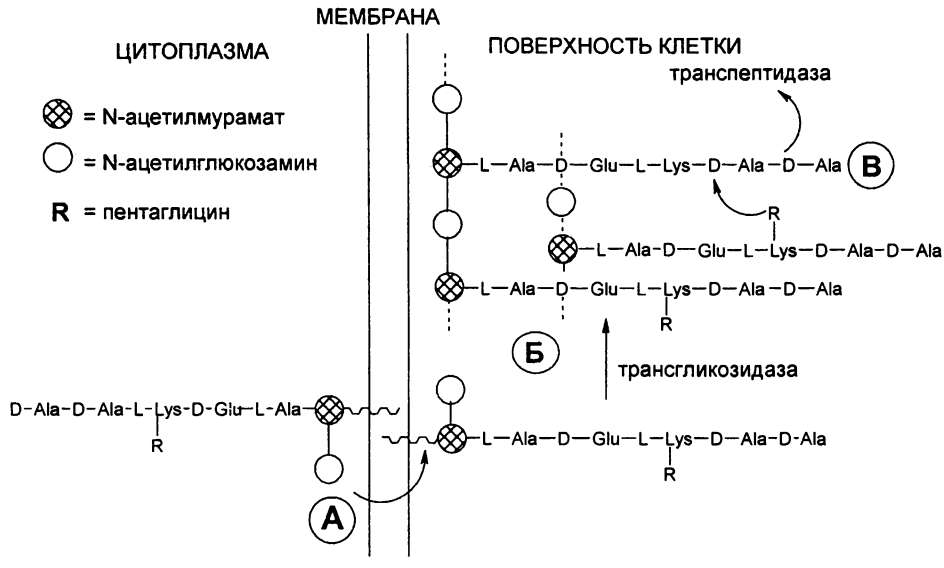


Рис. 117. Схема синтеза бактериальной клеточной стенки. Транслокация через плазматическую мембрану остатка дисахарида с подвешенным к нему пептидом (**А**). Соединение дисахаридов друг с другом ферментом трансгликозидазой (**Б**). Сшивание длинных полисахаридных цепей через пептидные остатки ферментом транспептидазой (**В**)

Изучение ристоцетина А показало, что он образует димеры в водном растворе. Пептидные остовы антибиотика связываются друг с другом четырьмя амид-амидными водородными связями, а четвертичный азот аминосахара при 6-м аминокислотном остатке образует водородную связь с атомом О карбонильной группы противоположной цепи. Отсутствие в ванкомицине аминосахара приводит к образованию только 4-х водородных связей. Полная структура димера ристоцетина А была получена с помощью ^{1}Н-ЯМР и подтверждена рентгеноструктурным анализом. Среди исследованных антибиотиков этого класса только тейкопланин и несколько его производных не образовывали димеры.

Интересной особенностью процесса димеризации антибиотиков этого класса является увеличение константы димеризации в присутствии аналога предшественника клеточной стенки. Следовательно, димеризация протекает кооперативно со связыванием лиганда, т. е. димер связывает лиганд сильнее, чем мономер. Константа димеризации возрастает в 100 раз в присутствии предшественника. Это означает, что два предшественника клеточной стенки, связываясь с димером с одинаковой аффинностью, должны увеличивать константу каждого из них, по крайней мере, в 10 раз по сравнению с мономером.

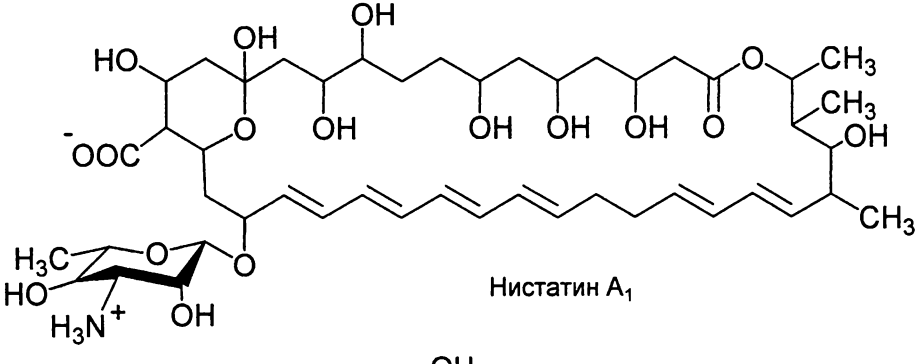
§ 19.3. Антибиотики, нарушающие функционирование плазматических мембран

Антибиотики по механизму действия разделяются на две группы:

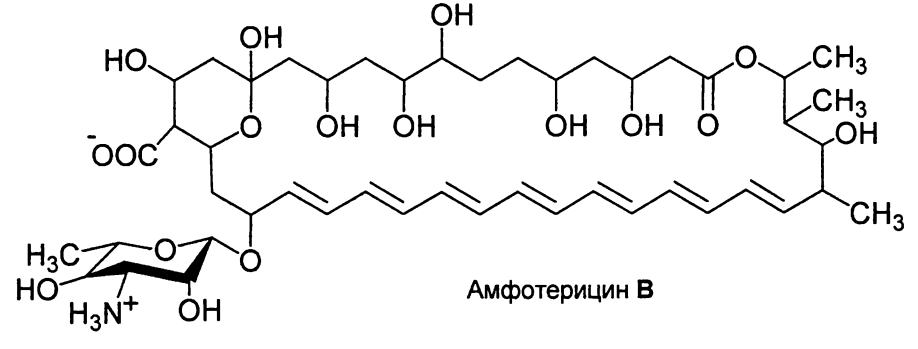
1) вещества, нарушающие структуру клеточной мембраны, что приводит к высвобождению внутриклеточного вещества (полиеновые макролиды, полипептидные антибиотики);

2) вещества, выполняющие роль переносчиков ионов (ионофоры) и вызывающие аномальное накопление ионов внутри клетки (депсипептидные антибиотики).

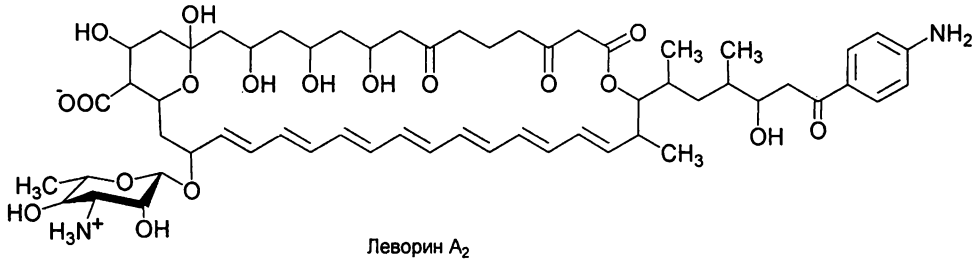
Полиеновые макролидные антибиотики. К этой группе относятся антибиотики, структурной основой которых является наличие в молекуле лактонного кольца больших размеров (с числом атомов в цикле больше 8) и системы двойных связей. В кольце имеется несколько гидроксильных групп, расположенных напротив двойных связей, поэтому молекула имеет гидрофобную и гидрофильную части и обладает свойствами поверхностно-активного вещества. Имеются и другие заместители, например, карбоксильная группа и остаток аминосахара. Многие макролидные антибиотики продуцируются штаммами бактерий *Streptomyces erythreus, Streptomyces antibioticus, Streptomyces noursei, Actinomices levoris Krass* и др. Наиболее известны такие, как *нистатин* A_1 и близкородственные ему *амфотерицин B* и *леворин* A_2.



Нистатин A_1



Амфотерицин **B**



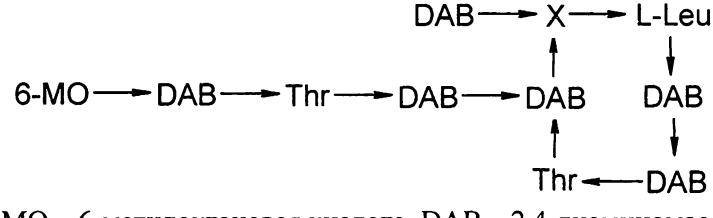
Леворин A_2

Нистатин A_1 и леворин A_2 являются цвиттер-ионами, они активны против дрожжей и грибов. Макролидные антибиотики с двумя и более лактонными группами обычно твердые вещества, хорошо растворимые в органических растворителях и плохо растворимые в воде, что и обуславливает их незначительную всасываемость. Полиеновые антибиотики не всасываются в желудочно-кишечном тракте, но иногда их применяют для подавления роста токсичных микроорганизмов в кишечнике (такая ситуация часто возникает после использования антибиотиков широкого действия, уничтожающих микробную флору кишечника). В настоящее время полусинтетические производные макролидных антибиотиков получают путем химической или биохимической модификации, например, ацетилированием.

Мишенью полиеновых макролидных антибиотиков являются мембраны, в которых содержатся стерины, имеющие 3β-гидроксигруппу и длинную цепь при C_{17}, поэтому они действуют на дрожжи, грибы и клетки млекопитающих. Прокариоты в связи с отсутствием в их мембранах стеринов устойчивы по отношению к полиеновым антибиотикам. В результате взаимодействия антибиотиков со стеринами мембран образуются поры с диаметром порядка 0,4 нм, через которые из клетки свободно выходят ионы одновалентных металлов, некоторые анионы и небольшие молекулы.

Полипептидные и депсипептидные антибиотики состоят из аминокислотных остатков, связанных пептидными связями. В химическом отношении это разнообразная группа соединений: они часто содержат D-аминокислоты или некоторые необычные для белков аминокислоты (N-метиламинокислоты, β-аминокислоты), их цепи могут быть замкнуты в циклы, а также содержат гетероциклы (часто тиазольные).

Большинство *полипептидных антибиотиков* токсичны. Исключением являются антибиотики *полимиксин B* (X=D-Phe) и *колистин* (X=D-Leu)



(6-MO – 6-метилоктановая кислота, DAB – 2,4-диаминомасляная кислота)

Это одни из немногих антибиотиков, действующих только на грамотрицательные бактерии. Они используются для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, вызванных микроорганизмами *Pseudomonas*, которые не излечиваются другими, менее токсичными антибиотиками.

Действие многих полипептидных антибиотиков приводит к нарушению структуры цитоплазматических мембран, что и обусловливает их бактерицидное действие. Среди таких антибиотиков наиболее известен *грамицидин А* (рис. 118).

OHC - L-Val - Gly - L-Ala - D-Leu - L-Ala - D-Val - L-Val - D-Val - L-Trp - D-Leu - L-Trp - D-Leu - L-Trp - D-Leu -L-Trp - $NHCH_2CH_2OH$

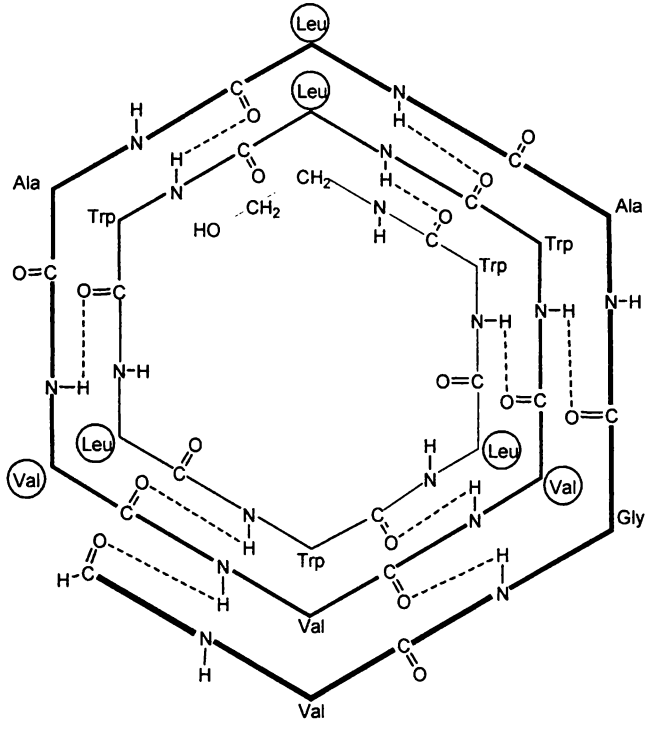


Рис. 118. Одна из возможных спиральных структур грамицидина А. D-аминокислоты обведены кружками (вид в направлении оси спирали; для удобства каждый следующий виток изображен с бóльшим диаметром)

Антибиотик является линейным пентадекапептидом с блокированными концевыми группами и чередующимися D- и L-конфигурациями аминокислотных остатков. Он относится к классу антибиотиков-*каналообразователей*, т. е. влияет на ионный транспорт. Молекула грамицидина А имеет спиральную структуру и образует полый цилиндр, в котором все CO- и NH-группы пептидной цепи соединены внутри- и межмолекулярными водородными свя-

зями, направленными практически параллельно оси цилиндра. Внутренний диаметр такого цилиндра равен ~ 0,3 нм, что достаточно для транспорта ионов металлов. Производительность искусственно созданного канала для ионов калия составляет 10^7 ионов/с.

В то же время возможна и альтернативная структура грамицидина А – двойная спираль, в которой две молекулы антибиотика могут образовывать димер «голова к голове» либо в линейном виде, либо наложенными друг на друга (рис. 119).

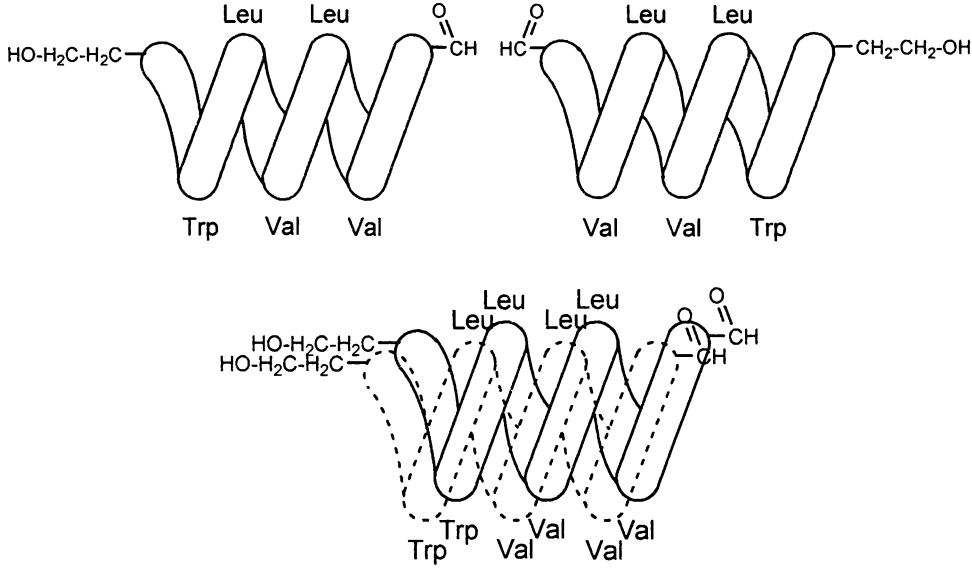


Рис. 119. Схема димера грамицидина А

Внутренний диаметр такой структуры также равен 0,3 нм. Вероятно, антибиотик существует в растворе в сложном конформационном равновесии с участием одно- и двуспиральных димеров. Предполагается, что выключение грамицидинового канала, т. е. переход в непроводящее состояние, сопряжено с флуктуацией в мембране: при увеличении толщины димера «голова к голове» происходит расплетание спирали и ее диссоциация до мономеров.

Депсипептидные антибиотики – это пептиды, в которых чередуются амидные и эфирные связи. Их можно квалифицировать как *ионофоры*, способные переносить неорганические катионы через мембрану. Антибиотики этой группы не нашли широкого применения в медицине из-за отсутствия у них избирательности действия по отношению к разным организмам, однако они получили широкое применение в биохимии в качестве инструмента для исследования мембран. Типичный представитель этой группы – *валиномицин*, переносящий через мембраны в клетку ионы калия. Это циклический депсипептид с чередующимися амино- и гидроксикислотами с пептидными

и сложноэфирными связями в кольце. Валиномицин включает три идентичных фрагмента, состоящих из двух молекул валина, молочной и D-гидроксиизовалериановой кислот. Две последние образуют своими OH-группами сложноэфирные связи с карбоксильными группами остатков валина, причем чередуются остатки L- и D-валина. На рис. 120 представлена структура валиномицина в комплексе с ионом калия.

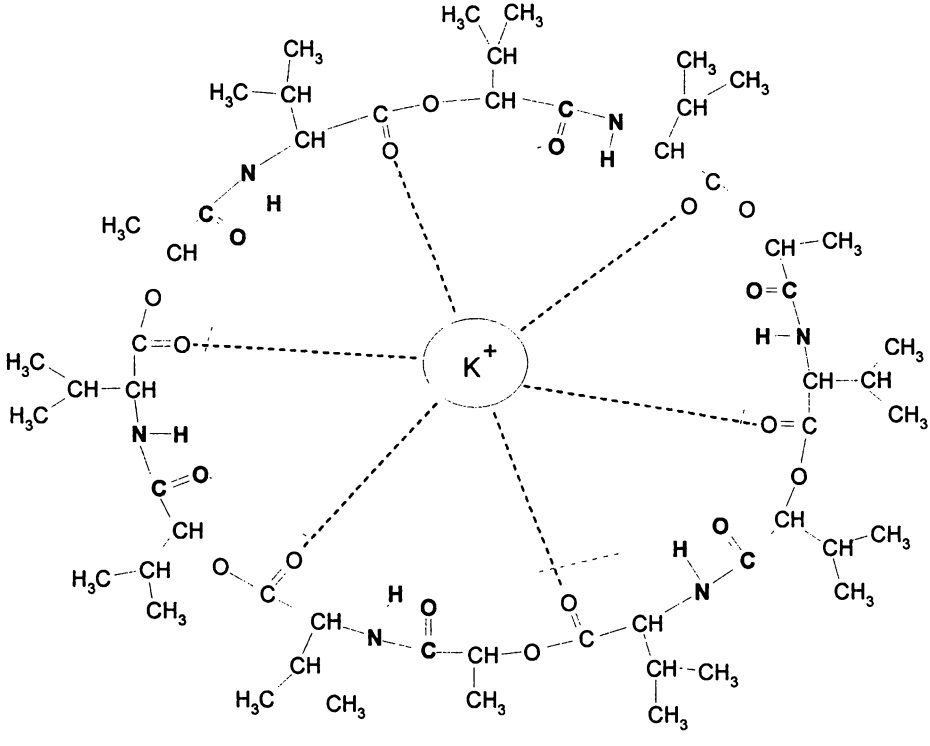


Рис. 120. Схема связывания ионов K^+ валиномицином

Валиномицин способен избирательно увеличивать проницаемость липидных бислоев для ионов щелочных металлов K^+, Rb^+, Cs^+, но не Na^+ Сродство этого депсипептида по отношению к ионам K^+ в 10^4–10^5 раз превосходит сродство к ионам Na^+ Поэтому валиномицин влияет на действие ферментов, ответственных за активный транспорт ионов K^+, Na^+, в первую очередь на Na,K-зависимую АТФазу.

Конформация валиномицина в неполярных растворителях напоминает браслет, стабилизированный шестью водородными связями C=O···H-N; в более полярных средах образуется структура с тремя водородными связями, а в водных растворах образуется открытая форма, не стабилизированная водородными связями.

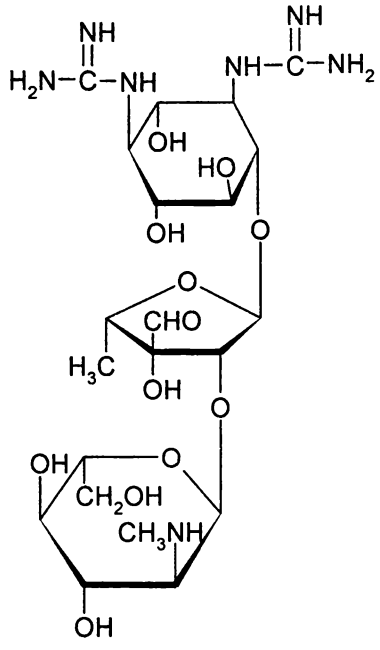
Ионы K^+, встраиваясь внутрь молекулы антибиотика, связываются шестью сложноэфирными карбонилами с помощью ион-дипольных взаимодействий. Размеры полости хорошо соответствуют ионным радиусам K^+ (0,133 нм) или Rb^+ (0,146 нм), хуже для ионов Cs^+ (0,165 нм), однако они слишком велики для ионов Na^+ (0,098 нм). Было показано, что при связывании валиномицином своего «субстрата» – иона калия, молекула валиномицина, подобно ферментам, претерпевает характерную конформационную подгонку, которая заключается в переориентации сложноэфирных карбонильных группировок из положения «наружу» в положение «внутрь» для захвата катиона. Валиномицин создает для ионов K^+ идеальную гидрофобную оболочку, заменяющую гидратную. Это обеспечивает беспрепятственное продвижение комплекса через липидную мембрану. Освободившись от иона калия, валиномицин возвращается в свою исходную протонированную форму.

§ 19.4. Антибиотики – ингибиторы трансляции

Существует большое число антибиотиков, воздействующих как на процессы синтеза биополимеров, так и на процессы функционирования белков и нуклеиновых кислот. Известно, что эти процессы особенно активно протекают в клетках, инфицированных вирусами и в быстро делящихся опухолевых клетках. Многие антибиотики ингибируют синтез нуклеиновых кислот, но лишь малая часть их находит применение в клинической практике из-за отсутствия избирательности их действия. Применение таких антибиотиков всегда представляет собой определенный риск, так как такие антибиотики поражают и здоровые органы с быстро делящимися клетками (клетки кроветворной системы, эпителиальные клетки).

В то же время антибиотики, действующие на нуклеиновые кислоты и белки и на процессы их синтеза, представляют интерес как инструмент исследования в молекулярной биологии. Антибиотик пуромицин сыграл важную роль в исследовании и выяснении механизма образования пептидной связи при синтезе белков на рибосоме, что будет описано далее.

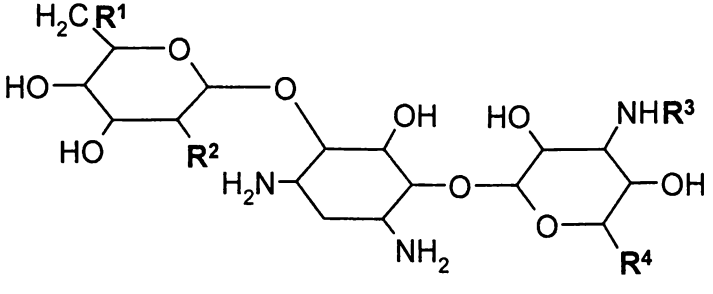
Среди антибиотиков, подавляющих синтез белков, т. е. ингибиторов трансляции, одними из первых были открыты *аминогликозиды*. Это обширная химическая группа, синтезирующаяся в основном микроорганизмами родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Bacillus*. Аминогликозиды содержат в своей структуре остаток циклического аминоспирта, с которым связаны остатки аминосахаров. Известно более 100 природных антибиотиков этого класса и большое число полусинтетических аналогов. Аминогликозидные антибиотики активны в отношении грамотрицательных бактерий. Открытый в 1944 году *стрептомицин* оказался первым антибиотиком, эффективным в лечении туберкулеза.



Стрептомицин

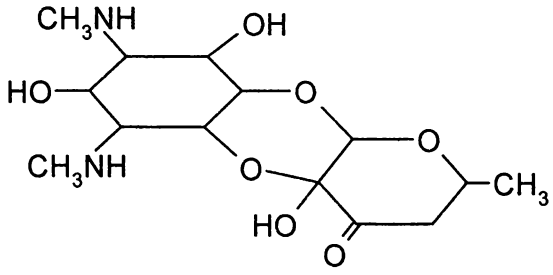
Антибиотики этой группы связываются с 30S-субчастицами рибосом прокариот и не связываются с рибосомами эукариот. На 30S-субчастицах связывается мРНК, а также на них расположен акцепторный участок (А-сайт), с которым взаимодействует аминоацил-тРНК. Аминогликозидные антибиотики, связывающиеся с 30S-субчастицами рибосом прокариот, блокируют А-сайт и ингибируют инициацию синтеза белка.

Для антибиотиков *канамицина* и *гентамицина* установлено два участка связывания с рибосомами.



Антибиотик	R^1	R^2	R^3	R^4
Канамицин А	NH_2	OH	H	CH_2OH
Гентамицин А	OH	NH_2	CH_3	H

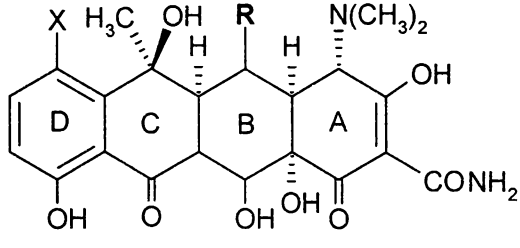
Антибиотик *спектиномицин* содержит сочлененные кольца:



Спектиномицин

Аминогликозидные антибиотики в настоящее время не имеют широкого применения, во-первых, вследствие большой распространенности устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов; во-вторых, из-за их гидрофильности они плохо всасываются при приеме внутрь и пригодны только для парентерального применения: в-третьих, они сильные аллергены, а также обладают повышенной нейротоксичностью.

К ингибиторам трансляции относится химическая группа антибиотиков – *тетрациклинов*. Эта группа антибиотиков занимает второе место после β-лактамных по широте клинического применения. Они образуются различными штаммами актиномицетов рода *Streptomyces*. Их биосинтез происходит путем циклизации цепи, образующейся при конденсации ацетатных и малонатных фрагментов. Это приводит к получению молекулы, состоящей из четырех конденсированных колец, что и послужило основанием для их названия. Тетрациклины эффективны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и хламидий. Они также применяются для лечения пневмонии, дизентерии, коклюша, гонореи, бруцеллеза, туляремии, сыпного и возвратного тифа, холецистита, менингита и др. Первыми были открыты *хлортетрациклин* (1948 г., *Streptomyces aureofaciens*) и *окситетрациклин* (1950 г., *Streptomyces rimosus*), а позднее получен *тетрациклин*.



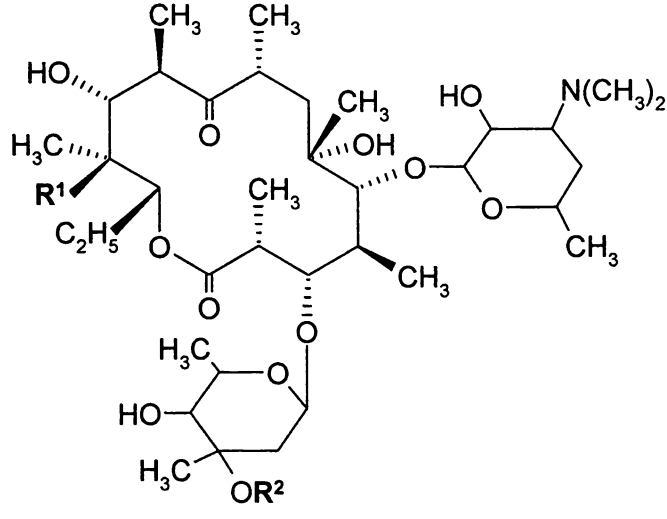
Название	X	R
Хлортетрациклин	Cl	H
Окситетрациклин	H	OH
Тетрациклин	H	H

Тетрациклины подавляют синтез белка на рибосомах, обратимо связываясь с 30S-субчастицами прокариот. В бесклеточной системе антибиотик связывается с малыми 40S-субчастицами рибосом эукариот, но не действует на целые клетки эукариот, что связано с его плохой проницаемостью через мембраны этих клеток.

Тетрациклиновые антибиотики хорошо переносятся в терапевтических дозах. Ограниченность их применения в настоящее время обусловлена широким распространением штаммов, устойчивых к антибиотику.

Еще одну большую химическую группу антибиотиков – ингибиторов трансляции – образуют *макролиды*. Они содержат в своей структуре кольцо, состоящее из не менее чем 12 атомов углерода, замкнутых через лактонную группу. В кольце имеются алкильные и гидроксильные группы, причем последние могут быть гликозилированы.

Типичными представителями этого класса антибиотиков являются 14-членные макролиды *эритромицины A-D* и *олеандомицин* и 16-членные *лейкомицины*, *спирамицины* и *тилозин*. Первый из макролидов – эритромицин – был выделен из почвенного актиномицета *Streptomyces erythreus* в 1952 году. Эритромицины и олеандомицин близки и по структуре, и по биологическим свойствам.

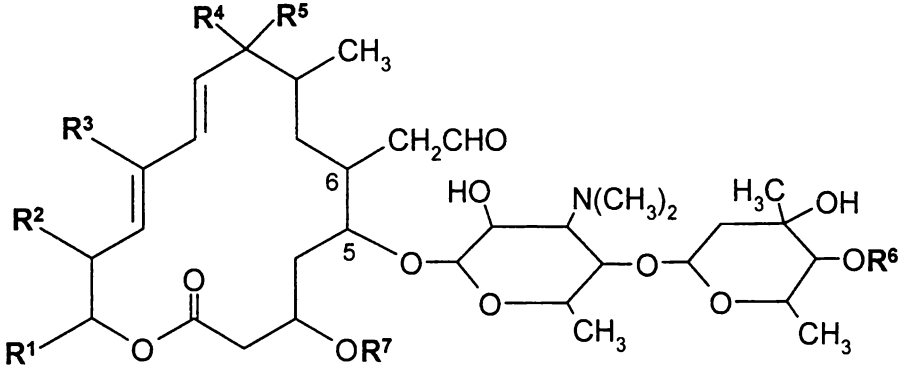


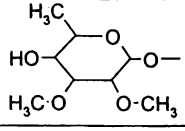
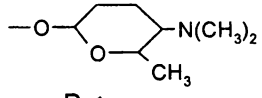
Эритромицины	R^1	R^2
A	OH	CH_3
B	H	CH_3
C	OH	H
D	H	H

Олеандомицин

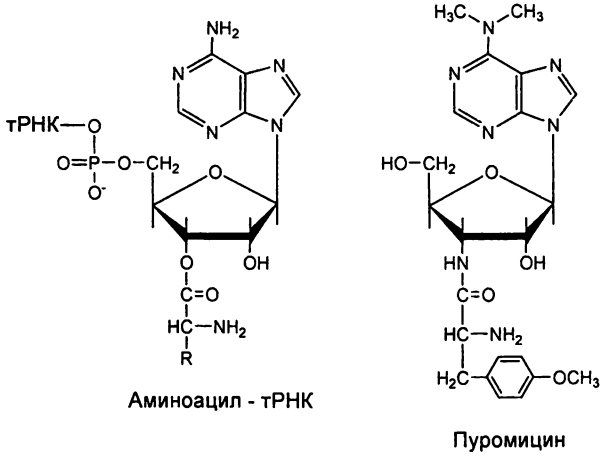
Первый представитель 16-членных макролидов – спирамицин – выделен в 1951 году из *Streptomyces ambofaciens*. 16-членные макролиды содержат в кольце одну пару сопряженных двойных связей и ацетальдегидную группу в качестве заместителя в положении 6. В положении 5 у них содержится остаток дисахарида.

Макролидные антибиотики связываются с большими 50S-субчастицами рибосом прокариот и не взаимодействуют с рибосомами эукариот. Они действуют практически только на грамположительные бактерии. Местом связывания антибиотиков является, вероятно, донорный Р-сайт, что препятствует транслокации в ходе синтеза белка.



	Лейкомицины	Спирамицины	Тилозин
R^1	CH_3	CH_3	C_2H_5
R^2	H	H	
R^3	H	H	CH_3
R^4	OH	 D-Форозамин	O
R^5	CO-*t*Bu,COPr, COEt или Ac	H	
R^6	H или Ac	H	H
R^7	H, Ac или COC_2H_5	H	H

Кратко остановимся на антибиотиках – ингибиторах биосинтеза белка, обладающих противоопухолевой активностью, одним из представителей которых является *пуромицин* – 3'-дезокси-3'-амино-(*n*-метокси фенилаланин) – N-диметиладенозин (производится культурой *Streptomyces fiboniger*).



Механизм действия пуромицина очень интересен, так как он сам вступает в реакцию образования пептидной связи с С-концевым аминокислотным остатком растущей полипептидной цепи на рибосоме. Он обладает структурным сходством с концевым фрагментом аминоациладенозина-тРНК, т. е. является структурным аналогом аминоацилированного 3'-концевого фрагмента тРНК. Это сходство и послужило разгадкой к пониманию механизма его действия.

Размер молекулы пуромицина значительно меньше размера тРНК, благодаря чему он легко проникает и связывается с А-сайтом рибосомы. Аминогруппа антибиотика образует пептидную связь с ацильной группой концевого

аминоациладенозина пептидил-тРНК (растущей пептидной цепи), связанного антикодоном с информационной РНК на рибосоме. После ацилирования пуромицин (в виде пептидилпуромицина) отщепляется от рибосомы и фактически вызывает преждевременную терминацию биосинтеза белковой молекулы. Пептидил-тРНК может взаимодействовать с пуромицином, только если нормально функционирует пептидилтрансфераза, переносящая растущую полипептидную цепь в аминоацил-тРНК-связывающий центр. Были синтезированы различные аналоги пуромицина. Оказалось, что для сохранения активности антибиотику необходимо наличие бензольного кольца. Замена *п*-метоксифенилаланина на другие аминокислоты, такие как пролин, триптофан и др., приводили к заметной потере активности. Введение в 5'-положение рибозы пуромицина цитидиловой кислоты усиливает действие антибиотика, так как это приводит к увеличению структурного сходства с аминоацил-тРНК.

Однако подавляющее большинство цитотоксических антибиотиков представлено ингибиторами синтеза нуклеиновых кислот. Нарушение синтеза нуклеиновых кислот может происходить в результате подавления синтеза предшественников или в результате нарушения реакции полимеризации. Среди противоопухолевых антибиотиков встречаются препараты, действующие на обоих уровнях.

§ 19.5. Антибиотики – ингибиторы репликации и транскрипции

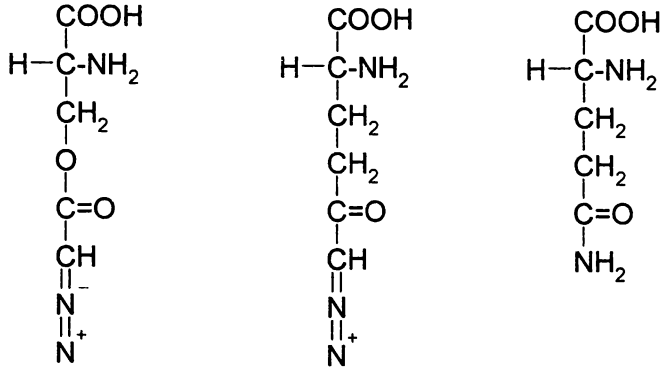
Биосинтез нуклеиновых кислот можно условно разделить на два этапа. Первый этап – это биосинтез мономерных компонентов – нуклеотидов и/или дезоксирибонуклеотидов, предшественников синтеза. Второй – образование из мономерных компонентов полимерных молекул нуклеиновых кислот. Таким образом, согласно этому принципу противоопухолевые антибиотики можно разделить на две категории: антибиотики, нарушающие биосинтез предшественников (мономерных компонентов), и антибиотики, нарушающие биосинтез биополимеров на стадии полимеризации мономерных компонентов.

Чаще всего ингибиторы биосинтеза предшественников являются *антиметаболитами*, т. е. соединениями, которые по своей структуре обладают достаточно большим сходством с природными предшественниками (метаболитами) и, таким образом, являются их аналогами. Аналоги метаболитов могут включаться вместо природных мономерных компонентов в биополимеры в процессе синтеза и изменять закодированную в них информацию. В то же время они подавляют образование истинных метаболитов.

Антиметаболиты, взаимодействуя с ферментами, узнающими в норме природный метаболит, препятствуют взаимодействию с природными метаболитами и выводят их из зоны контакта в активном центре фермента. Антиметаболиты по своей природе являются конкурентными ингибиторами. Такое ингибирование могут проявлять и продукты превращения антиметаболитов.

К ингибиторам синтеза предшественников нуклеиновых кислот относятся ингибиторы синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов.

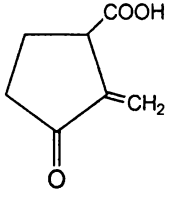
В синтезе пуриновых нуклеотидов донорами азота являются глутамин и L-аспарагиновая кислота, а в пиримидиновых нуклеотидах – карбамоилфосфат и L-аспарагиновая кислота. По своей молекулярной структуре антибиотики *азасерин* и *6-диазо-5-оксо-L-норлейцин (ДОН)*, продуцируемые *Streptomyces fragilis*, являются аналогами глутамина:



Азасерин ДОН Глутамин

Оба антибиотика – и азасерин, и ДОН – конкурируют с глутамином за связывание с ферментами, осуществляющими перенос аминогруппы от глутамина в строящуюся молекулу нуклеотида, например, при синтезе цитидин-5'-трифосфата или 5-фосфо-β-D-рибозиламина (при синтезе пуриновых нуклеотидов) в результате действия цитидилат синтетазы или глутаминзависимой амидотрансферазы. Азасерин связывается с ферментами и блокирует активный центр, который становится недоступен субстрату. Действие этих антибиотиков, в связи с нарушением синтеза предшественников, в итоге приводит к остановке синтеза нуклеиновых кислот.

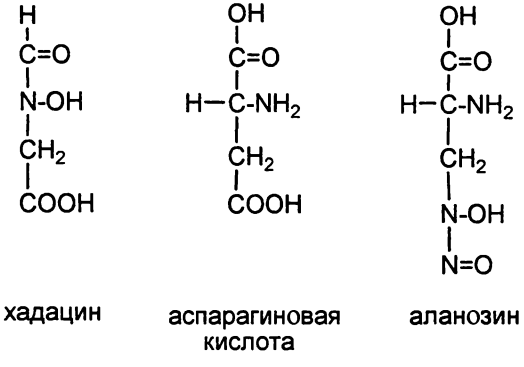
К ингибиторам синтеза предшественников нуклеиновых кислот можно отнести и антибиотик *саркомицин*, являющийся производным циклопентана и продуцентом *Streptomyces erytrochromogenes*, который подавляет синтез пиримидиновых нуклеотидов.



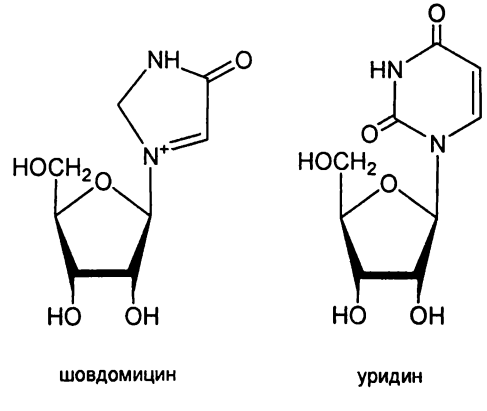
Саркомицин обладает также слабой антибактериальной активностью.

Антибиотики *аланозин* и *хадацидин* (N-формил гидроксиаминоуксусная кислота, природный антибиотик, продуцируемый мицелиальными грибами рода *Penicillinum*) являются аналогами L-аспарагиновой кислоты и мощными ингибиторами 5'-фосфорибозил-4-карбокси-5-аминоимидазол:L-аспартат синтетазы (К.Ф. 6.3.2.6). Они также конкурируют за связывание с аденилосукцинатсинтетазой, ферментом, катализирующим реакцию образования промежуточного продукта синтеза AMP-аденилосукцината с последующим его превращением в AMP, где донором аминогруппы выступает L-аспарагиновая кислота, которая отщепляется в виде фумарата.

IMP + L-Аспарагиновая кислота → аденилсукцинат→ фумарат +AMP



К антибиотикам, препятствующим синтезу пиримидиновых нуклеотидов, относится *шовдомицин,* являющийся структурным аналогом уридина:



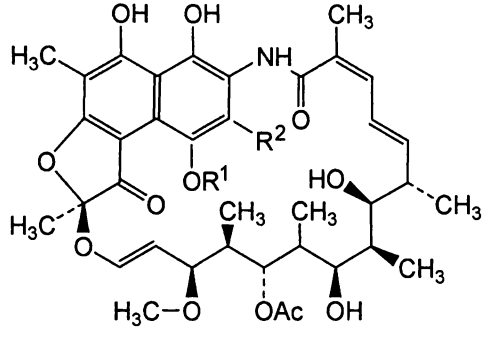
Антибиотики – ингибиторы реакций полимеризации при синтезе нуклеиновых кислот – можно разделить на две группы в зависимости от мишени, на которую они действуют:

– взаимодействующие с ферментами полимеризации – ДНК-зависимой-ДНК-полимеразой, ДНК-зависимой-РНК-полимеразой или РНК-зависимой-РНК-полимеразой;

– взаимодействующие с матрицей (ДНК или РНК), несущей информацию о нуклеотидной последовательности в синтезируемой молекуле нуклеиновой кислоты.

Среди представителей первой группы известны антибактериальные антибиотики, такие как *рифамицины* (A, B, C, D, E, S, O и SV), которые относятся к *анзамакролидам (*или *анзамицинам).* Эти антибиотики содержат в своей структуре нафталиновое или бензольное кольцо, соединенное с двух сторон одним заместителем или «ручкой» (от лат. ansa – ручка). Эти антибиотики вырабатываются стрептомицетами, нокардиями, микромоноспорами, а также высшими растениями. Рифамицины обладают высокой активностью против грамположительных бактерий и микобактерий туберкулеза, менее активны в отношении грамотрицательных бактерий из-за плохой проницаемости ими бактериальной стенки. Рифамицины связываются с β-субъединицей бактериальной РНК-полимеразы и подавляют стадию инициации.

РНК-полимеразы млекопитающих устойчивы к воздействию этих антибиотиков. При изучении рифамицинов было замечено, что в бактериальной клетке происходит разрыв эфирной связи гидроксихинона и его окисление до хинона с отщеплением боковой группы, это привело к получению полусинтетического производного рифамицина – *рифампицина.* Рифампицин также связывается с РНК-полимеразой бактерий и препятствует транскрипции. Известно, что в его химической структуре отсутствует -CH_2-COOH-группа (она заменена на H). Отсутствие этой боковой группы приводит к более прочному связыванию рифампицина с β-субъединицей, что и является причиной более высокой его активности. Рифампицины ингибируют инициацию синтеза РНК. Процесс элонгации нечувствителен к рифампицину.



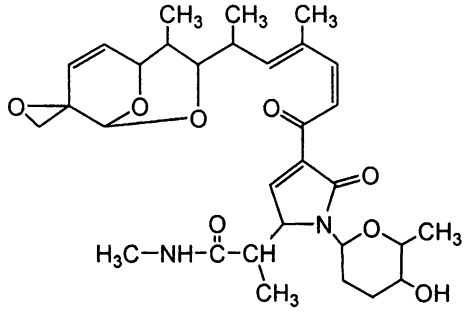
Рифамицин B $R^1 = CH_2COOH$, $R^2 = H$

Рифамицин SV $R^1 = R^2 = H$

Рифампицин $R^1 = H$, $R^2 =$ HC=N-N NCH3

Наиболее высокоактивными в отношении грамположительных бактерий являются рифамицины S и SV, они используются для профилактики и лечения менингококковых заболеваний, а также туберкулеза и других инфекций, вызванных грамположительными бактериями. Один из полусинтетических препаратов, полученных на основе рифамицина S, проявляет высокую активность в отношении *Mycobacterium aviumintracellulare,* поражающего людей с синдромом приобретенного иммунодефицита.

Антибиотик *стрептолидигин* также специфично связывается с β-субъединицей бактериальной РНК-полимеразы. Образуя комплекс фермент-матрица-антибиотик, он резко замедляет синтез РНК и, не подавляя стадию элонгации, приводит к разрушению транскрипционного комплекса, что ведет к терминации синтеза.



Противоопухолевых антибиотиков, действующих на полимеразы, найдено в природе намного меньше, чем антибиотиков, действующих на ДНК-матрицу. По способу воздействия на молекулу ДНК они могут быть разделены на следующие группы антибиотиков (рис. 121):

- интеркалирующие между основаниями ДНК (1);
- связывающиеся нековалентно в малой бороздке двуспиральной ДНК (2);
- ковалентно связывающиеся с ДНК (3);
- вызывающие разрыв цепей ДНК (4).

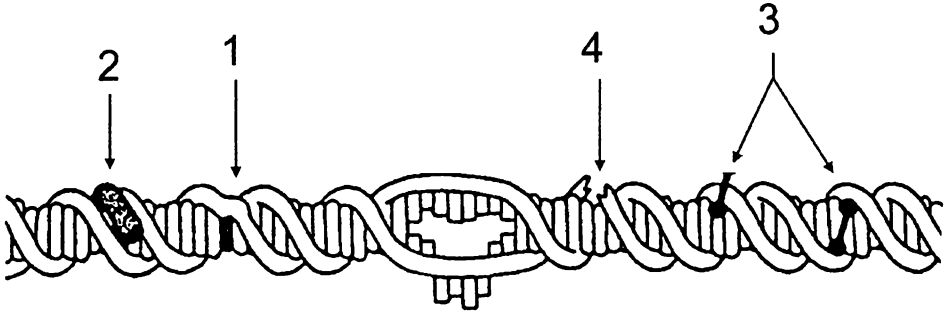
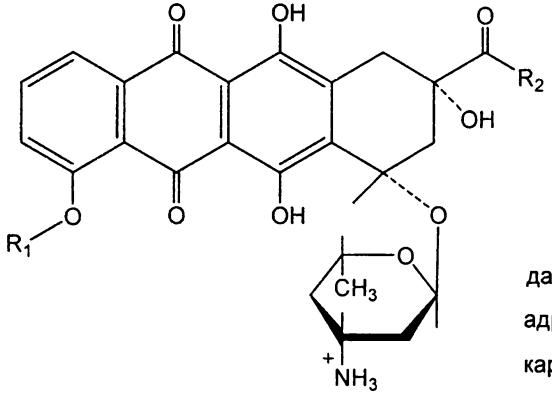


Рис. 121. Виды воздействия противоопухолевых антибиотиков на ДНК

Химические соединения *профлавин* и *этидий* являются типичными примерами интеркалирующих лигандов, свойства и поведение которых являются классическими. Изучение их позволило прийти к выводу, что плоские полициклические ароматические системы могут встраиваться между стопками гетероциклов в двойной спирали ДНК. Это должно приводить к изменению геометрии сахарофосфатного остова и нарушению регулярности спиральной структуры, удлинению двойной спирали и ее локальному раскручиванию. Плоскость встроенного ароматического лиганда располагается параллельно плоскости пар гетероциклических оснований и перпендикулярно оси двойной спирали. Увеличение длины спирали легко регистрируется по значению вязкости ДНК. Показано, что вязкость пропорциональна величине $(\text{длина})^{1/3}$ Локальное раскручивание (10–20 ^{0}C на каждую встроенную молекулу) регистрируется по изменению сверхскрученного состояния циклических плазмидных ДНК. Уровень связывания интеркалирующих лигандов определяется по уменьшению степени отрицательной (правоспиральной) сверхспирализации, что приводит к изменению коэффициентов седиментации, вязкости и подвижности в геле плазмидной ДНК.

Ориентацию молекул лиганда относительно длинной оси ДНК исследовали методом кругового дихроизма (КД), поскольку спектры КД нуклеиновых кислот чрезвычайно чувствительны к нарушению стопочной укладки гетероциклических оснований.

Среди противоопухолевых антибиотиков, связывающихся с ДНК по типу интеркаляции и относящихся к *антрациклиновой* группе, находятся *дауномицин* (или производимый в России *рубомицин*) и его аналоги (*адриамицин* и *карминомицин*), являющиеся гликозидами. Рубомицин был выделен в 1963–1965 гг. и оказался идентичным дауномицину, продуцируемому штаммами *Streptomyces peuceticus*. Дауномицин и его аналоги обладают высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий, а также используются в химиотерапии рака.



дауномицин	$R_1=R_2=CH_3$	
адриамицин	$R_1=CH_3$	$R_2=CH_2OH$
карминомицин	$R_1=H$	$R_2=CH_3$

В комплексе дауномицин-ДНК ароматическая хромофорная часть молекулы лиганда интеркалирует между уотсон-криковскими парами гетероцик-

лов, а циклогексановое кольцо с замещенным аминосахаром (даунозамином) располагается в большой бороздке спирали ДНК. Комплекс стабилизируется не только стэкинг-взаимодействием, но и водородными связями с гидроксильной и карбонильной группами дауномицина. За счет интеркаляции происходит нарушение процессов репликации и транскрипции. Интеркаляция препятствует связыванию полимераз с ДНК и приводит к подавлению синтеза нуклеиновых кислот.

Известно, что антрациклины взаимодействуют с топоизомеразами – ферментами, ответственными за разрыв, сшивание и топологическое состояние (сверхспирализацию) ДНК, что также приводит к нарушению синтеза нуклеиновых кислот. Другие антибиотики – ингибиторы топоизомераз, например, антрацены и акридины (амсакрин), как и антрациклины, являются фармакологическими препаратами и используются в терапии онкологических заболеваний (лейкемии, злокачественных карцином и лимфом).

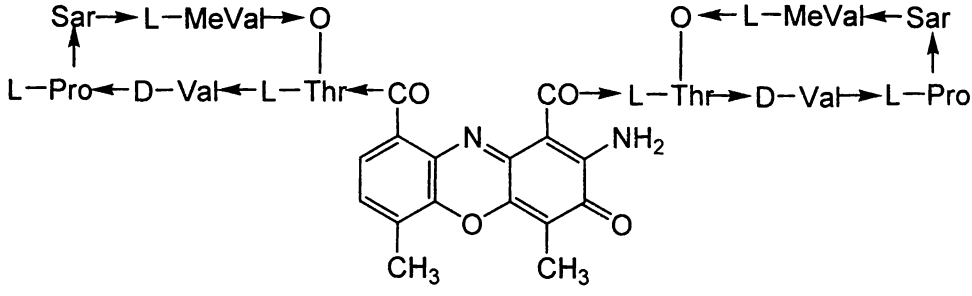
В то же время известно, что антрациклины могут связываться с мембранами клеток и внутриклеточных органелл. Это может приводить к нарушению многих биохимических процессов, протекающих в организме. Важным свойством антрациклинов является их способность генерировать семихинонные радикалы, что приводит к образованию свободных и/или гидроксильных радикалов, ответственных за многие клеточные повреждения. Кардиотоксичность, наблюдаемая для антрациклинов, возможно, и объясняется этой способностью.

Хорошо известный интеркалирующий антибиотик *актиномицин D,* принадлежащий к числу первых хромопептидов, аналогичным образом связывается с ДНК. Он выделен из *Streptomyces antibioiticus* еще в 1940 году и получен в кристаллическом виде, однако охарактеризован только в 1954 году. Этот антибиотик состоит из феноксазиновой хромофорной группы (*актиноцина)*, одинаковой для всех актиномицетов, и характеризуется наличием трех компланарных шестичленных колец, как в профлавине и этидии, и двух депсипептидных боковых цепей, в основном пентапептидов. Каждый пептид за счет связывания гидроксильной группы L-треонина, входящего в состав всех актиномицетов, с карбоксильной группой С-концевой аминокислоты, превращается в циклический лактон. Раскрытие лактонного цикла приводит к потере активности антибиотика.

Феноксазиновый хромофор актиномицина D интеркалирует между двумя GC-парами ДНК с образованием водородных связей между 2-аминогруппами гуанина и CO-остатками треонина в пептидных лактонных кольцах, которые уложены в малую бороздку ДНК-спирали.

При интеркаляции антибиотика происходит значительное изменение локальной структуры ДНК. Раскручивание спирали составляет ~28^0, что приводит к излому цепи ДНК. Также происходит удлинение рибозофосфатного остова ДНК на 3,4 Å (при присоединении одной молекулы антибиотика). Эти антибиотики в концентрации 0,1 мкг/мл подавляют развитие грамположительных, а в концентрации 1–10 мкг/мл – грамотрицательных бактерий. Не-

которые антибиотики этой группы обладают противоопухолевым действием. В медицинской практике нашли применение препараты актиномицина D и актиномицина C, которые эффективны в лечении соответственно опухолей почек и сарком, а также лейкозов, лимфогранулематоза и рака яичников. К настоящему времени выделена и установлена структура более 100 актиномицетов, но многие из них чрезвычайно токсичны.



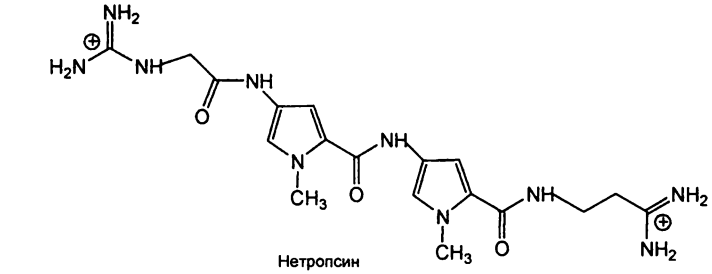
Актиномицин D

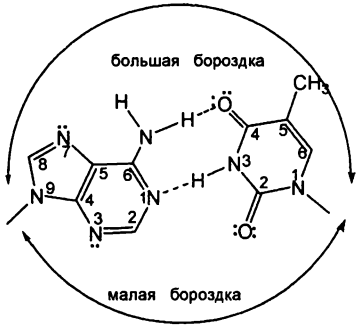
Sar - саркозин (N-метилглицин)

Из антибиотиков, связывающихся с малой бороздкой ДНК, наиболее известны *нетропсин* и *дистамицин*. Они используются в основном как противовирусные препараты. Эти антибиотики содержат в своей структуре два или четыре N-метилпирролокарбоксамидных остатка соответственно, а также положительно заряженные группы на обоих или на одном конце молекулы. Они специфичны к АТ-богатым участкам ДНК и связываются в малой бороздке за счет образования дополнительных водородных связей с гетероциклами. Атомы азота амидных групп антибиотиков образуют водородные связи с атомами O(2) тимина или N(3) аденина одной из цепей спирали, а амидиновые или гуанидиновые группы на концах цепи электростатически взаимодействуют с ближайшими фосфатными группами. Специфичность к АТ-богатым участкам ДНК обусловлена точным соответствием пространственной структуры антибиотиков, которая принимает форму полумесяца при укладке в малую бороздку, и расположением акцепторных групп у оснований ДНК, участвующих в образовании водородных связей (рис. 122).

Если в молекуле ДНК вместо аденина (6-аминопурин) стоит 2-аминопурин, то аминогруппы последнего, располагающиеся в малой бороздке, мешают укладке молекул антибиотиков. По этой же причине антибиотики данной группы гораздо менее охотно связываются в области расположения G·C пар.

При связывании с ДНК малобороздочных антибиотиков параметры спирали ДНК изменяются незначительно. Ширина малой бороздки увеличивается на 2 Å, изгиб спирали составляет 8^0 на молекулу лиганда, раскручивание спирали изменяется также незначительно.





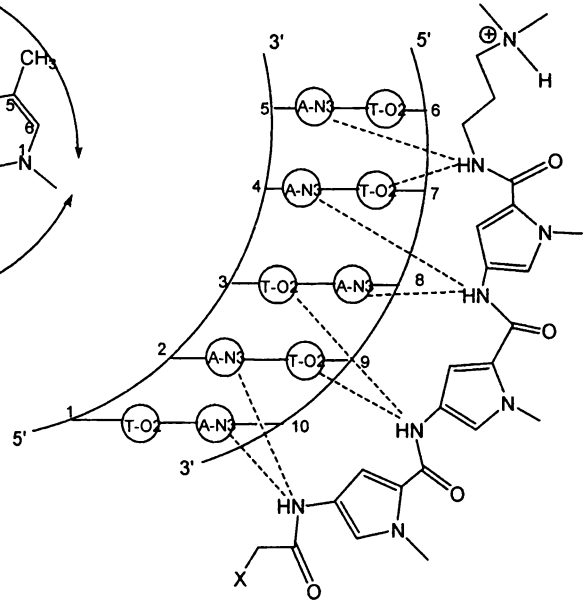
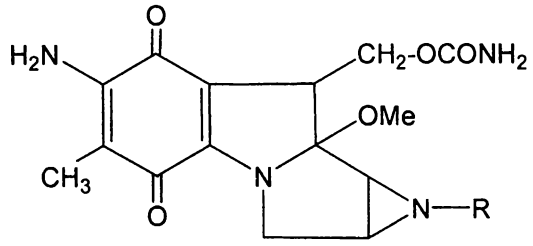


Рис. 122. Схема взаимодействия антибиотиков нетропсина и дистамицина с малой бороздкой ДНК. Пунктиром обозначены водородные связи между группами NH антибиотика и атомами N3 остатка аденина (A) и O2 остатка тимина (T)

Антибиотики, ковалентно связывающиеся с ДНК, также нашли широкое применение в медицине. К их числу относятся *митомицины* – антибиотики группы бензохинонов, вызывающие образование сшивок в цепи ДНК.



R = H: митомицин С

R=CH_3: порфиромицин

Эти антибиотики были выделены из *Streptomyces caespitonis*. Они содержат в своей структуре азиридиновое кольцо, остаток хинона и уретановую группу. Клинически наиболее широкое применение нашел митомицин С, который обладает широким спектром действия: подавляет как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, а также риккетсии. Он ингибирует рост раковых опухолей (саркомы, аденокарциномы, меланомы) и проявляет мутагенный эффект.

Механизм действия митомицина заключается в ферментативном восстановлении фрагмента хинона до гидрохинона с последующим спонтанным элиминированием метоксигруппы. Образующийся короткоживущий продукт, в котором индол содержит два активных центра – азиридиновое кольцо и метиленовую группу метиленуретановой боковой цепи, способен как алкилировать, так и образовывать межцепочечные сшивки в ДНК (рис. 123). Образование семихинонных радикалов при восстановлении хинона в гидрохинон было зарегистрировано с помощью ЭПР-спектроскопии.

К антибиотикам, образующим ковалентные сшивки с ДНК, относятся и пиррол(1,4)-бензодиазепиновые антибиотики. Это *антрамицин,* выделенный из термофильной культуры *Streptomyces refuineus subsp. thermotolerans,* а также из культуры *Streptomycts sp.*, *томаймицин,* выделенный из *Streptomyces achromogenes subsp. tomaymyceticus* и *неотрамицины А и В* (*Streptomyces sp.*). Одним из представителей этой группы является антибиотик *сибиромицин,* выделенный из *Streptosporangium sibiricum,* названный так в связи с наличием в его структуре аминосахара сибирозамина (рис. 124).

Эти антибиотики подавляют рост грамположительных бактерий и оказывают противоопухолевое действие, однако все они вызывают кардиотоксическое действие, что препятствует их широкому использованию в терапии.

Антрамицин, томаймицин и сибиромицин содержат в положениях 10, 11 карбиноламиновую группировку, а в случае неотрамицинов – азометиновую группировку вместо карбиноламиновой. В водных растворах азометиновая группа легко гидролизуется и переходит в карбиноламиновую. Кроме того, в структуре имеются фенольные гидроксильные группы и довольно часто – ненасыщенная боковая цепь в пиррольном кольце. Эти антибиотики связываются в малой бороздке с последовательностями 5'-PuGPu-3' Эффективность связывания падает в ряду: 5'-PuGPu > 5'PyGPy ≈ 5'-PuGPy >> 5'-PyGPy.

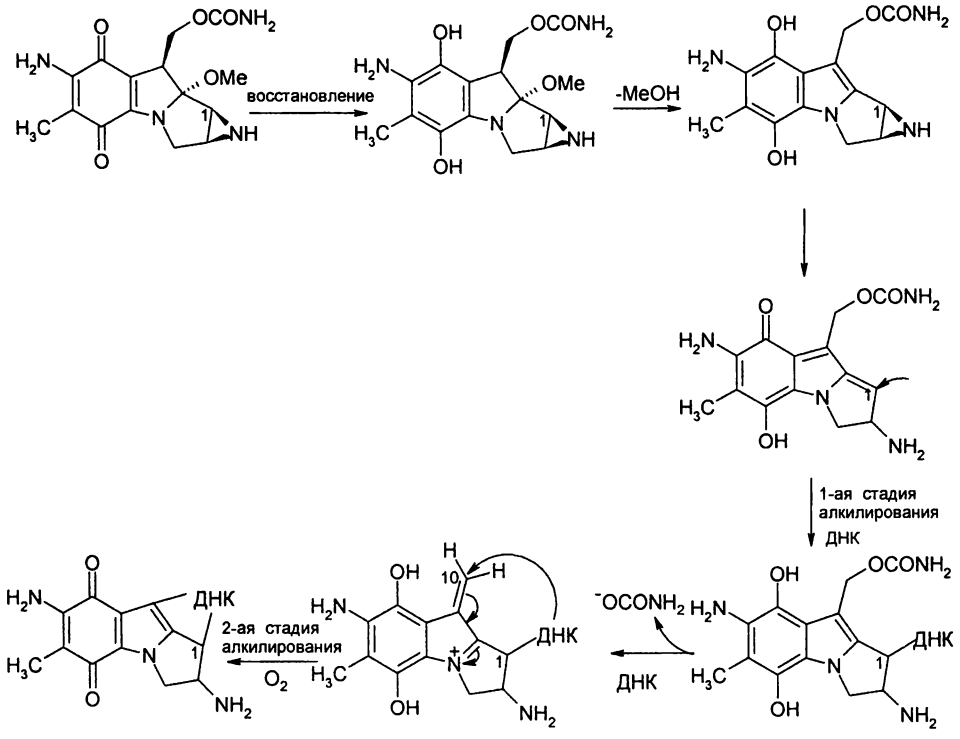


Рис. 123. Механизм образования ковалентных аддуктов митомицина С с ДНК

Антрамицин

Неотрамицин А R1 = H, R2 = OH

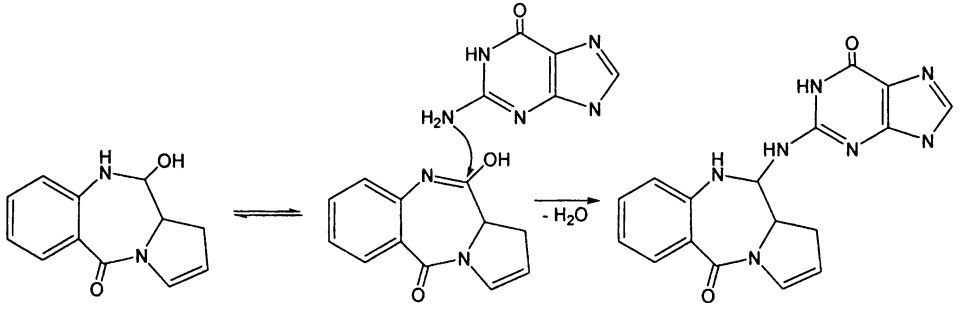
R1 = OH, R2 = H

Томаймицин

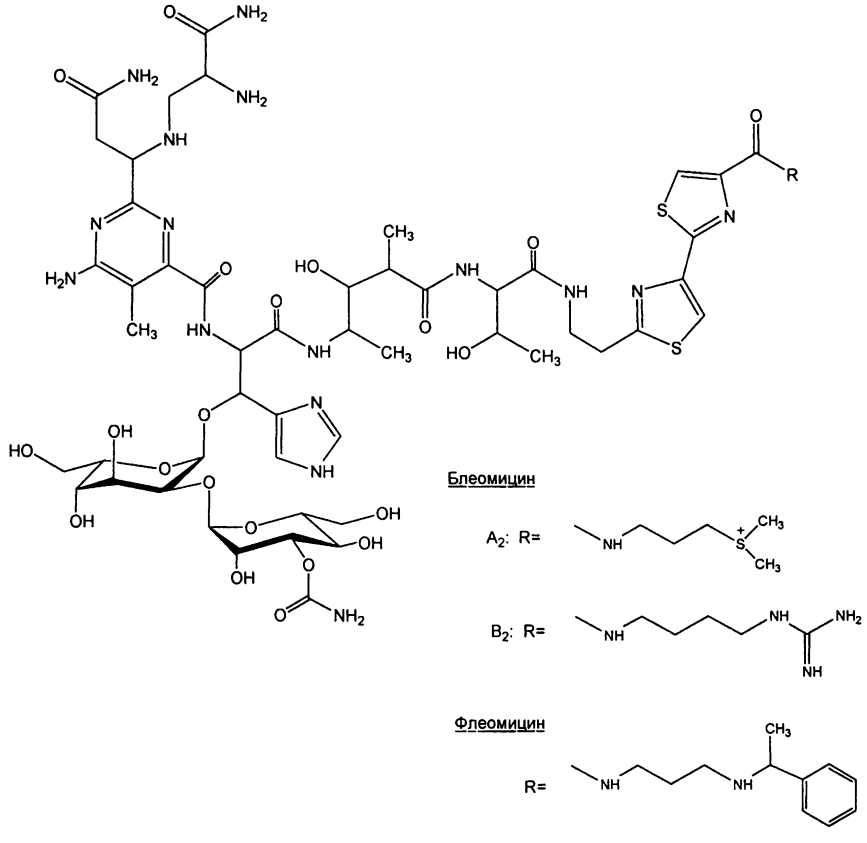
Сибиромицин

Рис. 124. Пирроло(1,4)-бензодиазепиновые антибиотики

Пирроло(1,4)-бензодиазепиновые антибиотики реагируют с ДНК с образованием ковалентного аддукта через экзоциклическую аминогруппу гуанина.

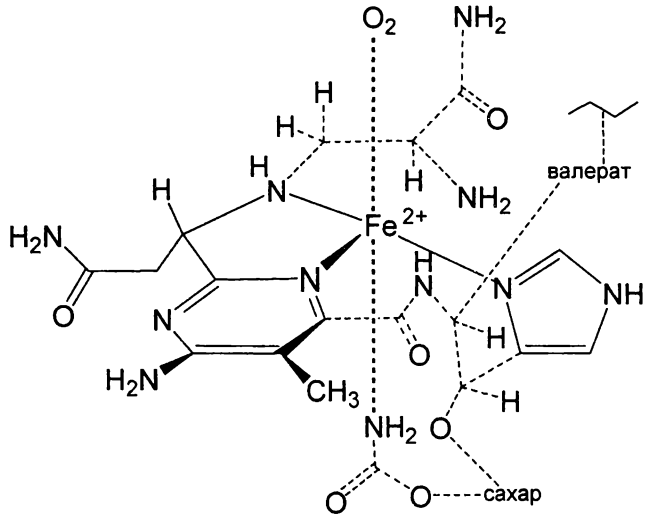


В онкологической практике нашла применение группа антибиотиков, расщепляющих нуклеиновые кислоты. К этой группе относятся *блеомицин, флеомицин* и другие близкие по структуре антибиотики. Их изучение показало, что для деградации ДНК требуется участие иона железа (II), молекулярного кислорода O_2 и восстанавливающего агента, такого как меркаптоэтанол $SHCH_2CH_2OH$ или дитиотреит $SHCH_2CH_2CH_2CH_2SH$.

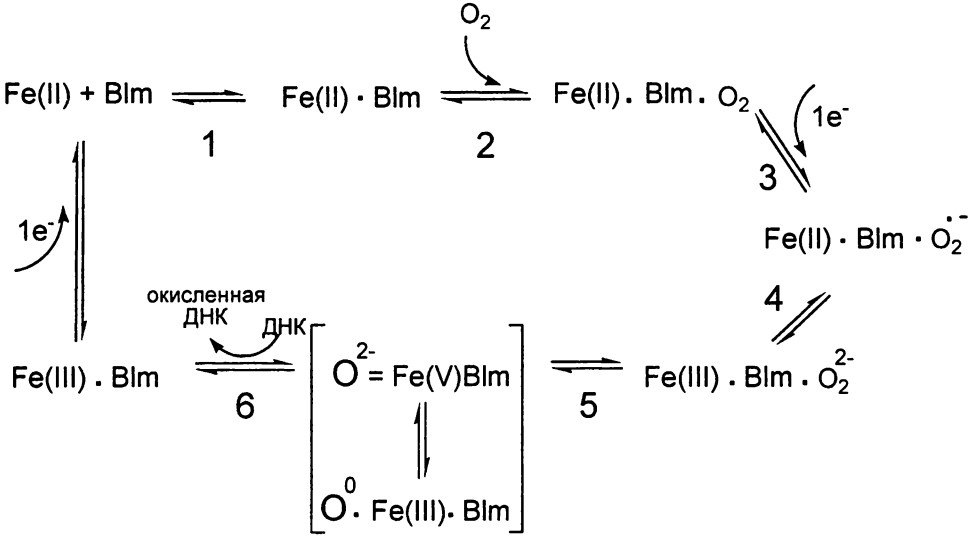


Блеомицины – это семейство гликопептидных антибиотиков. Их структура состоит из трех доменов, в которые входят аминокислоты, амины, L-глюкоза, карбамоил-D-манноза и/или другие сахара. Остатки пиримидина, β-аминоаланина и β-гидроксиимидазола вовлекаются в хелатирование иона железа (домен 1). При взаимодействии с кислородом происходит активация блеомицина, что и приводит к последующему расщеплению ДНК. Битиазольный остаток и заряженный «хвост» – 3-аминопропилдиметилсульфонат – ответственны за связывание и специфичное присоединение к узнаваемой последовательности ДНК (домен 2). Остатки глюкозы (или гулозы) и карбамоилированной маннозы, вероятно, ответственны за накопление блеомицина в опухолевых клетках и не требуются для проявления расщепляющей ДНК

активности. Строение хелатированного иона железа в составе домена 1 представлено на следующй схеме:



Активация же блеомицина осуществляется, по-видимому, следующим образом:



Этот механизм предполагает образование оксокомплекса высоковалентного железа. Согласно современным представлениям оксокомплексы принимают участие в реакциях окисления, катализируемых монооксигеназами, содержащими гем, например, при функционировании цитохрома P450 и перок-

сидаз. Блеомицин, таким образом, является уникальным негемовым комплексом железа, способным катализировать процессы окисления по механизму, аналогичному работе монооксигеназ.

Показано, что деградация ДНК в присутствии комплекса блеомицина с железом происходит с образованием двух наборов продуктов (рис. 125):

а) в присутствии избытка O_2 происходит разрыв цепей ДНК с образованием пропеналей гетероциклических оснований, концевых фрагментов в форме 3'-фосфогликолятов и 5'-фосфатов;

б) при недостатке O_2 образуются свободные гетероциклические основания, разрыв цепей ДНК происходит только в щелочных условиях с образованием 3'-и 5'-фосфатов и окисленных остатков рибозы.

Ключевым моментом механизма является отрыв атома водорода от С4'-рибозы с образованием радикала. В присутствии избытка кислорода происходит образование С4'-пероксирадикала, который далее восстанавливается до гидроксиперекиси. Последняя изомеризуется с помощью перегруппировки Криге с внедрением атома кислорода из перекисной группы в связь С3'-С4' Образующийся интермедиат расщепляется с образованием 3'-фосфогликолята, пропеналя гетероцикла и 5'-фосфатсодержащего фрагмента нуклеотидной цепи (путь **а**).

При недостатке кислорода С4'-радикал окисляется далее до С4'-катиона, который присоединяет гидроксильный анион от молекулы H_2O среды и превращается в С4'-гидроксипроизводное. Далее оно гидролизуется самопроизвольно, элиминируя гетероцикл, а затем после обработки щелочью по механизму β-элиминации – 3'-фосфатную группу, что и приводит к расщеплению цепи. При этом образуются фрагменты ДНК с 5'-фосфатной группой и фрагмент, несущий на 3'-концевом фосфате окисленный остаток рибозы (путь **б**).

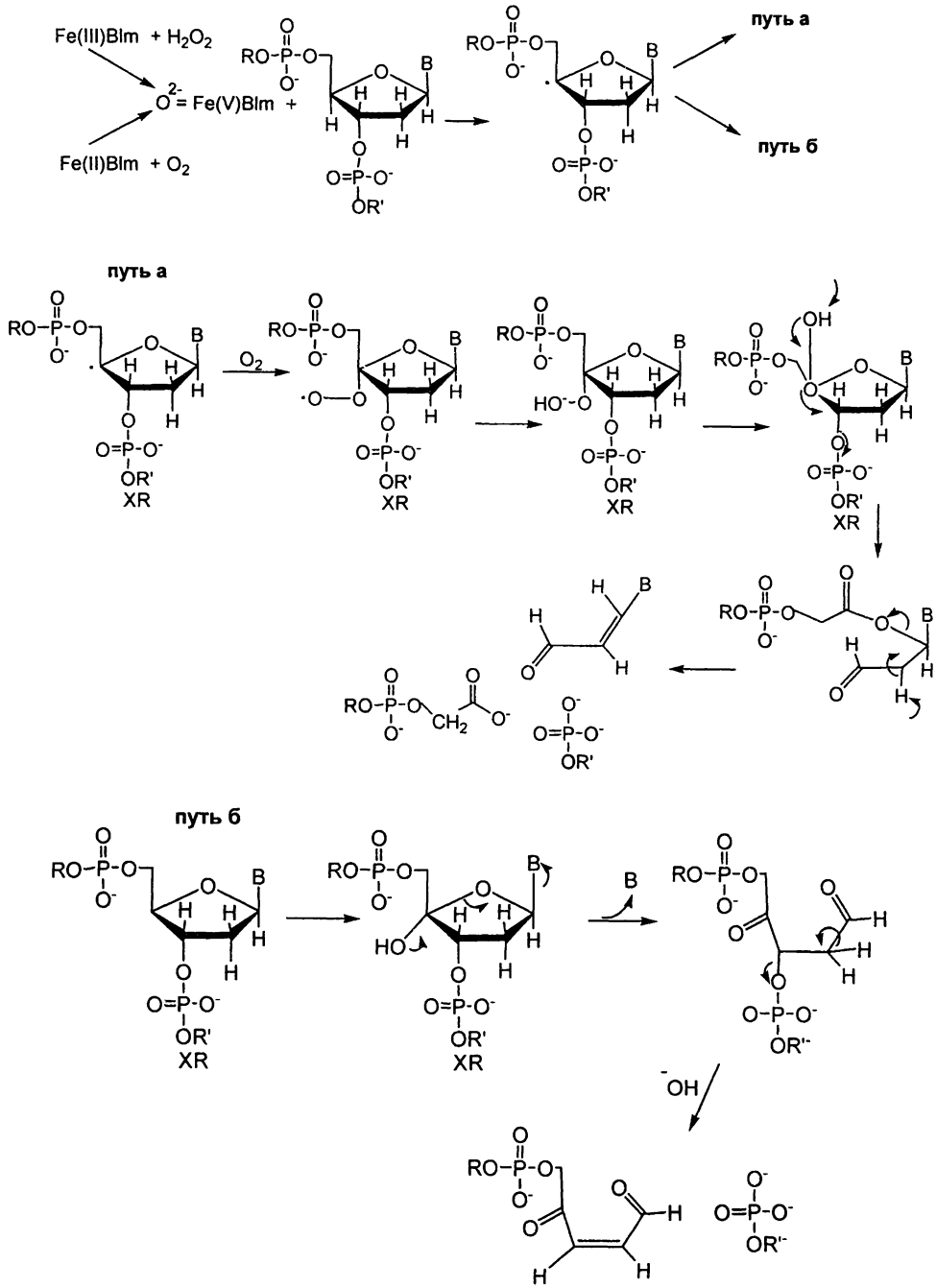
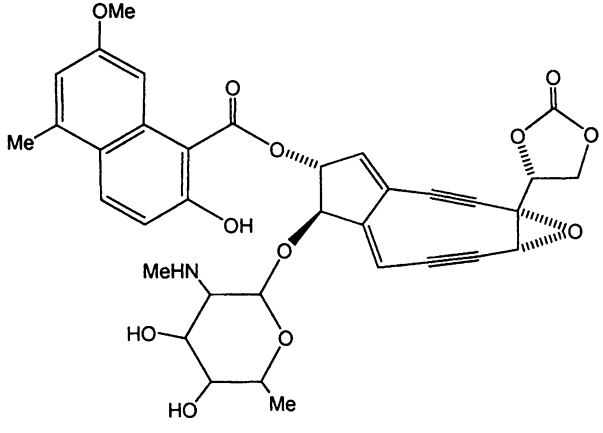


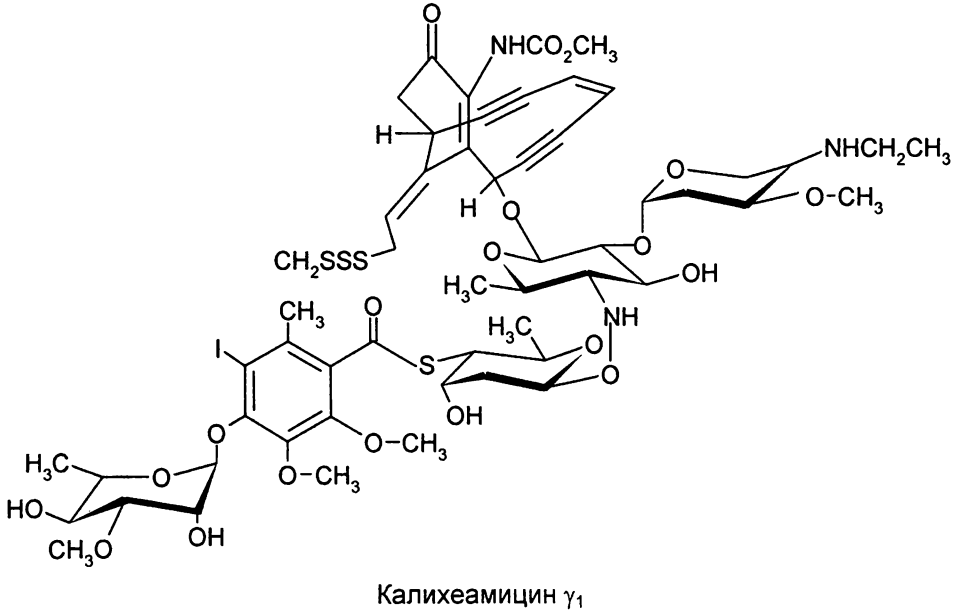
Рис. 125. Механизм расщепления ДНК блеомицином

В группу антибиотиков, расщепляющих ДНК, входят также соединения ендиильной природы – соединения с системой сопряженных кратных связей (двойных и тройных).

Первым из антибиотиков этой группы был открыт *неокарциностатин,* который продуцируется культурой *Streptomyces carzinostaticus.* Приведенная хромофорная группировки, имеющая бициклический ендииновый скелет, нековалентно связана с белком (полипептидом, состоящим из 113 аминокислот и обладающим протеазной активностью).

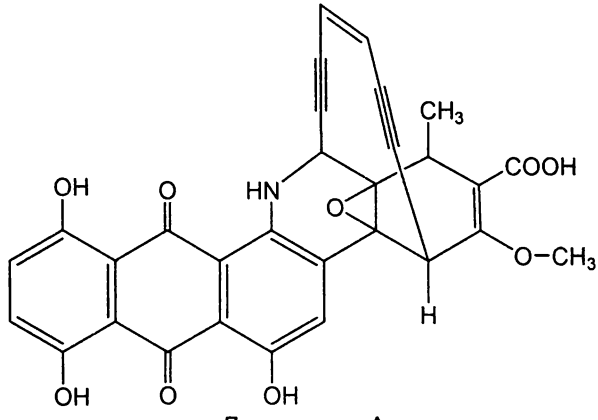


В настоящее время из разных микроорганизмов выделена серия антибиотиков, содержащих ендииновый скелет. Ниже приводятся некоторые примеры. Так, *Micromonospora echinospor* является продуцентом *калихеамицина* γ_1.



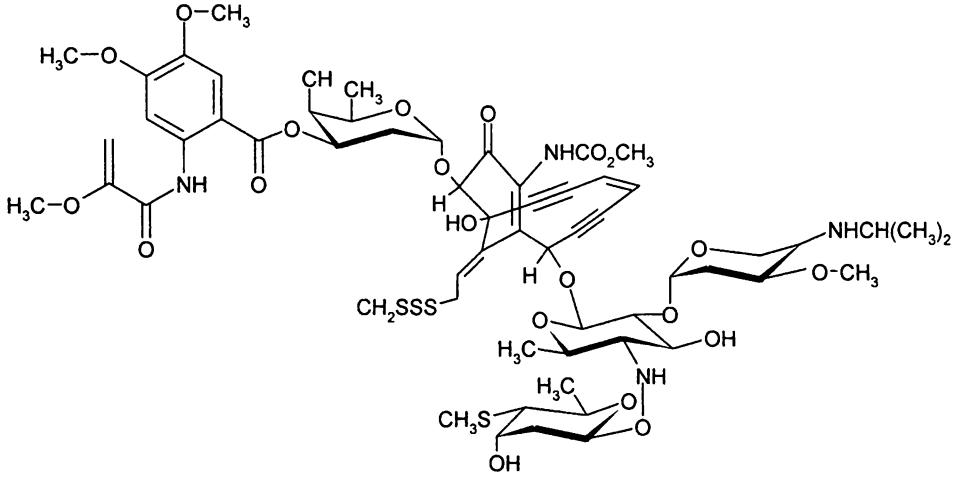
Калихеамицин γ_1

Из *Micromonospora chersina* выделен антибиотик *динемицин А*.



Динемицин А

Он проявляет высокую активность против многих видов опухолей и обладает низкой токсичностью. В 1985 году был выделен антибиотик *эсперамицин*.

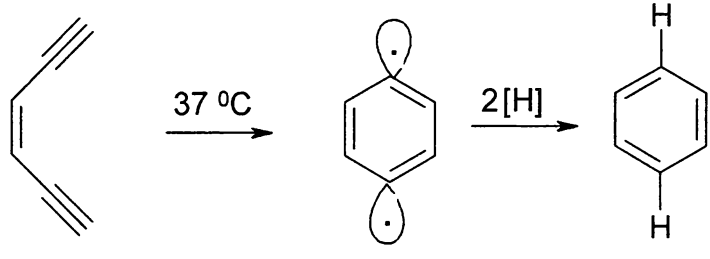


Эсперамицин

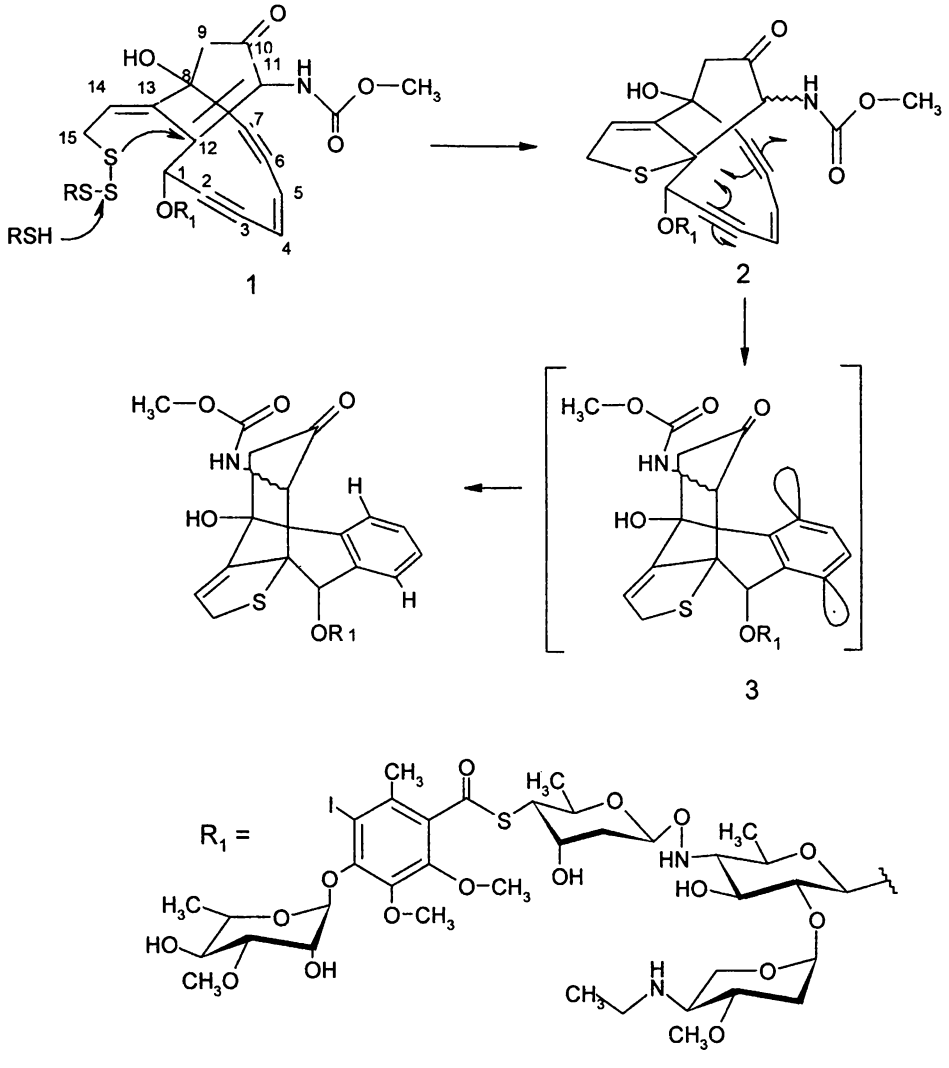
Один из группы антибиотиков, представляющих собой нековалентно связанные комплексы между неустойчивыми хромофорами и стабилизирующими их белками – *кедарцидин*, был выделен в 1992 году. Он активен в отношении грамположительных бактерий. Все эти антибиотики содержат 1,5-диин-3-еновую мостиковую группировку.

Кедарцидин

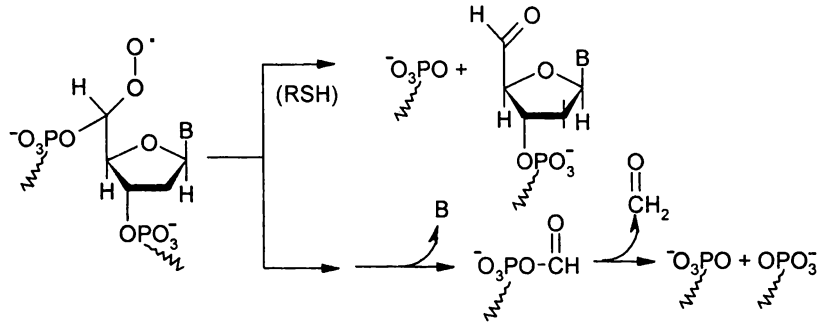
Действие ендииновых антибиотиков на ДНК связано со способностью их подвергаться реакции циклоароматизации (реакция Бергмана), протекающей через промежуточное образование радикалов, способных повреждать ДНК.



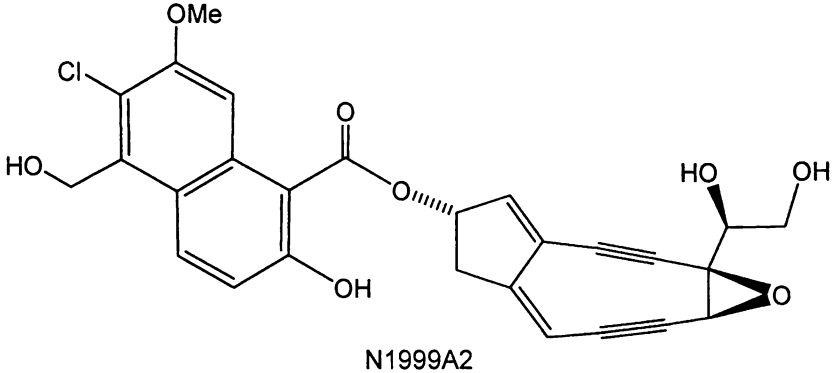
Механизм расщепления обеих цепей ДНК калихеамицином представлен на схеме.



Под действием восстановителей (например, сульфидной группы белковой молекулы) молекула антибиотика *1* присоединяет нуклеофильную группу по C_{12}, что вызывает перегруппировку связей в цикле и раскрытие оксирана с образованием промежуточного интермедиата *2*, который затем подвергается циклоароматизации с образованием бирадикала *3*. Далее бирадикал отрывает водород от атома C5' дезоксирибозы. Образующийся радикал дезоксирибозы присоединяет молекулу кислорода, вызывая последующие превращения, приводящие к разрыву ДНК.



Ендииновые антибиотики нового поколения, например аналог неокарциностатина антибиотик N1999A2, являются сильнейшими ингибиторами роста опухолевых клеток и бактерий, цитотоксические свойства их превосходят неокарциностатин в несколько раз. Молекула антибиотика N1999A2 содержит девятичленное ендииновое кольцо, но, в отличие от неокарциностатина, в нем отсутствуют как пептид, так и остаток сахара.



N1999A2

Все антибиотики этой группы также претерпевают циклоароматизацию и образование бирадикала под действием восстановителей. В основном эти антибиотики связываются с ДНК в малой бороздке с очень высокой селективностью, предпочитая последовательности TCCT, TCCC, TCCA, ACCT, TCCG, GCCT, CTCT, TCTC. В последние годы идет активный поиск новых антибиотиков, содержащих ендииновые структуры, в связи с их способностью разрушать раковые клетки, подавлять размножение различных микроорганизмов.

Глава 20. Биоинформатика

Биоорганическая химия имеет дело с огромным количеством информации. Так, первичная структура ДНК в геноме человека представлена примерно тремя миллиардами пар нуклеотидов. В напечатанном виде даже запись такой последовательности нуклеотидов заняла бы большое число томов. А манипулировать вручную такими данными для решения каких-либо задач биоорганической химии просто было бы немыслимо. Все это стало практически возможным после появления современных компьютеров и системы Интернет. В этой главе рассматриваются некоторые задачи, решаемые методами биоинформатики на основе первичных структур нуклеиновых кислот и белков.

Основным источником информации по нуклеотидным последовательностям ДНК и РНК и аминокислотным последовательностям в белках являются соответствующие банки данных. Для нуклеиновых кислот адреса этих банков данных в Интернете приведены в § 3.5, а для белков – в § 8.3. Существует три основных банка данных: GenBank, банк данных нуклеотидных последовательностей EMBL и японский банк данных нуклеотидных последовательностей DDBJ (табл. 22). Они разрабатываются в рамках проекта Международного сотрудничества нуклеотидных баз данных (INSDC). Принципы хранения и аннотации информации в этих банках данных сходные.

Таблица 22

Нуклеотидные банки данных и их основные интернет-ресурсы

Банк данных	Интернет-ресурсы	Ссылка
GenBank	Официальный сайт: *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/* Сайт подачи информации: *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/*	[1]
База данных нуклеотидных последовательностей EMBL	Официальный сайт: *http://www.ebi.ac.uk/embl/* Сайт подачи информации: *http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html*	[2]
DDBJ	Официальный сайт: *http://www.ddbj.nig.ac.jp/* Сайт подачи информации: *http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/*	[3]

Они содержат наборы записей – по одной записи на каждую нуклеотидную последовательность. Кроме самой последовательности, запись содержит дополнительную информацию (аннотацию). Как правило, это описание по-

следовательности, название организма, ссылки на литературу, список авторов секвенирования, информация, связанная с описанием функции ДНК/РНК. В данном пособии мы будем опираться на базу данных GenBank.

Пополнение информации GenBank осуществляется в основном за счет проектов секвенирования геномов, а также информации, переданной научными группами, осуществляющими секвенирование ДНК. Банки данных позволяют подавать информацию о вновь секвенированных последовательностях в электронном виде. Для согласованности представления информации о нуклеотидных последовательностях в банках данных разработана общая система описания их особенностей и система обмена информацией. В результате такого согласования последовательность нуклеотидов будет иметь единообразное аннотирование, в каком бы банке данных она ни находилась. Подробнее об общих принципах хранения и распространения информации в банках данных нуклеотидных последовательностей можно прочитать в работе [4] (см. в конце главы) и на сайте http://www.ebi.ac.uk/embl/Documentation/INSD_policies.html.

Рассмотрим особенности представления информации по нуклеотидным последовательностям на примере банка данных GenBank. Эта база данных разрабатывается и поддерживается Национальным центром биотехнологической информации (NCBI) Национального института здоровья (NIH), США [1] и является открытой для свободного доступа. По состоянию на декабрь 2009 года в базе содержалось около 108 миллионов последовательностей, а их общая длина составила порядка 106 миллиардов нуклеотидов. Каждая запись в GenBank содержит нуклеотидную последовательность и ее аннотацию. Аннотация последовательностей включает научное название последовательности, название организма, библиографические ссылки, таблицу особенностей, которые идентифицируют кодирующие районы и прочие участки, имеющие биологическую значимость (единицы транскрипции, сайты мутаций, модификаций, повторы и т. п.). Для кодирующей части приводится соответствующая ей аминокислотная последовательность. База данных GenBank обновляется каждые два месяца. В ходе обновления добавляются новые записи, а также модифицируется и уточняется содержание уже существующих записей.

§ 20.1. Представление последовательностей в компьютерном формате

Последовательность нуклеотидов ДНК на компьютере может быть представлена в виде строки, составленной из символов 4-буквенного алфавита, кодирующего типы нуклеотидов (A,T,G,C). Аналогично, последовательность аминокислот в белке можно представить в виде символов аминокислот 20-буквенного алфавита, соответствующего набору канонических аминокислот. Для хранения и ввода в программы анализа одним из наиболее часто используемых компьютерных форматов представления последовательностей явля-

ется формат FASTA (по названию программы, в которой он впервые стал использоваться). В этом формате одна или несколько последовательностей представляются в виде текстового файла. Описание каждой последовательности начинается с символа '>', за которым до конца строки следует название. Начиная со следующей строки приводится сама последовательность в символах стандартного алфавита (4-символьного для ДНК или РНК и 20-символьного для белковых последовательностей). Длина строки с последовательностью в этом формате обычно ограничена 80-ю символами для удобства визуализации в текстовых редакторах. Поэтому последовательность может быть записана в несколько строк. Пример нескольких последовательностей панкреатических рибонуклеаз из разных организмов в формате FASTA приведен на рис. 126.

Рис. 126. Последовательности панкреатических рибонуклеаз из разных организмов в формате FASTA

§ 20.2. Сравнение последовательностей макромолекул

Сравнение последовательностей генов и белков является важным для установления их взаимного родства, общности структуры или функций. Необходимым шагом при этом является выравнивание. Это процедура совмещения позиций двух последовательностей, причем выровненные участки последовательности должны иметь биологическое сходство (общность происхождения, функции, структуры и т. п.). На рис. 127 представлены выровненные последовательности аминокислот для белка TBP (см. гл. 8). Последовательности разбиты на несколько строк. Слева от последовательности приведены названия организмов, справа – длина. Столбцы выравнивания, в которых находятся одинаковые типы аминокислот, помечены звездочкой. Столбцы, в которых встречаются аминокислоты, имеющие высокое сходство боковых радикалов по физико-химическим свойствам, помечены двоеточием. Столбцы, в которых встречаются аминокислоты, сходные в меньшей степени, помечены точкой.

```
Drosophila      MDQMLSPNFSIPSIGTPLHQMEADQQIVANPVYHPPAVSQPDSLMPAPGSSSVQHQQQQQ 60
Human           MDQNNSLPPYAQGLASPQGAMTPGIPIFSPMMPYGTGLT-PQPIQNTNSLSILEEQQRQQ 59
                ***  *      .:.:*   *     *.:           *:.:      * ::.**:**

Drosophila      QSDASGGSGLFGHEPSLPLAHKQMQSYQPSASYQQQQQQQQLQSQAPGGGGSTPQSMMQP 120
Human           QQ---------QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAVAAAAVQQSTSQQA 110
                *.                  ::* *. *     ******** *.**            *.

Drosophila      QTPQSMMAHMMPMSERSVGGSGAGGGGDALSNIHQTMGPSTPMTPATPGSADPGIVPQLQ 180
Human           TQGTSGQAPQLFHSQTLTTAPLPG----TTPLYPSPMTPMTPITPATPASESSGIVPQLQ 166
                    *  *     *:        .*          ..* * **:*****.* ..*******

Drosophila      NIVSTVNLCCKLDLKKIALHARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGAKS 240
Human           NIVSTVNLGCKLDLKTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGAKS 226
                ******** ******.***:****************************************

Drosophila      EDDSRLAARKYARIIQKLGFPAKFLDFKIQNMVGSCDVKFPIRLEGLVLTHCNFSSYEPE 300
Human           EEQSRLAARKYARVVQKLGFPAKFLDFKIQNMVGSCDVKFPIRLEGLVLTHQQFSSYEPE 286
                *::**********::************************************ :*******

Drosophila      LFPGLIYRMVRPRIVLLIFVSGKVVLTGAKVRQEIYDAFDKIFPILKKFKKQS 353
Human           LFPGLIYRMIKPRIVLLIFVSGKVVLTGAKVRAEIYEAFENIYPILKGFRKTT 339
                *********::********************** ***:**::*:**** *:*
```

Рис. 127. Сравнение последовательностей, кодирующих TATA-box-связывающие белки человека и *Drosophila melanogaster*

Так, при сравнении двух последовательностей, кодирующих TATA-box-связывающие белки (TBP) у человека и Drosophila melanogaster (см. рис. 127), эти белки можно условно разбить на два домена. N-концевая часть белка (позиции последовательности у человека 1–161) вариабельна, содержит много замен и делеций/вставок, обозначенных символом '-'. В этой части белка

у человека расположен полиглутаминовый домен (позиции 55–95), практически отсутствующий у белка дрозофилы. С-концевая часть двух белков консервативна, содержит много позиций, аминокислоты в которых идентичны (помечены звездочками). Этот домен консервативен у самых различных организмов – от архей до высших эукариот. Функция этого домена заключается во взаимодействии с ДНК в районе TATA-box. Чтобы дать представление о заменах, во втором консервативном домене на рис. 128 приведены строки последовательностей, в которых прямоугольниками обведены замены, не влияющие на функцию боковых остатков – Val → Ile, Arg→Leu, Asp→Glu, Phe→Tyr, Ser→Thr. Существенно реже наблюдаются функционально неэквивалентные замены, обведенные овалом.

```
Drosophila  LFPGLIYRM V R PRIVLLIFVSGKVVLTGAKVR Q EIY D AF D K I F PILK K F K K Q S  353
Human       LFPGLIYRM I K PRIVLLIFVSGKVVLTGAKVR A EIY E AF E N I Y PILK G F R K T T  339
            ********* : : ********************   *** : ** : : * : ****   * : *   :
```

Рис. 128. Строки последовательностей, в которых обведены замены

При сравнении нескольких последовательностей информация может быть существенно больше, поскольку можно изучать не только вариабельность или консервативность позиций, но также и наборы аминокислот, которые в них наблюдаются. На основании этой информации можно оценивать функциональную важность позиций белка и даже предсказывать его структуру.

В настоящее время для выполнения процедуры выравнивания последовательностей разработано много программ, которые используют алгоритмы различной степени сложности. Одной из наиболее популярных является программа CLUSTALW, которую можно установить на персональном компьютере или воспользоваться ею через Интернет. Интернет-версия программы располагается на сервере Европейского института биоинформатики (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html). На вход этой программы подается набор из последовательностей гомологичных белков в формате FASTA. Описание алгоритма и программы CLUSTALW можно найти в работе [1]. Пример множественного выравнивания белков TBP из разных организмов, полученных при помощи программы CLUSTALW, приведен на рис. 129, на котором аминокислоты представлены различными цветами: красным цветом – малые и гидрофобные аминокислоты, включая триптофан (A, V, F, P, M, I, L, W); синим – отрицательно заряженные (D, E); розовым – положительно заряженные (R, H, K); зеленым – полярные незаряженные (S, T, Y, C, N, G, Q).

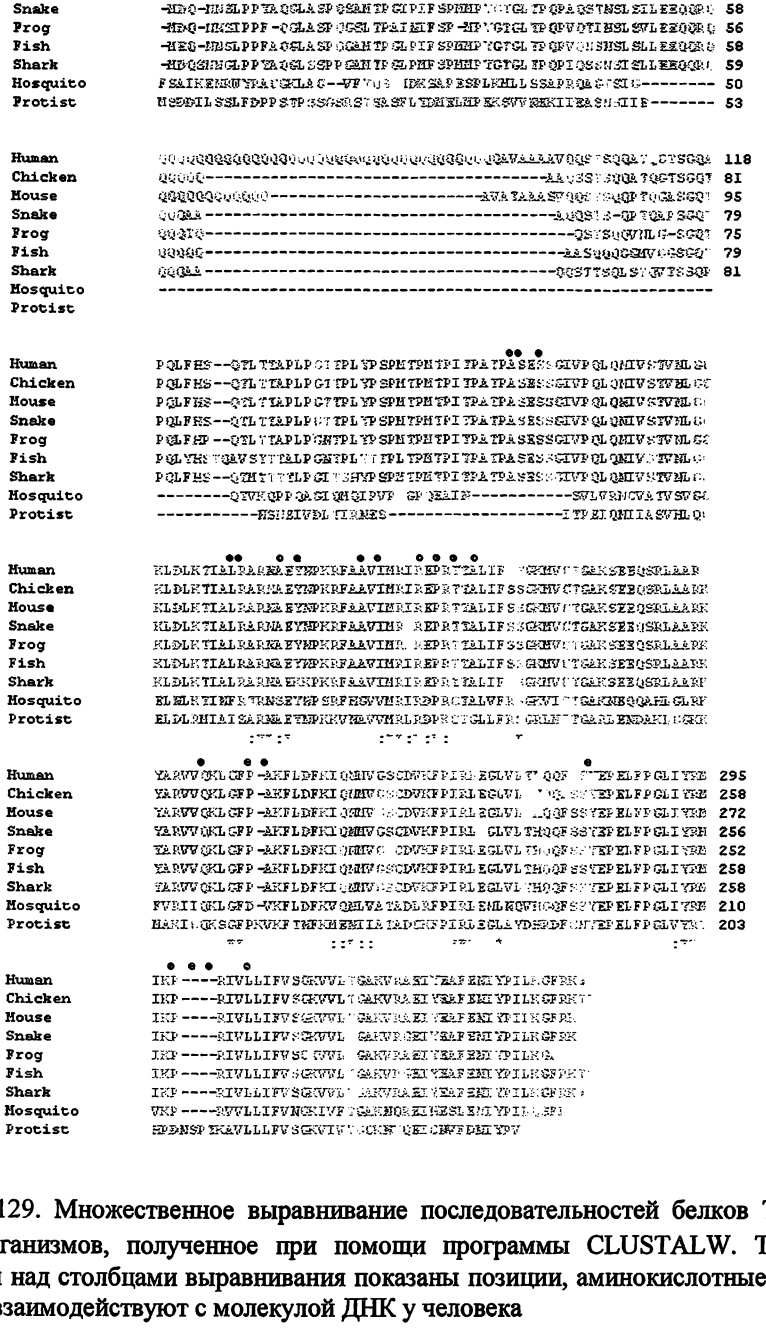


Рис. 129. Множественное выравнивание последовательностей белков TBP для девяти организмов, полученное при помощи программы CLUSTALW. Темными кружками над столбцами выравнивания показаны позиции, аминокислотные остатки которых взаимодействуют с молекулой ДНК у человека

Из рис. 129 хорошо видно разделение последовательности на консервативный С-терминальный и вариабельный N-терминальный участки. Для С-

терминального домена характерна высокая степень консервативности позиций выравнивания и повышенная частота встречаемости заряженных аминокислот (D, E, K, R, H). Этот домен (~ 180 аминокислотных остатков) содержит два повторенных участка длиной около 77 аминокислот, формирующих седлообразную структуру, способную связываться с малой бороздкой ДНК в районе TATA-box [2]. Остатки, формирующие в TBP человека взаимодействия с ДНК, показаны на рисунке кружочками над его последовательностью. Как видно из выравнивания, большинство из этих позиций консервативны.

N-терминальные домены белков TBP содержат преимущественно полярные незаряженные аминокислоты (выделенные зеленым цветом). Эти участки последовательностей наиболее вариабельны; например, у комара и протистов отсутствуют достаточно большие их фрагменты. Хорошо заметен полиглутаминовый тракт, характерный для последовательности человека. Интересно, что мутации, приводящие к увеличению числа повторенных глутаминов у человека, связаны с возникновением ряда «полиглутаминовых» нейродегенеративных заболеваний, таких как спиноцеребральная атаксия [3].

§ 20.3. Алгоритм BLAST быстрого поиска локального сходства

В некоторых случаях необходимо вместо полного выравнивания последовательностей по всей длине определить, существуют ли в паре последовательностей участки хорошего сходства. Например, в случае, когда секвенирована новая последовательность ДНК, возникает вопрос, существуют ли в банках данных сходные последовательности. Для решения подобных задач разработана программа BLAST. Она использует модификацию алгоритма парного выравнивания. Программа не строит глобального выравнивания двух последовательностей, а только находит в них участки высокого локального сходства. Программа позволяет проводить поиск гомологичных нуклеотидных последовательностей в банке данных размером в несколько десятков миллиардов нуклеотидов за считанные секунды. Сайт программы: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Алгоритмы программы BLAST описаны в работе [4].

§ 20.4. Поиск мотивов и функциональных сайтов в базе данных PROSITE

Активные сайты белка – короткие участки полипептидных последовательностей, которые выполняют в белках важные функции – связывание с лигандами (ионами металлов, ДНК, пептидами), формирование определенной пространственной структуры и т. п. Наборы аминокислот, характерные для последовательностей функционального сайта, называют мотивами. Опи-

сать мотивы для коротких гомологичных последовательностей можно при помощи паттернов (от англ. pattern – узор). Предположим, имеется набор последовательностей ДНК-связывающих доменов «цинковый палец» C2H2 [5] из нескольких гомологичных белков. Их выравнивание представлено ниже. Слева приведены идентификаторы последовательностей белков. Справа – последовательности их доменов C2H2. Под выравниванием приведена нумерация позиций и строка консенсуса – набора аминокислот, общих для всех последовательностей.

```
NP_446085.1  :CPAEGCDRRFSRSDELTRH-IRIH
NP_446085.1  :C--RICMRNFSRSDHLTTH-IRTH
AAO84551.1   :CPVESCDRRFSRSDELTRH-IRIH
ABH07425.1   :CPVETCDRRFSRSDELTRH-IRIH
XP_524650.2  :C--ETCGKRFTRQEHLRSHALSVH
XP_001232215.1:CT-E-CGKSFIRRDHLLKH-WRVH
XP_001626222.1:CDVHNCNRRFARNEELTRHK-
RIH
EDO34122.1:  :C--KVCRKAFGRKDHLSKHE-KTH
         :1.......10.......20...25
Консенсус
:CXXXXCXXXFXRXXXLXXHXXXXH
```

Для формирования паттерна прежде всего необходимо обратить внимание на консервативные позиции, характерные для гомологичных последовательностей (они выделены в выравнивании серым фоном, а в строке «Консенсус» – жирным шрифтом). В домене типа «цинковый палец» консервативные цистеины (C) и гистидины (H) образуют связи с заряженным ионом цинка, а консервативные остатки фенилаланина (F) и лейцина (L) входят в гидрофобное ядро домена. Консервативный аргинин (R) вступает в контакт с ДНК. Остатки между двумя цистеинами образуют короткую петлю (длина этой петли может варьировать от 2 до 5, как видно из выравнивания) [5]. В итоге паттерн, описывающий домены C2H2, можно записать как

Паттерн1: X(2)-C-X(2,4,5)-C-X(3)-F-X-R-X(3)-L-X(2)-H-X(3,4)-H

Здесь дефисом разделяется описание набора позиций (или одной позиции), буквами обозначены типы аминокислот, допустимые в этих позициях. Если тип аминокислоты в позиции неважен, то он обозначается символом X. В скобках указано число идущих подряд одинаковых остатков. Мотив может быть представлен не только набором консервативных аминокислот. Например, следует обратить внимание на позицию 17 выравнивания. В этой позиции наблюдаются только отрицательно заряженные аминокислоты (D – аспа-

рагиновая кислота и E – глутаминовая кислота). Их функция состоит в связывании с основаниями ДНК. Этот факт можно учесть при формировании паттерна путем явного указания допустимых типов аминокислот в 17-й позиции выравнивания, перечислив их в квадратных скобках ([DE]):

Паттерн2: X(2)-C-X(2,4,5)-C-X(3)-F-X-R-X-[DE]-X-L-X(2)-H-X(3,4)-H

Таким образом, паттерн 2 будет более адекватно отражать особенности последовательностей ДНК-связывающего домена C2H2. Подобные мотивы активных сайтов белков, известных в настоящее время, записаны и аннотированы в базе данных PROSITE (http://au.expasy.org/prosite/). По состоянию на ноябрь 2009 г. PROSITE содержал свыше полутора тысяч описательных записей и около 1300 паттернов для активных сайтов в последовательностях белков. База данных PROSITE тесно интегрирована с банками данных белковых последовательностей, все известные в настоящее время белки проверяются на наличие активных сайтов.

Существует ряд программ, которые позволяют искать в последовательности всевозможные активные сайты из базы PROSITE. Одна из таких программ – ScanProsite (http://au.expasy.org/tools/scanprosite/). Она также позволяет проводить поиск мотива, сформированного пользователем самостоятельно, в базе данных аминокислотных последовательностей. Описание базы данных PROSITE можно найти в работе [6].

§ 20.5. Предсказание вторичной структуры РНК

В настоящее время разработано несколько программ, доступных через Интернет, которые позволяют рассчитывать модель вторичной структуры РНК. Одной из наиболее популярных является программа MFold (http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/). Она позволяет оценивать вторичную структуру РНК методом оптимизации свободной энергии конформации РНК. Энергия вычисляется на основе термодинамических параметров, которые соответствуют энергии взаимодействия оснований. Результаты расчетов выводятся в текстовом и графическом виде. На вход программы подается последовательность нуклеотидов, для которой необходимо оценить вторичную структуру. Программа позволяет задавать параметры оптимизации, такие как набор ограничений на спаривание тех или иных оснований в последовательности, цикличность или линейность структуры ДНК/РНК. Предполагается, что формирование пространственной структуры (от англ. folding – укладка) происходит при температуре 37 ^{0}C. Результат расчета вторичной структуры фрагмента матричной РНК белка TBP человека программой MFOLD показан на рис. 130. Описание работы сервера Mfold представлено в работе [7].

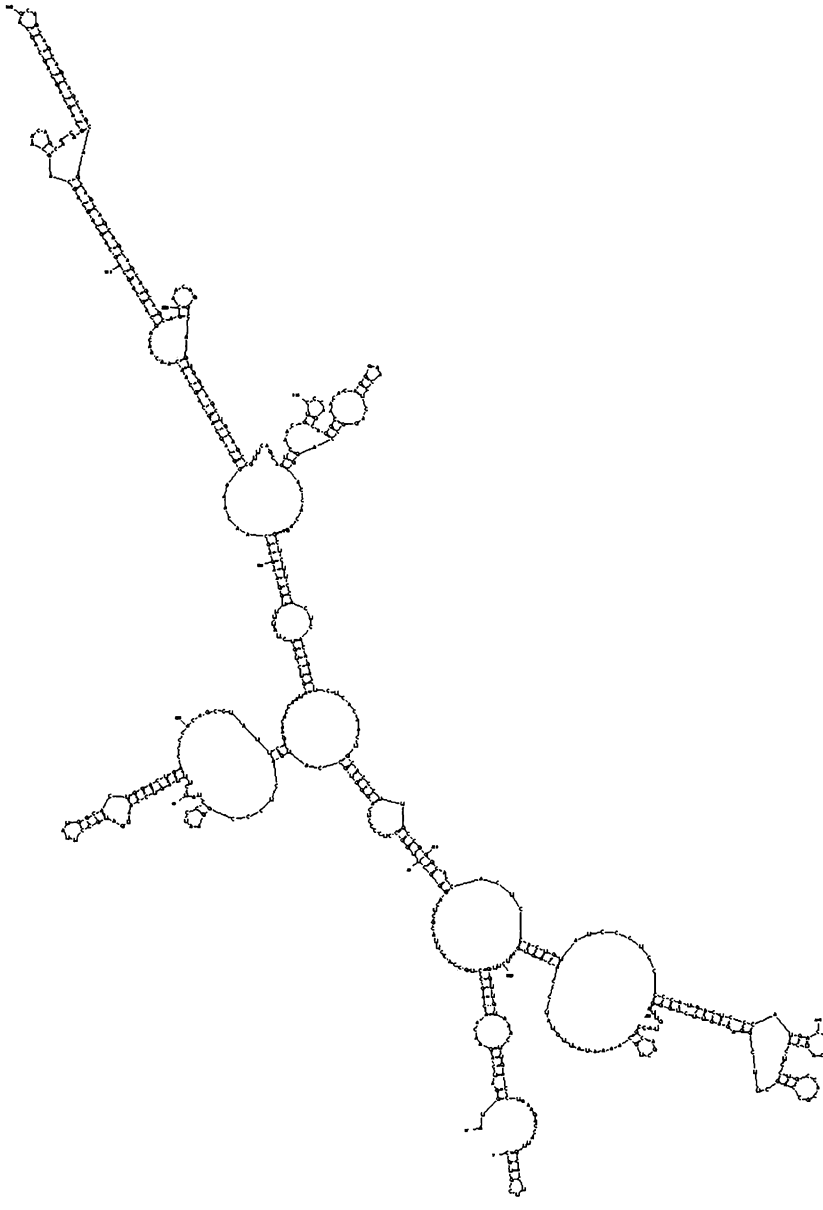


Рис. 130. Пример расчета вторичной структуры первых 714 оснований матричной РНК, кодирующей белок TBP человека программой Mfold

§ 20.6. Банк данных PDB

Банк данных PDB (Protein Data Bank) является основным источником информации о третичных и четвертичных структурах макромолекул, а также

о структуре их комплексов с малыми молекулами. Этот банк данных поддерживается Исследовательским консорциумом по структурной биологии (RCSB), который объединяет несколько научно-исследовательских организаций США. Официальные обновления информации происходят ежеквартально. По состоянию на декабрь 2009 года в PDB содержалось около 60 тысяч структур. Официальный сайт PDB: http://www.pdb.org. Описание банка данных PDB можно найти в работе [8].

Запись PDB может содержать как информацию о структуре одной полипептидной цепи, так и о структуре комплексов, которые включают несколько полипептидных цепей, цепи ДНК, РНК, молекулы ионов, лигандов и других соединений. Часть данных включает координаты атомов молекулы. Они описаны в строках, имеющих тип ATOM. Каждый атом в молекуле характеризуется порядковым номером, названием, мономером и цепью, к которой он относится, тремя координатами, значением температурного фактора (рис. 131).

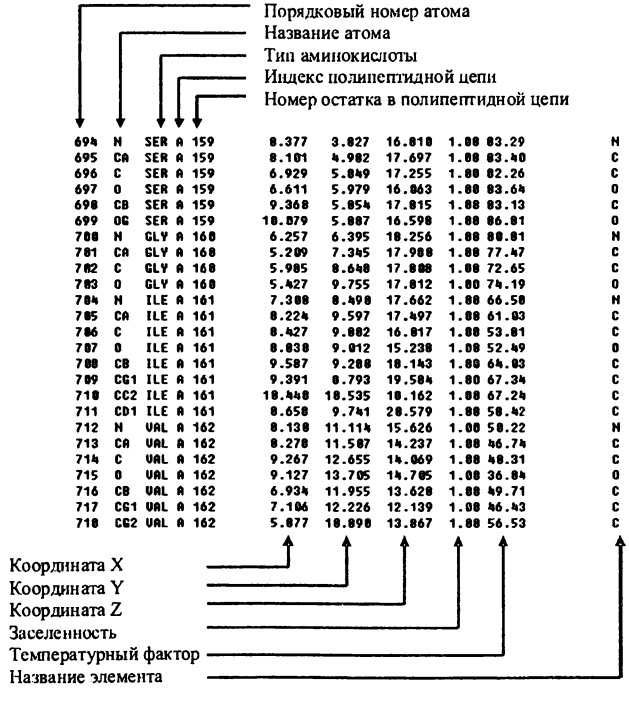


Рис. 131. Описание координат атомов аминокислотных остатков 159–162 цепи A (TBP). Атом характеризуется порядковым номером (первая колонка в строке ATOM), названием (2-я колонка), типом мономера (3-я колонка) и индексом цепи, к которой он относится (4-я колонка), тремя координатами X,Y,Z (6, 7 и 8-я колонки соответственно), значениями заселенности (9-я колонка) и температурным фактором (10-я колонка)

Иногда анализ электронной плотности не позволяет четко идентифицировать положение атома, тогда может быть приведено несколько его альтернативных положений. Заселенность – число от 0 до 1, которое характеризует надежность определения положения атомов. Для большинства атомов в структурах, полученных с высоким разрешением, заселенность равна 1. Температурный фактор – число от 0 до 100, которое характеризует тепловые флуктуации атома. Чем больше это число, тем больше флуктуации. Значение температурного фактора, как правило, больше для атомов боковых групп остатков, расположенных в петлях и на поверхности белка.

§ 20.7. Программы визуализации пространственных структур макромолекул

В банках данных пространственных структур информация о пространственных структурах содержится в текстовых файлах в виде списка координат атомов. Поэтому для визуализации этой информации необходимо использование дополнительных программ. В настоящее время разработано множество средств визуализации пространственных структур макромолекул, которые можно использовать как на локальных компьютерах, так и через Интернет (JAVA-приложения). Список наиболее популярных программ приведен в табл. 23.

Таблица 23

Программы визуализации пространственных структур макромолекул

Программа	Адрес в Интернет	Тип программы
Rasmol	http://www.umass.edu/microbio/rasmol/index2.htm	Приложение Windows
CN3D	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml	Приложение JAVA
Chime	http://www.umass.edu/microbio/chime/	Модуль к Internet Explorer

Примером программы визуализации структур может служить программа Rasmol (рис. 132). Она является одной из наиболее популярных и доступных. Официальный сайт программы содержит информацию о правилах работы с ней. Программа функционирует в режиме двух окон – графического и текстового. В графическом окне происходит визуализация структур макромолекул, в текстовое окно вводится управляющая информация, которая позволяет изменять масштаб рисунка, цвет, представление молекул, выделять группы атомов, остатков, белковых цепей. Управляющие данные вводятся в виде текстовых команд, описание которых приведено на странице помощи. Популярность этой программы и доступность ее кодов привела к тому, что на ее

основе разработаны новые, более функциональные средства визуализации структур (OpenRasmol, ProteinExplorer).

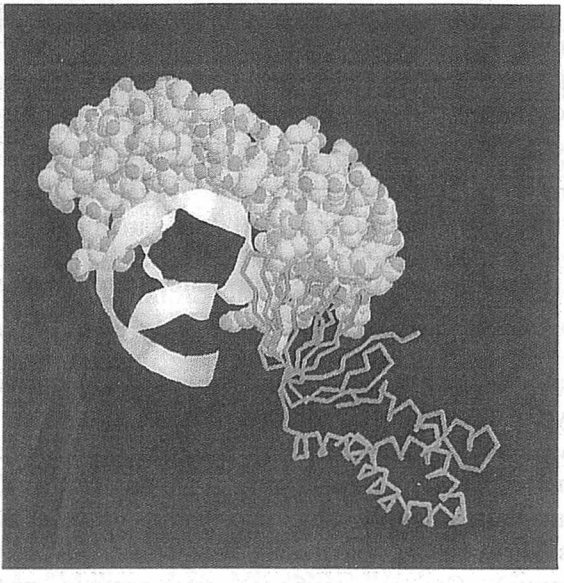


Рис. 132. Графический интерфейс программы Rasmol. На рисунке показана пространственная структура комплекса белка TBP (представлен сферами), ДНК (представленной в виде лент), альфа-, бета- и гамма-цепи фактора инициации транскрипции TFIIA, представленные в виде проволочной модели

Предсказание вторичной структуры белка

Одной из важных задач структурной биоинформатики является предсказание пространственной структуры белка по его аминокислотной последовательности. Одной из наиболее популярных программ предсказания вторичной структуры белка является программа PSIPRED (адрес в Интернете http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html). Анализ показал, что в среднем доля аминокислотных остатков, для которых вторичная структура при помощи программы PSIPRED предсказывается правильно, составляет 76–78 %.

Предсказание пространственной структуры белка

В настоящее время разработаны достаточно точные методы предсказания пространственной структуры белка по гомологии. Они работают хорошо тогда, когда для белка с искомой структурой находится гомологичный белок с известной структурой (шаблон). Одна из таких программ – SWISS-MODEL, адрес в Интернете: http://swissmodel.expasy.org/. Этот сервер позволяет решать различные задачи в области моделирования структуры белка, в частности, моделирование структуры по гомологии. В процессе моделирования

белка с неизвестной структурой программа ищет гомологичные для него белки, структура которых известна в банке данных PDB. Белок с наибольшим сходством является шаблоном для моделирования. Затем производится выравнивание последовательности искомого белка с последовательностью шаблона с учетом структурных особенностей последнего. После этого боковые группы остатков шаблона, которые различаются в выровненных позициях шаблона и искомого белка, заменяются на боковые группы аминокислот искомого белка. В местах структуры, соответствующих делециям или вставкам в выравнивании, достраиваются петли. После этого производится оптимизация конформации полученной модели с целью устранения стерически запрещенных состояний, которые могут возникать, например, из-за замены малой боковой группы на большую (Ala → Ile). Полученная в результате оптимизации структура выдается пользователю. Такой метод может работать достаточно хорошо, если уровень совпадения последовательности искомого белка и шаблона выше 50 %. В этом случае среднеквадратичное отклонение координат С-альфа атомов модели, как правило, не превышает 2.5 Å, а в случае высокой гомологии может быть менее 1 Å.

Литература

1. Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.

2. Nikolov D. B., Hu S. H., Lin J., Gasch A., Hoffmann A., Horikoshi M., Chua N. H., Roeder R. G., Burley S. K. (1992) Crystal structure of TFIID TATA-box binding protein. *Nature*, **360**, 40-46.

3. Koide, R.; Kobayashi, S.; Shimohata, T.; Ikeuchi, T.; Maruyama, M.; Saito, M.; Yamada, M.; Takahashi, H.; Tsuji, S. (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Molec. Genet.*, **8**, 2047-2053.

4. Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

5. Klug A. and Schwabe J. W. (1995) Zinc fingers. *The FASEB Journal*, **9**, 597-604.

6. Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., De Castro E., Langendijk-Genevaux P.S., Pagni M., Sigrist C.J. (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D227-D230.

7. Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3406-3415.

8. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.

Приложение

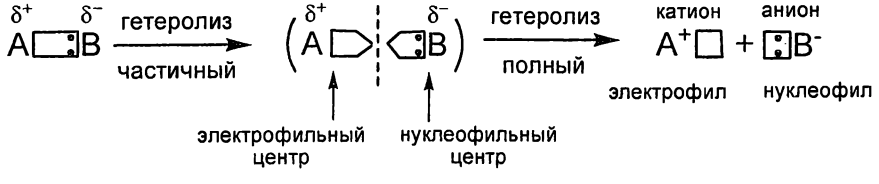
Реакции, протекающие в живых организмах, по своему химическому содержанию не отличаются от любых реакций органической химии (и от некоторых реакций неорганической химии). Среди этих реакций широко представлены различные кислотно-основные превращения. Для биоорганической химии наиболее существенны понятия о кислотах и основаниях по Бренстеду, т. е. как молекул, способных отдавать протон (кислоты) или принимать протон (основание). В силу обратимости процессов понятие о кислоте и основании являются сопряженными – кислота, отдавшая протон, становится сопряженным основанием, а основание, присоединившее протон, становится сопряженной кислотой. Количественной характеристикой сопряженной пары HA/A^- является константа равновесия реакции передачи протона от кислоты к молекуле воды, т. е. реакции

$$HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

$$K_a = [A^-]\,[H_3O^+]/[HA]$$

Причем вместо концентрации воды используется мольная доля, которая для достаточно разбавленных растворов близка к единице. Обычно в качестве характеристики пары приводят не саму константу ионизации, а ее десятичный логарифм, обозначаемый как pK.

Реакции классифицируются в зависимости от того, сохраняется или разрывается электронная пара, образующая участвующую в реакции связь. Если пара сохраняется, то процесс называют *гетеролитическим.* Разрыв связи, сопровождающийся переходом пары электронов к одной из образующихся частиц, называют гетеролизом. Гетеролиз может быть полным или частичным, когда электронная пара сильно смещается к одному из партнеров



При полном разрыве на одном из атомов возникает положительный, а на другом – отрицательный. Первая из образовавшихся частиц называтся *электрофилом*, а вторая – *нуклеофилом*. При частичном гетеролизе на одном из атомов возникает электрофильный, а на втором – нуклеофильный центр.

Важной характеристикой молекул является поляризуемость – способность образовывать наведенный дипольный момент во внешнем электрическом поле. Электрофилы и нуклеофилы характеризуются различной поляризуемостью и качественно подразделяются на *жесткие* (низкая поляризуемость) и *мягкие* (высокая поляризуемость).

Жесткие электрофилы имеют сравнительно большой положительный заряд, а их свободная орбиталь, на которую перейдет электронная пара нуклеофила, имеет низкий уровень энергии. Жесткими электрофилами являются: H^+, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}. *Жесткие нуклеофилы* хорошо удерживают свою электронную пару, поскольку ее орбиталь расположена близко к ядрам атомов и имеет низкий уровень энергии. Донорными атомами в жестких нуклеофилах могут быть кислород, азот, хлор, фтор. Жесткими нуклеофилами являются:

$$H_2O,\ OH^-,\ ROH,\ RO^-,\ ROR,\ RCOO^-,\ NH_3,\ Cl^-,\ F^-$$

Жесткие нуклеофилы трудно окисляются.

Мягкие электрофилы содержат акцепторные атомы большого размера с невысокой электроотрицательностью и с малым положительным зарядом. Их свободная орбиталь, принимающая электронную пару нуклеофила, имеет высокий уровень энергии. Мягкими электрофилами являются:

$$Hg^{2+},\ Cu^+,\ Ag^+,\ -I^{\delta+},\ -Br^{\delta+}$$

Мягкие нуклеофилы плохо удерживают свою электронную пару, поскольку ее орбиталь удалена от ядер атомов и имеет высокий уровень энергии. Донорными атомами в мягких нуклеофилах выступают атомы серы, углерода.

Мягкими нуклеофилами являются:

$$RS^-,\ RSR,\ RSH,\ I^-,\ R_2C{=}CR_2$$

Мягкие нуклеофилы довольно легко окисляются.

Если при разрыве химической связи образующая ее электронная пара разрывается, то разрыв называется *гомолитическим*. При этом образуются частицы, каждая из которых обладает неспаренным электроном. Такие частицы называются *свободными радикалами* или просто радикалами.

$$\underset{\text{молекула}}{A{:}B} \xrightarrow[\text{связи}]{\text{гомолиз ковалентной}} \underset{\text{радикал}}{A\cdot} + \underset{\text{радикал}}{\cdot B}$$

Прилагательное «свободный» следует применять в случаях, когда нужно избежать путаницы с понятием «радикал» как некоторая часть молекулы. Свободные радикалы в зависимости от их сродства к электрону могут либо

выступать как акцепторы электрона (т. е. быть *окислителями*), либо как доноры электрона (*восстановители*).

Главным источником радикалов в живых организмах является молекулярный кислород. Молекула кислорода парамагнитна, так как содержит два неспаренных электрона и представляет собой бирадикал $\bullet O_2 \bullet$. При неполном восстановлении кислорода образуются различные его активные формы, в том числе и свободные радикалы:

– супероксидный анион-радикал $\bullet O_2^-$

$$O_2 + e^- \rightarrow \bullet O_2^-$$

– гидропероксидный радикал $HO_2\bullet$

$$O_2 + e^- \rightarrow HO_2\bullet$$

– гидроксильный радикал $HO\bullet$

$$O_2 + 3e^- + 3H^+ \rightarrow HO\bullet + H_2O$$

Свободные радикалы образуются при воздействии на водные растворы биполимеров и других соединений проникающей радиации. Первичные процессы в зависимости от природы облучаемых соединений могут быть различны, но наиболее характерным продуктом облучения водных растворов являются радикалы $HO\bullet$.

Биологическое функционирование белков и нуклеиновых кислот неразрывно связано с их пространственной структурой. Геометрия любой молекулы определяется тремя группами геометрических характеристик ее химических связей – длинами всех ковалентных связей, углами между связями, образуемыми каждым из атомов молекулы, и торсионными углами между связями, примыкающими к соседним атомам. Первые две группы характеристик для атомов лежат в достаточно узких пределах и сравнительно мало влияют на геометрию молекулы в целом. Поэтому геометрия макромолекулы в основном определяется *торсионными углами* между атомами остова молекулы. Эти углы определяют взаимное расположение в пространстве четырех соседних атомов A, B, C и D. Схема определения понятия торсионного угла приведена на рис. 133.

Торсионным углом называют угол поворота связи A-B вокруг связи B-C относительно связи C-D, т. е. угол между плоскостями, содержащими атомы A, B, C и атомы B, C, D. За ноль принимают угол между указанными плоскостями, если они совпадают, причем связи A-B и C-D расположены по одну сторону от связи B-C. При этом если рассматривать систему атомов вдоль связи B-C, то связь A-B заслоняет связь C-D, в связи с чем такую структуру называют заслоненной. Согласно рекомендациям Международного союза чистой и прикладной химии (IUPAC, International Union of Pure and Applied

Chemistry) и Международного союза биохимии (IUB, International Union of Biochemists) торсионный угол между связями A-B и C-D считается положительным, если для перевода системы в заслоненную структуру нужно повернуть связь A-B по часовой стрелке, и соответственно отрицательным, если такой поворот должен быть осуществлен против часовой стрелки. При этом речь идет о поворотах, не превышающих 180^0 Каждая структура молекулы, характеризующаяся определенным набором величин всех ее торсионных углов, называется ее *конформацией.*

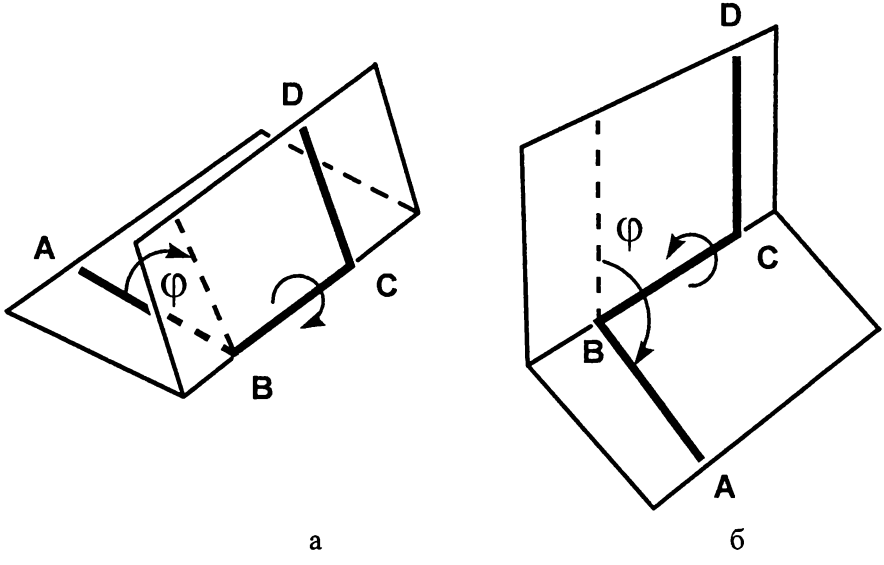


Рис. 133. К определению понятия торсионного угла φ: *а* – положительный угол; *б* – отрицательный угол

Список рекомендуемой литературы

Генис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с., ил.

Гершкович А. А., Кибирев В. К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. Киев: Наукова Думка, 1987. 264 с.

Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987. 584 с., ил.

Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. 3-е изд., испр. М.: Высш. шк., 2000. 479 с., ил.

Кочетков Н. К. и др. Химия углеводов. М.: Химия, 1967. 672 с.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М,: Просвещение, 1987. 815 с., ил.

Степаненко Б. Н. Химия и биохимия углеводов (моносахариды). М.: Высш. шк., 1977.

Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. 354 с., ил.

Branden C., Tooze J. Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc. N. Y.; L., 1991. 302 p.

Floss H. G., Yu T.-W. Rifamycin-mode of action, resistance and biosynthesis. Chem. Rev. 2005, Vol. 105. P. 621–632.

Galm U., Hager M. H., Van Lanen S. G., Ju J., Thorson J. S., Shen B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediynes and mitomycin. Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 739–758.

Kahne D., Leimkuhler C., Lu W., Walsh Ch. Glycopeptide and Lipoglycopeptide antibiotics. Chem. Rev. 2005, Vol. 105. P. 425–448.

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M. Principles of Biochemistry, Fifth Edition. Publisher: W. H. Freeman and Company; Fifth Edition (2008) ISBN-10: 0-7167-7108-X, 1158 p.

Shabarova Z., Bogdanov A. Advanced organic chemistry of nucleic acids. Weinheim; N. Y.; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH, 1994, 573 p.

Предметный указатель

α-кератин 197
α-спираль 190
β-галактозидаза 131
β-лактам 410
β-складка 192
1α,25-дигидроксихолекальциферол 403
1α-гидроксихолекальциферол 403
3,5,3'-трииодтиронин (Т3) 380
6-аминопенициллановая кислота 411
6-диазо-5-оксо-L-норлейцин (ДОН) 432
А-РНК 91
В-ДНК 87
В-лимфоцит 135
D-хиновоза 292
G-белок 333
L-рамноза 292
L-фукоза 292
N,N'-дициклогексилкарбодиимид (ДЦК) 208
N-ацетилгалактозамин 285
N-ацетилглюкозамин 285
N-ацетилмурамовая кислота 285
S_N2-замещение у насыщенного атома углерода, участие соседней группы 151
Т-лимфоцит 134
Z-ДНК 91

Авидин 396
авитаминоз 390
агароза 248
аденин 15
аденозин-3',5'-циклофосфат 37
аденозин-5'-трифосфат 20
адреналин 381
адриамицин 436
азасерин 432
аксон 132
активатор 131
активный центр панкреатической рибонуклеазы 349
активный центр фермента 342
актин 139
актиномицин D 437
актиноцин 437
акцепторный стебель 94
аланозин 433
аллостерический активатор 348
аллостерический ингибитор 348
альдоза 278
альдоновые кислоты 290
альдостерон 387
амилоза 302
амилопектин 302
аминоацил-тРНК 28
аминоацил-тРНК-синтетаза 28
аминогликозид 425
аминокислотный состав белка 141
аминопептидаза 176
амфотерицин В 420
ангидрид Лейкса 206
андростерон 386
анзамакролид 434
анзамицин 434
аномер 284
антибиотик 409
  гликопептидный 414
  грамотрицательный 409
  грамположительный 409
  депсипептидный 423
  полиеновый макролидный 420
  полипептидный 421
антибиотик-каналообразователь 422

антиген 134
антигенная детерминанта 134
антигенное воздействие 269
антикодон 28
анти-конформация 39
антиметаболит 431
антисмысловые олигонуклеотиды 267
антитела (иммуноглобулины) 135
антрамицин 440
антрациклиновая группа 436
апиримидиновый/апуриновый сайт(АП-сайт) 49
апоптоз 134
апофермент 131
аптамер 277
арахидоновая кислота 316
аспареномицины А-С 412
аспартам 237
АТФ-синтаза 340
аффинная модификация 258
аффинная хроматография 255
аффинное мечение 259
аффинный сорбент 255
ацетилхолин 133
ацетилхолинэстераза 133

Бактериофаг 35
банк нуклеотидных последовательностей 79
белки теплового шока 187
белок-рецептор 133
бензилиденовое производное диола (циклический ацеталь) 294
биополимер 11
бифункциональный реагент 199
блеомицин 443
бороздки 87
бромциансефароза 248

Вазопрессин 140
валиномицин 423
ванкомицин 414
вариабельный домен 135
вилка репликации 23
вироид 35
вирус 34
вирус иммунодефицита человека ВИЧ-1 34
вирусоид 35
витамин 390
витамин B_{13} (оротовая кислота) 407
витамин D (кальциферол, антирахитичный витамин) 402
витамин F 406
витамин N 392
витамин А (ретинол, аксерофтол, антиксерофтальмический фактор) 400
витамин A_1 (неовитамин А) 400
витамин B_1 391
витамин B_{12} (оксикобаламин, антианемический фактор, фактор кроветворения) 396
витамин B_2 (рибофлавин) 392
витамин B_3 (пантотеновая кислота) 393
витамин B_6 (пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин) ..394
витамин B_8, миоинозит (инозит, биос I, липотропный фактор) 407
витамин B_9, (птероилглутаминовая, фолиевая кислота) 394
витамин Е (α-токоферол) 403
витамин K_1 (филлохинон) 404
витамин K_2 (менахинон) 404
витамин Н (биотин, биос II) 396
витамин С (аскорбиновая кислота) 398
витаминоподобные вещества 406
витамины К 404
воска 322
восстанавливающие олигосахариды 297
восстановитель 468
встраивание гена 117
вторичная структура белка 189

вторичная структура нуклеиновых кислот....87

Ганглиозид....327
гаплоидная клетка....22
гем....138
гемоглобин....138
гемопротеид....358
ген....29
генетический код....26
ген-синтезатор....108
гентамицин....426
гепарин....302
гептапептид....414
гесперидин....407
гетероциклические основания....15
гиалуроновая кислота....302
гибридизация комплементарных последовательностей....85
гидроксилирование белков....171
гистон....22
гистон-ацетилтрансфераза....167
гистоновый код....167
главный комплекс гистосовместимости....135
гликан....301
гликирование белков....171
гликоген....301
гликогенин....301
гликогенфосфорилаза....301
гликозаминогликан....302
гликозид....296
гликозилгалогенид....296
гликозилирование....303
гликопротеин....303
гликохолевая кислота....330
глиоксаль....56
глицериновый альдегид....279
глобулярный белок....187
глутатион....140
глюкагон....383
глюкаровая кислота....290
глюкозопермеаза....336
глюконовая кислота....290
глюкуроновая кислота....290
глюцит....290
гомеодомен....272
гомоцистеинилирование белков 172
гормон....378
грамицидин....140
грамицидин А....422
гуанин....15
гуанозин-3',5'-циклофосфат....37

Дансилхлорид....145
Дауномицин....436
двуспиральный стебель....93
дегидрогеназа....353
дезоксирибоза....292
дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)....15
дезоксирибонуклеозид....16
декарбоксилирование α-кетокислот....366
денатурация белка....187
дендрит....132
диазометан....67
дизамещенная О-ацилизомочевина....208
диметилаллилпирофосфат....328
динемицин А....448
диоксигеназа....356
диплоидная клетка....22
дистамицин....438
дисульфидные мостики....127
ДНК, крестообразная структура..90
ДНК-зим....377
ДНК-лигаза....23
ДНК-полимераза....23
домен....135
дофамин....381
дуплекс....21

Замкнутые нуклеозиды....120

Изоаллоксазин....392
изопентенилпирофосфат....328
изопрен....400

изопропилиденовое производное диола (циклический кеталь) 294
изоэлектрическая точка белка 129
изоэлектрическая фокусировка ..130
иммобилизация биополимера.....247
иммобилизованный фермент.....250
иммуносорбент 255
ингибитор 131
инициация.....29
инсулин 382
интеграза.....35
интеркаляция.....84
интрон 30
ионофор 423

Калихеамицин γ_1 447
калнексин.....304
калретикулин.....304
кальмодулин 335
канамицин 426
карбодиимид 208
карбоксилирование (присоединение CO_2).....366
карбоксилирование глутамата....405
карбоксипептидаза 176
кардиолипин.....323
карминомицин.....436
карнитин 337
каротин 401
каспаза 134
катехин.....407
кверцетин.....407
кедарцидин 448
керазин.....326
кетоза 278
клавулановая кислота.....412
кодон 26
кодон-терминатор 27
колистин 421
коллаген.....139
комбинаторная химия 111
комплементарная ДНК (кДНК)....35
комплементарные последовательности.....20
конкурентный ингибитор..... 347
константа Михаэлиса..... 347
конформация 469
конформация по гликозидной связи 38
конформация полинуклеотидной цепи 37
кортизол 387
кортизон..... 387
кортикоид 387
кофактор 342
кофермент..... 342
кофермент А 393
коферменты (витамины) Q..... 406
крахмал 302
кривая плавления дуплекса..... 85
ксенобиотик..... 358
ксилит..... 290
кэпирование 30
кэпирование (при синтезе)..... 109

Лактатдегидрогеназа 354
лактоза..... 297
лактозный репрессор (lac-репрессор)..... 131
ланостерин..... 330
леворин A_2 420
лейкомицин 428
лейциновые застежки 276
лигирование..... 116
лимфоцит 134
линолевая кислота 317
линоленовая кислота 317
липкие концы 71
липоевая кислота 391
люминол..... 363

Макролид..... 428
малатдегидрогеназа 338
мальтоза 297
маннит..... 290
матричный фермент..... 23
мевалоновая кислота 328

медиатор (вторичный посредник) ... 379
межнуклеотидная связь ... 100
мелатонин ... 381
мессенджер РНК (мРНК) ... 24
метки
радиоактивные ... 252
флуоресцирующие ... 252
метод Максама-Гилберта ... 73
метод перекрывающихся блоков ... 78
метод Сэнгера ... 73
метод химической модификации 146
миелома ... 135
миколевая кислота ... 318
микрочип ... 111
минорные основания ... 30
миоглобин ... 195
миоинозит ... 291
митомицин ... 439
молекулярная селекция ... 276
моноклональные антитела ... 135
монооксигеназа ... 356
моносахарид ... 278
циклическая форма ... 284
монотерпен ... 329
морфолиниевая полинуклеотидная цепь ... 121
мотив ... 195
мутаротация ... 284
мутация ... 29

Направленный конформационный переход ... 128
нативная конформация ... 187
незаменимые аминокислоты ... 126
нейраминовая кислота ... 285
нейромедиатор ... 132
нейрон ... 132
неокарциностатин ... 447
неотрамицины А и В ... 440
нервон ... 326
нервоновая кислота ... 326
неструктурные белки ... 34
нетранскрибируемая цепь ... 25
нетропсин ... 438
никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+) ... 352
нингидрин ... 143
нистатин A_1 ... 420
нокардицин А ... 413
норадреналин ... 381
нуклеиновые кислоты ... 15
нуклеозид ... 16
нуклеозид-5'-дифосфат ... 18
нуклеозид-5'-монофосфат ... 17
нуклеозид-5'-трифосфат 18
нуклеозидциклофосфат ... 36
нуклеопротеид ... 27
нуклеосома ... 22
нуклеотид ... 15
нуклеофил ... 466
жесткий ... 467
мягкий ... 467
нуклеофильный катализатор ... 351

Обратная транскриптаза ... 35
озазон ... 295
озонирование ... 319
окислитель ... 468
окись азота (NO) ... 383
оксидаза ... 356
оксидоредуктаза ... 352
оксинервон ... 326
окситетрациклин ... 427
окситоцин ... 140
олеандомицин ... 428
олеиновая кислота ... 317
оливановая кислота ... 412
олигонуклеотид ... 20
олигонуклеотидный синтез
защитная группа ... 101
временная ... 101
диметокситритильная ... 101
для межнуклеотидного фосфата ... 102
для экзоциклической аминогруппы ... 102
постоянная ... 101

удаляемая фотохимически..112
Н-фосфонатный метод 104
реагент Маркевича 106
фосфодиэфирный метод 103
фосфотриэфирный метод.....103
олигонуклеотиды, блочный синтез 101
олигосахарид.....278
онкоген 133
опсин 138

Палиндромная последовательность 90
пальмитиновая (гексадекановая) кислота.....315
панкреатическая дезоксирибонуклеаза (ДНКаза)....66
панкреатическая рибонуклеаза...349
паринаровая кислота 317
паттерн.....33
пенициллин 411
пенициллоиновая кислота.....411
пепсин 176
пептидная связь.....123
пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) 122
пептидогликан.....306
первичная структура белка.....127
первичная структура нуклеиновой кислоты.....17
перспективные формулы Хеуорса.....284
петля.....93
пираноза.....284
пиранозный цикл
конформация «ванны» 288
конформация «кресла».....288
пиридоксалевый катализ.....363
пиримидиновые нуклеотиды.....15
пиросеквенирование.....76
плазмалоген.....321
плазмида 22
полиаденилирование 30
поликлональные антитела.....135
полимеразная цепная реакция (ПЦР) (амплификация)..... 113
полимиксин 421
полинуклеотидкиназа..... 35
полипептид 123
полипептидная цепь, субъединица 198
полисахарид..... 278
пострансляционное ацетилирование белков 167
пострепликационная модификация 32
посттранскрипционная модификация 29
посттрансляционная модификация 147
потенциал действия 339
праймер 25
прегненолон..... 385
препрогормон 382
прион..... 188
пробелок 164
прогестерон 387
проекционные формулы Фишера279
проинсулин..... 165
промотор..... 29
проникновение веществ через мембрану, челночный механизм 337
простагландин 388
простановая кислота..... 388
простетическая группа 131
пространственная структура белка..... 128
пространственная структура одноцепочечных рибонуклеиновых кислот..... 94
протеома 13
протоонкоген..... 133
протромбин..... 405
профлавин..... 436
процессивность 137
псевдовращение 287
псевдоузел 93
пуриновые нуклеотиды 15

пуромицин 430
ПЦР в реальном времени 115
пчелиный воск.....322

Радиоактивные изотопы.....252
разрыв связи
гетеролитический 466
гомолитический 467
рандомизованная
последовательность 276
расщепление
межрибонуклеотидных связей
алкилированием 67
расщепление по АП-сайтам 67
рахит 403
реактив Эллмана 163
реакции по гетероциклическим
основаниям
алкилирование по атому азота .51
ацилирование 53
дезаминирование 53
меркурирование 47
образование
этенопроизводных 54
присоединение бисульфита 48
присоединение карбодиимида..52
реакции отрыва атомов Н 57
реакции с пероксидами 52
реакция с гидразином 48
циклодимеризация.....55
циклоприсоединение OsO_4 53
циклоприсоединение
к псоралену 55
реакции по остаткам фосфорной
кислоты
активация фосфатного остатка
дифенилфосфохлоридом.....63
мезитоилхлоридом 63
окислительно-восстановительное
фосфорилирование по Мукаяма64
реакции по углеводным остаткам
ацилирование 59
реакции по цис-диольной
группе 59
реакционные центры
гетероциклических оснований..... 41
реакция нуклеофильного
присоединения-отщепления 158
резистентность патогенов 410
репарация..... 29
репликативная форма ДНК 82
репликация 23
ретровирус 34
рибит 290
рибозим 369
рибонуклеиновая кислота (РНК). 15
рибонуклеозид..... 16
рибосома 27
рибосомная РНК (рРНК)..... 27
рибосомные белки 27
рибосомные субчастицы 27
ристоцетин А 414
рифамицин..... 434
рифампицин..... 434
РНК-интерференция 271
РНК-полимераза..... 24
родопсин 138
рубомицин 436
рутин 407

Сайт-направленный мутагенез .. 344
саркомицин..... 432
сахарные кислоты 290
сахароза..... 297
свободный радикал 467
секвенатор белков 182
секвенатор нуклеиновых кислот . 75
секвенирование 69
селеноцистеин 124
сериновые протеазы..... 351
серотонин..... 382
сесквитерпен..... 329
сефароза 248
сиаловые кислоты 285
сибиромицин 440
сигнальный пептид 164
синапс..... 132
син-конформация 39

синтез полипептида
блочный метод 203
бензиловые эфиры 221
блокирование имидазольного кольца гистидина 230
защита гуанидиновой группы 227
защита индольного кольца гетероцикла 234
защита остатков гистидина 229
защитная группа по ε-аминогруппе лизина 223
защита SH-группы 235
монометокситритильная (Mmt) группа 244
защитная группа
2,6-дихлорбензильная 226
4,4'-диметоксибензгидрильная (MbH) 233
9-ксантильная (Xan) 233
адамантилоксикарбонильная (Adoc) 228
бензильная (Bzl) 224
удаляемая фотохимически ..217
9-флуоренилметил-оксикарбонильная (FMOC).216
бензилоксикарбонильная (Cbz) 215
трет-бутилоксикарбонильная (Boc) 216
трет-бутильная 224
тритильная (Trt) 233
карбодиимидный синтез 208
метионинсульфоксид 235
метод активированных эфиров212
метод смешанных ангидридов206
рацемизация хирального α-центра 237
трет-бутиловые эфиры 221
синтез углеводов
активация
диметилоксираном 312
трифторметансульфо-кислотой 311
цианэтилиденовая конденсация 309
защитные группы 308
синтезатор пептидов 242
сквален 330
смола Меррифилда 240
соединение олигонуклеотидов на комплементарной матрице 116
спейсер (линкер) 200
спектиномицин 427
спермацет 322
спиновое состояние 360
спирамицин 428
сплайсинг 30
стеариновая (октадекановая) кислота 315
стекинг-взаимодействие 84
стереоспецифическая нумерация321
стероидные гормоны 384
стрептавидин 396
стрептолидигин 435
стрептомицин 425
структура клеверного листа 94
структурные белки 34
субстрат 131
сульфазецин 413
сульфатид 327
суперспираль 89
сфинганин 324
сфингомиелин 325
сывороточный альбумин 138

Таурохолевая кислота 330
твердофазный синтез биополимеров 107
твердофазный синтез олигонуклеотидов 108
твердофазный синтез пептидов . 240
тейкопланин 414
тейхоевая кислота 303
температура плавления дуплекса 85
терминатор репликации 75
тестостерон 386
тетрагидрофолат (THF) 395

тетрациклин....427
тиамин....391
тиаминпирофосфосфат....391
тиенамицин....412
тилакоид....331
тилозин....428
тимин....15
тиреоглобулин....380
тиреоидные гормоны....380
тироксин (3,5,3',5'-
тетраиодтиронин, Т4)....380
токсин....138
томаймицин....440
топоизомераза....89
топологическая диаграмма....196
торсионный угол....468
транскрибируемая цепь....25
транскрипция....25
транслокация....265
трансляция....26
трансмембранный потенциал....339
трансметилирование....150
транспортная рибонуклеиновая
кислота, тРНК....94
трегалоза....297
третичная структура белка....193
трехмерная структура тРНК....96
трехнитевая структура
(триплекс)....92
триацилглицерин....320
трипсин....176
тромбин....405
туберкулостеариновая кислота...317
тубулин....139

Убиквитин....134
Убиквитинилирование....169
углевод....278
узнавание....128
унифицированные параметры....86
Уотсон-Криковские
взаимодействия....83
уравнение Михаэлиса-Ментен...347
урацил....15
уроновые кислоты....290
Фаг....35
фактор роста....133
нервов....133
тромбоцитов....133
эпидермиса....133
фактор транскрипции....29
фарнезол....329
ферменты с качающейся ножкой344
фибриллярный белок....197
фибрин....405
фибриноген....405
фиброин шелка....139
флавинадениндинуклеотид
(FAD)....392
флавинмононуклеотид (FMN)...392
флеомицин....443
фосфатидилглицерин....323
фосфатидилинозитол....324
фосфатидилхолин....324
фосфатидилэтаноламин....324
фосфодиэстераза змеиного яда....66
фосфодиэстераза селезенки....66
фосфодиэфирная связь....17
фосфоротиоатный аналог....270
фосфотидилсерин....324
фотолитография....112
фрагменты Оказаки....23
фураноза....284
фуранозный цикл
конформация конверт....286
твист-конформация....287
футпринтинг....272

Хадацидин....433
химерный белок....139
химический синтез
олигонуклеотидов....100
химический синтез полипептида203
химотрипсин....176
хитин....302
хлортетрациклин....427
холекальциферол....403
холестерин....330

хондроитинсульфат 302
хроматин 22
хромосома 22

Цеброновая кислота 326
целлюлоза 302
церамидолигогексозид 327
цереброзид 326
цереброн 326
цефазолин 411
цефаклор 411
цефалоспорин С 411
цефацетрил 411
циклический аденозин монофосфат (cAMP) 379
циклический гуанозин монофосфат (cGMP) 379
цинковые пальцы 275
цис-диольная группа 58
цитозин 15
цитолипин Н 327
цитохром Р450 359
цитруллин 383

Четвертичная структура белка ...198
четырехнитевая структура 92

Шаперон 187
Шовдомицин 433
шпилечный рибозим 371
шпилька 93

Экзо-конформация 286
экзон 30
экзонуклеаза 66
экспрессия 29
электрофил 466
  жесткий 467
  мягкий 467
элонгация 25
эндо-конформация 286
эндонуклеаза 66
эндонуклеазы рестрикции 70
энхансер 29
эргокальциферол 402
эргостерин 402
эриодиктин 407
эритромицины A-D 428
эсперамицин 448
эстрадиол 386
эстрон 386
этидий 436

Учебное издание

Кнорре Дмитрий Георгиевич,
Годовикова Татьяна Сергеевна,
Мызина Светлана Дмитриевна,
Федорова Ольга Семеновна

БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Учебное пособие

Редактор *Е. П. Войтенко*
Дизайн обложки *Е. В. Неклюдовой*

Подписано в печать 14.12.2011 г.
Формат 70×100 1/16. Офсетная печать.
Уч.-изд. л. 30. Усл. печ. л. 38,7. Тираж 300 экз.

Заказ № 323

Редакционно-издательский центр НГУ
630090, Новосибирск-90, ул. Пирогова, 2.

Исправления к учебному пособию Кнорре Д. Г. с соавт. «Биоорганическая химия»

На стр. 103 на рис. 41 следует читать $N(iPr)_2$.

Там же в последнем абзаце читать «триизопропиламин».

На стр. 106 второй абзац и рис. 43 читать как: «Дальнейшая обработка продукта дигидропираном приводит к селективному введению защиты по 2'-OH-группе. Остаток, образовавшийся при действии реагента Маркевича, удаляется обработкой триэтиламмоний фторидом, что приводит к синтону с селективно блокированной 2'-OH-группой. Эта группа выдерживает все последующие операции по олигонуклеотидному синтезу и удаляется обработкой 0,01 н HCl после завершения формирования полимерной цепи с образованием требуемого олигорибонуклеотида.

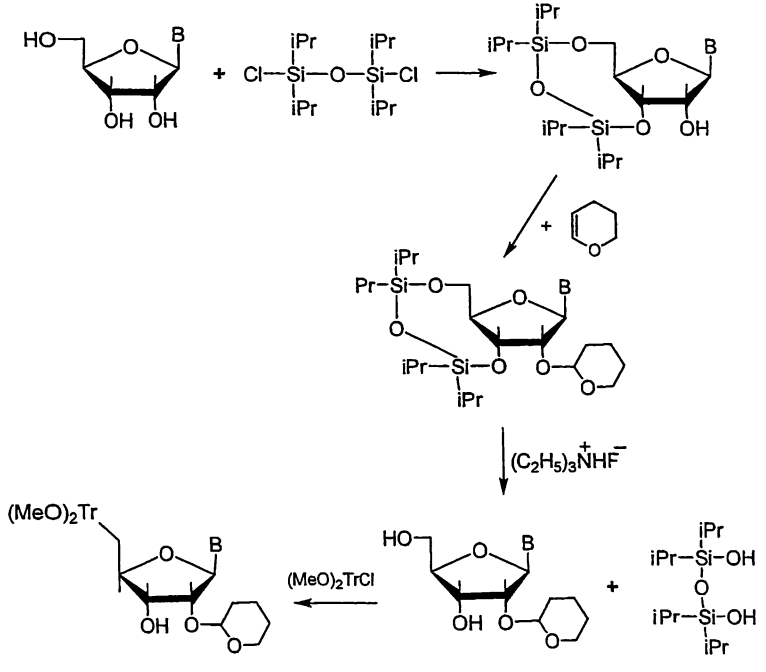


Рис. 43. Получение защищенного по 2'-OH-группе нуклеозида с помощью реагента Маркевича

На стр. 110 рис. 44 читать как:

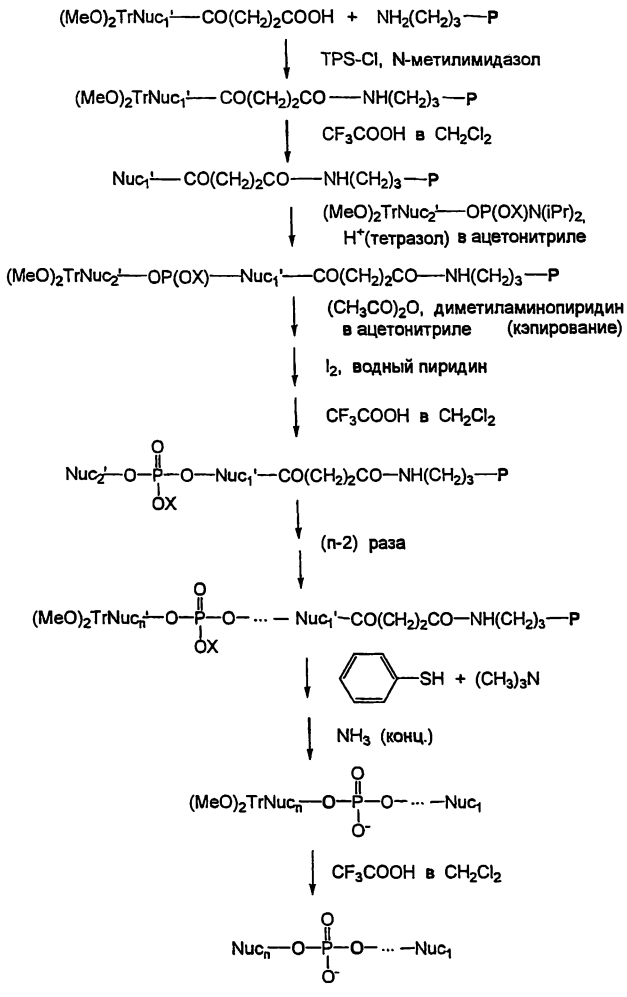


Рис. 44. Схема твердофазного фосфитамидного синтеза олигодезоксинуклеотида: Nuc_i – остатки нуклеозидов; Nuc'_i – остатки нуклеозидов с защищенной экзоциклической аминогруппой; P – нерастворимый носитель; X = CH_3; TPS-Cl – триизопропилбензолсульфохлорид

На стр. 141 первый абзац сверху следует читать как: «Там же представлены важные физико-химические характеристики аминокислот: максимумы поглощения при соответствующих длинах волн и молярные коэффициенты экстинкции, а также показатели кислотности».

На стр. 143 следует читать: «Подавляющее число аминокислот не обладает характерными спектрами поглощения или испускания, их идентификация проводится на основании данных по времени удерживания на твердой фазе в используемой системе хроматографического разделения».

На стр. 145 следует читать: «В результате взаимодействия с 2,4-динитрофторбензолом образуются окрашенные в желтый цвет 2,4-динитрофенильные производные аминокислот».

На стр. 151 второй абзац сверху следует читать как: «Карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот могут превращаться в сложноэфирные группировки при действии галоидалкилов, например йодуксусной и бромуксусной кислотами».

На стр. 159 третий абзац сверху следует читать как: «Реакции ацилирования по ε-аминогруппам остатков лизина позволяют блокировать действие специфичных к остаткам основных аминокислот сериновых протеаз, что дает возможность расщеплять белки избирательно только по остаткам аргинина».

На стр. 161 третий абзац сверху следует читать как: «Обе реакции проходят по ароматическим кольцам остатков тирозина и триптофана».

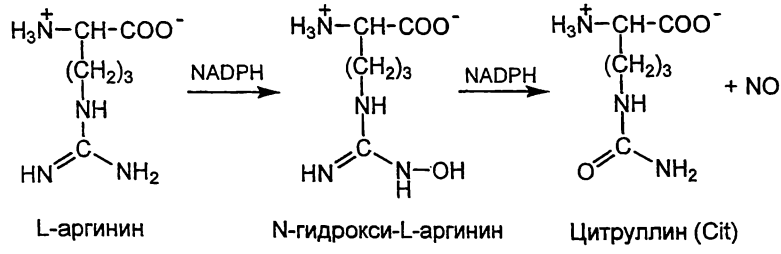
На стр. 217 во всех схемах вместо NO_2 читать NO.

На стр. 246 следует читать: «Последнюю можно было избирательно деблокировать и активировать с помощью 5-нитропиридина».

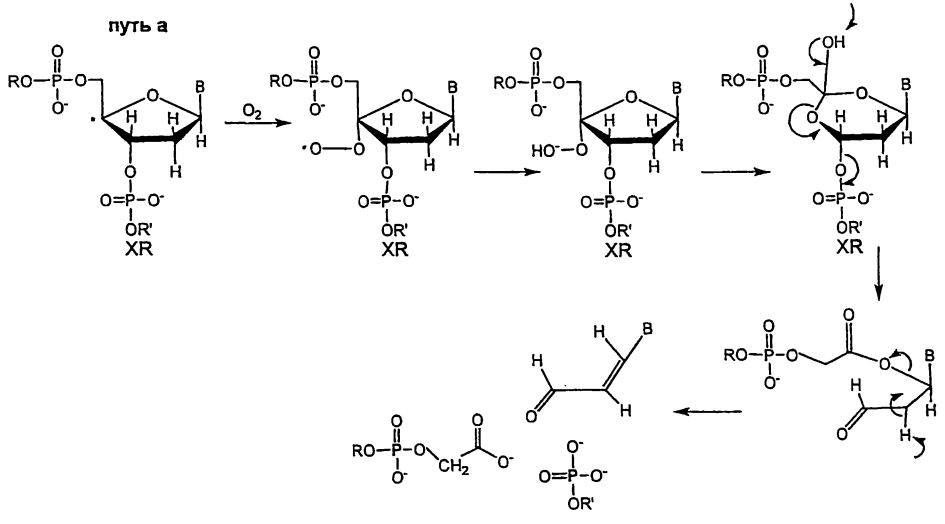
На стр. 269 следует читать: «В качестве примера экспериментального исследования, проведенного с целью антигенного воздействия на ДНК, можно привести воздействие пиримидинового олигодезоксирибонуклеотида с участком ДНК клеток, специфично взаимодействующих с промотором РНК, программирующей синтез иммуноглобулина IgE».

На стр. 340 в верхнем уравнении NAD следует читать как NAD^+

На стр. 383 схему внизу следует читать как:



На стр. 446 схему пути а следует читать как:



Кнорре Дмитрий Георгиевич, академик РАН, лауреат Ленинской пре[illegible] Правительства РФ в области [illegible] специалист в области физи[illegible] химической биологии. Один [illegible] молекулярной биологии и б[illegible] Сибирском отделении Академии наук СССР. В 1984 г. организовал и до 1996 г. возглавлял Новосибирский институт биоорганической химии. Создал и на протяжении ряда лет заведовал кафедрой молекулярной биологии на факультете естественных наук Новосибирского государственного университета, где им был разработан и читался курс по биоорганической химии.

Научная библиотека НГУ
1800465755

Годовикова Татьяна Сергеевна, доктор химических наук, лауреат премии Ленинского комсомола в области науки и техники, профессор кафедры молекулярной биологии и кафедры химии Специализированного учебно-научного центра Новосибирского государственного университета, специалист в области биоорганической химии белков и нуклеиновых кислот. Читает курсы лекций по биоорганической химии и химии природных соединений.

Мызина Светлана Дмитриевна, кандидат химических наук, профессор кафедры молекулярной биологии факультета естественных наук НГУ, специалист в области биологической химии, лауреат премии Правительства РФ в области образования. Принимала активное участие в разработке и читала курсы лекций по биологической, биоорганической и физиологической химии.

Федорова Ольга Семеновна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, специалист в области химической кинетики, биохимии и биоорганической химии. Занимается исследованием механизмов ферментативных процессов и изучением роли конформационной динамики белков и ДНК в протекании процессов репарации ДНК. Читает курс лекций по химии природных соединений.