

Ю.А.Овчинников

**БИО –
ОРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ**

МОСКВА
«ПРОСВЕЩЕНИЕ»
1987

Рецензенты:

директор Новосибирского института биоорганической химии Сибирского отделения
АН СССР академик *Д. Г. Кнорре*;

директор Института иммунологии МЗ СССР академик *Р. В. Петров*

Овчинников Ю. А.

О-35 Биоорганическая химия.— М.: Просвещение, 1987.— 815 с.:
ил.

Книга охватывает практически все разделы биоорганической химии и весь комплекс вопросов, находящихся на стыке ее с молекулярной биологией, главным из которых является структурно-функциональное изучение важнейших компонентов живой материи. В книге отражены современные научные достижения этой области, даны справочные сведения об исследователях, внесших существенный вклад в биоорганическую химию.

О $\frac{2001040000-804}{103(03)-87}$ КБ—52—5—1986

ББК 28.072

Моим учителям

ПРЕДИСЛОВИЕ



Юрий Анатольевич Овчинников (р. 1934), академик, вице-президент Академии наук СССР, председатель Секции химико-технологических и биологических наук Президиума АН СССР. С 1970 г. — директор Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, с 1972 г. — заведующий кафедрой биоорганической химии МГУ.

Ю. А. Овчинников — крупный ученый в области биоорганической химии и молекулярной биологии, химии и физико-химии белково-пептидных веществ. Автор более 500 работ, в том числе — известной монографии «Мембрано-активные комплексоны».

Ю. А. Овчинников, Герой Социалистического Труда, лауреат Ленинской и Государственной премий СССР, почетный иностранный член академий наук НРБ, ГДР, ВНР, ЧССР, Испании, Швеции и Индии, член немецкой Академии естествоиспытателей «Леопольдина», почетный доктор Гданьского университета (ПНР), Парижского университета (Франция), Уппсальского университета (Швеция), университета «Рикардо Палма» (Перу), университета г. Гранада (Испания), Софийского университета (НРБ).

Вторая половина нашего столетия отмечена стремительным прогрессом биологических знаний и их приложений в разнообразных сферах жизни современного общества. В сущности, интерес человека к живой природе никогда не угасал, но лишь последние десятилетия позволили приблизиться к пониманию удивительных тайн жизнедеятельности и на этой основе сделать решительный шаг в использовании новейших биологических открытий для борьбы с болезнями, для решения продовольственной проблемы и охраны окружающей среды. На службу человеку наших дней, наряду с электроникой, атомной энергетикой и химией, пришла биотехнология.

Успехи биологической науки неоспоримы, они привлекают всеобщее внимание, рождают много смелых прогнозов и надежд. Но каким бы головокружительным ни казался взлет биологии и биотехнологии, сегодня мы находимся лишь в начале пути. Живая материя необычайно разнообразна и сложна, и принципы ее функционирования в норме, в изменившихся условиях или при патологии познать очень нелегко. Загадку представляют собой пока многие простые организмы, не говоря уже о высокоорганизованных существах и самом человеке. Требуются глубочайшие знания, настойчивость и самопожертвование, преданность делу и вдохновение, чтобы стать соучастником этого великого движения вперед к познанию законов живого мира.

Биологическими проблемами занимаются сегодня десятки наук, в которых тесно переплетаются идеи и методы биологии, химии, физики, математики и других областей знания. Арсенал используемых биологией средств огромен. Именно в этом — один из источников ее бурного прогресса, основа достоверности ее выводов и суждений. Пути биологии и химии в познании механизмов жизнедеятельности пролегают рядом, и это естественно, ибо живая клетка — настоящее царство больших и малых молекул, непрерывно взаимодействующих, возникающих и исчезающих... Здесь находит сферу приложения и одна из новых наук — биоорганическая химия.

Становление биоорганической химии в мире проходило в конце 50-х — начале 60-х годов, и в тот же период это направление начало делать первые шаги в Советском Союзе. В нашей стране биоорганическая химия формировалась более целеустремленно и последовательно, опережая аналогичные шаги и тенденции за рубежом. Заслуга в этом принадлежала академику Михаилу Михайловичу Шемякину. Тогда ему оказали решительную поддержку руководители Академии наук А. Н. Несмеянов и Н. Н. Семенов, и уже в 1959 г. в системе АН СССР был создан базовый институт, а в 1963 г. организовано Отделение биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР. Сотратниками М. М. Шемякина в этой деятельности, а порой и борьбе, были академики А. Н. Белозерский и В. А. Энгельгардт; уже в 1965 г. академик А. Н. Белозерский основал Межфакультетскую лабораторию биоорганической химии МГУ, которая сейчас носит его имя.

Советская биоорганическая химия, возглавляемая мудрыми наставниками и обогащенная задором и вдохновением ее молодых энтузиастов, быстро завоевала достойные позиции на мировой арене. Устанавливаются плодотворные связи с ведущими лабора-

ториями мира — В. Прелога (Швейцария), А. Тодда (Великобритания), Т. Виланда (ФРГ), Г. Кораны (США), Э. Ледерера (Франция), С. Акабори (Япония) и др., начинается регулярный обмен информацией и сотрудничествами. Близкая дружба завязывается с коллективами Института органической химии и биохимии Чехословацкой Академии наук в Праге, институтов органической химии в Софии и Шанхае, университетов в Будапеште и Гданьске.

В 60-е годы в СССР, прежде всего в Институте химии природных соединений АН СССР, проводятся получившие мировое признание работы по синтезу стероидных гормонов и антибиотиков, включая полный синтез тетрациклина, крупные исследования по химии углеводов, липидов и пептидов. Советская наука завоевывает признанный приоритет в биоорганической химии мембран. В последующий период ведущие позиции нашей страны были закреплены в исследовании многих белков и полисахаридов, транспортных и информационных нуклеиновых кислот, в создании ряда лекарственных препаратов (фторафур, феназепам и др.).

Сегодня работы в области биоорганической химии проводятся в СССР широким фронтом, охватывая все важнейшие направления, в том числе синтез белков и генов. В системе Академии наук СССР созданы и успешно развиваются институты биоорганической химии во Владивостоке, Киеве, Минске, Новосибирске и Ташкенте, в этом направлении плодотворно трудятся академические институты Алматы, Душанбе, Еревана, Казани, Кишинева, Ленинграда, Москвы, Новосибирска, Одессы, Пушкино, Риги, Таллина, Ташкента, Тбилиси, Уфы, Фрунзе и других городов. Заметный вклад вносят также научные учреждения медицинского и сельскохозяйственного профиля, отраслевые научно-исследовательские институты. Велики заслуги в подготовке кадров и проведении актуальных исследований кафедры химии природных соединений МГУ, кафедры химии и технологии тонких органических соединений Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова, университетов Ленинграда, Новосибирска, Риги, Ростова, Свердловска, Тарту.

Становление биоорганической химии, химии природных и физиологически активных веществ в СССР опиралось на достижения выдающихся представителей отечественной химической школы — Н. Д. Зелинского, А. Е. Чичибабина, С. С. Наметкина, А. Н. Баха, В. М. Родионова, В. В. Феофилактова, А. П. Орехова, А. Е. Арбузова, Н. А. Преображенского. В современный период крупными достижениями в этой области, получившими высокую оценку в СССР и за рубежом, отмечены исследования академиков Б. А. Арбузова, А. А. Баева, А. Е. Браунштейна, В. А. Говырина, М. И. Кабачника, Д. Г. Кнорре, М. Н. Колосова, Н. К. Кочеткова, Р. В. Петрова, И. Я. Постовского, А. С. Садыкова, Г. К. Скрябина, Е. И. Чазова, М. Х. Чайлахяна, членов-корреспондентов АН СССР Л. Д. Бергельсона, В. Ф. Быстрова, М. Г. Воронкова, Р. П. Евстигнеевой, Г. Б. Елякова, Ю. А. Жданова, В. Т. Иванова, В. А. Кабанова, В. П. Мамаева, И. В. Мартынова, Н. Н. Мельникова, О. М. Нефедова, М. А. Прокофьева, Л. А. Сандахчиева, Е. Д. Свердловца, В. П. Скулачева, В. Н. Смирнова, Г. А. Толстикова, И. В. Торгова, Р. М. Хомутова, А. С. Хохлова, С. Ю. Юнусова, академиков АМН СССР и республиканских академий А. А. Ахрема, Ф. С. Бабичева, А. В. Богатского, Г. Я. Ванага, С. А. Вартаняна, С. А. Гиллера, Г. В. Лазурьевского, А. Л. Мнджояна, С. М. Навашина, В. Н. Ореховича, К. Т. Порошина, Г. И. Чипенса, Н. А. Юдаева, члена-корреспондента АМН СССР Ю. А. Панкова, профессоров С. М. Аваевой, В. К. Антонова, В. Н. Белова, М. Г. Бражниковой, Э. И. Будовского, Е. Д. Каверзневой, М. Я. Карпейского, А. Ю. Магидсона, Г. В. Меньшикова, Г. И. Самохвалова, Е. С. Северина, С. Б. Серебряного, А. П. Сколдинова, Н. Н. Суворова, А. И. Усова, А. Я. Хорлина,

О. С. Чиждова, Л. А. Шукиной и многих других. Я посчитал своим долгом отметить имена советских ученых в первой отечественной книге по биоорганической химии не только в знак признания их достижений, но и с уверенностью в том, что позиции этой науки будут и дальше крепнуть, способствуя росту ее международного авторитета.

Биоорганическая химия — это фундаментальная наука на стыке химии и биологии, она способствует раскрытию принципов функционирования живых систем. Но она имеет и выраженную практическую направленность, являясь теоретической основой получения новых ценных соединений для медицины и сельского хозяйства. Наука призвана служить обществу, человеку, а в наше время путь от открытия до его реализации резко сокращается. Поэтому нет ничего удивительного в том, что в книге обсуждаются и проблемы промышленного получения новейших препаратов на основе методов тонкого органического синтеза или биотехнологии.

Книгу такого рода писать непросто, ибо, по определению биоорганическая химия охватывает химию всех веществ живой клетки, а этих веществ десятки и сотни тысяч... Пришлось учитывать тенденции развития мировой науки, а в какой-то степени следовать моде и личным интересам. Не последнее слово принадлежало здесь моим коллегам и ученикам.

Главное место в книге занимают белки и нуклеиновые кислоты, и это закономерно. Не только потому, что они наиболее универсальны среди других «молекул жизни», но и потому, что с их познанием связаны подлинно революционные прорывы в биологической науке XX в. Шире, чем первоначально планировалось, представлены углеводы, поскольку их значение неуклонно растет и в будущем, по всей вероятности, станет решающим. Липиды и мембраны также выдвинуты на передовые позиции, и эта их новая роль сейчас общепризнанна — и в биоэнергетике, и в регуляции, и в развитии... В изложении главы по низкомолекулярным биорегуляторам, как природным, так и синтетическим, пришлось быть особенно лаконичным, ибо одни лишь пенициллины легко могли бы дать содержательнейший материал для целого учебника или монографии. Но в целом этот раздел отражает непреходящее значение традиционной химии природных соединений, давшей импульс развитию биоорганической химии наших дней.

Наконец, общепризнанно, что «историю делают люди». Это справедливо и для науки. Думаю, что книга выигрывает, когда мы знакомимся с главными участниками становления и развития увлекшей нас области знания, от далеких предков до сегодняшних дней...

В основу книги положен годичный курс биоорганической химии, читаемый для студентов биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и факультета физико-химической биологии и биотехнологии Московского физико-технического института. Подготовка студентов, слушающих курс, осуществляется на базе Научно-учебного центра Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, где параллельно проводятся семинарские и практические занятия. Следует подчеркнуть, что построение курса и его направленность во многом диктовались задачами развития данной области науки в СССР и были непосредственно связаны с тематикой ведущих академических институтов страны.

В создании книги принимали участие мои коллеги, непосредственно работающие над проблемами биоорганической химии и вносящие немалый творческий вклад в ее развитие в нашей стране. Особо отмечаю сотрудников Научно-учебного центра нашего института, в активе которых сегодня не только написанные главы, про-

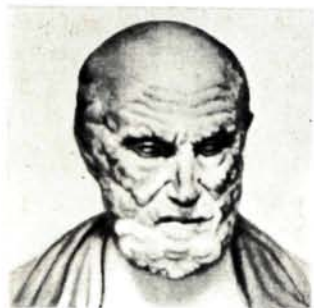
веденные семинары и прочитанные лекции, но и воспитанные ими десятки молодых научных работников института, пылкий ум и беспокойный характер которых являются живительным родником новых идей и достижений «шемякинцев»...

Я сердечно благодарю членов-корреспондентов АН СССР В. Т. Иванова и Е. Д. Свердлова, докторов химических наук В. М. Липкина, Н. Г. Абдулаева, Е. В. Гришина, Г. М. Сегалю, кандидатов химических наук Н. А. Алданову, Л. И. Барсукову, В. Б. Берзину, В. Л. Воейкову, В. Н. Граменицкую, М. Б. Костину, Г. С. Монастырскую, В. А. Несмеянова, А. Н. Обухова, Т. В. Овчинникову, В. В. Оноприенко, И. В. Северцову, Т. И. Соркину, О. А. Чупрунову и многих, многих других, кто разделил со мной трудности, волнения и раздумья в нетрадиционной для академического института работе над такой книгой. Я сердечно благодарю и моих коллег из зарубежных стран, приславших фотографии и многие ценные материалы.

Конечно, работа над книгой потребовала немало времени и сил, спрессовав до предела минуты отдыха. Но я встречал полное понимание в своей деятельности и в Академии наук, и в институте, и в моей семье... В конце концов эта работа меня увлекла, и я понимаю, что она будет продолжаться. Книги, даже общеобразовательные, всегда отражают этап в развитии науки, а наука никогда не стоит на месте. Поэтому, представляя эту книгу на суд специалистов, коллегам и тем, кому она в первую очередь предназначена, я надеюсь, что на ближайшие годы она сохранит свою актуальность и займет свое место на рабочем столе того, кто учится и работает.

Академик Ю. Овчинников

ВВЕДЕНИЕ



Гиппократ (Hippokrates) (460—377 до н. э.), древнегреческий врач, реформатор античной медицины. Образование получил под руководством своего отца Гераклида. Занимался врачебной практикой в Греции, Малой Азии, Ливии, у скифов. Заложил основы клинической медицины. С именем Гиппократа связано представление о высшем моральном облике врача (клятва Гиппократа).



Гален (Galenus) Клавдий (129 — ок. 201), древнеримский врач и естествоиспытатель. Обобщил представления античной медицины в виде единого учения, оказавшего существенное влияние на развитие естествознания вплоть до XV — XVI вв. Из растительного и животного сырья получал лекарственные средства, так называемые галеновы препараты. Создал первую в истории науки концепцию о движении крови.

Современный человек знает очень много. Бережно храня духовные и материальные ценности ушедших эпох, обогащаясь опытом предшествующих поколений и постоянно вскрывая новые законы природы и общества, человек неуклонно двигается вперед, к маящим вершинам познания. Путь этот непрост, порой извилист и тернист, и каждый шаг требует нелегких усилий, мужества и вдохновения. Но настойчивый поиск всегда бывает вознагражден еще одной золотой крупницей знания, удивительным ощущением прикосновения к истине...

Накоплением знаний, анализом явлений и фактов занимается наука. Если в период своего зарождения наука была единой, неделимой и эта прекрасная, органически свойственная ей черта особенно ярко проявилась в энциклопедических трудах великих мыслителей древности, то позднее наступила пора дифференциации науки. Из унитарной, стройной системы естествознания как единого целого возникли математика, физика, химия, биология и медицина, а в науках об обществе оформились история, философия, право...

Это неизбежное дробление науки, отражающее объективные процессы в развитии мира, продолжается и сегодня — появились кибернетика, ядерная физика, химия полимеров, океанология, экология, онкология и десятки других наук. Веянием времени стала и узкая специализация ученых, целых коллективов. Конечно, это отнюдь не исключает становления и воспитания широко образованных ученых с блестящей эрудицией, и мировая наука знает немало тому примеров.

И все же вопрос закономерен — не утрачивается ли в таком случае возможность осмысления целостной картины окружающего мира, не мельчает ли порой постановка проблем, не ограничиваются ли искусственно поиски путей их решения? Особенно для тех, кто только начинает свой путь к знаниям...

Отражением этого противоречия и прямым следствием действия законов диалектики явилось встречное движение наук по пути к взаимному обогащению, взаимодействию и интеграции. Появились математическая лингвистика, химическая физика, биологическая химия... Что будет конкретным и конечным итогом этого непрерывного искания, постоянной смены целей и объектов исследования, предсказать пока трудно, но одно является очевидным — в конечном итоге человек достигнет прогресса и в тех областях знания, которые совсем недавно казались окутанными покровом глубокой тайны...

Одним из ярких примеров является та область науки, которая лежит на границе биологии и химии. Что же объединяет эти научные дисциплины, в чем смысл их взаимодействия? Ведь биология была и, пожалуй, еще долгое время будет одной из самых загадочных областей знания, и в ней остается немало «белых пятен». Химия же, напротив, относится к разряду наук наиболее устоявшихся, точных, в ней основные закономерности выяснены и проверены временем. И тем не менее факт остается фактом — уже давно химия и биология идут навстречу друг другу. Когда это началось, вряд ли можно сейчас установить... Попытки объяснения явлений жизнедеятельности с позиций точных наук мы находим еще у мыслителей древнегреческой и древнеримской цивилизации, более отчетливо подобные идеи формулировались в трудах выдающихся представителей науч-

ной мысли средневековья и эпохи Возрождения. К концу XVIII в. было достоверно установлено, что в основе проявления жизни лежат химические превращения веществ, порой простых, а зачастую удивительно сложных. И именно с этого периода начинается подлинная летопись о союзе двух наук, летопись, богатая ярчайшими фактами и эпохальными открытиями, фейерверк которых не прекращается и в наши дни...

Крупнейшим событием можно считать рождение *органической химии*, которая первоначально рассматривалась как химия веществ, встречающихся в живой природе. На первых этапах в ней господствовали виталистические воззрения, утверждавшие, что химические соединения, выделяемые из живых организмов, не могут быть получены искусственным путем, без участия магической «жизненной силы». Сокрушительный удар сторонникам витализма был нанесен работами Ф. Вёлера, получившего типичное вещество животного происхождения — мочевины из цианата аммония. Последующими исследованиями позиции витализма были окончательно подорваны. В середине XIX в. органическая химия определяется уже как химия соединений углерода вообще — будь то вещества природного происхождения или синтетические полимеры, красители или лекарственные препараты.

Один за другим преодолевали органическая химия барьеры, стоящие на пути к познанию живой материи. В 1842 г. Н. Н. Зинин осуществил синтез анилина, в 1854 г. М. Бертло получил синтезом ряд сложных органических веществ, в том числе жиры. В 1861 г. А. М. Бутлеровым впервые было синтезировано сахаристое вещество — метилентан, к концу столетия успешно осуществляются синтезы ряда аминокислот и жиров, а начало нашего века ознаменовалось первыми синтезами белковоподобных полипептидов. Это направление, развивавшееся стремительно и плодотворно, оформилось к началу XX в. в самостоятельную *химию природных соединений*. К числу ее блистательных побед можно отнести расшифровку строения и синтез биологически важных алкалоидов, терпеноидов, витаминов и стероидов, а вершинами ее достижений в середине нашего века надо считать полные химические синтезы хинина, стрихнина, резерпина, пенициллина и простагландинов.

С другой стороны, использование химических методов в исследовании непосредственно биологических процессов привело в самом конце прошлого века к рождению *биохимии*. Ее появление обычно связывают с открытием энзиматического катализа и самих биологических катализаторов — ферментов, идентифицированных несколько позднее в качестве особых веществ и выделенных в кристаллическом виде в середине 20-х — начале 30-х годов. Крупнейшими событиями в биохимии явились установление центральной роли АТФ в энергетическом обмене, выяснение химических механизмов фотосинтеза, дыхания и мышечного сокращения, открытие трансминирования — а в итоге познание основных принципов обмена веществ в живом организме. В начале 50-х годов Дж. Уотсон и Ф. Крик расшифровали структуру ДНК, дав человечеству знаменитую двойную спираль, и ученый мир салютовал рождению новой науки о путях хранения и реализации генетической информации — *молекулярной биологии*.

Именно в этот период происходят качественные изменения в химии природных соединений — она вплотную приступает к химическому изучению сложнейших веществ живой природы, в том числе биополимеров. Основной акцент делается на изучение связи между их строением и биологической функцией, что имеет фундаментальное значение для понимания природы процессов жизнедеятельности. Л. Полинг открывает α -спиральные структуры в белках, Ф. Сенгер устанавливает аминокислотную последовательность



Ибн Сина (Авиценна), Абу Али Хусейн Ибн Абдуллах (ок. 980—1037), крупнейший врач средневековья, ученый-энциклопедист. Родился в Афшане (близ Бухары), жил в Средней Азии и Иране, занимал должность врача и визиря при различных правителях. Будучи одним из основоположников химии, сыграл выдающуюся роль в установлении связи между химией и медициной. Описал много лекарственных средств растительного, животного и минерального происхождения. Мировую известность получил его основной медицинский труд «Канон врачебной науки» — свод медицинских знаний того времени, в течение пяти веков считавшийся важнейшим врачебным руководством (более 30 латинских изданий) и оказавший громадное влияние на развитие естествознания, медицины и фармакологии во всех странах мира.

первого белка — инсулина, успешно завершается синтез первого пептидного гормона — окситоцина. Р. Вудворду удается осуществить полные химические синтезы хлорофилла и витамина В₁₂. Эти выдающиеся достижения химии, ставшие предвестником ее широкого наступления по всему фронту биологии, и означали собой, по существу, превращение химии природных соединений в современную *биоорганическую химию*. Темпы работ продолжали непрерывно нарастать, решаемые проблемы становились еще более сложными по выполнению и более значительными по их влиянию на прогресс знаний о живой природе. Совершенствование методического арсенала позволило начать широкие структурные исследования сложных белков и нуклеиновых кислот, осуществить полные синтезы первых белков и генов. Другими словами, перейти к тому этапу, который характеризует развитие биоорганической химии в настоящее время...

Вместе с биохимией, биофизикой и молекулярной биологией биоорганическая химия составляет сегодня единый фронт физико-химической биологии, прогресс которой является одним из значительных явлений в естествознании нашего времени.

ПРЕДМЕТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Биоорганическая химия 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. По существу она является химическим фундаментом современной биологии.

Разрабатывая основополагающие проблемы химии живого мира, биоорганическая химия способствует решению задач получения практически важных препаратов для медицины, сельского хозяйства, ряда отраслей промышленности.

Объекты изучения: белки и пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, биополимеры смешанного типа — гликопротеины, нуклеопротеины, липопротеины, гликолипиды и т. п.; алкалоиды, терпеноиды, витамины, антибиотики, гормоны, простагландины, ростовые вещества, феромоны, токсины, а также синтетические лекарственные препараты, пестициды и др.

Методы исследования: основной арсенал составляют *методы органической химии*, однако для решения структурно-функциональных задач привлекаются и разнообразные физические, физико-химические, математические и биологические методы.

Основные задачи: *выделение в индивидуальном состоянии изучаемых соединений* с помощью кристаллизации, перегонки, различных видов хроматографии, электрофореза, ультрафильтрации, ультрацентрифугирования, противоточного распределения и т. п.; *установление структуры*, включая пространственное строение, на основе подходов органической и физико-органической химии с применением масс-спектрометрии, различных видов оптической спектроскопии (ИК, УФ, лазерной и др.), рентгеноструктурного анализа, ядерного магнитного резонанса, электронного парамагнитного резонанса, дисперсии оптического вращения и кругового дихроизма, методов быстрой кинетики и т. п. в сочетании с расчетами на ЭВМ; *химический синтез* и *химическая модификация* изучаемых соединений, включая полный синтез, синтез аналогов и производных, — с целью подтверждения структуры, выяснения связи строения и биологической функции, получения практически ценных препаратов; *биологическое тестирование* полученных соединений *in vitro* и *in vivo*.

Круг интересов биоорганической химии необычайно широк — это и мир веществ, выделяемых из живой природы и играющих важную роль в жизнедеятельности, и мир искусственно получаемых органических соединений, обладающих биологической активностью. Естественно, описать все такие вещества и их свойства, даже при учете лишь соединений с известной структурой, в рамках данной книги не представляется возможным — их насчитывается сотни тысяч и число их непрерывно растет.

Полный перечень биологически значимых соединений, если это потребуется, можно найти в соответствующих монографиях, оригинальных и обзорных статьях, в многочисленных справочниках и банках данных.

Задача настоящей книги — дать понятие о характере изучаемых биоорганической химией объектов, рассказать о главных представителях важнейших классов веществ, описать приемы и методы исследования, коснуться ряда актуальных проблем — словом,



Ломоносов Михаил Васильевич (1711—1765), первый русский ученый-естествоиспытатель, физик и химик, поэт, художник, первый русский академик Петербургской АН (1745). Образование получил в Славяно-греко-латинской академии в Москве, Петербургском академическом университете, Марбургском университете и Школе горного дела во Фрайбурге; с 1745 г. — профессор Петербургской АН. Основал при АН первую в России химическую лабораторию (1748). В 1755 г. по инициативе М. В. Ломоносова основан Московский университет. Развивал атомно-молекулярные представления о строении вещества, сформулировал принцип сохранения материи и движения. Заложил основы физической химии, исследовал атмосферное электричество, описал строение Земли, открыл атмосферу на Венере.

БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ

Строение белков и пептидов

Химический синтез
и химическая модификация

Роль белков и пептидов в биологии



Гарвей [Harvey] Уильям (1578—1657), английский врач, основатель современной физиологии. Окончил Кембриджский университет (1597), с 1609 г. преподавал в Королевском университете. Основатель учения о кровообращении.

Белки, или протеины,— важнейший класс биологически активных веществ. Они играют ключевую роль в клетке, присутствуют в виде главных компонентов в любых формах живой материи, будь то микроорганизмы, животные или растения. Без белков невозможно представить себе жизнедеятельность, жизнь; и именно в этом смысле и сегодня сохраняет свое значение определение Ф. Энгельса: «Жизнь есть способ существования белковых тел». Белки чрезвычайно разнообразны по структуре и выполняют многочисленные биологические функции (схема 1).

В настоящее время трудно оценить общее число белков во всем царстве живой природы, но, учитывая огромное разнообразие организмов, следует признать факт существования по крайней мере многих миллиардов химически индивидуальных белков. Лишь в клетке *Escherichia coli* содержится более 3000 различных белков.

Молекулярная масса белков варьирует от 5 — 10 тыс. до 1 млн. и более. Сравнительно небольшие молекулы белковой природы (с молекулярной массой условно до 5000) называются пептидами. К пептидам относятся многие природные вещества с важными биологическими функциями (схема 2), их синтетические аналоги, а также продукты расщепления белков.

Биологические функции белково-пептидных веществ. Главная функция *белков-ферментов* — катализ биохимических реакций, и только ее одной было бы достаточно, чтобы считать белки самым важным классом биорегуляторов. Как биологические катализаторы ферменты участвуют в тысячах превращений, происходящих в живой клетке и составляющих основу ее метаболизма. Особое значение имеют такие универсальные ферментные системы, как ДНК- и РНК-полимеразы, разнообразные аденозинтрифосфатазы (АТФазы), аденилатциклазы. В целом группа белков-ферментов изучена сравнительно хорошо, причем существенно то, что в процессе их исследования были сформулированы общие принципы и разработаны методы структурно-функционального анализа белковых веществ.

Схема 1. Биологические функции белков.



Среди *гормонов* белками являются инсулин, секретируемый поджелудочной железой, паратиреоидный гормон щитовидной железы, а также ряд гормонов гипофиза — гормон роста, липотропин, пролактин, гонадотропин, лютеинизирующий и фолликулостимулирующий гормоны, тиреотропин; белковую природу имеют и некоторые, пока мало изученные гормоны кишечника. Значительное число известных гормонов являются пептидами — окситоцин, вазопрессин, аденокортикотропный гормон, α - и β -меланоцитстимулирующие гормоны (гипофиз), глюкагон (поджелудочная железа), гастрин, секретин и холецистокинин (желудочно-кишечный тракт), кальцитонин (щитовидная железа), тканевые гормоны брадикинин и ангиотензин, вещества гормонального характера глутатион и офтальмовая кислота и др.

Схема 2. Биологические функции пептидов.



К гормонам близко примыкают так называемые *рилизинг-факторы* гипоталамуса (либерины), а также соответствующие ингибиторы, представляющие собой сравнительно небольшие пептиды; их основная функция заключается в контроле секреции гормонов гипофиза.

Здесь уместно упомянуть и недавно открытые *нейропептиды мозга* — энкефалины, эндорфины, пептиды памяти, сна и т. п. Установлено, что эти пептиды образуются из более сложных белковых предшественников путем процессинга. Быстрый рост числа вновь обнаруживаемых соединений такого типа свидетельствует о важности химических механизмов в регуляции поведения и высшей нервной деятельности.

Среди белково-пептидных веществ имеется много *антибиотиков*. К ним относятся колицины, итурин, актиноксантин, неокарцино-статин и ряд других, пока плохо охарактеризованных соединений. Многочисленную группу составляют антибиотики-пептиды: грамицидин S, грамицидины А, В и С, тироцидины, бацитрацины, полимиксины, антибиотики-депсипептиды — валиномицин, энниатины, актиномицин D, низин, этамицин, эхиномицин; сюда же могут быть отнесены пенициллины, цефалоспорины, blastolizин и т. п.

Наиболее мощные из известных *токсиков* являются белками микробного происхождения. По уровню токсичности не имеют себе равных ботулинический, столбнячный и дифтерийный токсины и ряд энтеротоксинов. Среди растительных токсичных белков хорошо



Бойль (Boyle) Роберт (1627—1691), английский химик и физик. Образование получил в колледже Итона и Женевской академии. Развил атомистическую теорию, впервые дал научное определение химического элемента, указал на принципиальное значение эксперимента в химических исследованиях, заложил основы химического анализа, сформулировал один из газовых законов (закон Бойля — Мариотта).



Фуркруа (Fourcroy) Антуан Франсуа де, (1755—1809), французский химик, иностранный почетный член Петербургской АН (1802). Окончил Парижский университет (1780). Основные работы посвящены систематике химических соединений. Участвовал в разработке рациональной химической номенклатуры. Сторонник антифлогистической теории в химии. Установил химическую природу мочевины (1799, совместно с Л. Вокленом).



Дальтон (Dalton) Джон (1766—1844), английский физик и химик, основоположник химической атомистики. Образование получил самостоятельно, с 1793 г. преподавал в Новом колледже в Манчестере. Установил закон кратных отношений (1803), ввел понятие «атомный вес», первым определил атомные массы многих элементов. Открыл газовые законы, названные его именем (1801 и 1803). Впервые описал дефект зрения, названный дальтонизмом (1794).

изучены рицин (клещевина) и абрин. Белками являются и многочисленные зоотоксины змей, пауков, ракообразных. Среди пептидов необходимо упомянуть токсины пчел, шершней, ос, морских анемонов и других морских организмов, ядовитые начала бледной поганки фаллоидин и аманитин, их антагонист антаманид, грибковый метаболит малформин и др.

К группе пептидных *алкалоидов* принадлежат действующие начала спорыньи — эрготамин, эргозин, эргокрестин, а также франгуланин, скутианин, цицифин, пандамин.

Большую группу составляют так называемые *транспортные белки*, т. е. белки, участвующие в переносе различных веществ, ионов и т. п. К ним обычно относят цитохром с, участвующий в транспорте электронов, гемоглобин, гемоцианин и миоглобин, переносящие кислород, а также сывороточный альбумин (транспорт жирных кислот в крови), β -липопротеин (транспорт липидов), церулоплазмин (транспорт меди в крови), липид-обменивающие белки мембран. В последнее время эта группа пополнилась мембранными белками, выполняющими функции ионных каналов, — здесь необходимо упомянуть белковые компоненты полосы В-3, ответственные за транспорт анионов через эритроцитарную мембрану, белки Na^+ -, Ca^{2+} - и K^+ -каналов возбудимых мембран. К «транспортным» пептидам резонно отнести канал-образующие соединения типа аламетидина и грамицидинов А, В и С, а также пептидные антибиотики — ионофоры ряда валиномицина, энниатина и др.

Под понятием *защитные белки* объединяются вещества белковой природы, которые помогают организму преодолевать патологические состояния или бороться с возбудителями заболеваний (главным образом, в случае высших организмов). Сюда относятся, в частности, иммуноглобулины, антигены главного комплекса тканевой совместимости, антиген-распознающие рецепторы лимфоцитов, лимфокины, монокины, а также белки системы комплемента; вполне логично рассматривать здесь и антивирусные агенты типа интерферона, факторы некроза опухолей и др. В эту же группу могут быть включены и белки, вызывающие свертывание крови (фибриноген, фибрин, тромбин).

Среди *структурных белков* необходимо прежде всего упомянуть макромолекулы, составляющие остов многих тканей и органов и определяющие их механические свойства: коллаген соединительных тканей, костей и суставов, эластин связок, α -кератин кожи, волос, ногтей, рогов и перьев, склеротин наружного скелета насекомых, фиброин шелка. Эта группа может быть дополнена протеогликанами клеточных стенок бактерий, белками оболочек вирусов, некоторыми мембранными и рибосомальными белками. Отметим, что приписываемая многим белкам чисто структурная функция часто связана лишь с недостаточным уровнем знаний об их других, более специфических функциях.

Родственный класс составляют так называемые *двигательные белки*. Из них наиболее известны белки сократительного аппарата мышц — актин и миозин. Их разновидностью являются динеин ресничек и жгутиков простейших, спектрин мембран эритроцитов, нейростенин пресинаптических мембран и т. п. Сюда можно отнести и белки бактерий, ответственные за движение в градиенте концентраций различных веществ (хемотаксис), в частности мальтозу-связывающий белок *E.coli*.

Из *рецепторных белков* следует, безусловно, упомянуть родопсин зрительного аппарата животных и родственный ему бактериородопсин галофильных бактерий, которые способны воспринимать и преобразовывать световые сигналы. В настоящее время интенсивно изучаются рецепторы многочисленных гормонов, а также нейропептидов мозга, рецепторы нейромедиаторов (например, ацетилхоли-

новый рецептор постсинаптических мембран), рецепторы клеточной поверхности эритроцитов, лимфоцитов и других клеток.

Менее определена функция группы *регуляторных белков и пептидов*, поскольку, в известной степени, эту роль выполняют любые белки. Сюда относят белково-пептидные вещества, не вошедшие в состав вышеупомянутых групп, но весьма важные для функционирования отдельных звеньев клеточного механизма, например гистоны и репрессоры, регулирующие активность генов, «воротные» белки мембранных каналов, рибосомальные белковые факторы инициации и элонгации (см. с. 422). К этой группе можно отнести и встречающиеся в мышечной ткани природные пептиды карнозин и ансерин.

Наконец, следует упомянуть группу *запасных белков*. В ее состав входят овальбумин яичного белка, казеин молока, глиадин пшеницы, зеин ржи, гордеин ячменя, а также ферритин («депо» железа в селезенке) и др.

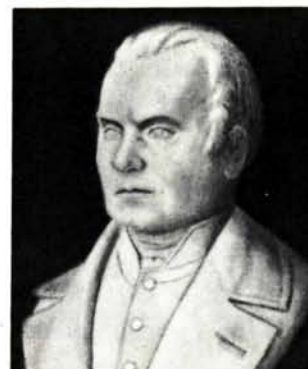
Белки — важнейшая составная часть пищи человека и корма животных. Человеку необходимо в день в среднем 70 г белка. Главным источником пищевого белка являются сельскохозяйственные продукты — мясо, молоко, пшеница, рожь, кукуруза, рис, соя, горох, фасоль, различные овощи и фрукты; значительные количества белка содержат рыба и продукты моря. Основными характеристиками пищевого или кормового белка принято считать его перевариваемость и сбалансированность по аминокислотному составу; это устанавливается путем сравнения данного белка со стандартным препаратом, например казеином или лактальбумином, в наилучшей степени отвечающим физиологическим потребностям человека и животных. В то же время известно, что многие белки содержат недостаточное количество некоторых незаменимых аминокислот — лизина, триптофана, метионина, вследствие чего их питательная ценность резко снижается; примером может служить белок кукурузы, обнаруживающий дефицит по лизину. В этом случае целесообразно для компенсации добавлять к рациону рассчитанные количества недостающего компонента — в виде свободной аминокислоты либо в виде другого белка, специфически богатого данным компонентом. Таким путем, в частности, готовят искусственные питательные смеси, применяемые для лечебного питания во многих странах.

Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме животных и должны поступать извне — с пищей. К ним относятся: гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин и аргинин. Организм некоторых животных обладает способностью синтезировать, хотя и недостаточно быстро, аргинин, необходимый для нормального роста.

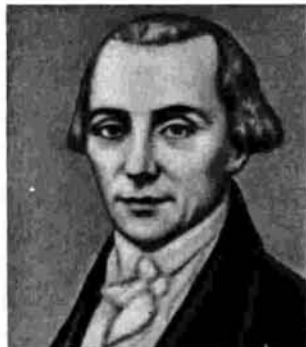
В настоящее время на земном шаре ощущается острый белковый дефицит, связанный с недостаточным производством и неравномерным распределением продуктов питания, а также быстрым ростом народонаселения. Эта проблема, особенно актуальная в развивающихся странах Азии и Африки, привлекает пристальное внимание многих государств и международных организаций. Лучшим и наиболее естественным путем увеличения производства пищевых продуктов является повышение продуктивности сельскохозяйственного производства во всех регионах нашей планеты на основе внедрения новейших достижений науки. Большое значение приобретает использование нетрадиционных источников белка — к ним можно отнести огромные биологические ресурсы Мирового океана, в частности криль, планктон и др. В этой связи несомненные перспективы открывает получение белка с помощью микробиологического синтеза: исходным сырьем здесь могут служить углеводороды нефти, чистые парафины, природный газ, отходы деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, меласса, синтетические



Гей-Люссак [Gay-Lussac] Жозеф Луи (1778—1850), французский химик и физик, иностранный почетный член Петербургской АН (1829). Образование получил в Политехнической школе в Париже (1806), ученик К. Бертолле. Открыл газовые законы, названные его именем. Получил синильную кислоту (1811), построил первые диаграммы растворимости (1819). Усовершенствовал методы элементного и объемного химических анализов. Улучшил технологию производства серной кислоты (башня Гей-Люссака).



Браконно [Braconnot] Анри (1780—1855), французский химик. Образование получил в Страсбургском и Парижском университетах. Основное направление работ — химия природных соединений. Впервые успешно осуществил выделение белков из растительных и животных тканей. Открыл в продуктах гидролиза белка глицин (1820).



Воклен [Vauquelin] Луи Никола (1763—1829), французский химик. Образование получил самостоятельно. Совместно с А. Фуркруа выяснил химическую природу мочевины (1799). Вместе с П. Робике открыл аспарагин (1805). Открыл и выделил в свободном состоянии хром и бериллий (1798).



Мульдер [Mulder] Геррит Ян (1802—1880) — голландский химик и врач, создатель первой теории строения белковых веществ. В 1840—1862 гг. — профессор Утрехтского университета. Предложил формулы протеина и индивидуальных белков (1838), построенные на основании протеиновой теории. Впервые осуществил синтез диметилбарбитуровой кислоты (1879), получил фиброин из шелка (1837).

спирты (метанол, этанол), метан и т. п. Мощная микробиологическая промышленность, производящая белково-витаминные концентраты в качестве добавок в корм сельскохозяйственным животным, создана в Советском Союзе.

Белку и его компонентам — аминокислотам — отводится центральное место и в проблеме создания искусственной пищи, над решением которой работают многие лаборатории мира.

Исторический очерк. Свое название белки получили от яичного белка, который с незапамятных времен использовался человеком как составная часть пищи. Согласно описаниям Г. Плиния Старшего, уже в Древнем Риме яичный белок применялся и как лечебное средство. Однако подлинная история белковых веществ начинается тогда, когда появляются первые сведения о свойствах белков как химических соединений (свертываемость при нагревании, разложение кислотами и крепкими щелочами и т. п.). Среди белков животного происхождения, вслед за яичным белком, были охарактеризованы белки крови. Образование сгустков крови при ее свертывании описано еще основателем учения о кровообращении У. Гарвеем; позднее на этот факт обратил внимание и Р. Бойль. Среди растительных белков пальма первенства принадлежит нерастворимой в воде клейковине из пшеничной муки, которую впервые получил Я. Беккари. В своих работах, опубликованных в «Комментариях Болонского института наук и искусств» в 1728 г., он отметил сходство клейковины с веществами животной природы, почему и называл ее *Gluten vegetabile*.

Впервые термин *белковый* (*albumineise*) применительно ко всем жидкостям животного организма использовал, по аналогии с яичным белком, французский физиолог Ф. Кене в 1747 г., и именно в таком толковании термин вошел в 1751 г. в «Энциклопедию» Д. Дидро и Ж. Д'Аламбера.

С этого периода исследования, связанные с получением белков, приобретают систематический характер. В 1759 г. А. Кессель-Майер, а несколько позднее И. Руэль описали выделение клейковины из различных растений и охарактеризовали ее свойства. В 1762 г. А. Халлер исследовал процесс образования и свертывания казеина, а в 1777 г. А. Тувенель, работавший тогда в Петербурге, называет творог белковой частью молока (*partie glutineuse*). Важнейший этап в изучении белков связан с работами французского химика А. Фуркруа, который рассматривал белки как индивидуальные вещества и доказал единую природу белковых веществ, выделенных из растительных и животных источников. Для трех главных белковых компонентов крови он предложил названия альбумин, желатин и фибрин. В 1780 г. Ф. Вассерберг относит к телам белковой природы хрусталик глаза.

К началу XIX столетия появляются первые работы по химическому изучению белков. Уже в 1803 г. Дж. Дальтон дает первые формулы белков — альбумина и желатина — как веществ, содержащих азот. В 1810 г. Ж. Гей-Люссак проводит химические анализы белков — фибрина крови, казеина и отмечает сходство их элементного состава. Решающее значение для понимания химической природы белков имело выделение при их гидролизе аминокислот. Вероятно, первым это сделал А. Браконно в 1820 г., когда, действуя на белки серной кислотой, при кипячении он получил «клеевой сахар», или гликокол (глицин), при гидролизе фибрина из мяса — лейцин и при разложении шерсти — также лейцин и смесь других продуктов гидролиза. Первой открытой аминокислотой был, видимо, аспарагин, выделенный Л. Вокленом из сока спаржи *Asparagus* (1806). В это же время Ж. Пруст получил лейцин при разложении сыра и творога. Затем из продуктов гидролиза белка были выделены многие другие аминокислоты (табл. 1).

Первая концепция строения белков принадлежит голландскому химику Г. Мульдеру (1836). Основываясь на теории радикалов, он сформулировал понятие о минимальной структурной единице, входящей в состав всех белков. Эту единицу, которой приписывался состав $2C_8H_{12}N_2 + 50$, Г. Мульдер назвал протеином (Pr), а свою концепцию — теорией протеина.

Позднее состав протеина был уточнен — $C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$; дополнительно к протеиным единицам некоторые белки содержали серу и фосфор. Формула белков, предложенная Мульдером в 1838 г., выглядела так:

белок сыворотки крови	10Pr S ₂ P
белок куриных яиц	10Pr SP
фибрин	10Pr SP
казеин	10Pr S
клейковина растений	10Pr S ₂
кристаллин (из хрусталика глаза)	15Pr

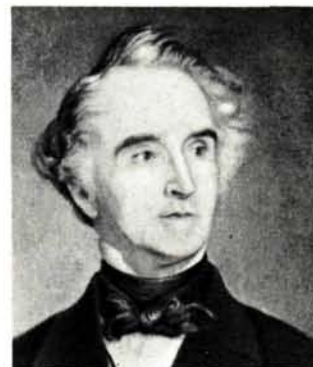
В частности, состав ногтей и лошадиных копыт изображался как $C_{120}H_{186}N_{34}O_{36}S_4 = (C_{40}H_{62}N_{10})_2O_{12}N_4 + C_{40}H_{62}N_{10}(O_{12}S_2)_2$.

Г. Мульдер пользовался структурными формулами и для обозначения ряда физиологических процессов. В своем учебнике физиологической химии (1844) он рассматривал дыхание как окисление протеина, пищеварение — как перестройку белка с изменением содержания S, P, Ca и т. п.

Работы Г. Мульдера способствовали широкому распространению взглядов о единстве всех белков, их фундаментальном значении в мире живой природы.

В ходе проверки «теории протеина» были резко расширены химические исследования белков, и в этом приняли участие выдающиеся химики того времени Ю. Либих и Ж. Дюма. Ю. Либих, поддержавший в принципе идею протеиновой единицы, уточнил формулу протеина $C_{48}H_{72}N_{12}O_{14}$, Ж. Дюма предложил свой вариант — $C_{48}H_{74}N_{12}O_{15}$, однако Г. Мульдер отстаивал правильность составленной им формулы. Его поддерживал Й. Берцелиус, изложивший теорию протеина в качестве единственной теории строения белка в знаменитом учебнике химии (1840), что означало полное признание и торжество концепции Г. Мульдера.

Однако вскоре наступают трудные времена для теории протеина. В 1846 г. Н. Э. Лясковский, работавший в лаборатории Ю. Либиха, доказал неточность многих приведенных Г. Мульдером анализов. Свои сомнения в правильности теории публично высказал Ю. Либих, он планировал начать широкие исследования структуры белков и даже изучил продукты распада белковых веществ. Понимая весомость аргументов оппонентов, Г. Мульдер пытался корректировать формулу протеина ($C_{36}H_{50}N_8O_{10}$), но в конце концов уступил под натиском новых фактов и открытий. Теория протеина стала достоянием истории, однако ее значение непреходяще, ибо она стимулировала химические исследования белков, сделала белки одним из главных объектов бурно развивающейся химии природных веществ.



Либих (Liebig) Иоганн Юстус фон (1803—1873), немецкий химик, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1830). Образование получил в Боннском и Эрлангенском университетах, а также в Сорбонне у Ж. Л. Гей-Люссака; преподавал в Гиссенском и Мюнхенском университетах. Организовал (1825) первую в Германии химическую лабораторию, где стажировались многие известные химики. Основные работы — в области органической, физиологической, аналитической химии и агрохимии. Предложил методы количественного элементного анализа органических веществ (1828). Один из создателей теории радикалов. Обнаружил явление изомерии (1823).

Таблица 1

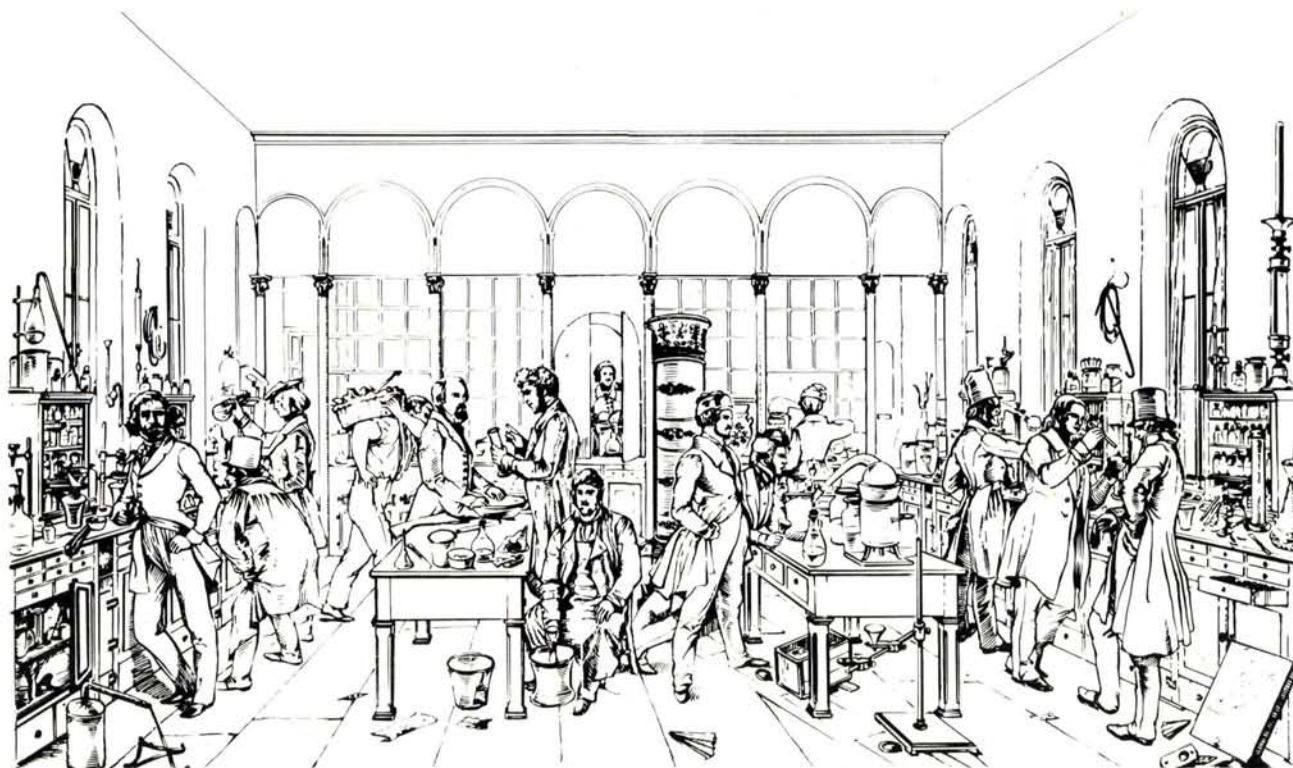
Открытие аминокислот в составе белков

Аминокислота	Год	Источник	Кто впервые выделил
Глицин	1820	Желатина	А. Браконно
Лейцин	1820	Мышечные волокна	А. Браконно
	1839	Фибрин шерсти	Г. Мульдер
Тирозин	1848	Казеин	Ф. Бопп
Серин	1865	Шелк	Э. Крамер
Глутаминовая кислота	1866	Растительные белки	Г. Риттхаузен
Аспарагиновая кислота	1868	Конглутин, легумин (ростки спаржи)	Г. Риттхаузен
Фенилаланин	1881	Ростки люпина	Э. Шульце, Й. Барбьери
Аланин	1888	Фиброин шелка	Т. Вейль
Лизин	1889	Казеин	Э. Дрексель
Аргинин	1895	Вещество рога	С. Гедин
Гистидин	1896	Стурин, гистоны	А. Кессель, С. Гедин
Цистин	1899	Вещество рога	К. Мёрнер
Валин	1901	Казеин	Э. Фишер
Пролин	1901	Казеин	Э. Фишер
Гидроксипролин	1902	Желатина	Э. Фишер
Триптофан	1902	Казеин	Ф. Гопкинс, Д. Кол
Изолейцин	1904	Фибрин	Ф. Эрлих
Метионин	1922	Казеин	Д. Мёллер
Треонин	1925	Белки овса	С. Шрайвер и др.
Гидроксизин	1925	Белки рыб	С. Шрайвер и др.

Для формирования современных представлений о структуре белка существенное значение имели работы по расщеплению белковых веществ протеолитическими ферментами. Одним из первых их использует Г. Мейснер. В 1850 г. К. Леман предлагает называть пептонами продукты разложения белков пепсином. Изучая этот процесс, Ф. Хоппе-Зайлер и Ш. Вюрц в 70-х годах прошлого столетия пришли к важному выводу, что пептоны образуются в результате гидролиза белков ферментом. Они были весьма близки к правильному толкованию таких экспериментов с позиций структурной химии, но, к сожалению, последнего шага на пути к теории строения белка сделать не сумели. Очень близок к истине был и А. Я. Данилевский, который справедливо утверждал, что белки построены из аминокислот и имеют полимерную природу; главной же структурной единицей он ошибочно считал биуретовую группировку RNHCONHCOR^1 .

Дальнейшие структурные исследования белка, а также основополагающие работы Т. Курциуса по синтезу пептидов привели в конце концов к формулированию (1902) пептидной гипотезы, согласно которой белки построены из аминокислот, соединенных пептидными связями $-\text{CO}-\text{NH}-$. Пептидная теория (Э. Фишер и В. Гофмейстер) получила полное подтверждение в дальнейших исследованиях. Изучение строения белков было поставлено на прочную научную основу.

Рис. 2. Лаборатория Ю. Либиха в Гиссене.

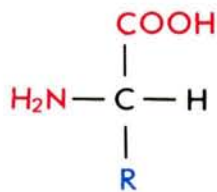


Строение белков и пептидов

Белки — высокомолекулярные природные полимеры, построенные из остатков аминокислот, соединенных амидной (пептидной) связью ($-\text{CO}-\text{NH}-$). Каждый белок характеризуется специфичной аминокислотной последовательностью.

По составу белки делятся на простые, состоящие только из аминокислотных остатков, и сложные. Сложные белки могут включать ионы металла (металлопротеины, или металлопротеиды), пигмент (хромопротеины, или хромопротеиды), образовывать прочные комплексы с липидами (липопротеины), нуклеиновыми кислотами (нуклеопротеины), а также ковалентно связывать остаток фосфорной кислоты (фосфопротеины), углевода (гликопротеины) или нуклеиновой кислоты (геномы некоторых вирусов).

Аминокислоты. Роль структурных элементов в белках выполняют α -аминокислоты, отличающиеся друг от друга строением боковых групп (боковых цепей), обозначенных R; в состав белков входят, как правило, аминокислоты в L-конфигурации.



α -Аминокислоты в белках ковалентно соединены между собой пептидными связями, образованными карбоксильной группой одной аминокислоты и α -аминогруппой другой:











Белковая молекула может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей, содержащих от 2 — 3 десятков до нескольких сотен аминокислотных остатков каждая.







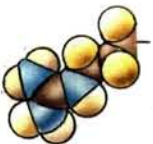

Практически все белки построены из 20 α -аминокислот, структура которых приведена в таблице 2.




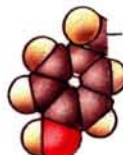


Дюма [Dumas] Жан Батист Андре (1800—1884), французский химик, один из основоположников современной химии, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1845). Образование получил в Женевском университете, с 1841 г. — профессор Сорбонны и Высшей медицинской школы в Париже. Впервые ввел понятие гомологии. Открыл метод определения плотности паров веществ (1826), количественного определения азота в органических соединениях (1830). Установил состав ацетона, хлороформа, камфоры, эмпирическую формулу индиго (1841).

Структура α -аминокислот, наиболее часто встречающихся в белках

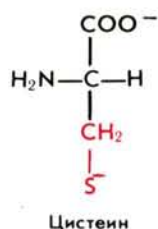
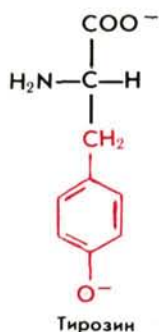
Аминокислота $R - CH(NH_2) - COOH$	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Глицин	Gly	G	$\begin{array}{c} H \\ \\ H - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
ГИДРОФОБНЫЕ				
Аланин	Ala	A	$\begin{array}{c} H \\ \\ CH_3 - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Валин	Val	V	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Лейцин	Leu	L	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH - CH_2 - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Изолейцин	Ile	I	$\begin{array}{c} CH_3 - CH_2 - CH - C - COO^- \\ \\ CH_3 \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Пролин	Pro	P	$\begin{array}{c} H_2C \\ \\ C \\ \\ H_2C - N^+ - C - COO^- \\ \\ H_2 \\ \\ H \end{array}$	
Фенилаланин	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 - CH_2 - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	
Триптофан	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{Indole ring} - CH_2 - C - COO^- \\ \\ NH_3^+ \end{array}$	

Аминокислота R — CH(NH ₂) — COOH	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Метионин	Met	M	$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
ГИДРОФИЛЬНЫЕ				
Серин	Ser	S	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Треонин	Thr	T	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Аспарагин	Asn	N	$\text{NH}_2 - \underset{\text{O}}{\text{C}} = \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Глутамин	Gln	Q	$\text{NH}_2 - \underset{\text{O}}{\text{C}} = \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Лизин	Lys	K	$\text{H}_3\text{N}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Аргинин	Arg	R	$\text{H}_2\text{N} - \underset{\substack{\text{NH}_2 \\ +}}{\text{C}} = \text{NH} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$	
Гистидин	His	H	$\text{HC} = \underset{\text{H}}{\text{C}} - \text{CH}_2 - \underset{\substack{\text{NH}_3 \\ +}}{\overset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{COO}^-$ $\text{HN} = \underset{\text{H}}{\text{C}} - \text{NH}$	

Аминокислота R — CH(NH ₂) — COOH	Условные обозначения		Структурная формула	Строение боковой цепи (R)
	трехбуквенное	однобуквенное		
Аспарагиновая кислота	Asp	D	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Глутаминовая кислота	Glu	E	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Цистеин	Cys	C	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HS} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	
Тирозин	Tyr	Y	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{COO}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	

В зависимости от характера боковых цепей они подразделяются на две группы: 1) аминокислоты с неполярными (гидрофобными) алифатическими или ароматическими R-группами, 2) аминокислоты с полярными (гидрофильными) R-группами.

К первой группе относятся 8 аминокислот: 6 с алифатической боковой цепью — аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин и 2 с ароматической — фенилаланин и триптофан. 7 аминокислот в боковой цепи содержат группировки, способные нести отрицательный или положительный заряд. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты принадлежат к классу аминокислотных кислот, их β- и γ-карбоксильные группы при pH 7,0 заряжены отрицательно. К основным аминокислотам, боковые цепи которых могут нести положительный заряд, относятся лизин, аргинин и гистидин. ε-Аминогруппа лизина и гуанидиновая группировка аргинина при pH 7,0 протонированы. В щелочных условиях отрицательно заряженными могут быть боковые группы тирозина и цистеина.

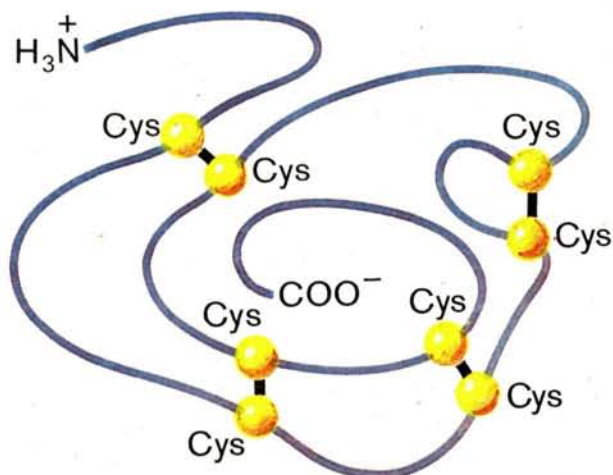


При pH 7,0 эти группы ионизированы частично. Характерной особенностью остатков цистеина является их способность подвергаться в составе молекулы белка самопроизвольному окислению с образованием «двойной» аминокислоты — цистина.



Данилевский Александр Яковлевич (1838—1923), русский биохимик, член-корреспондент Петербургской АН (1898). Окончил Харьковский университет (1860). Основные работы посвящены ферментам, химии белков и вопросам питания. Впервые разработал адсорбционный метод разделения ферментов поджелудочной железы. Предложил теорию строения белковых молекул.

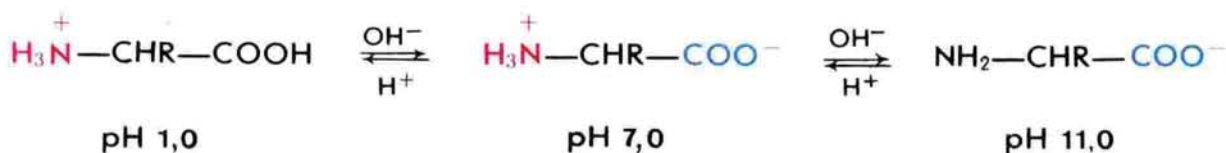
Дисульфидные связи остатков цистина ковалентно связывают участки одной или нескольких полипептидных цепей, образуя между ними поперечные дисульфидные мостики.



Помимо основных 20 аминокислот, некоторые белки содержат и их производные, образующиеся в процессе посттрансляционной модификации. Так, в фибриллярном белке коллагене и в некоторых растительных белках встречаются 4-гидрокси-пролин (HyPro) и 5-гидроксилизин (HyLys).

Фосфопротеины содержат остатки О-фосфосерина, реже — О-фосфотирозина, а в гликопротеинах ряд остатков серина, треонина или аспарагина — ковалентно присоединенные углеводные цепи. В гистонах ε-аминогруппы некоторых остатков лизина бывают моно-, ди- или триметилированы, иногда — ацетилированы. В других белках встречаются также иодированные остатки тирозина, метилированные остатки аргинина и гистидина. Особенно часто необычные аминокислоты входят в состав пептидных антибиотиков.

α-Аминокислоты в водных растворах при нейтральных рН существуют преимущественно в виде диполярных ионов (цвиттер-ионов), у которых аминогруппы протонированы ($-\text{NH}_3^+$), а карбоксильные группы диссоциированы ($-\text{COO}^-$). Ионизация молекул аминокислот зависит от рН раствора:



Линдерстрём-Ланг (Linderström Lang) Кай Ульрик (1896 — 1959), датский биохимик, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Высшую техническую школу в Копенгагене (1919), с 1938 г. возглавлял Карлсбергскую лабораторию. Основные труды — в области физической химии белков; ввел понятие о трех уровнях организации белковой молекулы. Выделил кристаллическую протеиназу (1949).

Белки дают ряд цветных реакций, обусловленных наличием определенных аминокислотных остатков или общих химических группировок. Эти реакции широко используются для аналитических целей. Среди них широко известны нингидриновая реакция, позволяющая проводить количественное определение аминокислот в белках, пептидах и аминокислотах, а также биуретовая реакция, применяемая для качественного и количественного определения белков и пептидов. (При нагревании белка или пептида, но не аминокислоты, с CuSO_4 в щелочном растворе образуется окрашенное в фиолетовый цвет комплексное соединение меди, количество которого можно определить спектрофотометрически.) Цветные реакции на отдельные аминокислоты используются для обнаружения пептидов, содержащих соответствующие аминокислотные остатки. Для идентификации гуанидиновой группы аргинина применяется реакция Сакагучи — при взаимодействии с α-нафтолом и гипохлоритом натрия гуанидины в щелочной среде дают красное окрашивание. Индольное кольцо триптофана может быть обнаружено реакцией Эрлиха — красно-фиолетовое окрашивание при реакции с п-диметиламинобензальдегидом в H_2SO_4 . Реакция Паули позволяет выявить остатки гистидина и тирозина, которые в щелочных растворах реагируют с диазобензолсульфонокислотой, образуя производные, окрашенные в красный цвет.

По предложению К. У. Линдерстрёма-Ланга, различают четыре уровня организации белковых молекул — первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Хотя эти категории в известной степени устарели, ими пока продолжают пользоваться. Последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи называется первичной структурой. Термин «вторичная структура» относится к типу укладки полипептидных цепей. Наиболее часто встречаются типы — правая α-спираль, β-структура и β-изгиб. Под третичной структурой белка понимается расположение его

полипептидной цепи в пространстве. Термин «четвертичная структура» относится к белкам, в состав которых входит несколько полипептидных цепей (субъединиц), не связанных между собой ковалентно; такая структура отражает характер взаимного расположения этих субъединиц в пространстве.

Первичная структура белков и пептидов

Все белки различаются по своей первичной структуре. Потенциально возможное число таких структур практически неограниченно; так, для 15-членного пептида, состоящего из различных аминокислот, существует 20^{15} возможностей их взаимного расположения. Если же провести подобный расчет для среднего по величине белка с молекулярной массой 35 000 — 40 000, то окажется, что в живой природе все эти возможности не реализуются: общее число различных типов белков у всех видов живых организмов составляет величину порядка 10^{10} — 10^{12} .

Познание биологической функции и, в частности, молекулярного механизма физиологического действия белка невозможно без детального знания его строения. Установление первичной структуры белка служит основой для определения вторичной и третичной структур, выяснения расположения функциональных групп в его активном центре и открывает путь к познанию механизма его функционирования. Исследование первичной структуры «мутантных» белков позволяет на молекулярном уровне выяснить характер наследственных болезней. Данные по первичной структуре используются как один из показателей при установлении и проверке таксономических взаимоотношений между различными видами живых организмов и построении схемы биологической эволюции.

Принципиально первичную структуру белков можно определять путем непосредственного анализа аминокислотной последовательности или путем расшифровки нуклеотидной последовательности соответствующих генов с помощью генетического кода. Естественно, наибольшую надежность обеспечивает сочетание этих методов.

Исследование первичной структуры белка начинается с определения его молекулярной массы, аминокислотного состава, N- и C-концевых аминокислотных остатков. Поскольку пока не существует метода, позволяющего установить полную первичную структуру белка на целой молекуле, полипептидную цепь подвергают специфичному расщеплению химическими реагентами или протеолитическими ферментами. Смесь образовавшихся пептидных фрагментов разделяют и для каждого из них определяют аминокислотный состав и аминокислотную последовательность.

После того как структура всех фрагментов установлена, необходимо выяснить порядок их расположения в исходной полипептидной цепи. Для этого белок подвергают расщеплению при помощи другого агента и получают второй, отличный от первого набор пептидных фрагментов, которые разделяют и анализируют аналогичным образом.

Предположим, что исследуемый белок имеет последовательность, представленную на схеме. При действии на него трипсином гидролизуются связи Lys—Val и Arg—Ser, а при обработке бромцианом (BrCN) расщепляются связи Met—Tyr и Met—Ala.

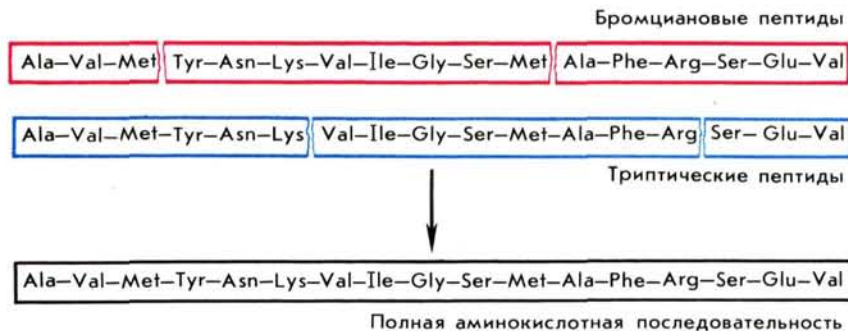


Лясковский Николай Эрастович (1811—1871), русский биохимик. Окончил медицинский факультет Московского университета, с 1855 г. — заведующий кафедрой химии Московского университета. Известен трудами в исследовании белков, впервые правильно установил эмпирические формулы фибрина и яичного и растительного альбумина.



Хоппе-Зайлер (Hoppe-Seyler) Эр Феликс (1825—1895), немецкий биохимик. Образование получил в университетах Галле и Лейпцига (1850) 1872 г. — профессор Страсбургского университета. Основные работы посвящены биохимии крови, изучению обмена веществ. Выяснил структуру основных пигментов крови. Кристаллический продукт превращения гемоглобина — гемохромоген.

Сопоставление аминокислотных последовательностей бромциановых и триптических пептидов позволяет однозначно выяснить их расположение вдоль полипептидной цепи белка. Обычно для определения полной структуры белка двух гидролизатов оказывается недостаточно, причем чем длиннее полипептидная цепь белковой молекулы, тем большее число различных типов расщеплений белка приходится использовать.



На завершающей стадии исследования первичной структуры белка проводится определение положения дисульфидных мостиков, если таковые имеются.

Определение аминокислотного состава

Анализ аминокислотного состава включает полный кислотный гидролиз исследуемого белка или пептида с помощью 5,7 н. соляной кислоты и количественное определение всех аминокислот в гидролизате. Гидролиз образца проводится в запаянных ампулах в вакууме при 110 °С в течение 24 ч. При этом полностью разрушается триптофан и частично серин, треонин, цистин и цистеин, а глутамин и аспарагин превращаются соответственно в глутаминовую и аспарагиновую кислоты. В то же время пептидные связи, образованные аминокислотными остатками с разветвленной боковой цепью (Val, Ile, Leu), из-за стерических препятствий гидролизуются частично. Особенно стабильны связи Val-Val, Ile-Ile, Val-Ile и Ile-Val.

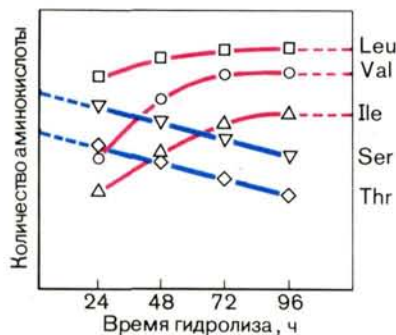


Рис. 3. Кинетика выхода некоторых аминокислот в процессе кислотного гидролиза.

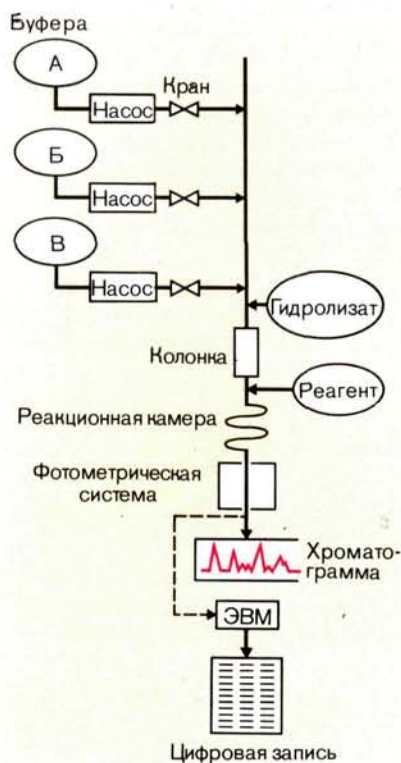
С целью более надежного определения аминокислотного состава белка проводится параллельный гидролиз в течение 24, 48, 72 и 96 ч и все пробы далее количественно анализируются. Для валина, лейцина и изолейцина берутся максимальные значения, а для серина и треонина полученные значения экстраполируются к нулевому времени (рис. 3).

При анализе содержания в белке триптофана вместо соляной кислоты для гидролиза используется 4 н. метансульфокислота. Триптофан можно идентифицировать спектрофотометрически или с помощью цветных реакций.

Обычно при определении аминокислотного состава белка ограничиваются анализом суммарного содержания глутамина и глутаминовой кислоты, аспарагина и аспа-

рагиновой кислоты, а их дифференциация проводится в процессе установления первичной структуры. Цистеин и цистин анализируются в виде цистеиновой кислоты или карбоксиметилцистеина.

Количественное определение аминокислот в гидролизате белка или пептида проводится с помощью аминокислотного анализатора — прибора, разработанного в 1958 г. С. Муром и У. Стейном. Принципиальная схема анализатора приведена на рисунке 4.

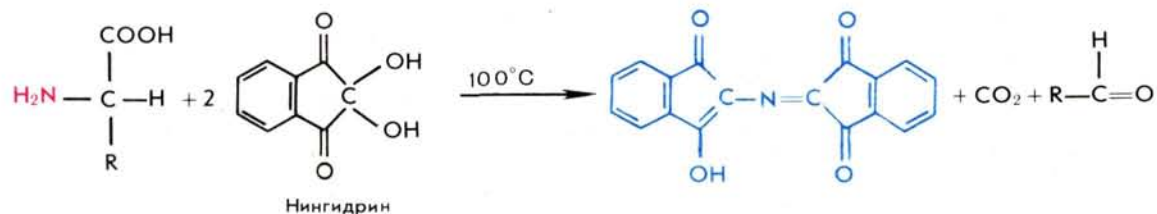


Мур [Moore] Станфорд (1913—1982), американский биохимик. Окончил университет Вандербилта (штат Теннесси, 1935), с 1952 г. — профессор Рокфеллеровского института медицинских исследований. Основные труды посвящены химии белков, установил первичную структуру панкреатической рибонуклеазы. Сконструировал аминокислотный анализатор. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с К. Анфинсеном и У. Стейном).

Рис. 4. Схема аминокислотного анализатора.

Смесь аминокислот разделяется методом ионообменной хроматографии на колонке, заполненной сульфированной полистирольной смолой. Колонка промывается буферными растворами с последовательным повышением их pH и концентрации. Время удерживания каждой аминокислоты строго определено и зависит от степени ее ионизации.

Выходящий из колонки элюат смешивается с раствором нингидрина и в специальной ячейке нагревается до 100 °С. Аминокислоты, реагируя с нингидрином,



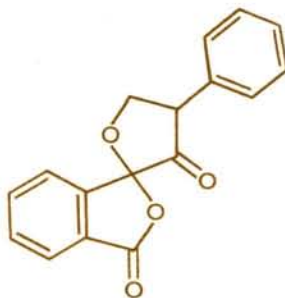


Стейн [Stein] Уильям Хоуард (1911—1980), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1933), с 1938 г. работал в Рокфеллеровском институте медицинских исследований в Нью-Йорке. Основные труды — по исследованию строения белков. Совместно с С. Муром разработал количественный метод определения аминокислот, основанный на ионообменной хроматографии, и создал автоматический аминокислотный анализатор. Впервые установил (1960, совместно с С. Муром) первичную структуру рибонуклеазы. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с К. Анфинсеном и С. Муром).

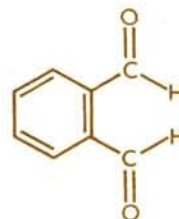
превращаются в аммиак, CO_2 и альдегид. Освобождающийся аммиак взаимодействует с другой молекулой нингидрина и дает окрашенное в фиолетовый цвет производное, имеющее максимум поглощения при 570 нм. Пролин при реакции с нингидрином образует продукт желтого цвета ($\lambda_{\text{макс.}} = 440$ нм). Интенсивность окраски получающихся в результате реакции продуктов, пропорциональная содержанию аминокислот в исследуемом гидролизате, измеряется с помощью спектрофотометра, показания которого регистрируются самописцем и могут поступать для обработки в миниЭВМ.

В современных аминокислотных анализаторах надежно детектируется 1 нмоль аминокислоты, время анализа составляет 1,5 — 2 ч и весь процесс автоматизирован (рис. 5).

Для повышения чувствительности вместо нингидрина в ряде анализаторов применяют флуорескамин или о-фталевый альдегид,



Флуорескамин



о-Фталевый альдегид

которые при реакции с аминокислотами образуют флуоресцирующие соединения. С использованием специального детектора в этом случае удастся регистрировать 10 — 50 пмоль аминокислоты.

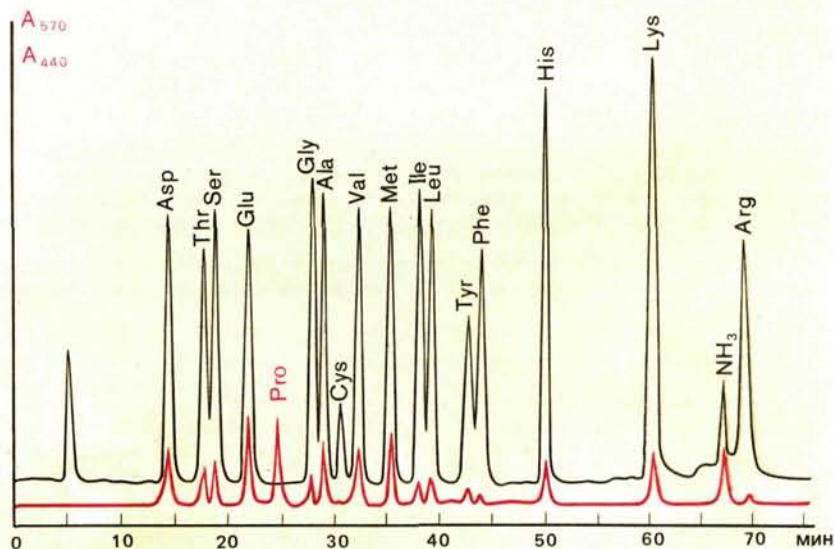


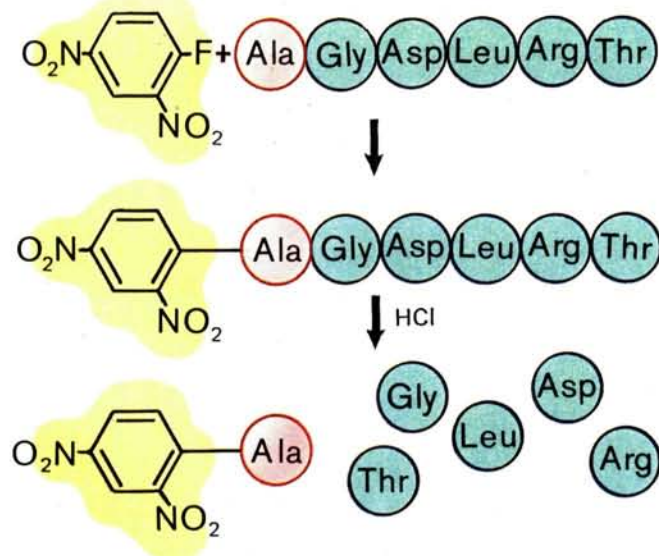
Рис. 5. Анализ стандартной смеси аминокислот (1 нмоль).

В полипептидной цепи белка с одной стороны расположен аминокислотный остаток, несущий свободную α -аминогруппу (аминоили N-концевой остаток), а с другой — остаток со свободной α -карбоксильной группой (карбоксильный, или C-концевой остаток). Анализ концевых остатков играет важную роль в процессе определения аминокислотной последовательности белка. На первом этапе исследования он дает возможность оценить число полипептидных цепей, составляющих молекулу белка, и степень гомогенности исследуемого препарата. На последующих этапах с помощью анализа N-концевых аминокислотных остатков осуществляется контроль за процессом разделения пептидных фрагментов.

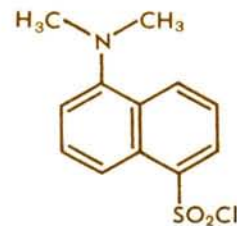
Один из первых методов определения N-концевых аминокислотных остатков был предложен Ф. Сенгером в 1945 г. При реакции α -аминогруппы пептида или белка с 2, 4-динитрофторбензолом получается *динитрофенильное* (ДНФ) производное, окрашенное в желтый цвет. Последующий кислотный гидролиз (5,7 н. HCl) приводит к разрыву пептидных связей и образованию ДНФ-производного N-концевой аминокислоты. ДНФ-Аминокислота экстрагируется эфиром и идентифицируется методом тонкослойной хроматографии в присутствии стандартов.



Сенгер [Sanger] Фредерик (р. 1918), английский биохимик. Окончил Кембриджский университет (1939); с 1951 г. руководил отделом химии белка Медицинского исследовательского совета и одновременно с 1954 г. — лабораторией молекулярной биологии Кембриджского университета. Разработал основные методы исследования первичной структуры белков, установил химическое строение инсулина. Предложил эффективный метод определения нуклеотидной последовательности в полидезоксирибонуклеотидах. Лауреат Нобелевских премий по химии (1958; 1980, совместно с У. Гилбертом и П. Бергом).



Наибольшее применение для определения N-концевых остатков в настоящее время находит разработанный в 1963 г. В. Греем и Б. Хартли *дансильный метод*. Как и метод динитрофенилирования, он основан на введении в аминогруппы белка «метки», не удаляющейся при последующем гидролизе. Его первая стадия — реакция дансилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорида) с непротонированной α -аминогруппой пептида или белка с образованием дансилпептида (ДНС-пептида).



Дансилхлорид



Хартли (Hartley) Брайен (р. 1926), английский биохимик. Окончил университет в Лидсе (1947), с 1981 г. — директор Центра биотехнологии Лондонского университета. Известен работами по химии пептидов и белков, разработал (совместно с В. Греем) дансильный метод определения N-концевых аминокислотных остатков.

На следующей стадии ДНС-пептид гидролизуются (5,7 н. HCl, 105 °С, 12 — 16 ч) и освобождается N-концевая α -ДНС-аминокислота. Кроме того, в результате дансирования боковых групп остатков лизина и тирозина могут получаться ϵ -ДНС-лизин и O-ДНС-тирозин.

ДНС-Аминокислоты обладают интенсивной флуоресценцией в ультрафиолетовой области спектра ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$); обычно для их идентификации достаточно 0,1 — 0,5 нмоль вещества.

Некоторые ограничения дансильного метода связаны с использованием достаточно жесткого кислотного гидролиза; при этом имеет место разрушение остатков триптофана и дезаминирование остатков аспарагина и глутамина. В то же время связи, образованные остатками валина и изолейцина типа ДНС—Ile—Val—, ДНС—Val—Ile— и т. п., обладают повышенной устойчивостью к гидролизу, в результате чего наряду с ДНС-аминокислотами образуются ДНС-дипептиды, что осложняет идентификацию. В этом случае целесообразно увеличить продолжительность гидролиза до 2 — 3 суток. С другой стороны, для повышения выхода лабильных ДНС-серина, ДНС-треонина и ДНС-пролина следует сократить время гидролиза до 4 ч.

Долгое время единственным методом идентификации ДНС-аминокислот являлся метод микротонкослойной хроматографии. Были предложены разнообразные системы для разделения ДНС-аминокислот с помощью одномерной и двумерной хроматографии на тонких слоях целлюлозы, силикагеля (рис. 6) и полиамида. Однако сейчас более перспективным методом идентификации ДНС-аминокислот становится высокоэффективная обратнoфазовая жидкостная хроматография с использованием флуоресцентного детектора, позволившая повысить чувствительность дансильного метода до уровня 10 пмолей (рис. 7, 8).

Имеется ряд методов, с помощью которых можно определять как N-концевой аминокислотный остаток, так и N-концевую аминокислотную последовательность. К ним относится деградация по методу Эдмана и ферментативный гидролиз аминокислотазами. Эти методы будут подробно рассмотрены в разделе, посвященном определению аминокислотной последовательности пептидов.

Среди химических методов определения C-концевых аминокислотных остатков заслуживают внимания метод гидразинолиза, предложенный С. Акабори, и оксазалоновый метод В. Матсуо. В первом из них при нагревании пептида или белка с безводным гидразином при 100 — 120 °С пептидные связи гидролизуются с об-

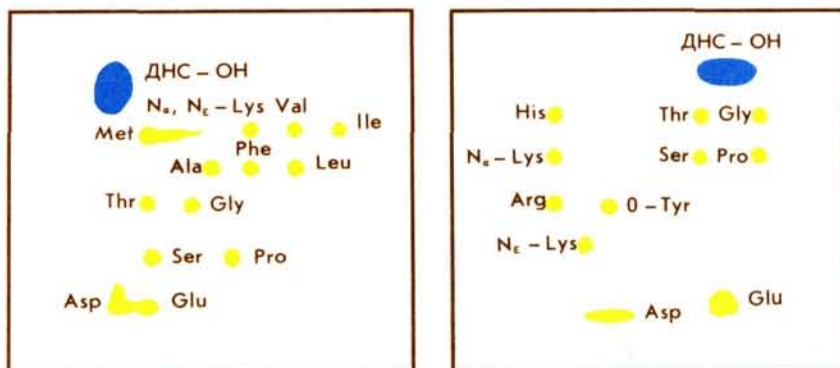
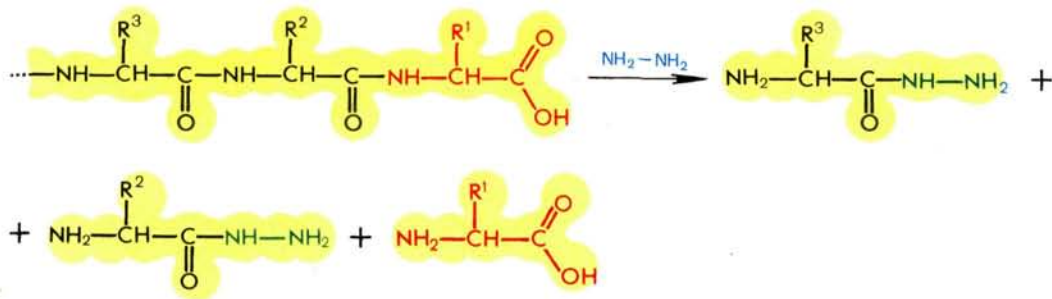


Рис. 6. Разделение ДНС-производных аминокислот двумерной хроматографией на тонком слое силикагеля в различных системах растворителей.

разованием гидразидов аминокислот. С-Концевая аминокислота остается в виде свободной аминокислоты и может быть выделена из реакционной смеси и идентифицирована.



Метод имеет ряд ограничений. При гидразинолизе разрушаются глутамин, аспарагин, цистеин и цистин; аргинин теряет гуанидиновую группировку с образованием орнитина. Гидразиды серина, треонина и глицина лабильны и легко превращаются в свободные аминокислоты, что затрудняет интерпретацию результатов.

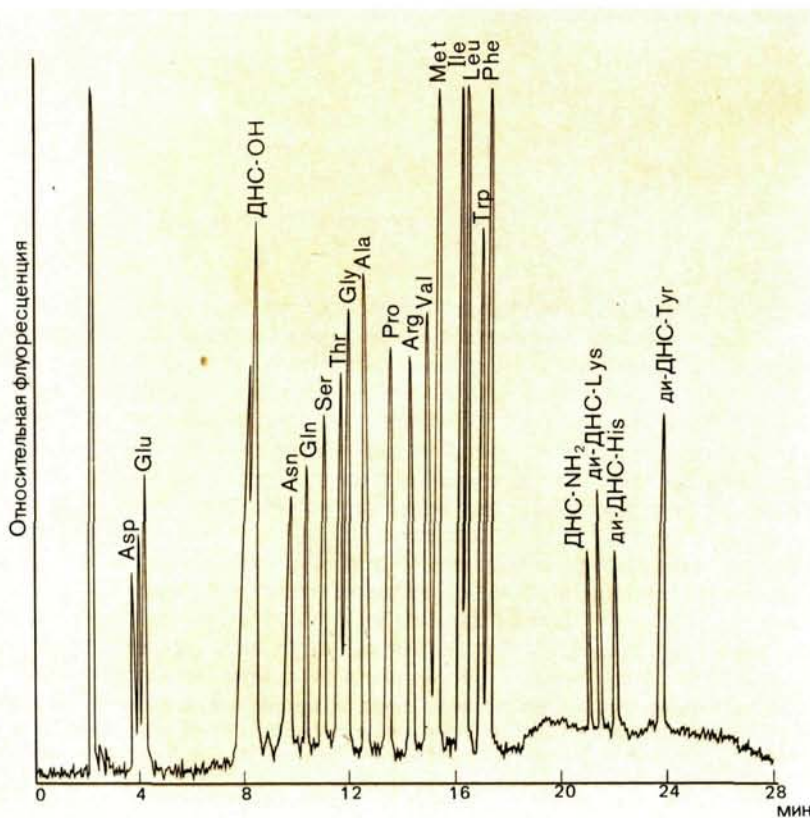
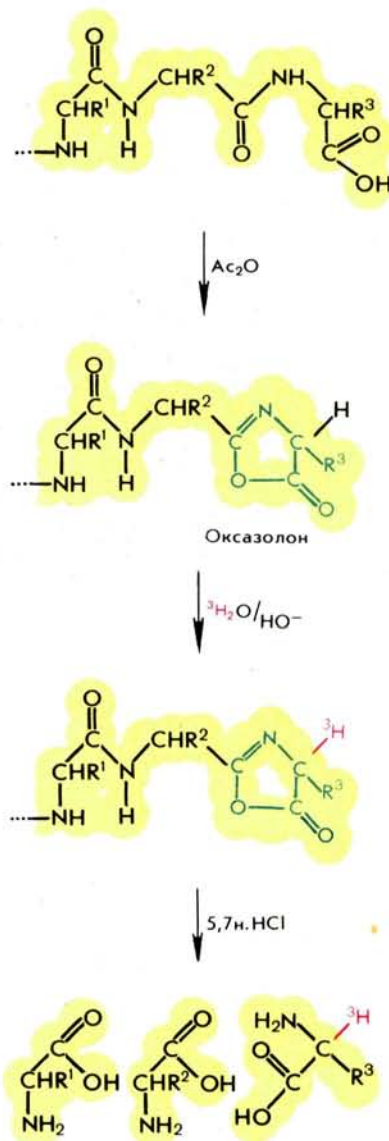


Рис. 7. Разделение ДНС-производных аминокислот (20 пмоль) методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой («Ультрасфер ODS»).



Акабори [Akabori] Сиро (р. 1900), японский химик-органик и биохимик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Тохоку университет в Сендае (1925), с 1938 г. — профессор Осацкого университета. Основные труды посвящены выделению и анализу аминокислот, пептидов и белков. Предложил способ определения С-концевого аминокислотного остатка в белках или пептидах гидразиолизом.

Оксазоновый метод, часто называемый методом тритиевой метки, основан на способности С-концевого аминокислотного остатка под действием уксусного ангидрида подвергаться циклизации с образованием оксазолона. В щелочных условиях резко увеличивается подвижность атомов водорода в положении 4 оксазонового кольца, и он может быть легко обменен на тритий. Образующиеся в результате последующего кислотного гидролиза тритированного пептида или белка продукты реакции содержат радиоактивно меченную С-концевую аминокислоту. Хроматографирование гидролизата и измерение радиоактивности позволяют идентифицировать С-концевую аминокислоту пептида или белка.



В некоторых случаях тритий включается в остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, расположенные в середине пептидной цепи. С-Концевые остатки пролина в описанных условиях не образуют оксазолона, а в С-концевые остатки треонина и серина обычно не удается ввести достаточного количества радиоактивной метки, что, вероятно, связано с деградацией последних в присутствии уксусного ангидрида.

Чаще всего для определения С-концевых аминокислотных остатков используют ферментативный гидролиз карбоксипептидазами, позволяющий анализировать также и С-концевую аминокислотную последовательность.



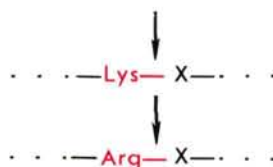
Рис. 8. Жидкостной микроколоночный хроматограф ХЖ-1311 с флуоресцентным детектором (НТО АН СССР, г. Ленинград).

Фрагментация полипептидной цепи

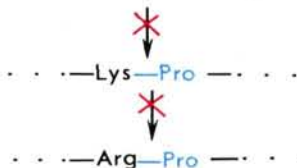
Необходимый этап в определении первичной структуры белка — расщепление белковой молекулы на пептидные фрагменты. Структурная химия белка располагает широким арсеналом химических и ферментативных методов фрагментации полипептидной цепи. Выбор того или иного метода определяется конкретными физико-химическими свойствами изучаемого белка и общим стратегическим планом проведения исследования. Химические методы обладают высокой селективностью, однако процесс расщепления протекает, как правило, с выходом, не превышающим 50%. Эти методы целесообразно использовать для получения крупных фрагментов. Возможности ферментативных методов гидролиза значительно шире, они дают как крупные, так и мелкие пептиды.

Ферментативные методы гидролиза. Наиболее широко используемым ферментом при установлении первичной структуры белков является *трипсин*. Коммерческий бычий трипсин получают активацией его предшественника — трипсиногена, выделяемого из секрета поджелудочной железы. Трипсин относится к классу сериновых протеиназ и проявляет наибольшую активность в диапазоне рН 7,0—9,0. Фермент обладает уникальной субстратной специфич-

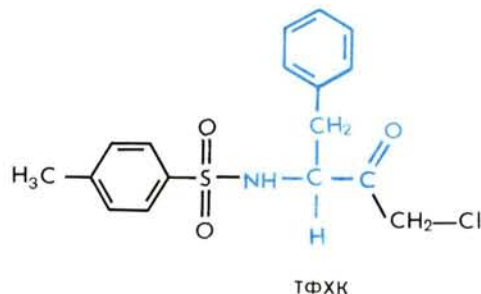
ностью, катализируя гидролиз связей, образованных карбоксильными группами только основных аминокислот — лизина и аргинина.



Гидролиз трипсином в оптимальных условиях происходит, как правило, с выходом, близким к 100%. Однако в ряде случаев на полноту и скорость протекания процесса оказывают влияние положение гидролизуемой связи в цепи и химическая природа боковых групп соседних аминокислотных остатков. Пептидные связи, рядом с которыми находятся свободные α -амино- или α -карбоксильные группы, гидролизуются сравнительно медленно. Так, лизин, занимающий N-концевое положение в рибонуклеазе и лизоциме, практически не отщепляется при гидролизе трипсином, а в В-цепи инсулина происходит только частичное расщепление связи лизина с С-концевым аланином. Как правило, соседство дикарбоновых аминокислот (Asp и Glu) и особенно цистеиновой кислоты или карбоксиметилцистеина затрудняет гидролиз пептидной связи трипсином. Однако практически во всех перечисленных случаях удается добиться достаточно полного гидролиза путем увеличения соотношения трипсин — субстрат или времени инкубации. Исключение составляют связи, образованные остатками лизина и аргинина с пролином (Lys — Pro и Arg — Pro), абсолютно устойчивые к действию фермента.

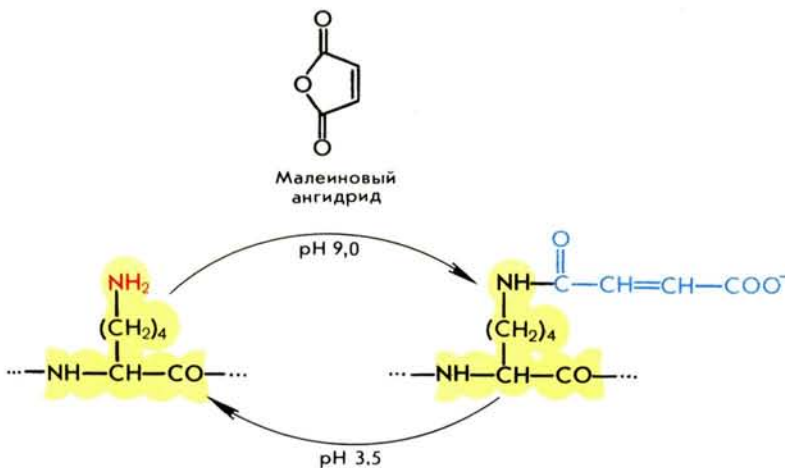


Трипсин обладает высокой избирательностью действия, и все же при достаточно большом времени инкубации и избытке фермента в ряде случаев наблюдается расщепление связей, включающих остатки ароматических аминокислот: тирозина, фенилаланина и триптофана. Коммерческие препараты трипсина могут содержать 0,05% примесей химотрипсина, поэтому во избежание аномальных разрывов пептидных связей применяют различные ингибиторы химотрипсина. Лучший из них — L-(1-тозиламидо-2-фенилэтил)хлорметилкетон (ТФХК) является аналогом ацилированного фенилаланина. Однако даже обработанный ТФХК трипсин иногда гидролизует типичные субстраты химотрипсина. По-видимому, проявление



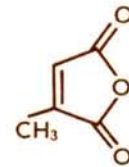
в некоторых случаях химотрипсиноподобной активности объясняется структурной и функциональной особенностью самого трипсина. Не исключено, что другим фактором, вызывающим неспецифичность действия фермента, является повышенная чувствительность некоторых пептидных связей, определяемая пространственной структурой субстрата.

Введение заместителей в боковые цепи лизина или аргинина препятствует гидролизу трипсином по остаткам модифицированных аминокислот и позволяет расщеплять белки избирательно только по остаткам аргинина или лизина соответственно. Особенно часто используется модификация остатков лизина с последующим гидролизом белка по остаткам аргинина. В качестве модифицирующих агентов применяются ангидриды дикарбоновых кислот. В результате реакции ацилирования происходит замена 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 °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 °C; 40 ч) гидролизуются, регенирируя 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. Цитраконовая группа удаляется в более мягких условиях (pH 3,5; 20 °C; 4 ч), однако ее недостаток — пониженная устойчивость при щелочных значениях pH. Для необратимой модификации остатков лизина наилучшим агентом является янтарный ангидрид.

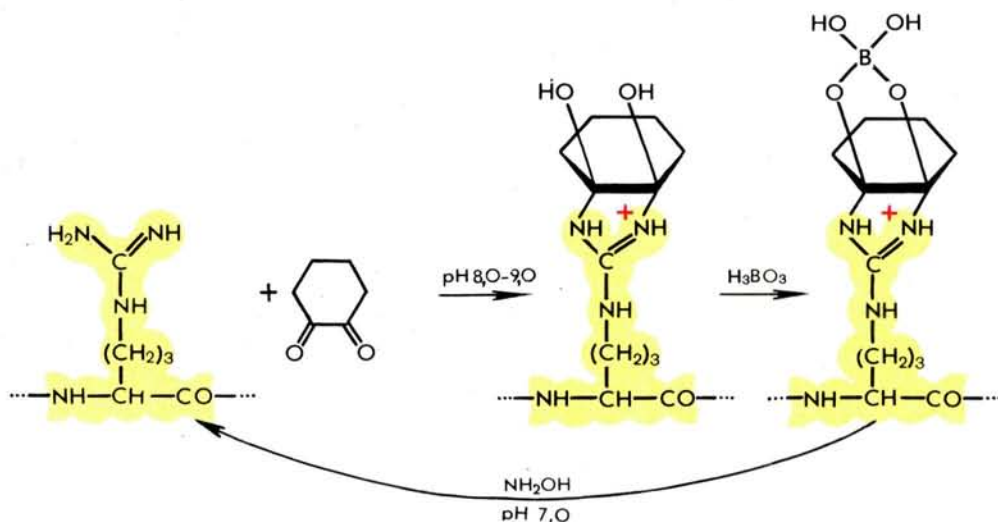


2-Метилмалеиновый (цитраконовый) ангидрид



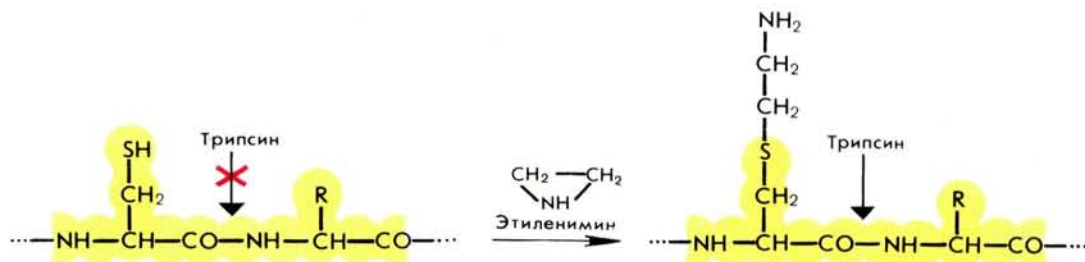
Янтарный ангидрид

Методы модификации остатков аргинина в белках основаны на конденсации гуанидиновой группы с различными дикетонами и диальдегидами. Наибольшее применение среди них находит реакция с 1,2-циклогександионом, предложенная в 1975 г. Л. Патти и Э. Смитом. Модификация протекает в мягких условиях (рН 8,0 — 9,0; 25 — 40 °С) в натрий-боратном буфере с образованием стабильного комплекса производного аргинина с боратом.



Модифицирующая группировка удаляется путем обработки 0,5 М гидроксиламином при рН 7,0, 37 °С, что дает возможность проводить последующее расщепление трипсином по освобождающимся остаткам аргинина.

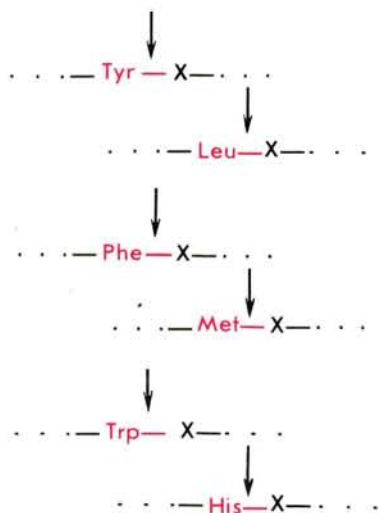
С помощью химической модификации можно также увеличивать число гидролизуемых трипсином связей. Для этой цели, в частности, используется аминоэтилирование остатков цистеина этиленмином (Л. Линдлей, 1956):



Пептидные связи, образованные карбоксильной группой S-(β-аминоэтил)цистеина, являющегося структурным аналогом лизина, способны расщепляться под действием трипсина, однако

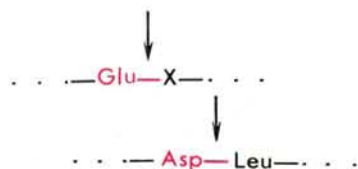
с меньшей скоростью, чем связи, образованные остатками лизина и аргинина. Более полного расщепления можно достичь увеличением концентрации фермента и продолжительности гидролиза.

Наряду с трипсином из поджелудочной железы выделяют другую сериновую протеиназу — *химотрипсин*. Используемый для структурных исследований α -химотрипсин А проявляет максимальную активность в диапазоне рН 7,8 — 9,0. Химотрипсин обладает гораздо более широкой специфичностью, чем трипсин. Фермент преимущественно катализирует гидролиз пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических аминокислот — тирозина, фенилаланина и триптофана. С меньшей скоростью гидролизуются пептидные связи лейцина, метионина, гистидина. Скорость расщепления отдельных связей в белках и пептидах зависит от характера соседних аминокислотных остатков.



Аналогично трипсину химотрипсин обычно медленно гидролизует связи, расположенные в непосредственной близости от свободных α -амино- и α -карбоксильных групп. Наличие рядом с атакуемой химотрипсином связью отрицательного заряда (Glu, Asp, CMCys (карбоксиметилцистеин), CysSO₃H (цистеиновая кислота)) существенно снижает скорость гидролиза, а присутствие основных аминокислот (Lys и Arg) увеличивает степень расщепления. Чрезвычайно затруднен гидролиз пептидных связей, образованных иминогруппой пролина.

В последнее время при исследовании первичной структуры белков широкое применение находит протеиназа из *Staphylococcus aureus*, выделенная в 1972 г. Г. Р. Драпо, которая также относится к классу сериновых протеиназ. Фермент имеет два максимума протеолитической активности — при рН 4,0 и 7,8. Протеиназа из *S. aureus* с высоким выходом расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильной группой глутаминовой кислоты.



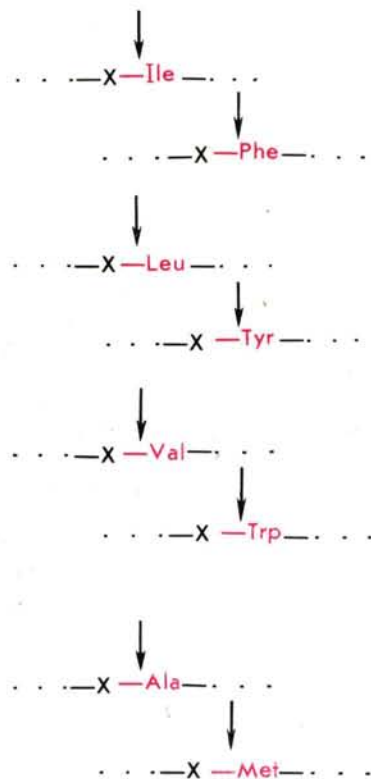
Смит [Smith] Эмиль Л. (р. 1911), американский биохимик, иностранный член АН СССР (1982). Окончил Колумбийский университет (1931), с 1963 г. — профессор Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Один из ведущих специалистов по химии и биохимии белков, в первую очередь ферментов. Установил первичную структуру ряда гистонов, глутаматдегидрогеназы и др. белков. Автор (совместно с Р. Хиллом, И. Леманом и др.) широко известной книги «Основы биохимии».



Гросс [Gross] Эрхард (1928—1981), американский химик-органик. Образование получил в университетах Майнца и Франкфурта-на-Майне (Германия), с 1973 г. руководил лабораторией молекулярных структур Национального института здоровья (США). Основные работы посвящены химии пептидов. Предложил метод расщепления пептидов с помощью бромциана (совместно с Б. Виткопом).

В ряде случаев гидролизу подвергаются также связи, образованные остатком аспарагиновой кислоты. Остатки гидрофобных аминокислот (особенно лейцин), следующие за остатками аспарагиновой кислоты, благоприятствуют такому гидролизу. Как и в случае трипсина и химотрипсина, связи, в образовании которых участвует иминогруппа пролина, не расщепляются протеиназой из *S. aureus*. Свободная карбоксильная группа С-концевого аминокислотного остатка глутаминовой, аспарагиновой кислот и карбоксиметилцистеина, а также свободная α -аминогруппа значительно снижают скорость гидролиза, когда они располагаются рядом с атакуемой ферментом связью или даже отстоят от нее на один аминокислотный остаток.

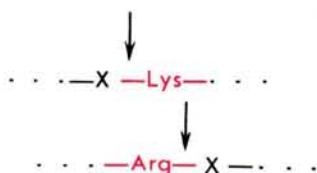
Термолизин, выделяемый из культуральной среды термофильной бактерии *Vacillus thermoproteolyticus*, относится к классу нейтральных протеиназ, содержащих цинк в качестве кофактора. Термолизин необычайно термостабилен: в течение часа он полностью сохраняет свою активность при 60 °С (рН 7,0) и теряет менее 50% активности при 80 °С. Фермент устойчив в 8 М растворе мочевины, 20%-ном растворе этанола или метанола. Максимальную активность он проявляет в диапазоне рН 7,0 — 9,0. В отличие от большинства протеолитических ферментов, специфичность термолизина определяется природой остатка, которому принадлежит аминокислотная группа гидролизуемой связи. Термолизин преимущественно расщепляет пептидные связи, включающие аминокислотные остатки с гидрофобной боковой цепью (Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Trp).



С меньшей скоростью гидролизуются связи, в образовании которых участвуют остатки аланина и метионина. Присутствие свободных карбоксильных и α -аминогрупп рядом с остатком гидрофобной аминокислоты несколько замедляет скорость гидролиза, а остаток пролина, следующий за остатком гидрофобной аминокислоты, препятствует гидролизу.

Трипсин, протеиназа из *S. aureus*, химотрипсин и термолизин являются ферментами, наиболее часто используемыми в настоящее время при установлении первичной структуры белков. Первые два из них, обладающие наиболее высокой специфичностью, применяются главным образом для первичного расщепления белковой молекулы. Термолизин и химотрипсин обычно служат инструментом для дополнительной фрагментации крупных пептидов — продуктов химического или ферментативного гидролиза белка. В то же время довольно часто они применяются и для первичного расщепления белков небольшой и средней молекулярной массы с целью получения «перекрывающихся» фрагментов.

Для избирательного расщепления молекулы белка по остаткам лизина или аргинина в последние годы довольно широко используются новые ферменты. Среди них так называемая лизин-специфичная протеиназа, выделяемая из грибов *Armillaria mellea*, и клострипаин из *Clostridium histolyticum*.



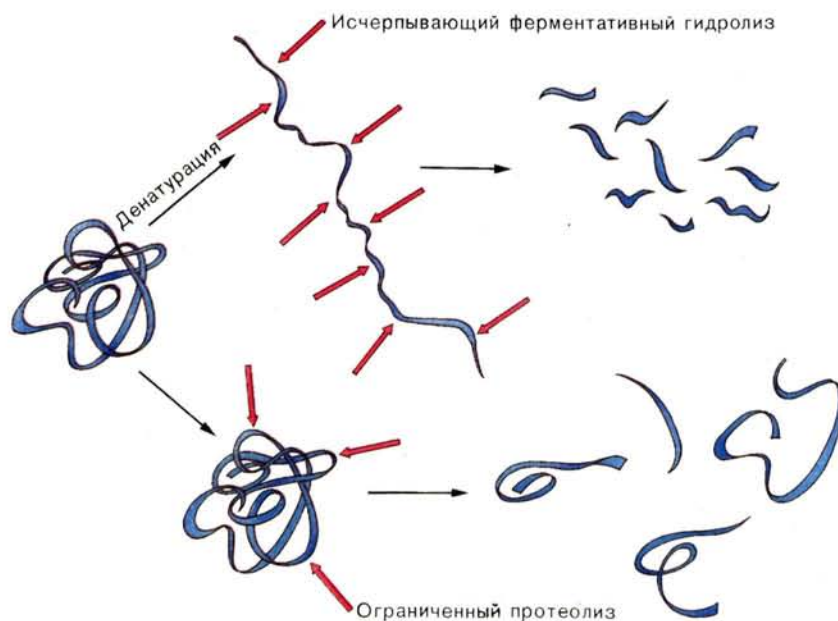
Лизин-специфичная протеиназа в основном катализирует расщепление пептидных связей, образованных α -аминогруппой лизина, а клострипаин предпочтительно гидролизует связи, образованные карбоксильной группой остатков аргинина.

В распоряжении исследователей имеется также большой набор менее специфичных протеолитических ферментов (пепсин, эластаза, субтилизин, папаин, проназа и др.). Эти ферменты используются в основном при дополнительной фрагментации пептидов. Их субстратная специфичность определяется природой аминокислотных остатков, не только образующих гидролизуемую связь, но и более удаленных по цепи.

Для исчерпывающего ферментативного гидролиза необходимо, чтобы белковая глобула находилась в денатурированном состоянии, т. е. все пептидные связи должны быть максимально доступными для атаки ферментом. В белке же, находящемся в нативной конформации, как правило, гидролизу подвергается только ограниченное число связей, расположенных на поверхности белковой молекулы, что приводит к образованию небольшого числа фрагментов. Этот процесс известен под названием *ограниченного протеолиза*. Реакции ограниченного протеолиза широко распространены в биологических системах, и с ними связано осуществление целого ряда физиологических процессов. В частности, к ним относятся процессы активации зимогенов протеиназ желудочно-кишечного тракта и сыворотки крови, процессинг многих гормонов и т. п.

Метод ограниченного протеолиза получил широкое распространение в структурно-функциональных исследованиях белков большой молекулярной массы. С помощью ограниченного протеолиза часто удается расщепить молекулу белка на небольшое число фрагментов и проводить дальнейшее исследование их строения, сводя таким образом одну сложную задачу к нескольким более простым.

Для реализации такого подхода необходимо выбрать протеолитический фермент и подобрать условия, при которых полипептидная цепь исследуемого белка будет гидролизоваться только по наиболее доступным пептидным связям. Важным условием ограниченного протеолиза является сохранение нативной конформации белка. Поэтому при выделении белка следует избегать действия денатурирующих агентов. Во многих случаях удастся расщепить молекулу белка на небольшое число фрагментов, если проводить гидролиз в условиях, которые снижают актив-



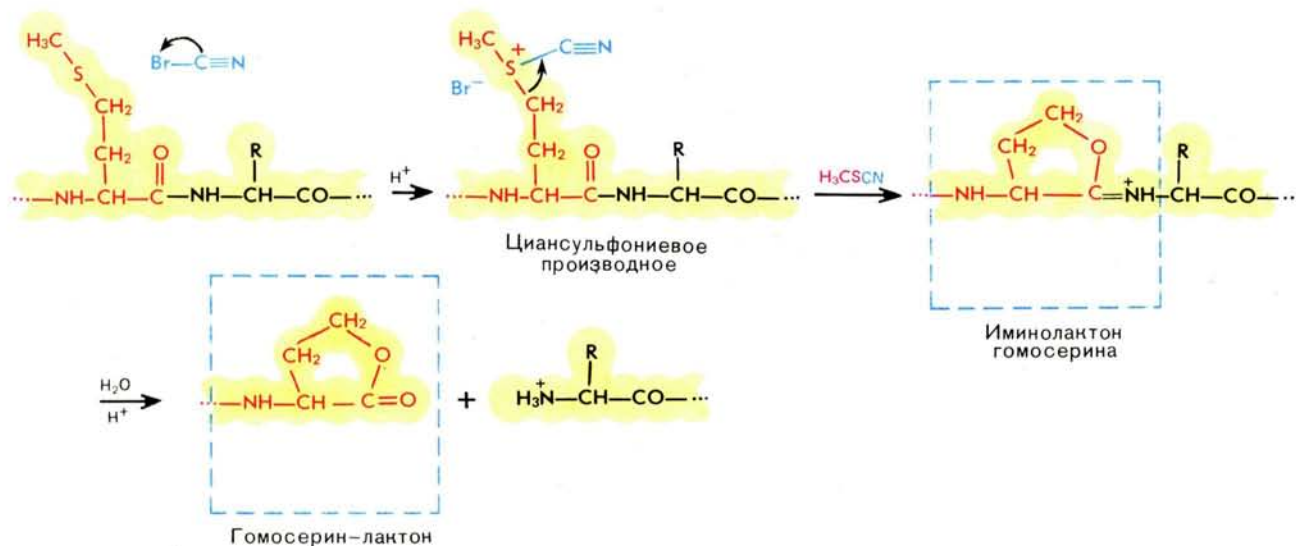
ность используемого протеолитического фермента. Обычно такими условиями являются небольшое фермент-субстратное соотношение, пониженная температура, а также значение pH, не соответствующее оптимуму действия фермента.

Так, при гидролизе основного белка миелина пепсином при pH 3,0, 37 °С и фермент-субстратном соотношении 1:50 наблюдается образование 17 фрагментов; при pH 3,0, 24 °С и фермент-субстратном соотношении 1:500 расщепление проходит главным образом по трем связям, а при pH 6,0, 24 °С и фермент-субстратном соотношении 1:500 расщепляется единственная связь Phe — Phe. Молекулу мембранного белка можно расщепить на небольшое число фрагментов, если подвергать протеолизу нативную мембрану со встроенным в нее белком. При этом под действием фермента способны расщепляться только пептидные связи, находящиеся на поверхности мембраны (см. с. 608).

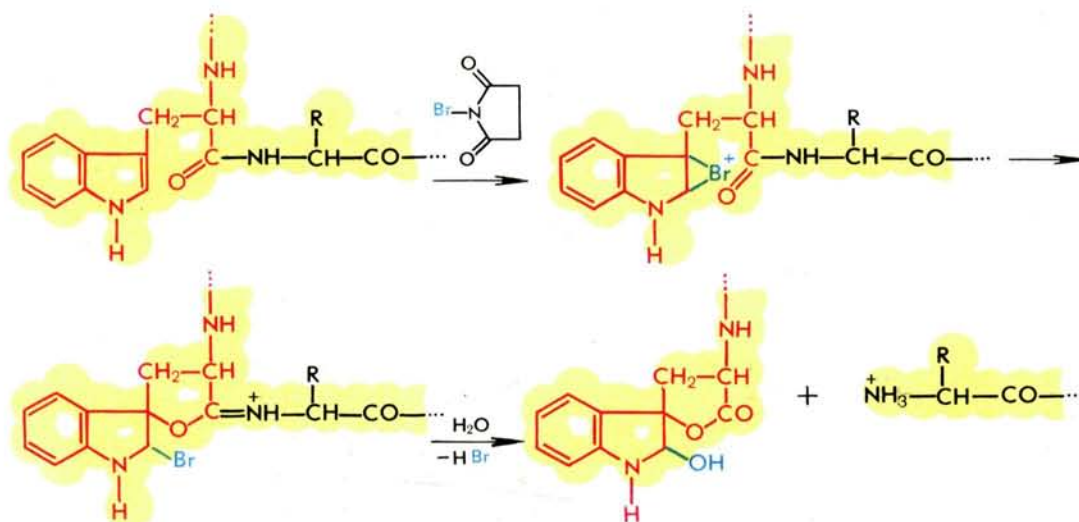
Химические методы расщепления. Среди химических методов фрагментации белков наиболее специфичным и чаще всего применяемым является расщепление бромцианом по остаткам *метионина*. Метод разработан в 1961 г. Э. Гроссом и Б. Виткопом и по избирательности действия не имеет себе равных.

Реакция с бромцианом проходит с образованием промежуточного циансульфониевого производного метионина, спонтанно превращающегося в кислых условиях в иминолактон гомосерина, который, в свою очередь, быстро гидролизуетсся с разрывом иминовой связи. Получающийся на С-конце пептидов лактон гомосерина далее частично гидролизуетсся до гомосерина (HSer), в результате чего каждый пептидный фрагмент, за исключением С-концевого, существует в двух формах — гомосериновой и гомосеринлактоновой.

Реакцию обычно проводят при комнатной температуре в течение 15–30 ч в сильнокислой среде (чаще всего в 70%-ной муравьиной кислоте) при 100-кратном избытке бромциана на каждый остаток метионина. В этих условиях связи, образованные остатками метионина, обычно расщепляются на 90–100%. Исключение составляют связи метионина с серином и треонином, расщепляющиеся лишь частично. В условиях обработки белка бромцианом может иметь место частичный гидролиз связи Asp–Pro, неустойчивой в кислой среде.

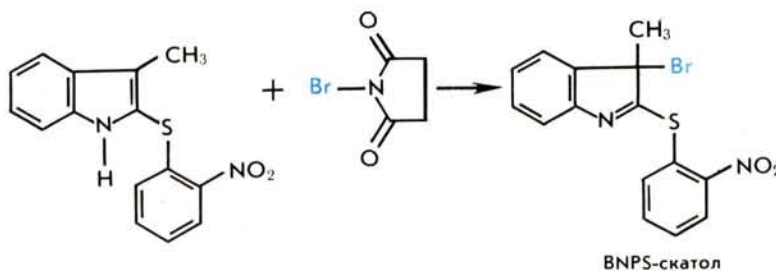


Большое число методов предложено для расщепления белка по карбонильной группе остатка *триптофана*. Одним из используемых для этой цели реагентов является N-бромсукцинимид:



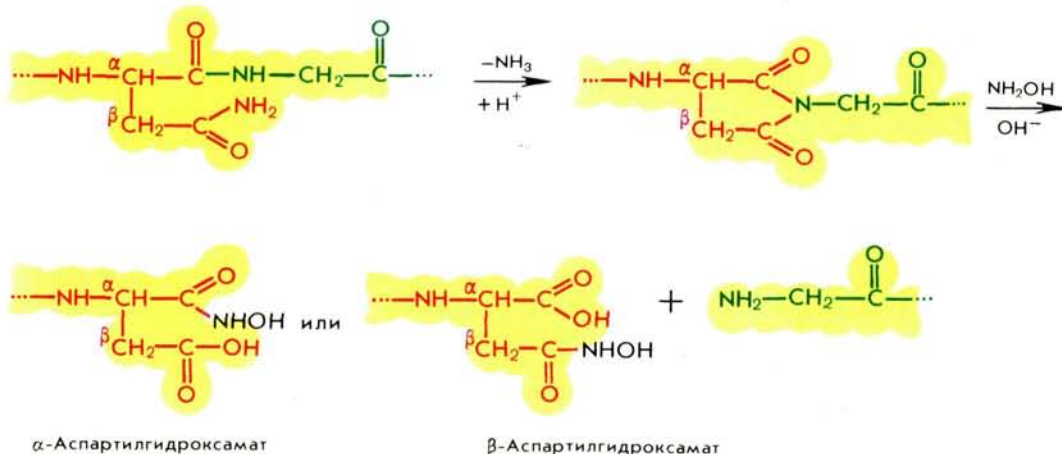
Под влиянием электрофильного агента карбонильная группа остатка триптофана способна вступать в 1,5-взаимодействие с двойной связью индольного кольца, при этом происходит окисление индола до гидроксииндолина, сопровождающееся разрывом пептидной цепи. Реакция проводится при 2 — 3-кратном избытке реагента (рН 4,0; 20 °С; 2 ч). Расщепление триптофансодержащих пептидов N-бромсукцинимидом происходит с выходом 50 — 90%, а белков — лишь 10 — 60%. N-Бромсукцинимид способен расщеплять также связи, образованные карбонильными группами остатков тирозина и гистидина, однако в более жестких условиях (увеличение избытка реагента, повышение температуры и понижение рН).

Более селективным реагентом является 2-(2-нитрофенилсульфенил)-3-метил-3-броминдол (BNPS-скатол), получаемый обработкой 2-(2-нитрофенил)сульфенилскатола N-бромсукцинимидом (А. Фонтана, 1972)



При действии на белки BNPS-скатола происходит специфическое расщепление пептидной цепи только по остаткам триптофана. Остатки метионина при этом окисляются до метионинсульфона. Оптимальные условия проведения реакции: 50%-ная уксусная кислота, 37 °С, 24 ч, 10-кратный избыток BNPS-скатола, выход составляет 30 — 70%. Реакция протекает по механизму, аналогичному механизму расщепления N-бромсукцинимидом.

В 1979 г. М. Хермодсон предложил новый метод расщепления пептидных связей, образованных остатками триптофана, с помощью о-иодозобензойной кислоты. Реагент селективно разрывает связи Тгр — X, не модифицируя остатки тирозина и гистидина; метионин может окисляться до сульфоксида. Остатки цистеина и цистина необходимо предварительно защищать путем S-алки-

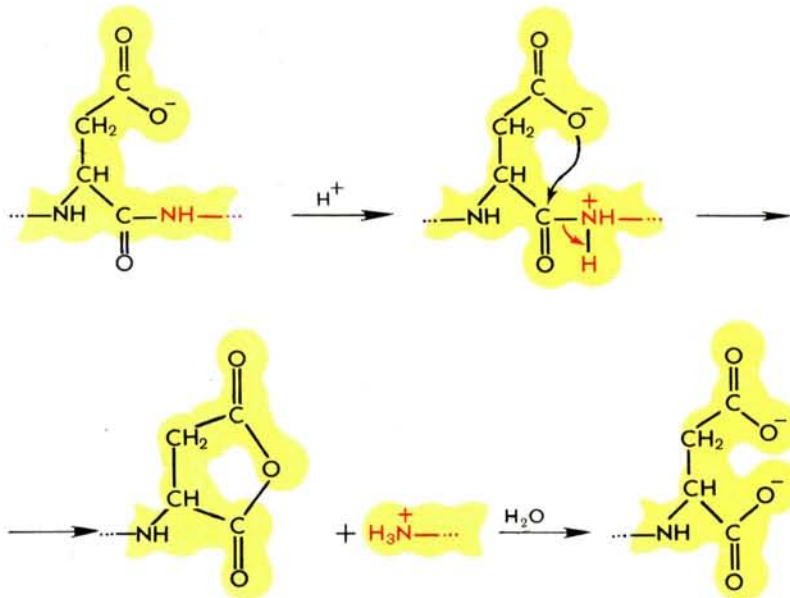


лирования. Реакция проводится в 80%-ной уксусной кислоте в присутствии 2-кратного избытка *o*-иодозобензойной кислоты в течение 24 ч при 20 °С, выход достигает 70 — 100%.

В структурных исследованиях нашел применение метод расщепления полипептидной цепи гидроксиламином по связи *аспарагинил-глицил*. Как показали исследования механизма реакции, с гидроксиламином взаимодействует циклический имид ангидрида аспартил-глицила, образующийся из аспарагинил-глицила. Этому превращению способствует предварительное выдерживание белка в кислой среде.

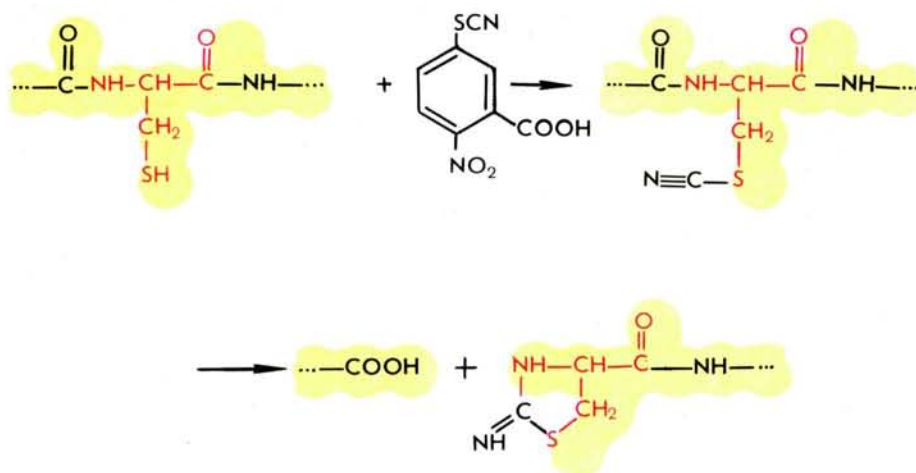
При реакции ангидроаспартил-глицила с гидроксиламином в щелочной среде (рН 10,5) и при температуре 35—60 °С происходит расщепление пептидной цепи с образованием смеси α - и β -аспартилгидроксаматов. У большинства изученных белков при действии гидроксиламина в указанных условиях проходило специфичное расщепление связей Asp—Gly на 50 — 70%. Незначительный разрыв других пептидных связей, например Asp—Leu, наблюдался редко.

В ряде случаев для расщепления белковых молекул используется метод частичного кислотного гидролиза. Наиболее чувствительными к действию кислот являются аспартильные пептидные связи. Механизм реакции гидролиза, вероятно, включает в себя замещение карбоксильным анионом протонированного атома азота пептидной связи:



Наименее устойчивы в кислых условиях связи Asp—Pro. Повышенная их лабильность обусловлена тем, что атом азота остатка пролина в пептидных связях имеет наибольшую основность по сравнению с остатками других аминокислот и легче протонируется. Подобраны условия (10%-ная уксусная кислота — пиридин, рН 2,5, 7 М гуанидин · HCl, 40 °С, 4 суток), при которых связи Asp—Pro расщепляются достаточно селективно и с большим выходом (до 90%).

В 1974 г. А. Патчорник предложил метод расщепления пептидных связей, образованных остатком цистеина, с помощью 2-нитро-5-тиоцианатобензойной кислоты (НТЦБ):



НТЦБ цианирует остаток цистеина, превращая его в остаток β -тиоцианатоаланина, который в мягких условиях (рН 8,0 — 9,0; 37 °С; 12 — 16 ч) циклизуется в 2-иминотиазолидинкарбоновую кислоту с разрывом пептидной связи. Расщепление полипептидной цепи по остаткам цистеина в указанных условиях специфично и обычно проходит с выходом 80 — 90%.

Существенным недостатком метода является то, что полученные при расщеплении фрагменты, за исключением N-концевого, не содержат свободной α -аминогруппы и поэтому не могут подвергаться деградации по методу Эдмана. С помощью восстановительного десульфирования на никелевом катализаторе удастся превращать иминотиазолидинкарбоновую кислоту в аланин. Однако при этом наблюдается частичное расщепление некоторых пептидных связей.

Среди описанных методов химического расщепления наибольшее применение при исследовании первичной структуры белков находит деградация бромцианом по остаткам метионина. Относительно широко используется расщепление по остаткам триптофана и по связи Asn—Gly. Значительно реже применяют частичный кислотный гидролиз по связи Asp—Pro и расщепление по остаткам цистеина и тирозина. При расщеплении белков по остаткам метионина, триптофана и цистеина обычно образуются крупные пептидные фрагменты, содержащие в среднем 40 — 80 аминокислотных остатков, что связано с низким содержанием этих аминокислот в белках. Более крупные пептиды могут быть получены при расщеплении связей Asn—Gly и Asp—Pro.

Разделение смеси пептидных фрагментов, образовавшихся при расщеплении полипептидной цепи белка ферментативными или химическими методами, является одним из наиболее сложных и ответственных этапов в процессе определения первичной структуры. Успех на этом этапе во многом зависит от опыта, знаний, изобретательности исследователя и его искусства.

При выборе методов разделения пептидов необходимо учитывать количества разделяемых веществ и их физико-химические свойства. Одним из основных параметров является длина полипептидной цепи. Методы разделения сравнительно коротких пептидов, содержащих до 15 — 20 аминокислотных остатков, хорошо разработаны.

Для первичного фракционирования смесей, содержащих несколько десятков пептидов, часто используют ионообменную хроматографию на катионитах типа дауэкс, представляющих собой сульфированный сополимер полистирола и дивинилбензола (рис. 9). Элюирование пептидов с колонки проводится с помощью специально подобранных градиента pH и концентрации летучего пиридин-ацетатного буфера. Детекция пептидного материала в элюате осуществляется путем измерения оптического поглощения при 254 нм в пробе после реакции с нингидрином. Иногда вместо нингидрина используется о-фталевый альдегид и какие-либо специфичные реакции (например, реакция Сакагучи, позволяющая обнаруживать аргининсодержащие пептиды). Состав объединенных фракций после ионообменной хроматографии исследуется с помощью аналитической хроматографии в тонком слое целлюлозы и анализа концевых аминокислотных остатков. Результаты аналитических опытов служат основой для выбора последующей схемы деления и очистки пептидов. Для этой цели обычно применяются хроматография и электрофорез на бумаге или пластинках с тонким слоем целлюлозы или силикагеля.

При разделении менее сложных смесей (10 — 15 пептидов) часто опускается стадия ионообменной хроматографии. Выбор схемы разделения проводится на основании анализа так называемых «пептидных карт». Для получения пептидной карты (рис. 10) смесь пептидов, образовавшаяся в результате ферментативного или химического гидролиза белка, наносится в виде небольшой полоски на лист хроматографической бумаги или пластинки с тонким слоем целлюлозы и подвергается электрофорезу или хроматографии во взаимно перпендикулярных направлениях. После проявления пептидной карты специфичным реактивом на бумаге или пластинке образуется характерный для данного белка набор пятен, их взаимное расположение позволяет оценить эффективность использованных методов разделения и выбрать оптимальный вариант.

С помощью метода пептидных карт можно проводить препаративное разделение смеси небольшого числа пептидов. Для этого при проявлении пептидной карты используются низкие концентрации соответствующих реактивов (нингидрина или

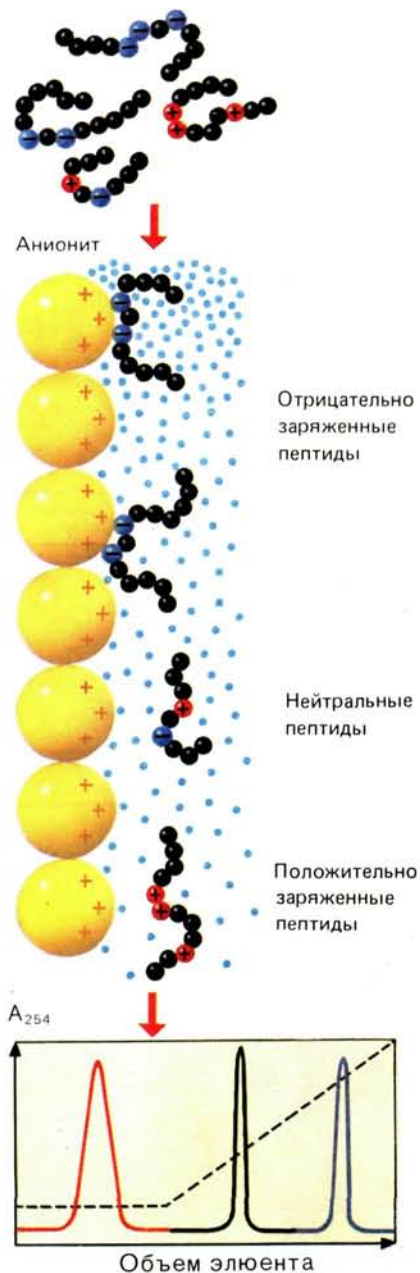
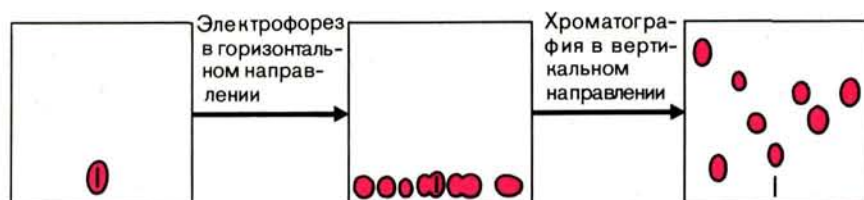


Рис. 9. Разделение пептидов методом ионообменной хроматографии.

Рис. 10. Разделение пептидов методом пептидных карт.



флуорескамина), в результате чего значительная часть пептидов не реагирует с реактивом и может быть элюирована с носителя для структурных исследований. Пептидные карты удобно применять также для выделения радиоактивно или флуоресцентно меченных пептидов.

Значительно более трудную задачу представляет разделение смесей крупных пептидов, содержащих более 20 аминокислотных остатков. Основная сложность связана со свойством таких пептидов «слипаться» в водных растворах друг с другом и образовывать высокомолекулярные агрегаты. С целью предотвращения агрегации в буферные растворы добавляются детергенты (мочевина, гуанидин-гидрохлорид, додецилсульфат натрия).

Для разделения смеси крупных пептидов обычно применяется метод гель-фильтрации, позволяющий проводить фракционирование по молекулярной массе. В качестве неподвижной фазы используются высокогидрофильные декстраны с поперечными «сшивками» (сефадексы) или полиакриламидные гели (биогели) (рис. 11). Они хорошо набухают в воде, образуя гели, которые действуют подобно молекулярному сити. В настоящее время выпускается более 20 типов сефадексов и более 30 типов биогелей, различающихся частотой поперечных сшивок и размером гранул. Выбор носителя для хроматографической колонки определяется молекулярной массой разделяемых пептидов.

Широко используемым методом разделения крупных пептидов является также ионообменная хроматография, в качестве носителей в этих случаях служат ионообменные целлюлозы: диэтил-аминоэтил-(DEAE)- и карбоксиметил-(CM)- и ионообменные полимеры декстрана: DEAE-, CM-, сульфоэтил-(SE)-, сулфопропил (SP)- и диэтил-2-гидроксипропил-аминоэтил-(QAE)- сефадексы.

Гидрофильные свойства таких ионообменников, их способность набухать в водной среде обеспечивают лучшие условия проницаемости для крупных молекул по сравнению со смолами на основе полистирола. Хроматография проводится обычно в водных трис-HCl [(гидроксиметил)аминометан-гидрохлорид, $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$] буферах, содержащих 6–8М раствор мочевины. Элюирование пептидов осуществляется при постепенном повышении ионной силы раствора.

Для фракционирования крупных пептидов иногда применяется метод противоточного распределения, в котором разделение основано на различной растворимости веществ в несмешивающихся жидкостях, например фенол — вода или бутанол — вода. Один из вариантов этого метода заключается в простой экстракции пептидов n-бутанолом из водного раствора.

В последние годы для разделения смесей пептидов очень широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на носителях с обращенной фазой (рис. 12), которые представляют собой силикагель с ковалентно присоединенными углеводородами, содержащими обычно 8 или 18 углеродных атомов. Используется также и просто хроматография на силикагеле. Разделение проводится с помощью специального жидкостного хроматографа, в комплект которого входят: колонки, особым образом упакованные, насос, позволяющий создавать давление до 200 атм, градиентный смеситель, работающий с высокой степенью воспроизводимости, и высокочувствительный ультрафиолетовый или флуоресцентный детектор (рис. 13). К достоинствам метода следует отнести исключительно высокую скорость разделения (менее 1 ч), воспроизводимость результатов и возможность проводить аналитические опыты на микрограммовых количествах вещества. Особенно эффективно применение ВЭЖХ для разделения смесей низкомолекулярных пептидов, образующихся при ферментативном расщеплении белков. Хроматография обычно проводится на колонках с обращенной фазой C_{18} в 0,05%-ной трифторуксусной кислоте с исполь-

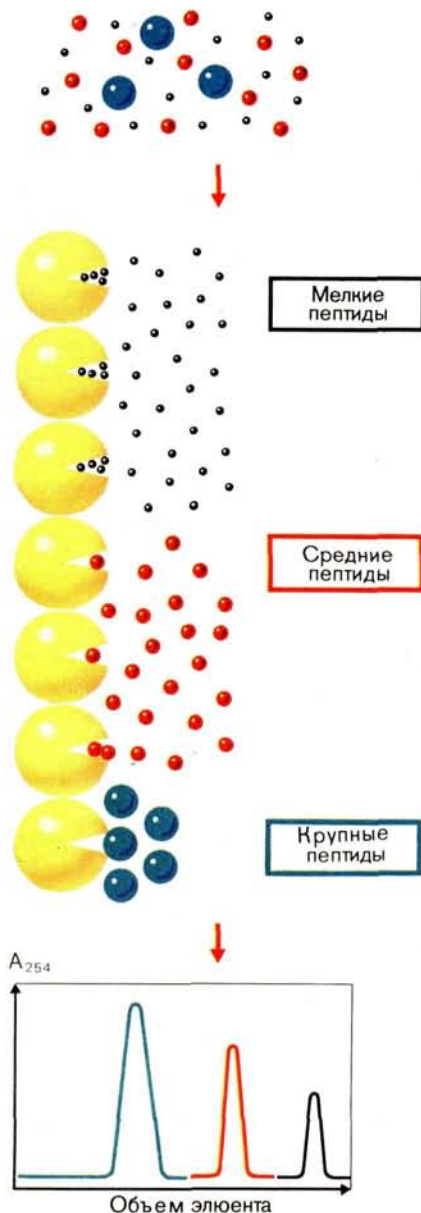


Рис. 11. Разделение пептидов методом гель-фильтрации.

зованием для элюирования градиента ацетонитрила. Разрешающая способность таких носителей превосходит разрешающую способность ионообменных смол. С помощью ВЭЖХ в ряде случаев удается разделить смеси высокомолекулярных пептидов и белков.

Аналитический контроль за процессом разделения высокомолекулярных пептидов осуществляется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Электрофорез проводится в присутствии додецилсульфата натрия, который образует мицеллы с разделяемым веществом, нивелируя его электрический заряд, в результате чего разделение происходит исключительно по молекулярной массе. Метод имеет большую чувствительность и высокую разрешающую способность. Электрофорез используют и для непосредственного разделения небольших количеств пептидов.

Часто перед исследователями встает задача селективного выделения из суммарного гидролизата белка пептидов, несущих определенные функциональные группы. Для этих целей может быть эффективно использована хемоспецифическая, или ковалентная, хроматография, основанная на образовании ковалентной связи пептида с носителем. Чаще всего метод ковалентной хроматографии применяют для селективного выделения цистеинсодержащих пептидов. В основу метода положена иммобилизация пептидов, содержащих свободные сульфгидрильные группы, на носителях с активированными SH-группами за счет реакции тиол-дисульфидного обмена, в результате которой между пептидом и носителем образуется дисульфидная связь (рис. 14). При этом дисульфиды, не содержащие остатков цистеина, не связываются с носителем и удаляются при промывании соответствующим буфером. Цистеинсодержащие пептиды выделяют далее восстановлением дисульфидных связей при pH 8,0 избытком меркаптоэтанола или дитиотреита. Более селективного разделения тиолсодержащих и тиолнесодержащих пептидов можно достигнуть, если проводить ферментативный или химический гидролиз белка, предварительно иммобилизованного на нерастворимом носителе. В качестве носителя в обоих случаях используется тиол-сефароза 4В, которая содержит в качестве активированной группы смешанный дисульфид, образующийся при обработке глутатион-сефарозы 2,2'-дипиридилдисульфидом.

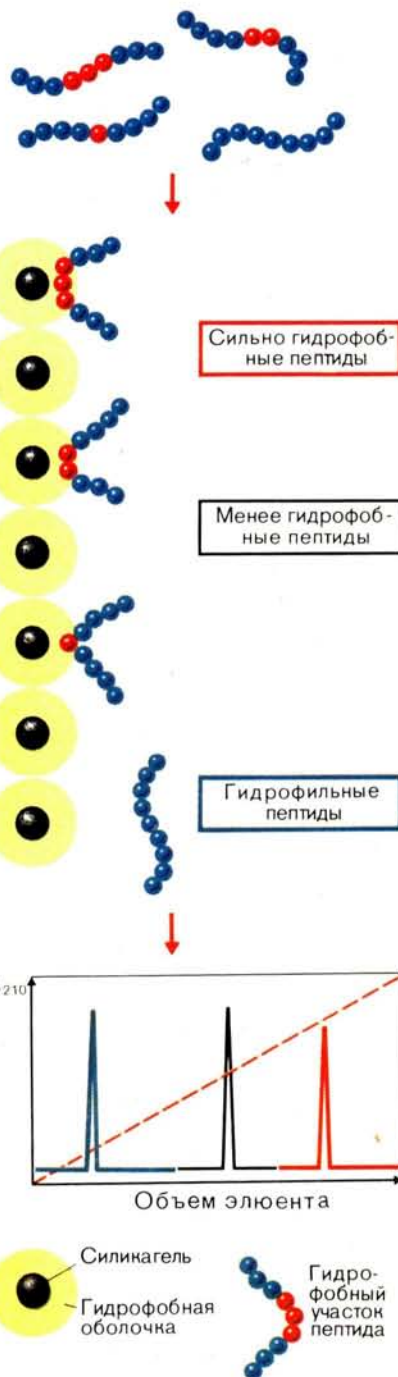
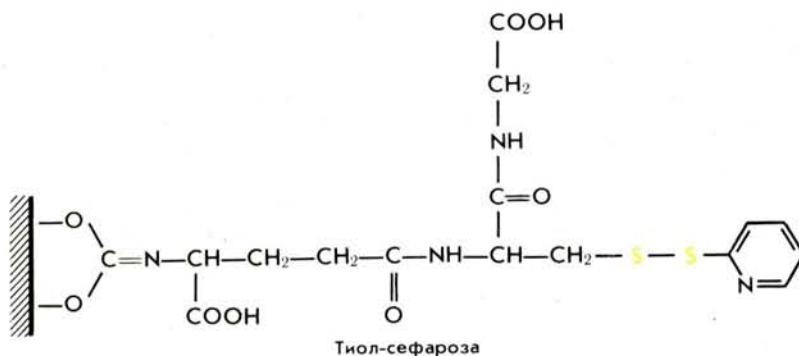
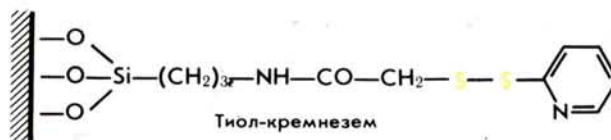


Рис. 12. Разделение пептидов хроматографией на обращенной фазе.

Значительно большей химической устойчивостью обладают матрицы на неорганической основе — пористое стекло, кремнезем. Так, на активированном тиол-кремнеземе можно проводить иммобилиза-



цию труднорастворимых (мембранных) белков и осуществлять последующий химический гидролиз конъюгата.

Рис. 13. Жидкостной микроколоночный хроматограф «Миллихром» (СССР, ПО «Научприбор», г. Орел).

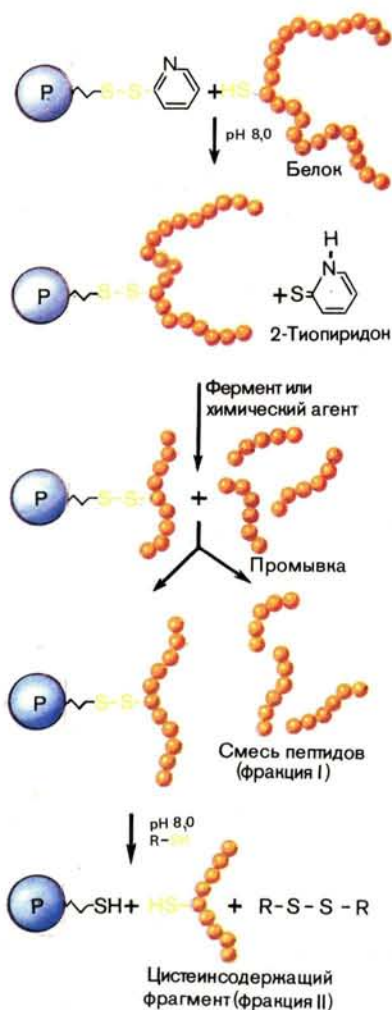
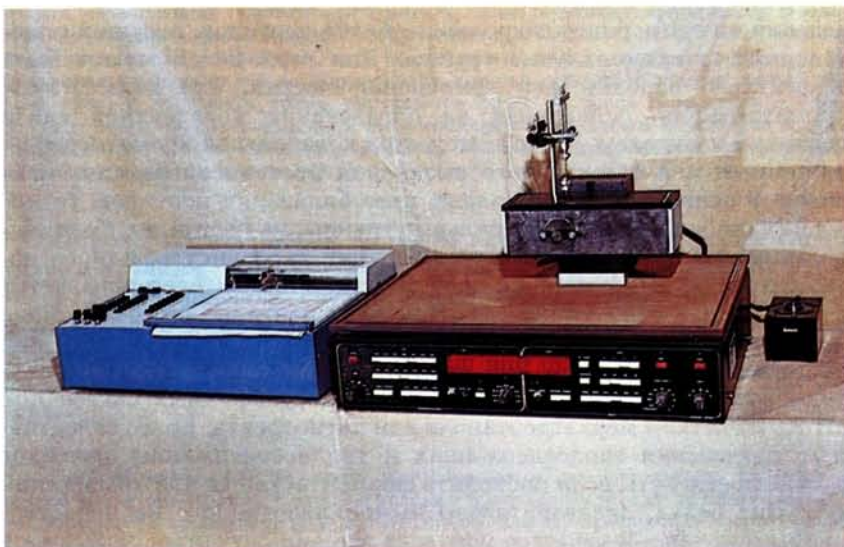


Рис. 14. Разделение тиолсодержащих и тиолнесодержащих пептидов ковалентной хроматографией.

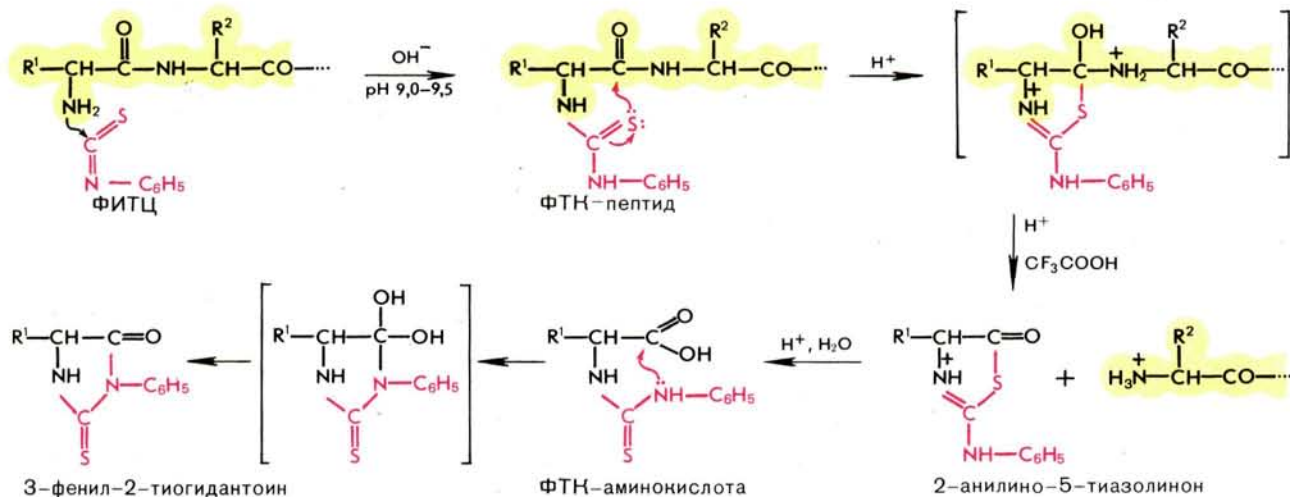
Существуют также методы ковалентного присоединения к носителям триптофан- и лизинсодержащих пептидов, однако они применяются относительно редко.

Для селективного выделения пептидов можно использовать иммуносорбенты, представляющие собой антитела, ковалентно присоединенные к нерастворимому полимеру-носителю. Среди последних нашли распространение носители на основе производных бром-ацетилцеллюлозы и гелей агарозы с ковалентно присоединенными антителами к 2,4-динитрофенолу. Такие носители применяются для выделения функционально важных пептидных фрагментов, содержащих реакционноспособные аминокислотные остатки после их селективного динитрофенилирования. Разработаны методики присоединения 2,4-динитрофенильной группы к остаткам цистеина, метионина, лизина и триптофана.

Новые возможности для специфичного выделения отдельных фрагментов белка открылись в связи с разработкой техники моноклональных антител (рис. 15). Иммуносорбенты на основе моноклональных антител к различным участкам белковой молекулы могут быть использованы для селективного выделения пептидных фрагментов, несущих антигенные детерминанты этих антител. Поскольку в основном антигенные детерминанты находятся во фрагментах полипептидной цепи, располагающихся на поверхности глобулы, метод применяется также для изучения топографии белков.

Для установления аминокислотной последовательности белков используется совокупность химических, ферментативных и физико-химических методов. Ниже будут рассмотрены те из них, которые нашли наиболее широкое применение в практике структурной химии белка.

Метод Эдмана. Основным методом определения аминокислотной последовательности является метод деградации полипептидной цепи с помощью фенолизоцианата (ФИТЦ), разработанный П. Эдманом в 1950 — 1956 гг. Метод Эдмана позволяет последовательно отщеплять N-концевые аминокислотные остатки в виде фенолтиогидантоинов (ФТГ). Каждый цикл деградации включает три стадии: 1) образование фенолтиокарбамоил (ФТК)-пептида, 2) отщепление N-концевого остатка аминокислоты в форме анилинотиазолинона, 3) изомеризацию тиазолинона в ФТГ и идентификацию последнего.



На первой стадии происходит присоединение ФИТЦ к непротонированной α -аминогруппе пептида.

Реакция проводится в летучих буферных системах (pH 9,0 — 9,5); в качестве оснований используются третичные или гетероциклические амины (триэтиламин, диметилаллиламин, пиридин). Выход на этой стадии может существенно снижаться вследствие побочных реакций. Такими реакциями являются окислительное десульфирование ФТК-группы пептида под действием кислорода воздуха, блокирование α -аминогруппы пептида за счет образования оснований Шиффа со следовыми количествами альдегидов, присутствующих в реагентах и растворителях. Поэтому все стадии деградации пептида по методу Эдмана проводятся в атмосфере инертного газа, а употребляемые реагенты предварительно тщательно очищаются. В щелочных условиях ФИТЦ гидролизуется с образованием дифенилтиомочевины и анилина. Побочные продукты затрудняют идентификацию фенолтиогидантоинов аминокислот, поэтому после стадии присоединения производится экстракция реакционной смеси бензолом для удаления остатков ФИТЦ и побочных продуктов.

На второй стадии деградации в присутствии безводной сильной кислоты (обычно трифторуксусной) происходит отщепление N-концевой аминокислоты с образованием 2-анилино-5-тиазолинона и освобождение α -аминогруппы последующего аминокислотного остатка.

Условия реакции достаточно мягкие и обычно не вызывают неспецифического расщепления полипептидной цепи. Однако остатки глутамина, когда они становятся N-концевыми в пептиде, могут превращаться в остатки пироглутаминовой кислоты, блокирующие дальнейшую деградацию.

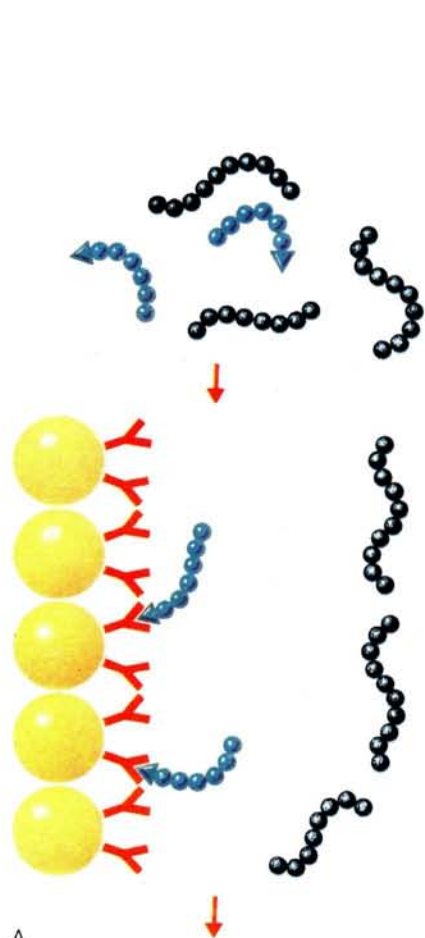
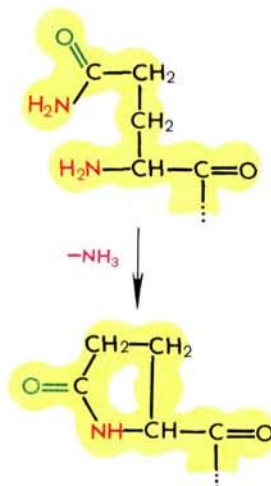


Рис. 15. Разделение пептидов аффинной хроматографией на иммуносорбенте.



Аспарагин в кислых условиях (особенно в случае последовательности Asn — Gly) может образовывать циклический имид (см. с. 51), также препятствующий процессу.

Стадия изомеризации состоит из двух последовательных реакций — быстрый гидролиз тиазолинона в ФТК-производное аминокислоты и циклизация последнего в 3-фенил-2-тиогидантоин.

Некоторые ФТГ частично разрушаются в условиях изомеризации (1 н. HCl, 80 °С, 10 мин). Так, ФТГ серина легко отщепляет молекулу воды, в меньшей степени процесс деградации протекает и у треонина. Для предотвращения разрушения ФТГ изомеризация иногда проводится в присутствии различных тиолов (дитиозеритритол, бутандиол и др.).

Идентификация отщепленных ФТГ является определяющей стадией в процессе деградации пептидов по методу Эдмана. В течение длительного времени для этой цели использовалась хроматография на бумаге, однако затем она была вытеснена другими более чувствительными и скоростными методами: микротонкослойной хроматографией на силикагеле и полиамиде, жидкостной и газожидкостной хроматографией.

Для одномерной и двумерной микротонкослойной хроматографии разработан ряд систем растворителей. Способ обнаружения ФТГ основан на сильном поглощении этих производных в УФ-области спектра ($\lambda_{\text{макс.}} = 265 - 270$ нм, среднее значение молярного коэффициента экстинкции равно 16 000). В состав сорбента на пластинках добавляется флуоресцентный индикатор. Чувствительность метода составляет 1 нмоль вещества.

Жидкостная и газожидкостная хроматография для идентификации ФТГ обычно используется в комбинации с автоматической деградацией пептидов на секвенаторе (см. ниже). При газожидкостной хроматографии ФТГ после перевода в летучее состояние разделяются на специальных колонках, наполненных жидкой фазой (обычно смесь силиконовых фаз). Некоторые ФТГ перед хроматографированием необходимо силилировать, чтобы повысить их летучесть (Asp, Glu, CMCys, CysSO₃H) или улучшить разделение (Ser, Thr, Lys). Поэтому анализ обычно проводится в два приема (до и после силилирования).

В последние годы наиболее широкое применение для идентификации ФТГ находит жидкостная хроматография высокого разрешения на колонках с обращенной фазой. Хроматография проводится

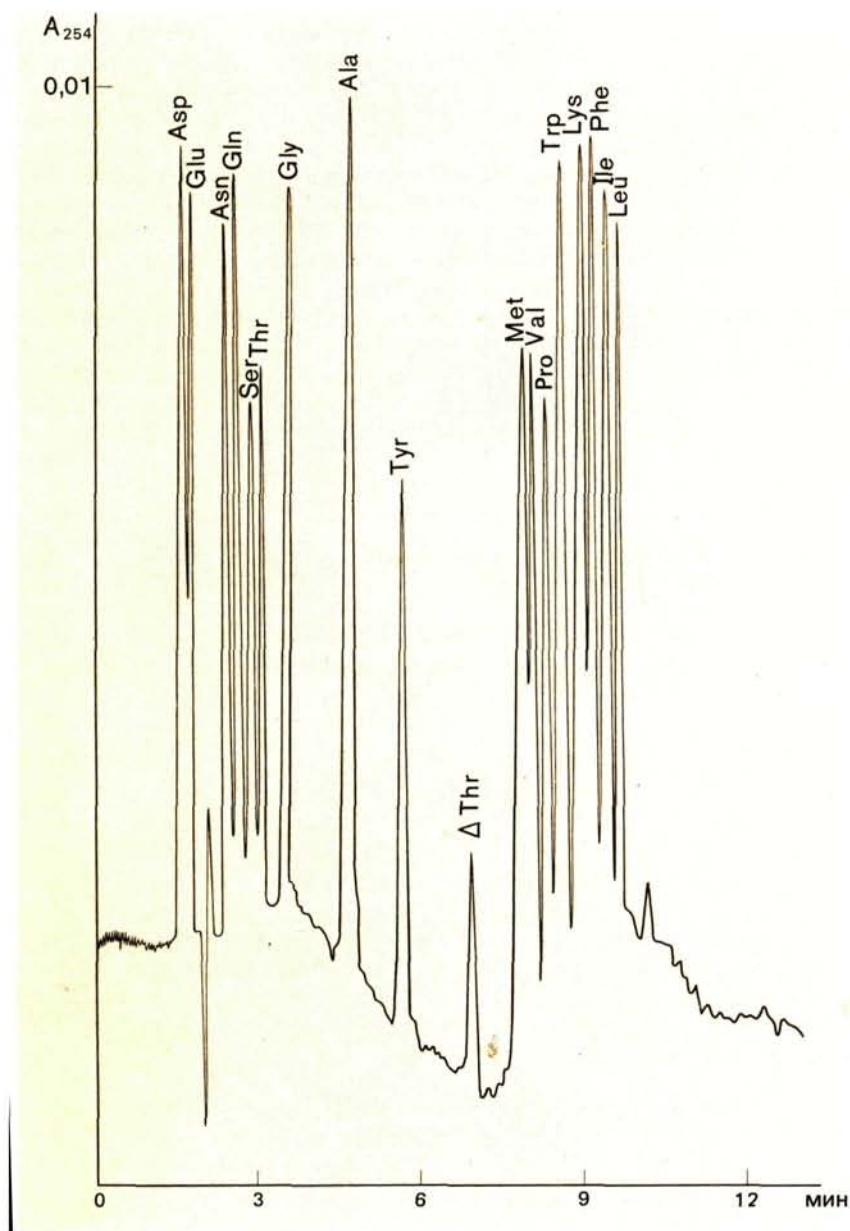


Рис. 16. Разделение ФТГ-аминокислот (50 пмоль) методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой («Ультрасфер ODS») в градиенте ацетонитрил → трифторацетат натрия.



Эдман (Edman) Пэр Виктор (1916—1977), шведский химик. Окончил Каролинский институт в Стокгольме (1946); с 1957 г.— руководитель отдела молекулярной биологии в Институте медицинских исследований в Мельбурне (Австралия) и с 1971 г.— в Институте биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде (ФРГ). Автор широко известного метода определения первичной структуры пептидов и белков. Совместно с Дж. Бэгом разработал конструкцию прибора для автоматического определения аминокислотной последовательности.

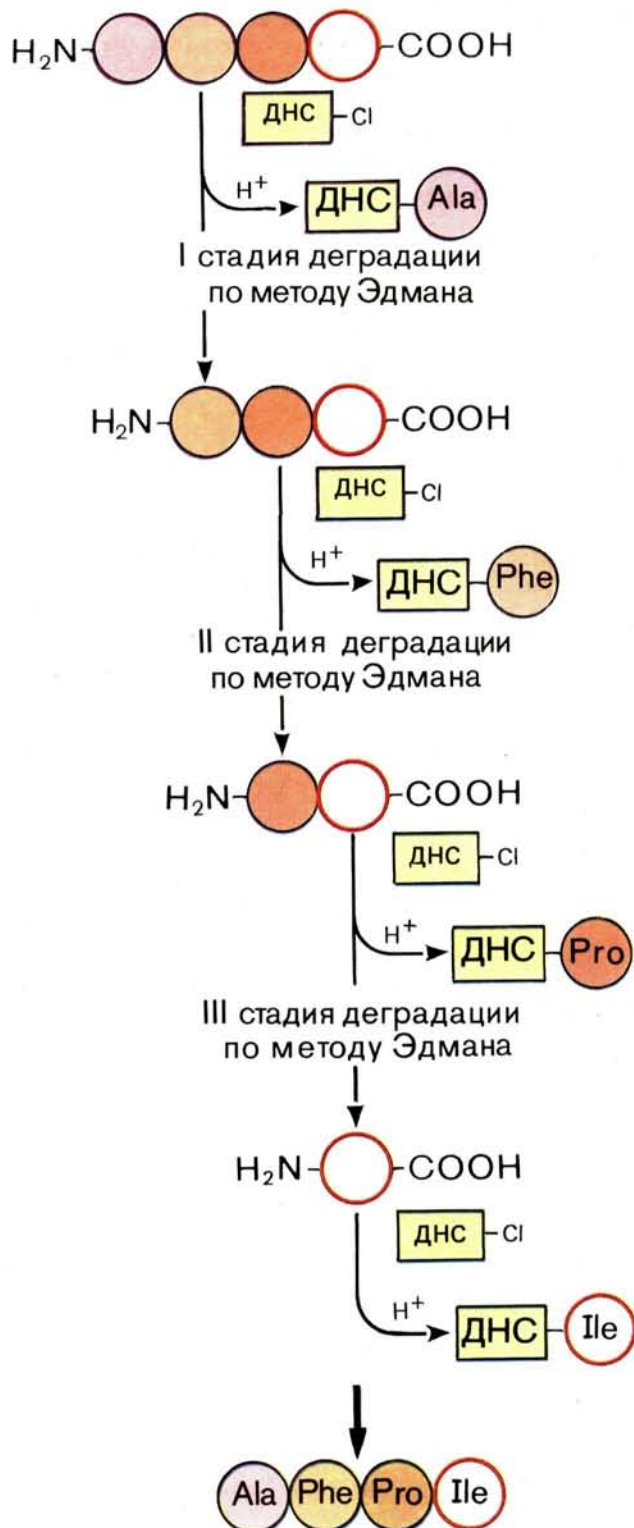


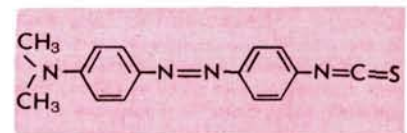
Рис. 17. Определение аминокислотной последовательности пептида методом ДНС-Эдмана.

либо в градиенте концентрации ацетонитрила или метанола (рис. 16), либо в изократных условиях (в отсутствие градиента). Достоинствами метода являются: высокая чувствительность (30 — 50 пмоль), скорость (на один анализ требуется менее 10 мин), хорошая разрешающая способность и возможность количественного определения ФТГ. Часто для идентификации аминокислот, отщепляемых при деградации пептидов по методу Эдмана, используются также масс-спектрометрия и аминокислотный анализ. В последнем случае анализируемый ФТГ вначале гидролизуются с помощью HI до свободной аминокислоты.

Среди модификаций метода Эдмана широкое применение нашел метод, сочетающий последовательную деградацию пептида с анализом N-концевых аминокислотных остатков в виде их дансильных производных (ДНС-Эдман). По этому методу перед каждым циклом деградации отбирается определенная аликвотная часть пептида для анализа N-концевой аминокислоты (рис. 17). Достоинства метода — более высокая чувствительность определения ДНС-аминокислот и меньшие потери материала на каждой стадии деградации за счет исключения экстракции бензолом ФТК-производных пептидов. Ограниченная доступность биологического материала вызывает необходимость работы с субмикрочислотами белков и побуждает к поиску новых методов структурного анализа. Существует большое число аналогов ФИТЦ, которые образуют тиогидантоины, обладающие рядом преимуществ по сравнению с ФТГ. Наибольшее распространение в практике лабораторных исследований получил 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат (ДАБИТЦ).

Образующиеся при деградации пептида с ДАБИТЦ ярко-розовые 4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоины (ДАБТГ) имеют коэффициент экстинкции ($\epsilon_{436} = 34\ 000$) примерно в два раза более высокий, чем у ФТГ. Чувствительность идентификации ДАБТГ при тонкослойной хроматографии на полиамиде составляет 0,01 — 0,05 нмоль (рис. 18).

Чтобы избежать необходимости использования высоких температур (75 °С) для количественного связывания ДАБИТЦ с N-концевой аминогруппой, применяется двойное карбамоилирование (сначала с ДАБИТЦ, а затем с ФИТЦ) при обычной температуре (45 °С). Метод дает хорошие результаты особенно при анализе труднорастворимых гидрофобных пептидов. К его недостаткам следует отнести затруднения с идентификацией неустойчивых ДАБТГ серина, треонина и лизина.



ДАБИТЦ

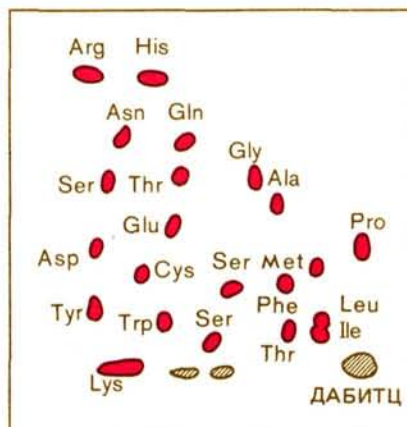
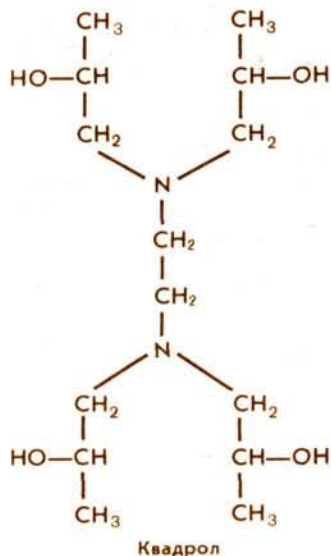


Рис. 18. Разделение ДАБТГ-аминокислот двумерной тонкослойной хроматографией на полиамиде.



Автоматическое определение аминокислотной последовательности. Крупным достижением в области структурных исследований белков явилось создание в 1967 г. П. Эдманом и Дж. Бэггом секвенатора — прибора, который с высокой эффективностью осуществляет последовательное автоматическое отщепление N-концевых аминокислотных остатков по методу Эдмана. В секвенаторе все реакции проводятся в цилиндрическом стеклянном стаканчике (рис. 19), вращающемся с постоянной скоростью в атмосфере инертного газа. Исследуемый образец белка наносится в виде тонкой пленки на стенки стаканчика, а реактивы и растворители по шлангу подаются на его дно. За счет центробежной силы они поднимаются по стенкам, соприкасаются с пленкой белка, затем собираются в специальной канавке в верхней части стаканчика и удаляются по отводному шлангу. Большая поверхность соприкосновения между двумя фазами способствует легкому проникновению реагентов сквозь пленку белка, быстрому протеканию реакций и беспрепятственной экстракции продуктов реакции.

В секвенаторе исключен контакт анализируемого образца белка с кислородом воздуха и стандартизованы условия проведения всех стадий реакции. Наряду с тщательной очисткой используемых реагентов и растворителей, это позволяет проводить автоматическое отщепление аминокислотных остатков с выходом 95% и выше. Для предотвращения испарения реагентов в большой объем реакционного стаканчика в качестве основания в реакции присоединения применяют квадрол — (N,N,N',N'-тетра(2-гидроксипропил)-этилендиамин, а в реакции отщепления — гептафтормасляную кислоту, обладающие пониженной летучестью. В секвенаторе проводятся только первые две стадии реакции Эдмана — присоединение и отщепление. Образовавшиеся в результате анилинотиазолиноны экстрагируются и собираются в коллекторе фракций. Их превращение в ФТГ осуществляется вручную или с помощью автоматической приставки — конвертера.

Наилучшими объектами для жидкофазного секвенатора являются белки и пептиды, содержащие в своем составе от 60 до 200 аминокислотных остатков. Для них обычно удается определять последовательность 30 — 50 остатков. При исследовании более крупных белков в процессе деградации наблюдается значительный гидролиз

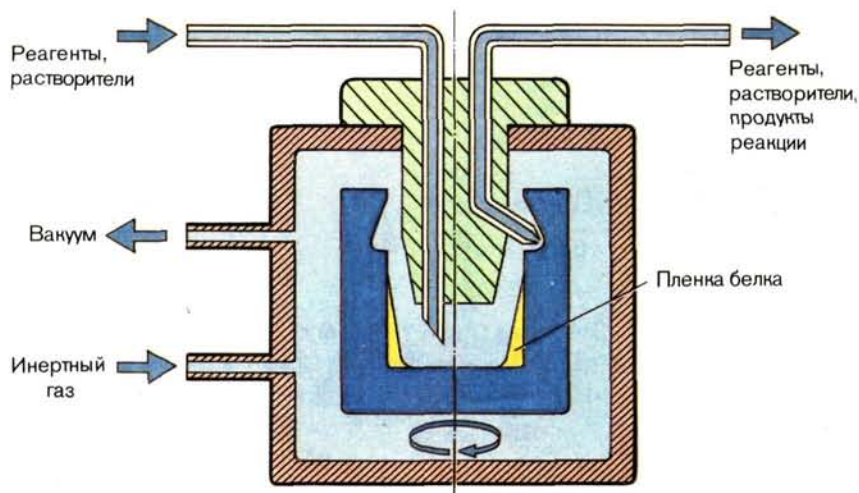
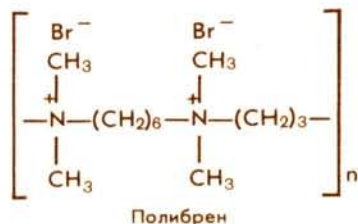
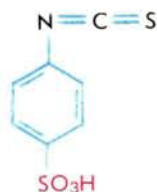


Рис. 19. Схема реакционной камеры жидкостного секвенатора.

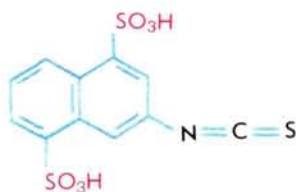
лабильных пептидных связей внутри полипептидных цепей. С другой стороны, короткие пептиды, особенно пептиды, содержащие в своем составе гидрофобные аминокислотные остатки, интенсивно вымываются из стаканчика секвенатора. Для предотвращения такого рода потерь пептидов разработан ряд методических приемов. Один из них предусматривает добавление в реакционную камеру специальных носителей, препятствующих механическому удалению пептида. В качестве носителей используются белки, не содержащие свободной α -аминогруппы (например, цитохром *c*), или синтетические полимеры: полиорнитин и полибрен.



Растворимость пептида в органических растворителях резко уменьшается при увеличении его гидрофильности. Для повышения гидрофильности можно использовать так называемые реагенты Браунитцера, являющиеся высокополярными аналогами фенилизоцианата.



Реагент Браунитцера I



Реагент Браунитцера III



Браунитцер [Braunitzer] Герард (р. 1921), немецкий химик-биоорганик. Окончил Технический университет в Граце (1947), с 1972 г. — директор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде (ФРГ). Установил первичную структуру белка вируса табачной мозаики (1956) и большого числа гемоглобинов.



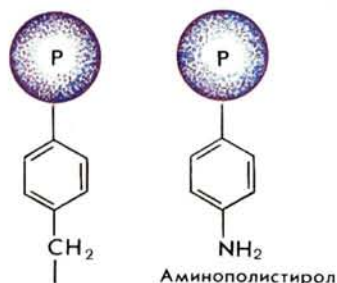
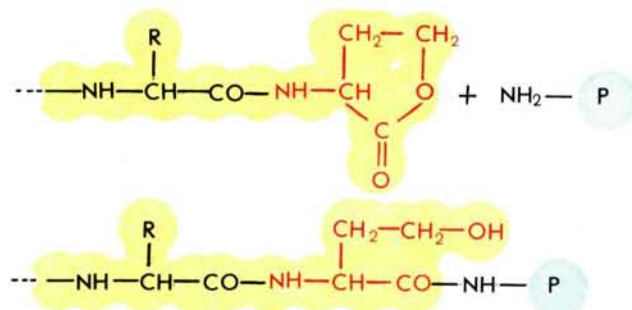
Ларсен [Laursen] Ричард Аллан (р. 1938), американский химик и биохимик. Получил образование в Калифорнийском университете в Беркли (1961) и Иллинойском университете в Урбане (1964), работал в Бостонском университете (1966). Впервые предложил метод твердофазной деградации пептидов.

Если на первой стадии деградации по методу Эдмана вместо ФИТЦ добавить реагент Браунитцера, то за счет модификации ϵ -аминогрупп значительно повысится гидрофильность лизинсодержащих пептидов, в результате чего они могут успешно анализироваться с помощью секвенатора.

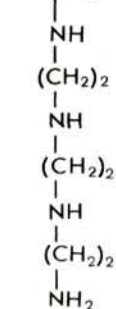
Другой вариант автоматического определения аминокислотной последовательности коротких пептидов, основанный на ковалентном присоединении их к нерастворимому носителю, предложен Р. Ларсеном. Реакционным сосудом в твердофазном секвенаторе служит хроматографическая колонка, с носителем которой ковалентно связан исследуемый пептид. Через колонку последовательно пропускаются необходимые реагенты и растворители. Присоединение пептида к носителю является определяющей стадией в процессе. Для этой цели широко применяются матрицы на основе

полистирола и пористого стекла. В качестве функциональной группы, реагирующей с пептидом, обычно используется алифатическая (ароматическая) аминогруппа, связанная с носителем «ножкой» различной длины.

Легко могут быть иммобилизованы бромциановые пептиды, содержащие в качестве С-концевого остатка реакционноспособный лактон гомосерина; для полного превращения остатка гомосерина в лактон они предварительно обрабатываются трифторуксусной кислотой.

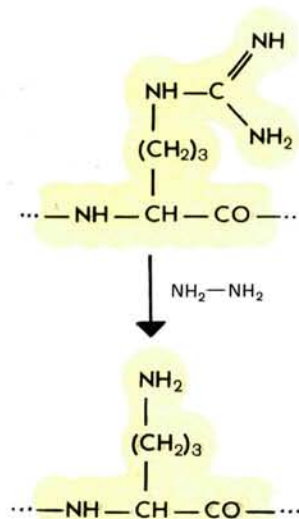
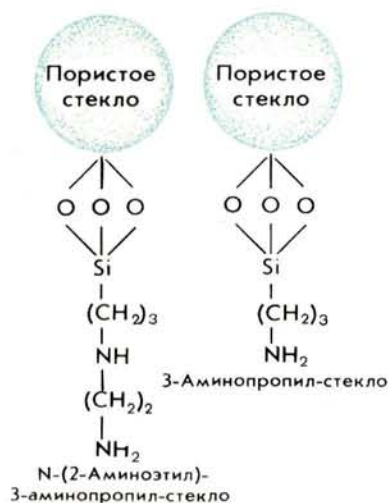


Триэтилен-тетрааминопалистирол



Конденсация лактона гомосерина с аминогруппами носителя обычно проходит с выходом 60 — 100% и не сопровождается побочными реакциями. Аналогичным образом для ковалентного присоединения пептидов используется лактон, образующийся при расщеплении пептидных связей по остаткам триптофана с помощью N-бромсукцинимиды или BNPS-скатола (см. с. 50).

Лизинсодержащие пептиды присоединяются к носителю по ε-аминогруппам путем конденсации с п-фенилендиизотиоцианатом. При этом связанной с носителем оказывается также и α-аминогруппа N-концевого остатка пептида. Однако после первого цикла деградации освобождается α-аминогруппа второго аминокислотного остатка, и процесс может быть продолжен обычным образом.

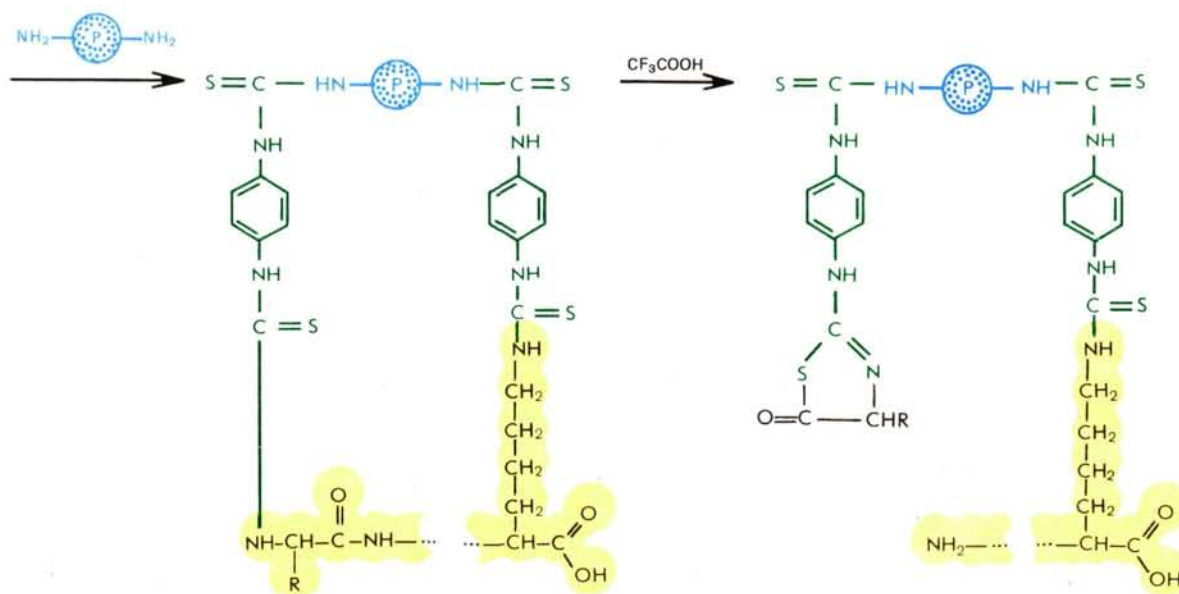
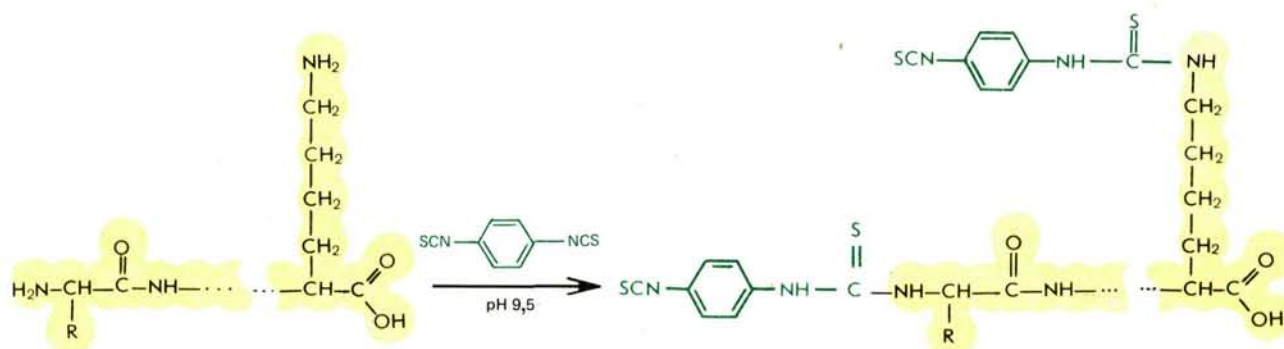


Метод применим также для пептидов, содержащих остатки аминокислоты метионина и аргинина. Последние предварительно превращаются в остатки орнитина с помощью гидразиолиза.

Условия гидразиолиза являются достаточно жесткими (80 °С, 64%-ный гидразин, 10 мин), что приводит к частичному расщеплению пептидных связей, а общий выход реакции присоединения не превышает 30 — 55%.

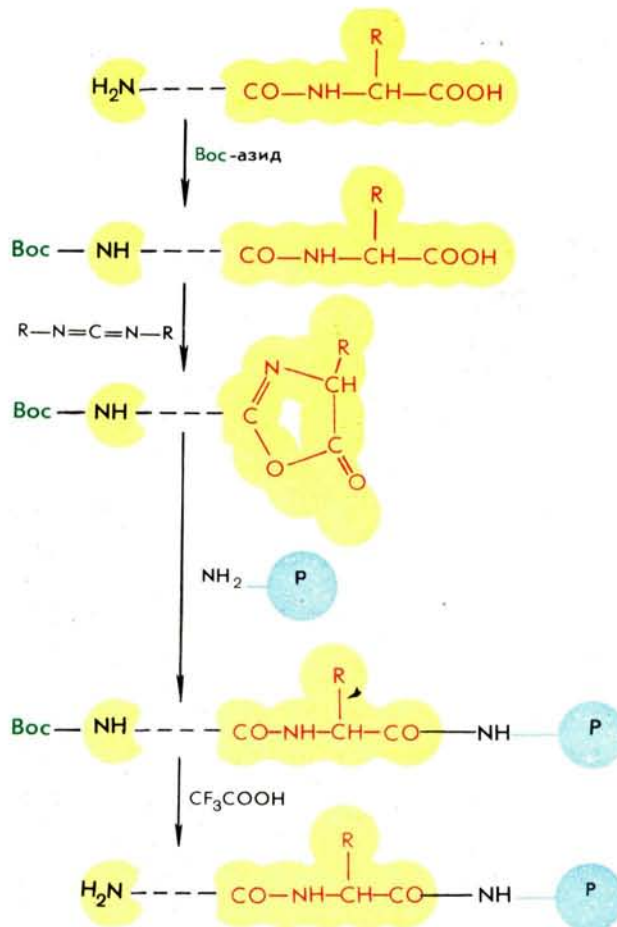
Пептиды, содержащие цистеин, могут быть ковалентно присоединены к специальному носителю с помощью реакции тиол-дисульфидного обмена (см. выше).

Наиболее общий вариант иммобилизации пептида — присоединение по С-концевой карбоксильной группе. В качестве конденсирующих агентов используются водорастворимые карбодиимиды (например, N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимид). Как правило, α-аминогруппа пептида предварительно защищается с помощью легко удаляемой трет-бутоксикарбонильной группы или ФТК-группы, образующейся при реакции с ФИТЦ. В отличие от перечисленных выше методов, выходы при конденсации с помощью карбодиимида непредсказуемы и колеблются в диапазоне 0 — 90%. Легче других присоединяются к носителю короткие аргининсодержащие пептиды.





Худ (Hood) Лерой Е. (р. 1938), американский биохимик. Образование получил в Калифорнийском технологическом институте, в настоящее время — директор Ракового центра там же. Научные интересы связаны с изучением антигенов главного комплекса гистосовместимости. Создал ряд автоматических методов анализа первичной структуры белков.



Твердофазный секвенатор позволяет получать наилучшие результаты при анализе пептидов, содержащих от 5 до 40 аминокислотных остатков. Иногда он применяется и для изучения структуры более крупных пептидов и белков, особенно гидрофобных, легко вымываемых из реакторов жидкофазного прибора. С помощью этого метода удастся определять последовательность 20 — 25 аминокислотных остатков.

В 1981 г. Л. Худ и М. Ханкепиллер сконструировали новую модель секвенатора — газофазный секвенатор, предназначенный для анализа микроколичеств белков и пептидов. В приборе (рис. 20) исследуемый образец наносится на небольшой (диаметр 10 мм) диск из пористого стеклянного волокна, пропитанный полибренном. После высушивания диск зажимается между двумя стеклянными цилиндрами, образующими миниатюрную реакционную камеру (внутренний объем 0,05 мл) (рис. 21). Через капилляр в центре верхнего цилиндра (диаметр 0,5 мм) в реакционную камеру подаются необходимые реагенты (летучие — в газообразном состоянии), которые, проходя через поры диска, взаимодействуют с адсорбированным на нем белком или пептидом и далее выводятся через капилляр в нижнем цилиндре.

Нековалентная иммобилизация образца на пористой пластинке, уменьшение объема реакционной камеры и соответственно расхода реагентов и растворителей для промывок позволили сократить до

минимума потери материала в процессе деградации на газофазном секвенаторе и тем самым снизить количество анализируемого пептида или белка до уровня 100 — 500 пмоль.



Рис. 20. Газофазный секвенатор АР-03 (НТО АН СССР, г. Ленинград).

Ферментативные методы. Для определения структуры пептидов и белков можно применять ферменты, катализирующие отщепление N- и C-концевых аминокислотных остатков полипептидной цепи (аминопептидазы и карбоксипептидазы).

Гидролиз пептидов с помощью карбоксипептидаз является основным способом определения C-концевого остатка и C-концевой аминокислотной последовательности. При исследовании структуры пептидов и белков используются карбоксипептидазы А, В, С и Y. Карбоксипептидазы А (СРА) и В (СРВ) выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота, карбоксипептидазу С (СРС) — из кожуры и листьев цитрусовых, карбоксипептидазу Y (СРУ) — из пекарских дрожжей.

Общим требованием к субстрату для всех карбоксипептидаз является наличие α -карбоксильной группы у C-концевой аминокислоты. Природа боковой цепи у отщепляемого аминокислотного остатка — основной фактор, определяющий скорость гидролиза пептидной связи. На скорость отщепления C-концевой аминокислоты в большой степени влияет также природа соседнего с ней остатка. Расположенные в соседнем положении аминокислотные остатки с ароматической или алифатической боковой цепью, а также остатки дикарбоновых аминокислот значительно ускоряют отщепление C-концевой аминокислоты. Напротив, если в соседнем положении находятся глицин и пролин, скорость гидролиза снижается.

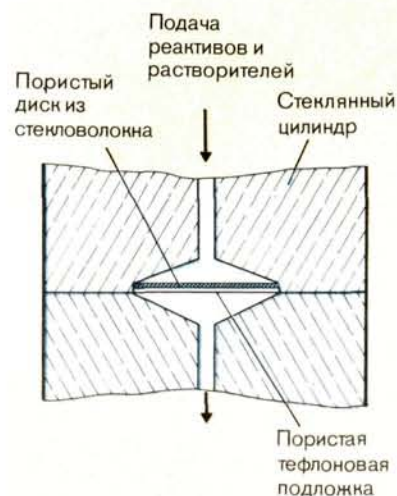


Рис. 21. Схема реакционной камеры газофазного секвенатора.

Скорости отщепления аминокислот карбоксипептидазами А и С

Тип отщепления	CPA	CPC
Быстрое отщепление	Tyr, Phe, Leu, Trp, Ile, Met, Thr, Gln, His, Ala, Val, HSer	Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Val, His
Медленное отщепление	Asn, Ser, Lys, MetSO ₂ *	Ser, Thr, Met, Ala, Asp, Asn, Glu, Gln, Lys, Arg, Pro, CMCys
Очень медленное отщепление	Asp, Glu, Gly, CMCys, CysSO ₃ H	Gly
Не отщепляются	Pro, HyPro, Arg	HyPro

* MetSO₂ – метионинсульфон

Все аминокислоты по скорости отщепления их карбоксипептидазами А и С могут быть разделены на 4 группы (табл. 3).

Оптимальное значение pH для пептидазной активности составляет 7,0 — 9,0, оно меняется в зависимости от субстрата. Так, скорость отщепления С-концевых дикарбоновых аминокислот возрастает при снижении pH, тогда как скорость отщепления лизина возрастает при увеличении pH свыше 9,0.

Карбоксипептидаза В катализирует отщепление основных аминокислот (лизина и аргинина). Пептидная связь, образованная остатком аргинина, гидролизуется быстрее, чем связь, образованная остатком лизина. Для пептидазной активности оптимальное значение pH равно 8,0 — 9,0.

Карбоксипептидаза У отщепляет практически все аминокислоты, включая пролин, и ее специфичность аналогична специфичности CPC. Гидролиз проходит наиболее эффективно при pH 5,5 — 6,5. Оптимальное значение pH для отщепления лизина и аргинина — 7,0.

Как и другие карбоксипептидазы, CPY наряду с пептидазной обладает и эстеразной активностью. Кроме того, CPY присуща также амидазная активность, т. е. фермент может быть использован и для анализа пептидов, концевая карбоксильная группа которых амидирована.

С-Концевая аминокислотная последовательность определяется следующим образом: субстрат инкубируется с ферментом при 25 — 37 °С и через определенные интервалы времени из реакционной смеси отбираются аликвотные части, реакция останавливается подкислением и количество отщепленных аминокислот определяется на аминокислотном анализаторе. Построив график зависимости количества отщепленных аминокислот от времени (рис. 22), можно определить С-концевую последовательность. Таким образом удастся установить последовательность до 5 аминокислотных остатков.

Успешное определение структуры С-концевых участков пептидов и белков в значительной степени зависит от рационального выбора фермента и условий проведения процесса. Выбор карбоксипептидазы обуславливается природой исследуемого пептида. Очевидно, что

при анализе триптических пептидов, содержащих основные аминокислоты в качестве С-концевых остатков, целесообразно применять СРВ или смесь СРА и СРВ. Для идентификации С-концевых остатков химотриптических пептидов используют, как правило, СРА. Установление С-концевой последовательности фрагментов, полученных в результате гидролиза белка протеиназой из *St. aureus*, предпочтительнее проводить с помощью СРУ.

Пептидгидролазы, отщепляющие N-концевые аминокислотные остатки пептидов и белков, составляют группу аминопептидаз. Необходимым условием для действия аминопептидаз является наличие у субстрата свободной α -аминогруппы. Ферменты этой группы гидролизуют и дипептиды. В структурных исследованиях белков наибольшее применение нашли лейцинаминопептидаза (ЛАП) и аминопептидаза М (АПМ), выделяемые из почек свиньи.

ЛАП катализирует отщепление почти всех аминокислот, но с наибольшей скоростью — аминокислоты с объемными гидрофобными радикалами (Leu, Pe и Val). Пептидные связи, образованные N-концевыми остатками аргинина и лизина, слабо атакуются ЛАП, а связи остатка пролина вообще не гидролизуются.

АПМ в одинаковой степени катализирует гидролиз всех пептидных связей, за исключением связей, образованных остатками пролина. Кинетический анализ процесса гидролиза аминопептидазами позволяет определить последовательность 2 — 5 N-концевых аминокислотных остатков пептида или белка.

Существует группа ферментов, которые при гидролизе пептидов и белков отщепляют N- или С-концевые дипептидные фрагменты. К ним относятся катепсин С, или дипептидиламинопептидаза I (ДАП I), и катепсин В, или дипептидилкарбоксипептидаза. Процесс определения аминокислотной последовательности с помощью этих ферментов состоит из нескольких стадий: 1) гидролиз исследуемого соединения соответствующей дипептидазой, 2) разделение и идентификация отщепленных пептидов, 3) определение порядка расположения дипептидов в полипептидной цепи исследуемой молекулы.

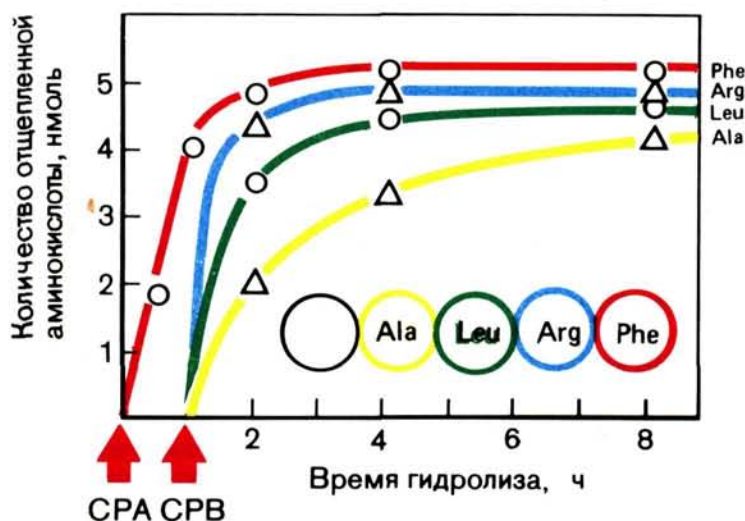


Рис. 22. Определение С-концевой последовательности пептида с помощью карбоксипептидаз.

Расположение дипептидов в полипептидной цепи определяют либо путем изучения кинетики отщепления дипептидов, либо с помощью так называемого метода «домино», принцип которого (рис. 23) заключается в том, что гидролиз с ДАП I проводят на исходном и укороченном (с помощью метода Эдмана) на один аминокислотный остаток пептиде. При этом получают дипептиды с перекрывающимися последовательностями аминокислот.

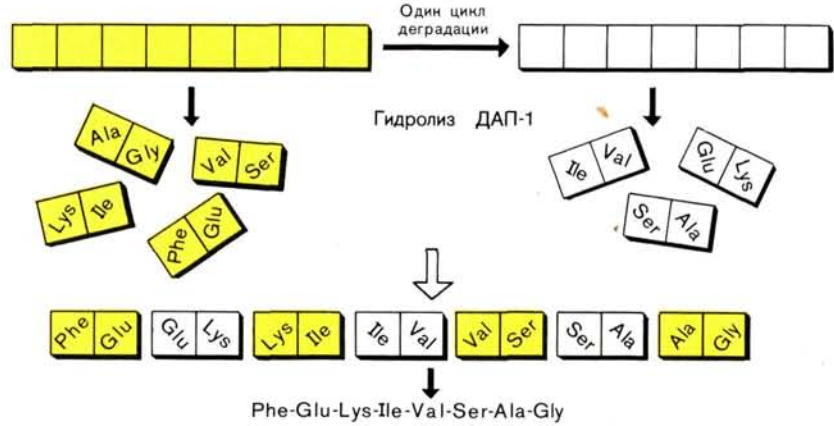


Рис. 23. Определение аминокислотной последовательности пептидов с помощью дипептидаминопептидазы I (принцип «домино»).

Масс-спектрометрический метод. Наряду с химическими и ферментативными методами для определения аминокислотной последовательности пептидов находят применение физико-химические методы, в частности масс-спектрометрия.



Рис. 24. Ионизация молекул электронным ударом.

Процесс съемки масс-спектра соединения состоит из нескольких стадий: переводение исследуемого образца в газообразное состояние; ионизация его, при которой происходит распад большинства образующихся молекулярных ионов; ускорение полученных ионов в электрическом поле, последующее их разделение (в зависимости



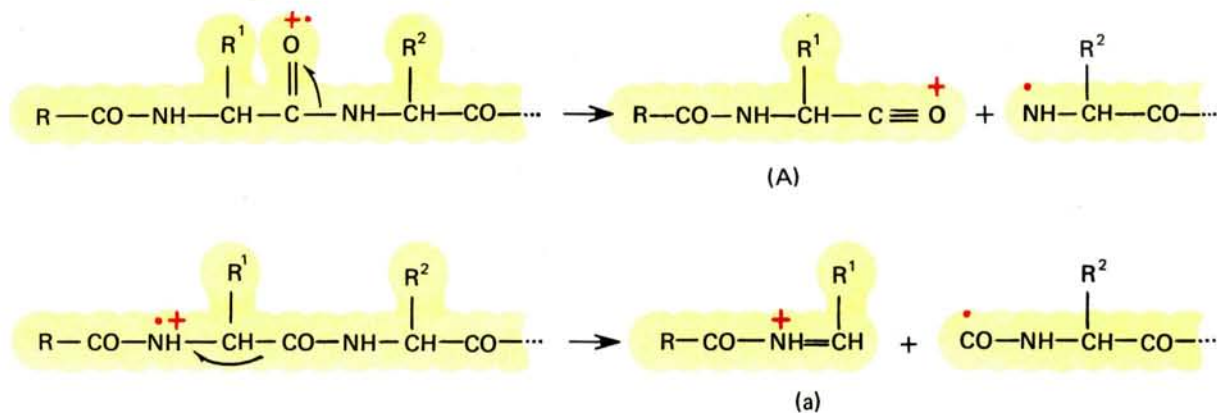
Рис. 25. Ионизация молекул ускоренными атомами Хе (или Аг).

от отношения массы к заряду) в магнитном поле; и наконец регистрация масс-спектра. Вследствие цвиттер-ионного характера пептиды с большим трудом подвергаются испарению. Летучесть их может быть повышена путем ацилирования и этерификации. Для ацилирования обычно используют трифторуксусный ангидрид или N-гидроксисукцинимидный эфир жирной кислоты, например декановой. Этерификацию можно осуществить метанолом в присутствии каталитических количеств хлористого сульфурила. В ряде случаев прибегают также к переметилированию атомов азота в пептидных связях путем обработки ацилированного пептида иодистым метилом и гидридом натрия в диметилсульфоксиде.

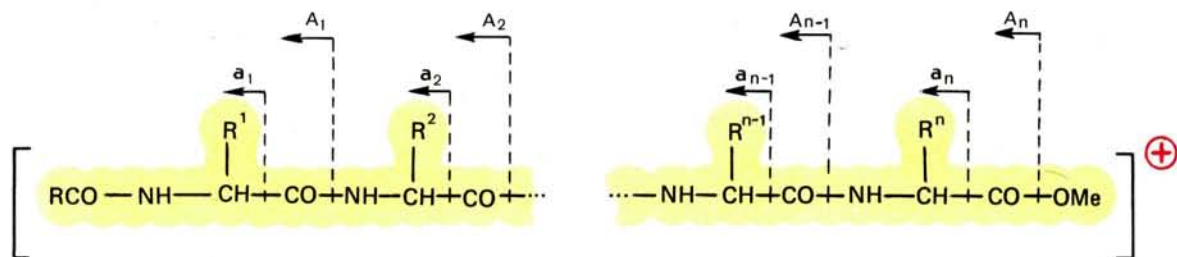
Для ионизации исследуемых молекул в масс-спектрометре используется несколько способов. Традиционным методом ионизации является бомбардировка электронами с энергией порядка 70 эВ (рис. 24). Применяется также ионизация ультрафиолетовыми лучами (фотоионизация) или положительно заряженными ионами (химическая ионизация). В последнее время разработаны новые методы — ионизация в сильных электрических полях (полевая ионизация или полевая десорбция), а также ионизация бомбардировкой ускоренными атомами (атомы Аг и Хе с большой кинетической энергией) (рис. 25). При использовании последних двух методов отпадает необходимость предварительного испарения исследуемого вещества, оно происходит одновременно с ионизацией.

В большинстве случаев в процессе ионизации происходит «выбивание» электронов из молекул испаренного вещества, в результате чего последние превращаются в положительно заряженные ионы. В молекулах пептидов легче всего ионизируются карбонильные

атомы кислорода и атомы азота пептидной связи. При распаде образующихся ионов преимущественно расщепляются связи, находящиеся в β -положении к положительному заряду. В результате такого распада из молекулярных ионов производных пептидов образуются аминокислотные (A) и альдиминные (a) фрагменты.



Поскольку в процессе первоначальной ионизации в молекулах исследуемого пептида положительный заряд оказывается локализованным на разных атомах кислорода или азота, при их дальнейшем распаде образуется набор всех возможных фрагментов аминокислотного и альдиминного типа фрагментации (A и a).



Идентификация пиков аминокислотных и альдиминных фрагментов в масс-спектре дает основную информацию о строении пептида (рис. 26).

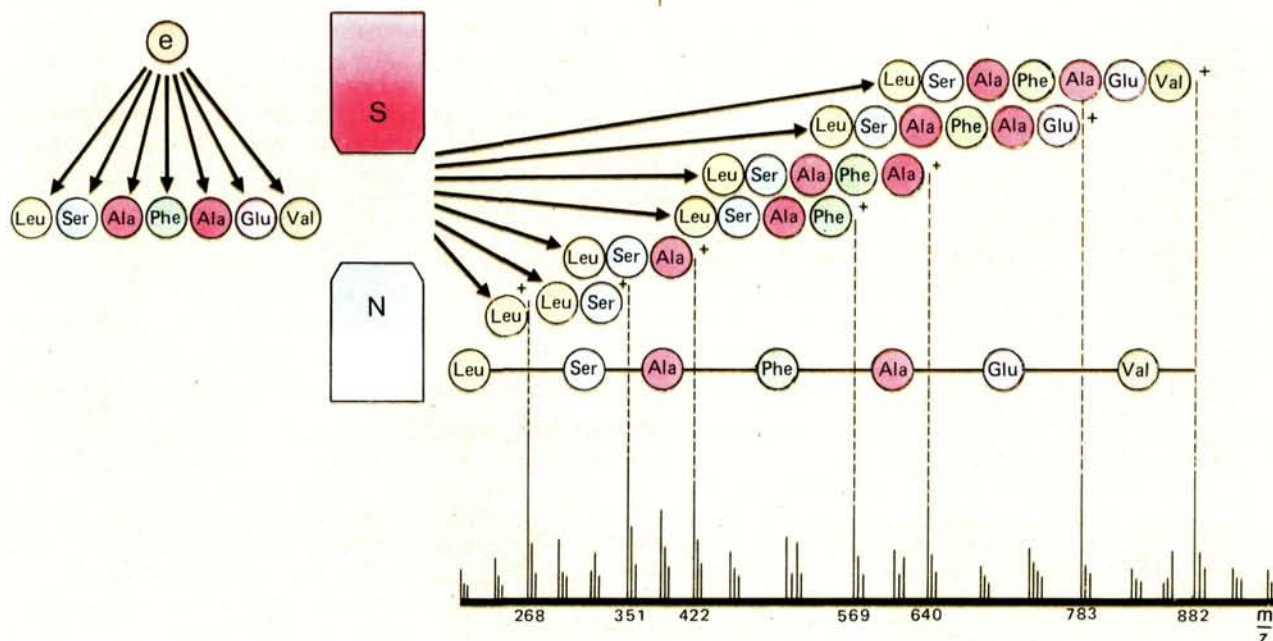
Аминокислотный тип фрагментации, конечно, не является единственным путем распада молекулярных ионов пептидов. Боковые цепи каждого аминокислотного остатка вносят свои специфические особенности в общую картину масс-спектра. Ионы фрагментов, образующихся в результате специфического распада боковых цепей, дают дополнительную информацию о структуре пептидов.

Одно из преимуществ масс-спектрометрического метода заключается в возможности анализировать пептиды, не содержащие свободной α -аминогруппы, и устанавливать химическую природу блокирующего остатка. При использовании электронной ионизации метод пригоден для анализа сравнительно коротких (4 — 6 остатков) пептидов. Границы возможностей масс-спектрометрии в изучении структуры пептидов резко расширились с введением более современных методов ионизации. Применив для этой цели бомбардировку ускоренными атомами, Г. Моррис показал, что можно получать масс-спектры пептидов, молекулярная масса которых достигает 3000, причем для определения структуры достаточно 1 — 5 нмоль вещества, т. е. в таком случае по чувствительности масс-спектрометрический метод не уступает другим методам.

Одним из достоинств бомбардировки ускоренными атомами, так же как и полевой десорбции, является исключение стадии предварительной модификации пептида. В настоящее время масс-спектрометрия с ионизацией бомбардировкой ускоренными атомами является одним из наиболее прогрессивных методов анализа структуры пептидов средней молекулярной массы (15 — 40 аминокислотных остатков). Особенно эффективно использование метода на завершающих стадиях анализа в сочетании с предварительным исследованием структуры пептида на секвенаторе.

При ионизации полевой десорбцией масс-спектры пептидов состоят практически из одних молекулярных ионов. На этой основе Я. Шимониши был разработан метод исследования структуры белка путем непосредственного анализа смеси пептидов, получаемых после ферментативного гидролиза. Смесь пептидов подвергается деградации по методу Эдмана, и после каждого этапа, наряду с идентификацией отщепленных аминокислот, масс-спектрометрически по молекулярным ионам определяются молекулярные массы

Рис. 26. Принцип масс-спектрометрического метода определения аминокислотной последовательности пептидов.



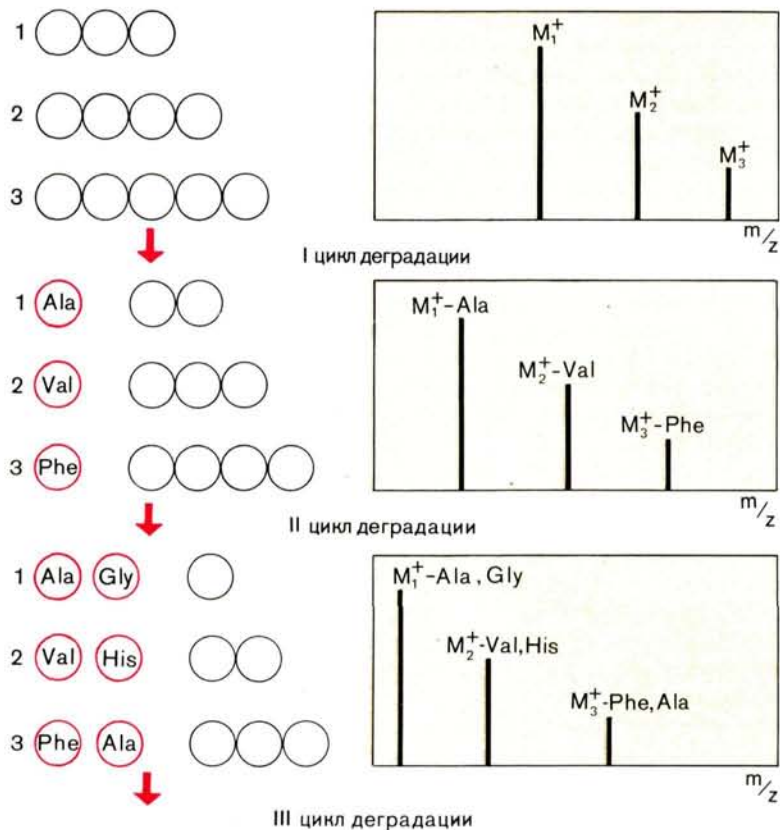


Рис. 27. Комбинация метода Эдмана и масс-спектрометрии в анализе структуры белка.

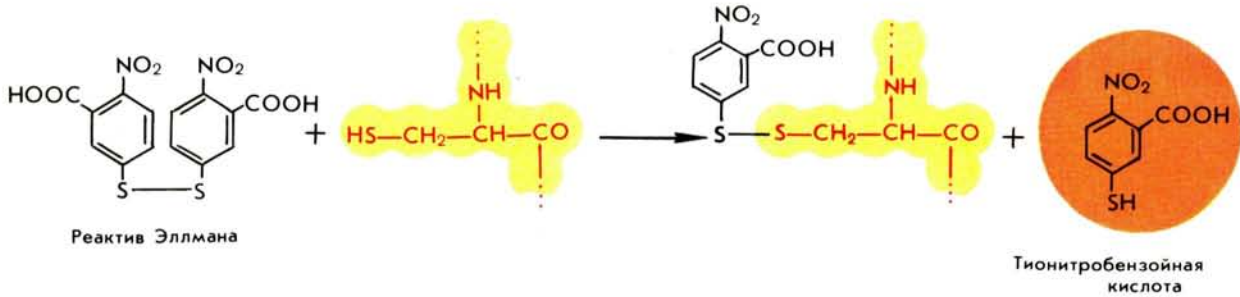
пептидов (рис. 27). Обработка полученных данных на ЭВМ позволяет в большинстве случаев однозначно устанавливать аминокислотную последовательность пептидов гидролизата. Метод особенно эффективен при сравнительном изучении структуры мутантных белков.

Хорошие результаты удается также получить при использовании масс-спектрометрии с ионизацией полевой десорбцией или бомбардировкой ускоренными атомами для анализа С-концевой последовательности пептидов в сочетании с ферментативным гидролизом с помощью карбоксипептидаз.

Анализ расположения сульфгидрильных групп и дисульфидных связей

Сульфгидрильные группы остатков цистеина играют важную роль в проявлении функциональной активности многих белков. В условиях, близких к физиологическим, они являются эффективными нуклеофильными реагентами, обладающими высокой реакционной способностью. Поэтому необходимо модифицировать свободные SH-группы белка на первом этапе изучения его структуры,

что обычно достигается с помощью реакции алкилирования (иодуксусной кислотой или ее амидом) или окисления надмуравьиной кислотой до цистеиновой кислоты. Те же реакции с последующим количественным анализом образующихся производных на аминокислотном анализаторе применяются и для предварительного определения числа свободных сульфгидрильных групп. Для этой цели используется также прямое титрование белка реактивом Эллмана [5,5'-дителио-бис-(2-нитробензойная кислота)] или дипиридилдисульфидом, приводящее к образованию смешанных сульфидов.



При реакции сульфгидрильных групп с реактивом Эллмана образуется тионитробензойная кислота, которая обладает сильным поглощением при 412 нм и может быть определена количественно спектрофотометрически.

Дисульфидные группы цистина менее реакционноспособны, однако они легко в щелочных условиях вступают в реакции дисульфидного или тиол-дисульфидного обмена:



Молекула белка, стабилизированная дисульфидными связями, устойчива к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов. Поэтому при наличии в исследуемом белке дисульфидных связей необходимыми этапами работы являются их восстановление и последующая модификация или окисление с образованием стабильных производных цистеина. Число дисульфидных связей в белке определяется по разности суммарного содержания остатков цистеина и количества свободных сульфгидрильных групп.

Дисульфидные группы выполняют важные функции по поддержанию нативной конформации белковой молекулы. Локализация положений дисульфидных связей является обязательным этапом при определении первичной структуры белков.

Последовательность операций на этой стадии следующая: вначале проводится ферментативный гидролиз нативного белка в условиях, исключающих дисульфидный обмен (т. е. при pH ниже 7,0), полученная смесь пептидов фракционируется и у выделенных цистинсодержащих фрагментов после восстановления дисульфидной связи определяется аминокислотная последовательность. Разделе-



Нейрат [Neurath] Ганс (р. 1909), американский биохимик. Окончил Венский университет (1933), с 1950 г.— профессор биохимии Вашингтонского университета. Основные работы — по изучению структуры и функции белков, механизма действия протеаз.

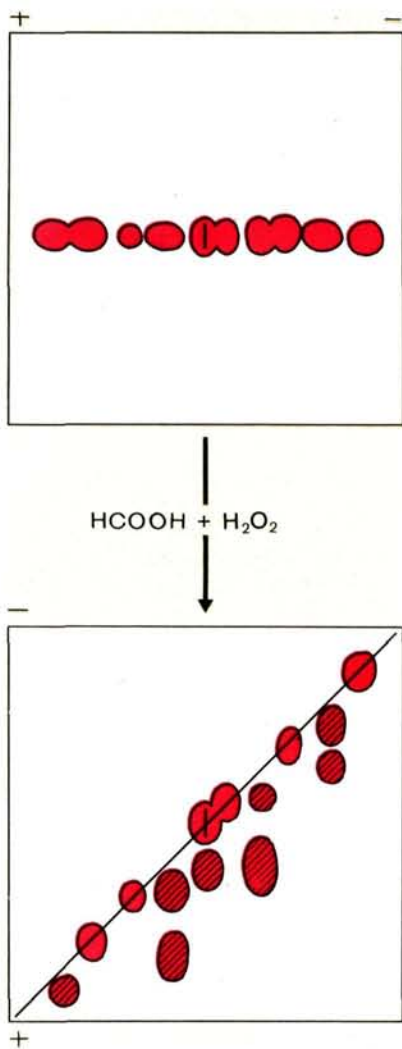


Рис. 28. Выделение цистинсодержащих пептидов методом диагонального электрофореза.

ние пептидов также необходимо проводить в кислой среде. На практике для выделения цистинсодержащих пептидов часто применяется метод диагонального электрофореза (рис. 28). По этому методу смесь пептидов наносится в центре листа хроматографической бумаги, проводится электрофорез в буфере с рН 3,6 или 6,5, полученная полоса обрабатывается парами надмуравьиной кислоты для перевода остатков полуцистина в цистеиновую кислоту, и затем повторно проводится электрофорез в тех же условиях, но в перпендикулярном направлении. При проявлении полученной карты нингидриновым реактивом пептиды, содержащие цистеиновую кислоту, обнаруживаются за пределами диагонали.

Стратегия и тактика исследования первичной структуры белков

Стратегия изучения первичной структуры белка, особенно на первых этапах, всецело определяется его аминокислотным составом и молекулярной массой. Дальнейший план исследования зависит от полученных результатов и должен подвергаться постоянной коррекции.

Стратегические принципы изучения первичной структуры белка претерпевали значительные изменения по мере развития и усовершенствования применяемых методов. Следует отметить три основных этапа в их развитии. Первый этап начался с классической работы Ф. Сенгера (1953) по установлению аминокислотной последовательности инсулина, второй — с широкого введения в структурный анализ белка автоматического секвенатора (начало 70-х годов) и, наконец, третий — с разработки скоростных методов анализа нуклеотидной последовательности ДНК (А. Максам, В. Гилберт, Ф. Сенгер, начало 80-х годов).

В классических работах 60-х — начала 70-х годов для расщепления белка использовались главным образом такие методы, которые позволяли получать большое число фрагментов небольшого размера. Структура их изучалась классическими методами анализа (ручной метод Эдмана, ДНС-Эдман, расщепление карбоксипептидазами и аминопептидазами). При этом для основного гидролиза применялся главным образом трипсин, а для получения перекрывающихся пептидов также использовались ферментативные методы гидролиза (химотрипсин, термолизин и пепсин).

С появлением в лабораториях секвенатора для расщепления белка стали применять химические методы, позволяющие получать крупные фрагменты: расщепление по остаткам метионина — бромцианом, триптофана — BNPS-скатолом, по связи аспарагинилглицил — гидроксиламином. Из ферментативных методов чаще использовался гидролиз трипсином белка, модифицированного по остаткам лизина, а также гидролиз стафилококковой протеиназой. Такой подход исключал кропотливую работу по выделению и установлению структуры большого числа мелких пептидов, что позволило во многих случаях резко ускорить проведение исследований.

В качестве примера использования классического подхода при определении первичной структуры белка может служить установление аминокислотной последовательности аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи (А. Е. Браунштейн, В. М. Липкин и др., 1972).

Аспаратаминотрансфераза относится к числу основных представителей фосфопиродоксальных ферментов, катализирующих реакции переаминирования, или трансминирования. На первом этапе определения аминокислотной последовательности этого фермента были использованы исчерпывающий триптический гидролиз карбоксиметилированного образца и ограниченный триптический гидролиз (только по остаткам аргинина) малеилированного и карбоксиметилированного образца, что позволило в конечном итоге выделить и идентифицировать все пептиды, составляющие полипептидную цепь белка. Нахождение перекрывающихся пептидов с целью реконструкции полипептидной цепи аспаратаминотрансферазы потребовало применения нескольких ферментативных и химических методов расщепления белковой молекулы.

Недостаточная информативность каждого из этих методов в отдельности была связана с трудностью выделения всех необходимых пептидов и с наличием в полипептидной цепи белка однотипных повторяющихся последовательностей.

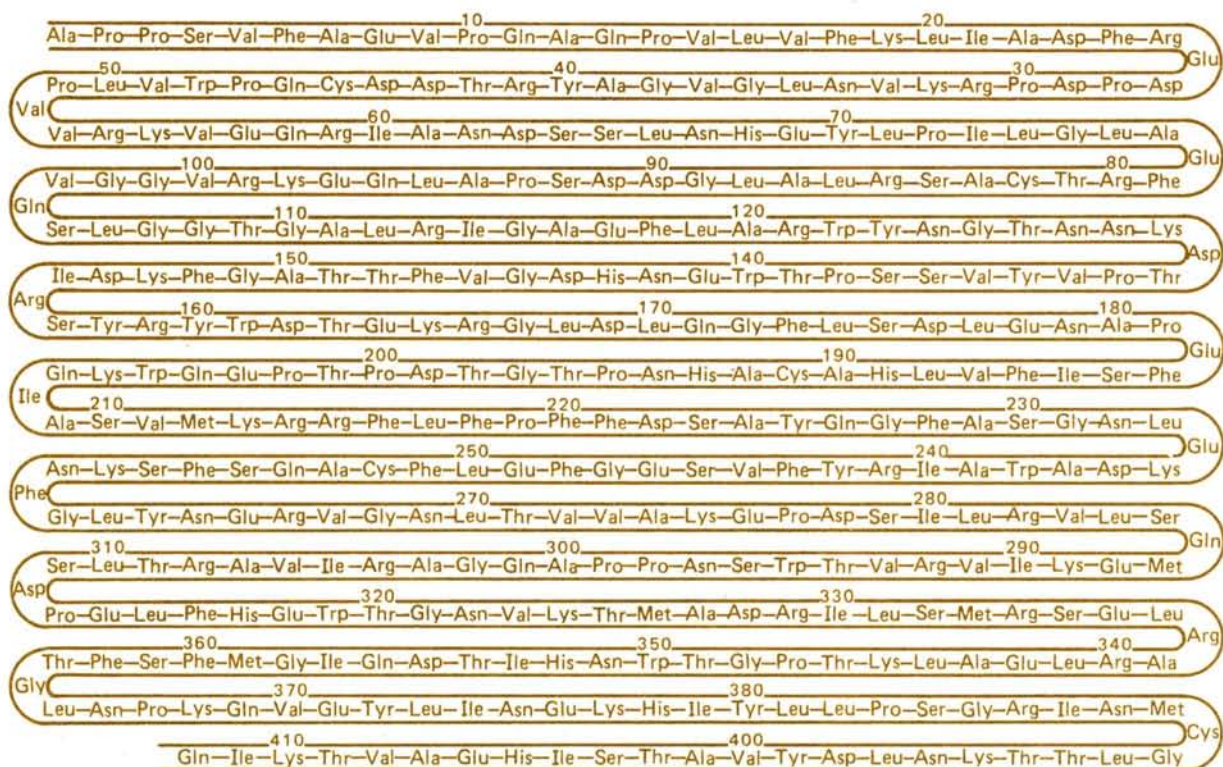
Аминокислотная последовательность аспаратаминотрансферазы изображена на рисунке 29. Этот фермент содержит две одинаковые полипептидные цепи, построенные из 412 аминокислотных остатков каждая. Молекулярная масса одной полипептидной цепи равна 46 344, а всего холофермента (с учетом двух молей пиродоксальфосфата) — 93 147.

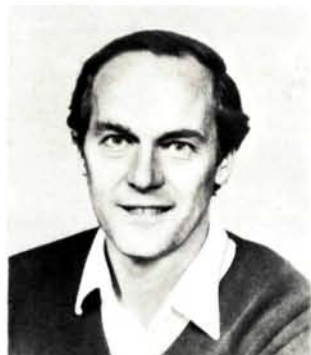
Широкое использование секвенатора можно проиллюстрировать на примере опубликованной в 1973 г. К. Уолшем, Г. Нейратом и сотр. работы по определению первичной структуры свиного трипсина. Общая стратегия исследования представлена на рисунке 30.

Прямым исследованием свиного β -трипсина с помощью секвенатора удалось определить последовательность первых 39 аминокислотных остатков (аминокислоты с 7 по 45, нумерация аминокислот, как у бычьего трипсиногена). Образец β -трипсина содержал примесь α -трипсина, образующегося в результате разрыва связи Lys—Ser (131 — 132) при автолизе. Анализ С-концевого фрагмента (α -С) на секвенаторе позволил установить последовательность аминокислотных остатков с 132 по 171.

Содержащий два остатка триптофана N-концевой фрагмент α -трипсина (α -N) был обработан BNPS-скатолом. Из образовавшейся смеси пептидов выделялся фрагмент (41 — 127), при исследовании которого была установлена последовательность аминокислот с 41 по 75 остаток. Далее молекула β -трипсина расщеплялась бромцианом по остаткам метионина и гидроксиламином по связи Asn — Gly и гидролизовалась трипсином по остаткам аргинина после предварительного блокирования ϵ -аминогруппы остатков лизина с помощью янтарного ангидрида. Два

Рис. 29. Аминокислотная последовательность цитоплазматической аспаратаминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи.





Уолш (Walsh) Кеннет (р. 1931), американский химик-биоорганик. Окончил Торонтский университет (1959), в настоящее время работает в Университете шт. Вашингтон (Сиэтл). Основные работы — по выяснению взаимосвязи между структурой и функцией белков. Разработал эффективные подходы к выяснению первичной структуры белков. Определил аминокислотные последовательности ряда протеолитических ферментов, факторов свертывания крови, фосфодиэстераз и других белков.

последних метода расщепления использовались также при изучении С-концевого фрагмента α -трипсина (α — С) и N-концевого бромцианового фрагмента (СВ — N). Во всех случаях аминокислотная последовательность выделенных пептидов исследовалась с помощью секвенатора. Таким образом, была установлена практически полная первичная структура (кроме остатков 228 и 229) свиного трипсина.

В изучении первичной структуры белков достигнут значительный прогресс. Ежегодно устанавливается полная структура около 100 новых белков. Определены аминокислотные последовательности таких сложных ферментов, как гликогенфосфорилаза и β -галактозидаза, содержащих соответственно 841 и 1021 аминокислотных остатков в одной полипептидной цепи. Наряду с этим

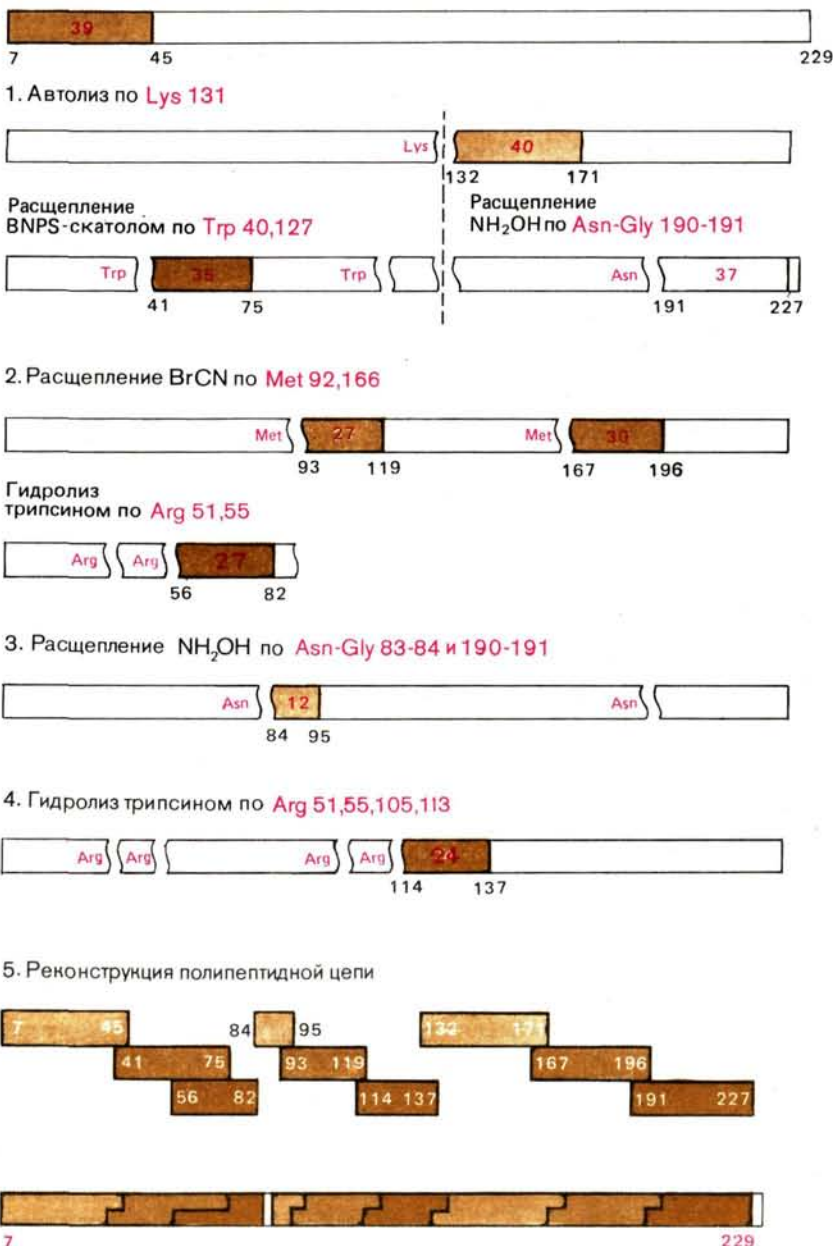


Рис. 30. Схема установления первичной структуры трипсина. Окрашены участки полипептидной цепи, структура которых определена с помощью секвенатора.

в структурной химии белка в настоящее время имеются определенные проблемы. Наибольшие сложности возникают у исследователей, имеющих дело с мембранными белками, белками, выделяемыми в ничтожно малых количествах, и с белками большой молекулярной массы ($M > 100\,000$).

При изучении мембранных белков необходимо принимать во внимание присущие им необычные свойства. Высокое сродство этих белков к липидам и гидрофобность приводят к практически полной их нерастворимости в водных средах. Пептидные фрагменты, полученные при гидролизе мембранных белков, также плохо растворимы и обладают повышенной склонностью к агрегации. Эти и некоторые другие сложности встретились при исследовании структуры бактериородопсина — основного белка пурпурной мембраны галофильной бактерии *Halobacterium halobium*.

Уменьшение количества белков и пептидов, необходимых для анализа их структуры, является одной из центральных проблем, стоящих перед исследователями. С целью ее решения ведется поиск новых методов изучения структуры, в частности более чувствительных способов идентификации производных аминокислот (см. с. 61). Один из перспективных подходов заключается в широком использовании радиоактивных методов анализа. В ряде лабораторий при деградации пептидов в секвенаторе применяется радиоактивный ^{35}S - или ^{14}C -ФИТЦ. Можно вводить радиоактивную метку непосредственно в анализируемый белок. Для многих белков это достигается добавлением радиоактивно меченных аминокислот непосредственно в питательную среду, на которой выращивается культура, являющаяся источником исследуемого белка. Таким же путем оказывается возможным радиоактивно метить белок избирательно по определенным аминокислотным остаткам. Если белок, радиоактивно меченный, например, по остаткам лейцина, анализировать с помощью секвенатора, то простое измерение радиоактивности экстрактов, содержащих анилинотиазолиноны, позволяет безошибочно определить, в каких положениях полипептидной цепи в N-концевой области белка расположены остатки лейцина (рис. 31). Аналогичным образом можно определить положение и других аминокислотных остатков. Такой прием используется для анализа N-концевой последовательности предшественников белков, доступных лишь в ничтожно малых количествах. Для исследования полной структуры он, однако, не применяется из-за дороговизны и трудоемкости.

Особые задачи возникают при исследовании первичной структуры сверхкрупных белков (молекулярная масса более 100 000), поскольку с ростом молекулярной массы все сложности увеличиваются в геометрической прогрессии. Один из возможных подходов в этом случае заключается в использовании ограниченного протеолиза для расщепления исходного белка на небольшое число фрагментов средней молекулярной массы (20 000 — 40 000) и в последующем исследовании фрагментов как отдельных белков.

Этот прием был использован при определении структуры фактора элонгации биосинтеза белка EF—G (Ю. Б. Алахов и др., 1976). Инкубирование EF—G ($M\ 81\,000$) в нативном состоянии с трипсином приводит к образованию четырех сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов T_4 , T_5 , T_6 и T_7 ($M\ 41\,000$, $27\,000$, 8000 и 3000 соответственно). Фрагменты были выделены в гомогенном виде, установлено их строение и расположение в полипептидной цепи белка (рис. 32).

Развитие методов анализа нуклеотидной последовательности ДНК сделало возможным на основе генетического кода выводить соответствующие аминокислотные последовательности исходя из установленных нуклеотидных. При реализации такого подхода

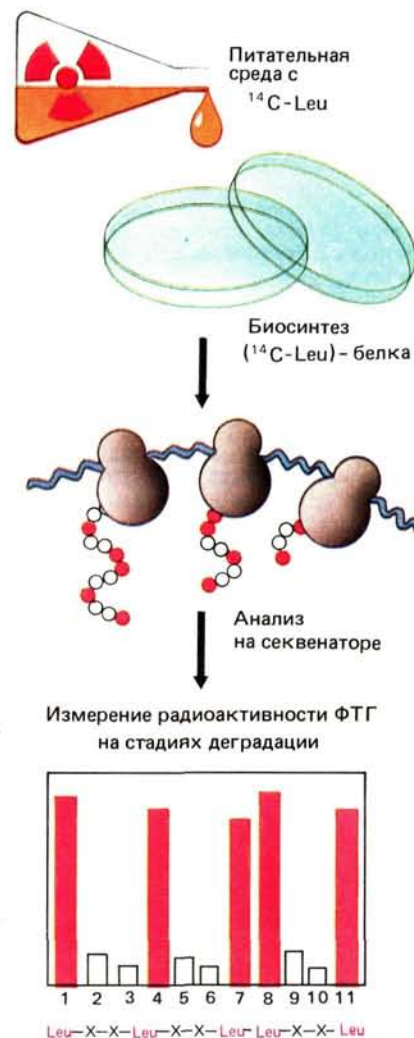


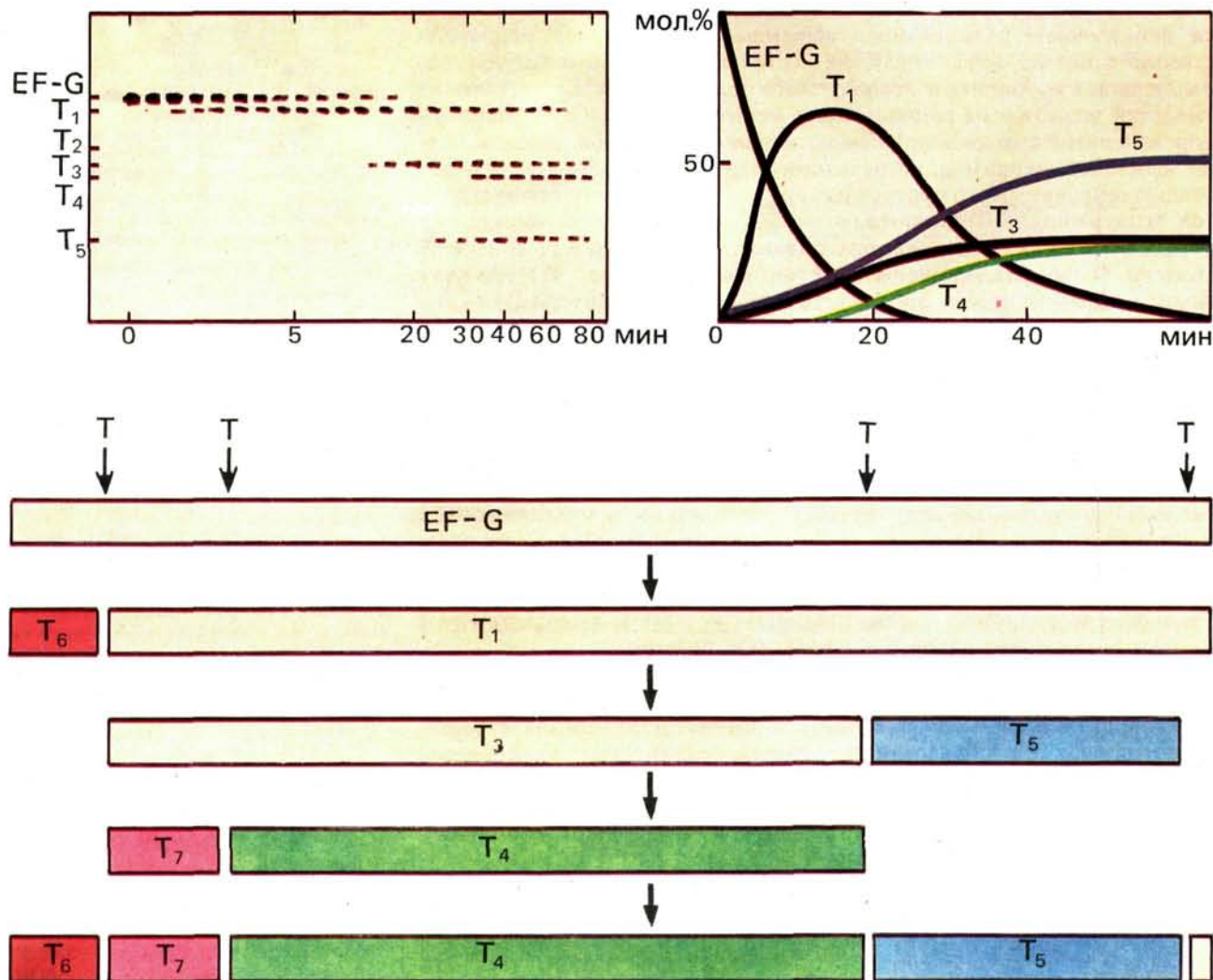
Рис. 31. Анализ аминокислотной последовательности белка, радиоактивно меченного по отдельным аминокислотам.

следует, однако, иметь в виду целый ряд ограничений и возможные источники ошибок. Во-первых, выведенная из нуклеотидной аминокислотная последовательность может не соответствовать реальной вследствие процессинга, который часто происходит как на уровне информационной РНК, так и при превращении белка-предшественника в конечный белок. Во-вторых, лишь одна ошибка в определении последовательности ДНК (пропуск или вставка) приводит к выведению совершенно неправильной аминокислотной последовательности белка.

Таким образом, установление первичной структуры ДНК не всегда может заменить непосредственное исследование аминокислотной последовательности кодируемого ею белка. В то же время параллельное изучение первичных структур белка и ДНК чрезвычайно эффективно.

Установление нуклеотидной последовательности дает возможность расположить изученные пептидные фрагменты в непрерывную полипептидную цепь, позволяя решать, таким образом, наиболее сложную задачу структурного анализа белка. С другой стороны,

Рис. 32. Ограниченный гидролиз трипсином фактора элонгации EF-G. Кинетика образования триптических фрагментов (вверху) и их расположение в полипептидной цепи белка (внизу).



данные по аминокислотной последовательности пептидов упрощают и уточняют анализ нуклеотидной последовательности. Параллельное изучение первичных структур белка и ДНК было использовано, в частности, при определении аминокислотной последовательности β - и β' -субъединиц ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*, полипептидные цепи которых состоят из 1342 и 1407 аминокислотных остатков соответственно (В. М. Липкин, Е. Д. Свердлов и др., 1980).

В последние годы анализ первичной структуры белков на основе исследования нуклеотидной последовательности соответствующих генов принимает все большие масштабы. Первоначально такие исследования касались белков прокариотических организмов, в основном *E. coli*, генетика которых хорошо изучена, и получение структурных генов не представляло большого труда. По мере развития методов генной инженерии появилась возможность выделять также структурные гены белков эукариот.

Во многих ведущих лабораториях мира созданы так называемые банки или библиотеки генов многих высших животных и человека. В этих банках гены разнообразных белков хранятся в составе специальных векторов — плазмид или фагов. Для выделения соответствующего гена из банка используются гибридизационные зонды — небольшие нуклеотидные фрагменты, синтезированные на основе установленной аминокислотной последовательности пептидов исследуемого белка. Из-за «вырожденности» генетического кода могут использоваться не любые последовательности для этой цели. Подходящими являются пептиды, содержащие в своем составе аминокислоты, представленные одним или двумя кодонами, поскольку в этом случае минимально число различных вариантов олигонуклеотидов, способных кодировать данный пептид. Оптимальными являются пептиды, содержащие остатки метионина и триптофана, кодируемые уникальными кодонами. Поэтому особое значение приобретают исследования по выделению и изучению таких пептидов. Имеются и другие методические подходы для выделения структурных генов белков, связанные, в частности, с их способностью в определенных условиях экспрессироваться. Синтезируемый в результате экспрессии белок может быть идентифицирован, например, с помощью иммунохимических методов (см. с. 439).

Возможности современных методов генной инженерии открыли широкие перспективы для изучения белковых систем, которые еще вчера казались недоступными для исследователей вследствие их чрезвычайно низкого содержания. В частности, совсем недавно Ш. Нуме удалось определить структуры ацетилхолинового рецептора и основного компонента натриевого канала из электрического органа рыбы *Electrophorus electricus*.

Сегодня известны первичные структуры более 2000 белков, причем все возрастающая информация поступает из анализа нуклеотидной последовательности генов. Для тех, кто старается более глубоко понять язык аминокислотных последовательностей, доступен уже огромный материал — обширный текст, который в целом представляет собой существенные фрагменты «книги жизни». Что может дать более глубокий его анализ? Бесспорно, он совершенно необходим в изучении связи между строением и функцией отдельных представителей пептидно-белковой природы. Но, может быть, он приведет нас к открытию более общего «белкового кода», позволит нам в будущем в той или иной мере предсказывать свойства белков по их первичной структуре. Это уже можно делать достаточно успешно в отношении пространственной структуры. А биологическая роль? Вряд ли природа придумала аминокислотный алфавит из 20 букв случайно. Есть над чем подумать, и все возрастающий поток новых данных по аминокислотным последовательностям отнюдь не делает каждый новый шаг в этом направлении более скучным, — напротив, он воодушевляет нас, рождает новые пути и концепции и вновь и вновь обращает нас к вопросу о тайне химической азбуки живого.



Липкин Валерий Михайлович (р. 1942), советский химик-биоорганик. Окончил Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева (1964), с 1965 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области изучения химической структуры белков. Лауреат Государственной премии СССР (1982).



Нума (Numa) Шосаку (р. 1929), японский биохимик. Окончил университет Киото (1952); работал в США и ФРГ (1956—1967), с 1968 г. — профессор университета Киото. Широко известен работами по установлению первичной структуры мембранных белков с помощью методов генной инженерии (ацетилхолиновый рецептор, Na^+ -канал возбудимых мембран, трансдуцин и др.).

Пространственное строение белков и пептидов

Каждый белок или пептид специфическим образом свернут в пространстве, и эта конформация определяет его физико-химические и биологические свойства. Пространственная структура белка (пептида) в целом кодируется его первичной структурой. Эта взаимосвязь создает предпосылки для теоретических расчетов и предсказаний вторичной структуры белков на основе их аминокислотной последовательности. Пространственная структура достаточно подвижна, т. е. способна изменяться под воздействием внешних условий или различных агентов, и в этом смысле правильнее говорить о предпочтительной конформации белка или пептида, об одной из многих, энергетически наиболее выгодной пространственной структуре. Среда, даже наиболее естественная, не может не вызывать ответной реакции белковой молекулы, и особенно тех ее группировок, которые расположены на поверхности глобулы и участвуют в многочисленных взаимодействиях. В живой клетке белок находится в постоянно меняющемся окружении и вынужден как-то перестраиваться, когда ему приходится вступать в контакт с соседними белками, рецепторами или такими постоянными партнерами, как нуклеиновые кислоты, липиды, полисахариды, ионы металлов и другие низкомолекулярные соединения. Поэтому естественно стремление исследователя получить более полную информацию о динамических характеристиках белковой молекулы. Образно говоря, он хочет видеть не фотографию, а цветной кинофильм обо всех приключениях и превращениях функционирующей молекулы белка.

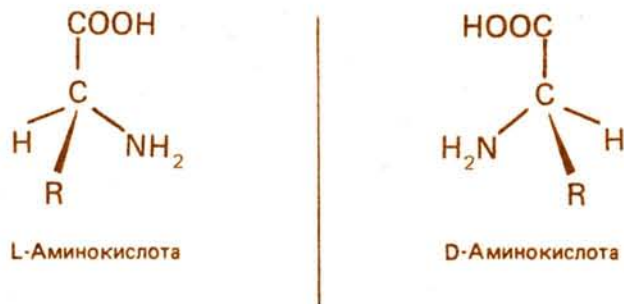
Первостепенное значение имеет выяснение конформации нативного белка, которая определяет специфичность биологического действия. Поскольку условия эксперимента при анализе пространственного строения пептидно-белковых веществ обычно отличаются от условий, в которых они функционируют *in vivo*, в каждом случае необходимо строго доказывать, что исследуемая предпочтительная конформация в целом сохраняется в широком диапазоне параметров среды (например, в растворе или кристалле).

Таким образом, выяснение пространственного строения пептидов и белков представляет собой достаточно сложную задачу. В некоторых случаях трехмерная структура конкретного соединения может быть выяснена на основе какого-либо одного метода (например, с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллического белка). При исследовании пептидов и небольших белков в растворах хорошие результаты дает сочетание ряда физико-химических методов. Иногда ценную информацию можно получить на основе применения, наряду с экспериментальными подходами, теоретических расчетных методов.

В белках, как уже отмечалось, различают несколько уровней пространственной организации, т. е. вторичную, третичную и четвертичную структуры. Хотя эти понятия несколько устарели для белков, а для пептидов не применяются вообще, ими пользуются ради преемственности, поскольку в конечном счете представляет интерес полное описание пространственного строения данного белка или пептида с точными координатами атомов, со всеми конформационными переходами — в непосредственной связи с выполняемой биологической функцией.

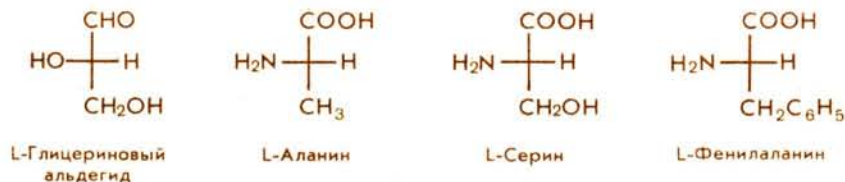
Стереохимия аминокислот. Все встречающиеся в белках аминокислоты (кроме пролина) могут быть изображены формулой $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$, где R — радикалы различной природы. В общем случае это соединения с асимметрическим атомом углерода, и,

следовательно, каждая аминокислота может существовать в пространстве в виде двух форм — с L- и D-конфигурацией асимметрического центра.



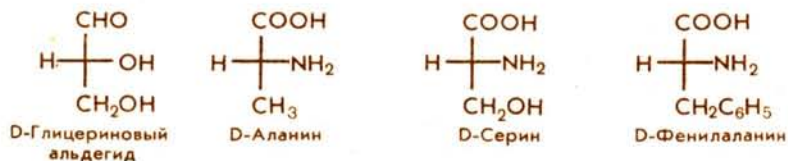
Принадлежность аминокислот к L- или D-ряду в случае простейших представителей (аланин, серин) доказывается прямым сведением их к соответствующему глицериновому альдегиду с помощью стереоспецифических превращений.

В состав всех белков входят только L-аминокислоты (исключение составляет оптически неактивный глицин), которые могут быть представлены в виде проекционных формул Фишера:



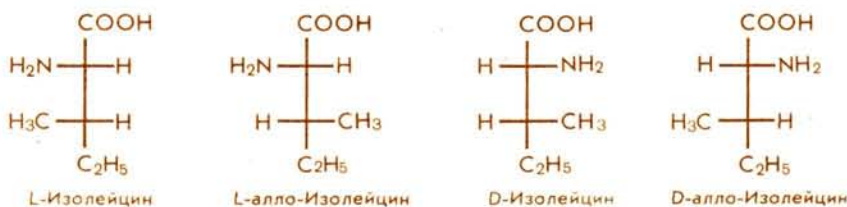
Принадлежность к L-ряду не обязательно связана с определенным направлением вращения плоскости поляризованного света: L-аминокислоты имеют как положительное, так и отрицательное вращение в зависимости от радикала R и условий исследования.

Противоположную конфигурацию имеют D-аминокислоты:

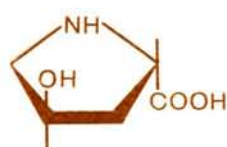


Остатки D-аминокислот входят в состав многих природных пептидов, прежде всего антибиотиков. В частности, в грамицидин S входит D-фенилаланин, в грамицидин A — D-валин, D-лейцин, D-триптофан, в актиномицин D — D-изолейцин, в полимиксин — D-серин. D-Пролин встречается в эргоалкалоидах.

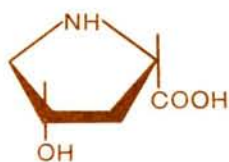
Некоторые аминокислоты имеют два асимметрических углеродных атома, что обуславливает возможность существования четырех оптически активных стереомерных форм (2^n , где n — число асимметрических атомов). Эти формы проиллюстрированы на схеме для треонина и изолейцина.



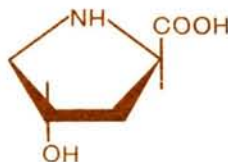
Появление заместителя в пирролидиновом кольце пролина также приводит к образованию алло-форм, в которых заместитель (гидроксигруппа) и карбоксильная группа находятся в *цис*-положении.



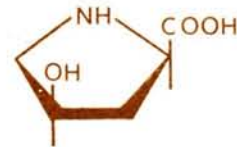
L-Гидроксипролин



L-алло-Гидроксипролин



D-Гидроксипролин



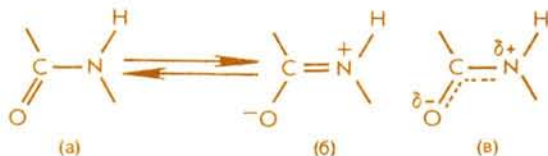
D-алло-Гидроксипролин

При кислотном гидролизе белков получается смесь L-аминокислот, которые с помощью дробной кристаллизации или хроматографии могут быть выделены в чистом виде. Аналогично при гидролизе ряда природных пептидов (грамицидины A и S, актиномицин и т. п.) можно получить и соответствующие чистые D-аминокислоты.

Часто аминокислоты для исследовательских целей и практических нужд получают с помощью микробиологического синтеза (лизин и др.) — тогда продуктами являются L-изомеры. Если же пользуются химическим синтезом, то обычно образуются смеси L- и D-изомеров аминокислот, т. е. рацематы. Для их разделения используются различные приемы. Одним из наиболее распространенных является избирательный гидролиз ферментами (ацилазами, эстеразами и т. п.) N-ацетил-D,L-аминокислот или соответствующих сложных эфиров D,L-аминокислот; в этом случае расщеплению подвергается лишь L-форма и, таким образом, в растворе образуются свободные L-аминокислоты, которые легко отделяются от стабильных по отношению к ферментативному гидролизу производных D-аминокислот.

Другим приемом является образование солей D,L-аминокислот с оптически активными агентами, например алкалоидами бруцином и стрихнином, а также другими оптически активными аминами, производящимися в промышленных масштабах (амфетамин и др.). В силу различной растворимости соответствующих диастереомерных солей (D,L и L,L) они разделяются путем кристаллизации или дробного осаждения и при последующем разложении кислотами образуют оптически чистые L- и D-аминокислоты. Эти методы, ранее широко применявшиеся в лаборатории, постепенно утрачивают свое значение. В производственных условиях для разделения рацемических аминокислот все шире используются хроматография на оптически активных адсорбентах и иммобилизованные ферменты.

Пептидная связь. Главной структурной единицей белков и пептидов является пептидная (амидная) связь $—CO—NH—$. Согласно современным представлениям, пептидная связь в белках является практически плоской, ее основные параметры приведены на рисунке 33. В обычных условиях наблюдаются лишь небольшие отклонения от плоской системы (до $5—10^\circ$); большие деформации возможны в напряженных циклических системах. Пептидная связь примерно на 10% короче обычной, простой C—N и имеет характер «частично двойной» связи $—C=N—$. При изучении этой проблемы Л. Полинг и Р. Кори, анализировавшие методом рентгеноструктурного анализа ряд модельных ди- и трипептидов, предложили в 1948—1955 гг. объяснять особую природу связи C—N «резонансом» между двумя формами пептидной связи *a* и *б*.



Другими словами, в белках и пептидах связь C—N является частично кратной (как это показано структурой *в*) из-за взаимодействия неподеленной пары электронов атома азота с π -электронной системой карбонильной группы, что приводит к затрудненному вращению вокруг связи C—N (барьер вращения составляет $63—84$ кДж/моль).

Обычно пептидная связь имеет *транс*-конфигурацию, т. е. является транспланарной (рис. 33, *a*). В напряженных циклических системах (некоторые циклопептиды, производные пролина и т. п.),

а также при большом размере заместителей у атома азота в N-алкилированных производных пептидная связь может существовать в плоской *цис*-форме (рис. 33,б). *Цис*- и *транс*-пептидные связи можно различить с помощью физических методов (ИК-, ЯМР-спектроскопии и др.). В белках пептидная связь практически всегда имеет *транс*-конфигурацию.

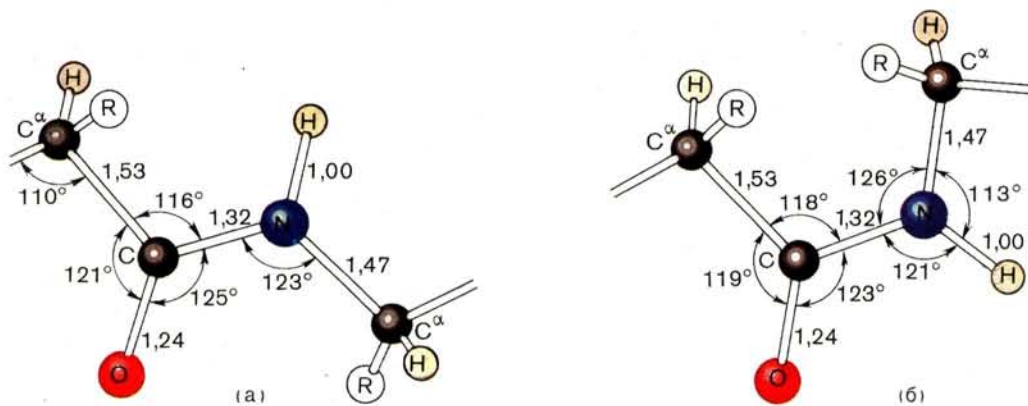


Рис. 33. Валентные углы и длины связей (в нм) в *транс*- и *цис*-пептидных связях (а и б соответственно).

Рассмотрим теперь фрагмент пептидной цепи, включающий две плоские пептидные связи с подвижным (своего рода шарнирным) сочленением в точке, где находится асимметрический углеродный атом (рис. 34).

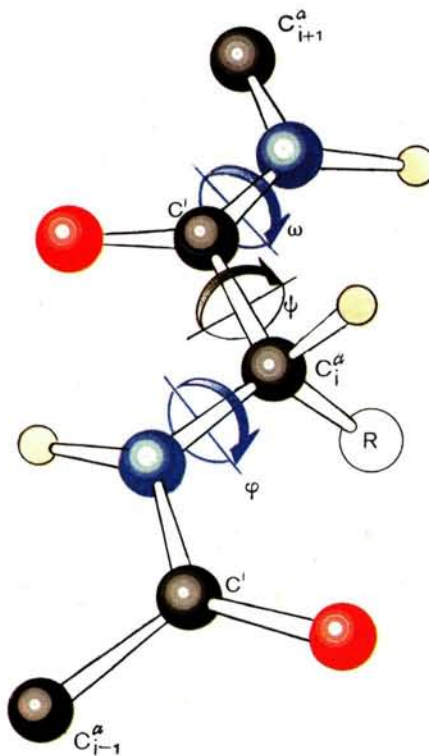


Рис. 34. Определение двугранных углов в полипептидной цепи.

В этом звене пептидной цепи повороты возможны вокруг двух простых связей $N-C^{\alpha}$ и $C^{\alpha}-C'$, примыкающих к асимметрическому атому. Согласно принятой номенклатуре, такие повороты измеряются двугранными углами $\varphi(N-C^{\alpha})$ и $\psi(C^{\alpha}-C')$; нередко используются также углы ω (вращение вокруг пептидных связей $C'-N$), а также χ^1 , χ^2 и др. (вращение вокруг связей $C^{\alpha}-C^{\beta}$, $C^{\beta}-C^{\gamma}$ и т. д.). В качестве нулевой точки отсчета принимается конформация (рис. 35), в которой $\varphi = \psi = \omega = 0^{\circ}$ (заслоненное расположение остатков основной пептидной цепи). Направление отсчета углов — положительных (до $+180^{\circ}$) и отрицательных (до -180°) — на рисунке 35 показано стрелками.

Легко понять, что любые конформации пептидной цепи могут быть описаны набором значений углов φ и ψ у каждого из C^{α} -атомов (обычно $\omega = 180^{\circ}$); другими словами, знание таких значений для всех пептидных звеньев эквивалентно полной информации о пространственном строении основной цепи белка и пептида.

Графически конформационные параметры полипептидной цепи удобно изображать с помощью карт, предложенных Г. Рамачандраном в 1963 г. («карты Рамачандрана») и отражающих зависимость энергии остатка от параметров φ и ψ (рис. 36). Значения углов φ и ψ откладываются по осям координат от -180° до $+180^{\circ}$. В силу взаимодействия между заместителями в пептидной цепи углы φ и ψ не могут принимать любые значения — для них разрешенными оказываются лишь некоторые дискретные области (выделенные на карте темным цветом), которые соответствуют энергетически выгодным конформациям пептидной цепи, т. е., по существу, являются областями минимума энергии. Их достаточно компактная локализация свидетельствует о том, что углы φ и ψ взаимосвязаны, изменение одного из них влечет изменение второго. Например, если угол ψ приобретает значение в интервале $60 - 120^{\circ}$, то для угла φ энергетически выгодным оказывается значение, не превышающее -60° .



Рамачандран [Ramachandran] Гопалачандрам Нараяна (р. 1922), индийский биофизик. Образование получил в Мадрасе (Индия) и Кембридже (Великобритания); профессор Мадрасского университета (1950), с 1970 г. возглавляет Отдел молекулярной биофизики Индийского института науки. Известен работами по пространственной структуре белков. Заложил основы теоретического конформационного анализа пептидо-белковых веществ.

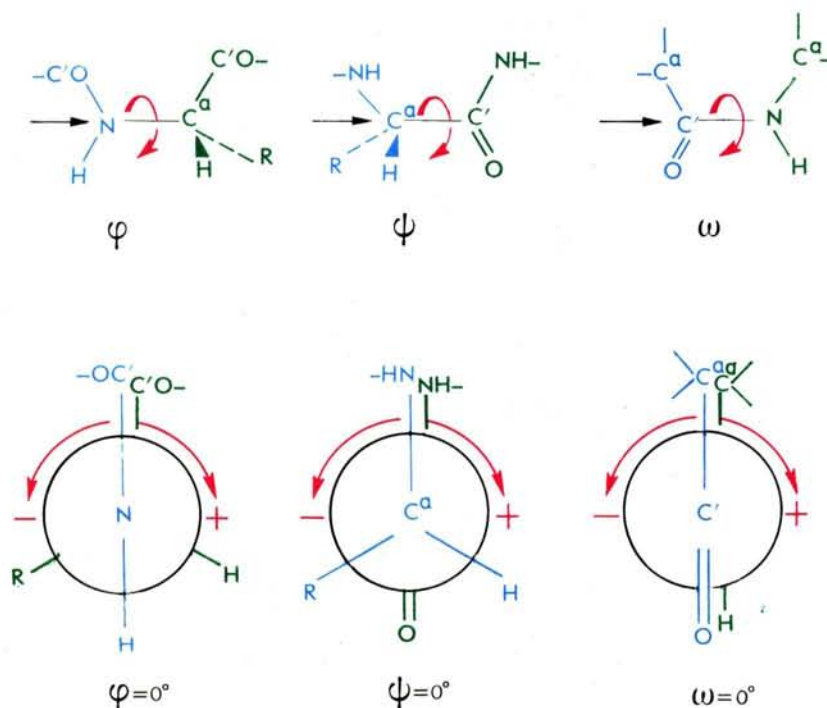
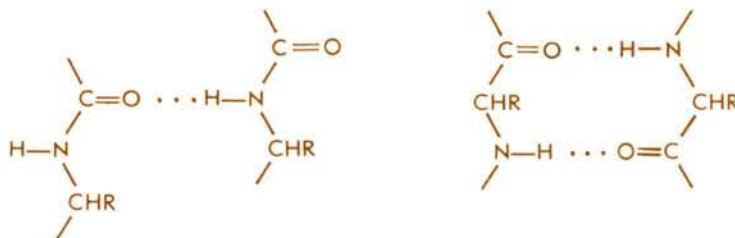


Рис. 35. Конформации пептидной цепи, отвечающие нулевым значениям углов φ , ψ и ω (черные стрелки указывают направление взгляда наблюдателя).

Невалентные взаимодействия в пептидной цепи. Пространственная структура белков и пептидов в основном определяется невалентными взаимодействиями между различными атомами. К их числу относятся ван-дер-ваальсовы, электростатические, или ионные, ион-дипольные и диполь-дипольные, гидрофобные, торсионные взаимодействия и водородные связи.



Водородные связи, как правило, образуются между подвижным атомом водорода ($-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$) и гетероатомом, чаще всего атомом кислорода. Водородная связь имеет донорно-акцепторную природу, т. е. она образуется с участием неподеленной электронной пары гетероатома (донор электронов); акцептором электронов является атом водорода. Наибольшее значение для формирования пространственной структуры белков имеют водородные связи между CO - и NH -группами пептидного остова.

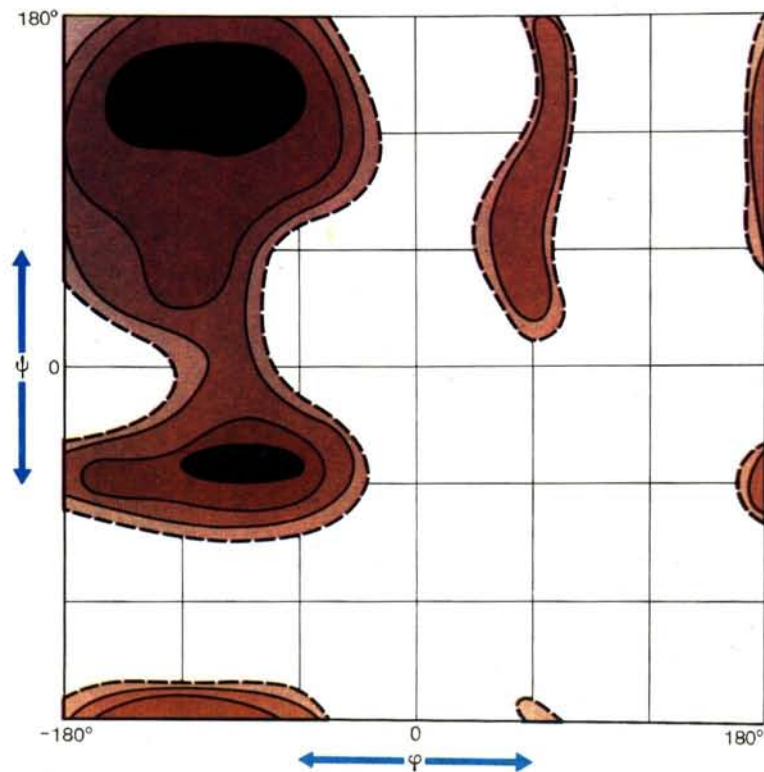
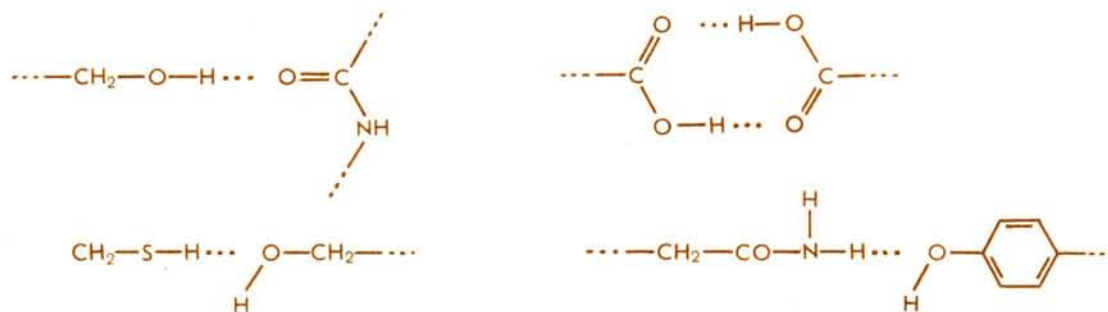


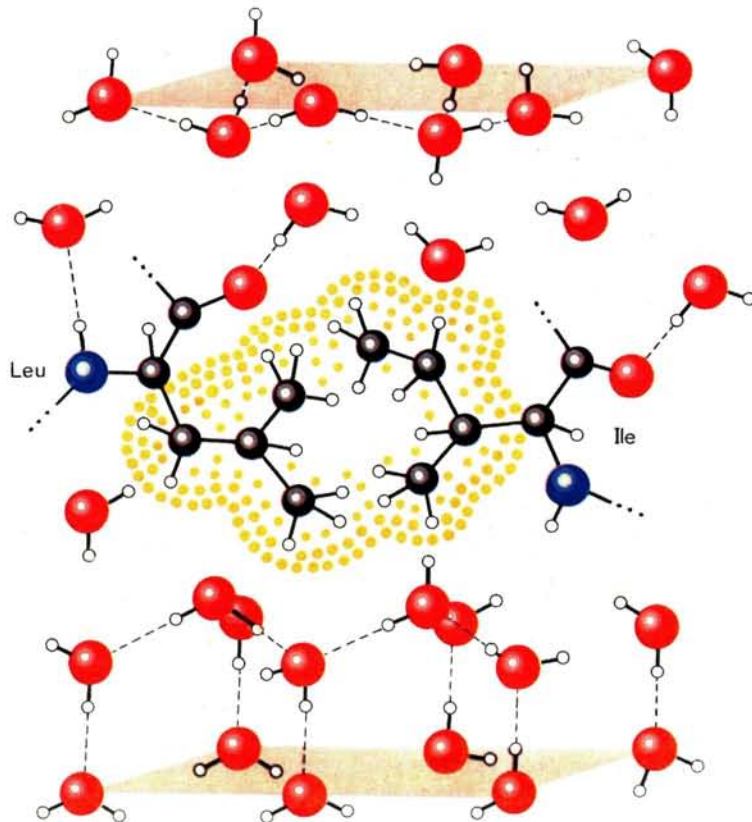
Рис. 36. Разрешенные области для двугранных углов основной цепи.

В неполярном окружении энергия водородной связи $\text{CO} \dots \text{HN}$ составляет около 16,7 кДж/моль, а повышение полярности среды снижает эту энергию.

Помимо указанных, возможны и водородные связи с участием функциональных групп боковых цепей, например:



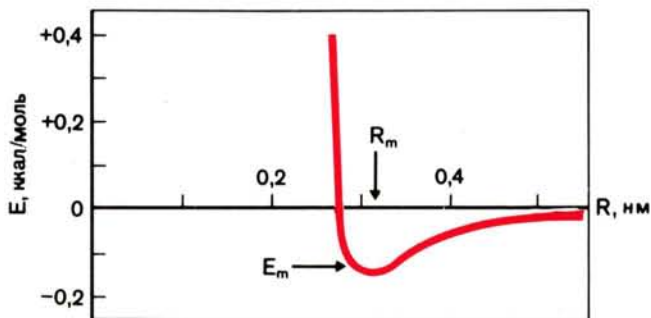
Труднее объяснить гидрофобные взаимодействия. По существу, такие взаимодействия, имеющие энтропийную природу, связаны с тем, что неполярные заместители выталкиваются из воды и стремятся ограничить свой контакт с водой; напротив, вода стремится



восстановить свое структурированное состояние и как бы принудительно группирует заместители в кластеры, обладающие минимумом энергии. В такого рода «взаимодействия» вступают в основном неполярные боковые группы аминокислотных остатков.

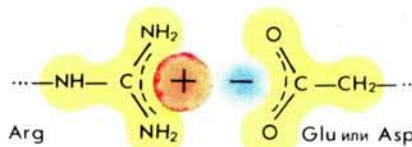
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия, описываемые потенциалом Ленард-Джонса (рис. 37), складываются из дисперсионных сил притяжения атомов и сил взаимного отталкивания их электронных оболочек. Как видно из рисунка 37, наиболее выгодным является расстояние R_m , равное или близкое сумме эффективных радиусов взаимодействующих атомов. Энергетический вклад каждого контакта невелик ($< 0,42$ кДж/моль), но ввиду их большого числа ван-дер-ваальсовы взаимодействия дают основной вклад в суммарную энергию внутримолекулярных невалентных взаимодействий.

Рис. 37. Потенциал Ленард-Джонса (минимум потенциала отвечает расстояние R_m и энергия притяжения E_m).



Астбери [Astbury] Уильям Томас (1898—1961), английский кристаллограф. Образование получил в Кембриджском университете; работал в Университетском колледже, а затем в Королевском институте в Лондоне. Автор фундаментальных работ по изучению пространственной структуры кератина, миозина, фибрина и коллагена. Впервые обнаружил β -структуру белков.

Ионные, или электростатические, взаимодействия представляют собой взаимодействия заряженных групп. При этом, как известно, одноименно заряженные группы отталкиваются, а разноименно заряженные притягиваются. К ним относятся, в частности, взаимодействия ионогенных групп, образующих солевые связи.



Энергия солевых связей в гидрофобном окружении может достигать 41,9 кДж/моль, но их число в белках сравнительно невелико. Повышение диэлектрической постоянной среды понижает энергию солевых связей. Во многом аналогичны электростатическим ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия.

Наконец, торсионные взаимодействия характеризуют «скрученность» ординарной связи. В частности, поворот какой-либо группировки вокруг ординарной связи может нарушать электронную структуру этой связи и вызывать своего рода «тормозную» реакцию. Торсионные силы относительно слабы, но при анализе поворотов вокруг связей C—C, C—N в боковых цепях аминокислотных остатков их нельзя не учитывать.

Реализуемая в данных условиях конформация белка и пептида определяется суммой всех перечисленных взаимодействий и является энергетически наиболее выгодной, что и отражается «попаданием» соответствующих углов в разрешенные области конформационных «карт Рамачандрана».

Вторичная структура белков

Регулярная структура полипептидной цепи предопределяет возможность формирования стандартных, так называемых канонических, конформаций, легко обнаруживаемых в нативной форме с помощью различных методов. Такого рода пространственно упорядоченные участки, стабилизированные водородными связями между пептидными CO- и NH-группами, называются элементами *вторичной структуры*.

Исторически первой описанной пространственной конфигурацией полипептидной цепи была β -структура, предложенная У. Астбери в 1941 г. на основании рентгеноструктурных исследований β -кератина. Через 10 лет Л. Полинг и Р. Кори установили, что β -структура, или «складчатый лист» (рис. 38), — это стабилизированный межцепочечными водородными связями ассоциат вытяну-

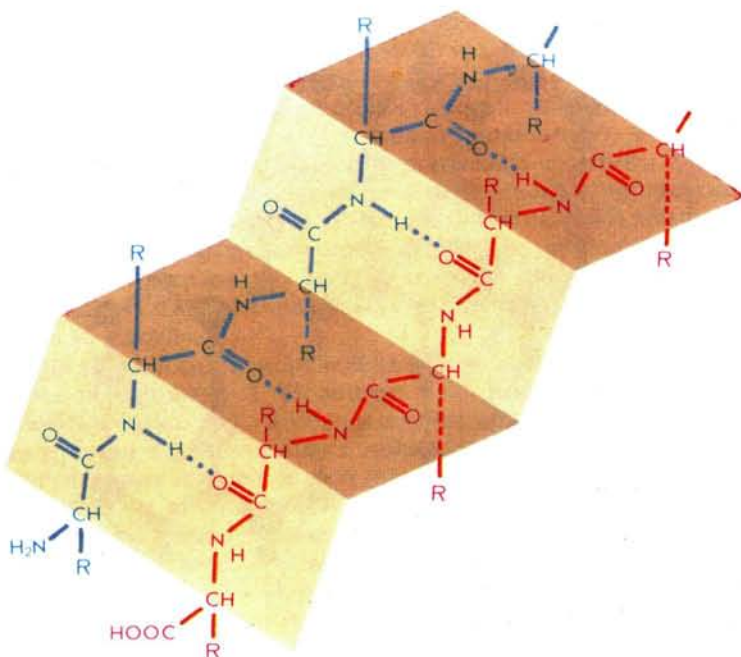
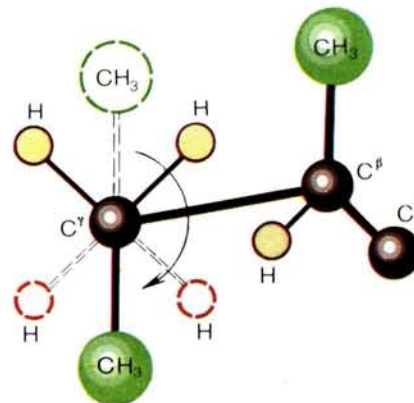


Рис. 38. Конформация β -складчатого листа.



Полинг (Pauling) Лайнус Карл (р. 1901), американский физик и химик, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Калифорнийский технологический институт (1922). Известен фундаментальными трудами по изучению строения сложных молекул, главным образом белков. Исследуя природу химической связи, создал метод электронных пар и теорию резонанса. Сформулировал (1951, совместно с Р. Кори) теорию вторичной структуры белка и открыл α -спираль. Лауреат Нобелевской премии по химии (1954) и Нобелевской премии мира (1962), Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1970).

тых, зигзагообразных пептидных цепей. В зависимости от взаимной ориентации цепей различают параллельные и антипараллельные β -структуры (рис. 39).

Примером белков природного происхождения с β -структурой является фиброин шелка. По существу, предельная вытянутость β -структуры и определяет большую прочность шелковой нити, ее малую растяжимость. С другой стороны, так как отдельные «слои» ее связаны друг с другом лишь за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий, шелк чрезвычайно эластичен.

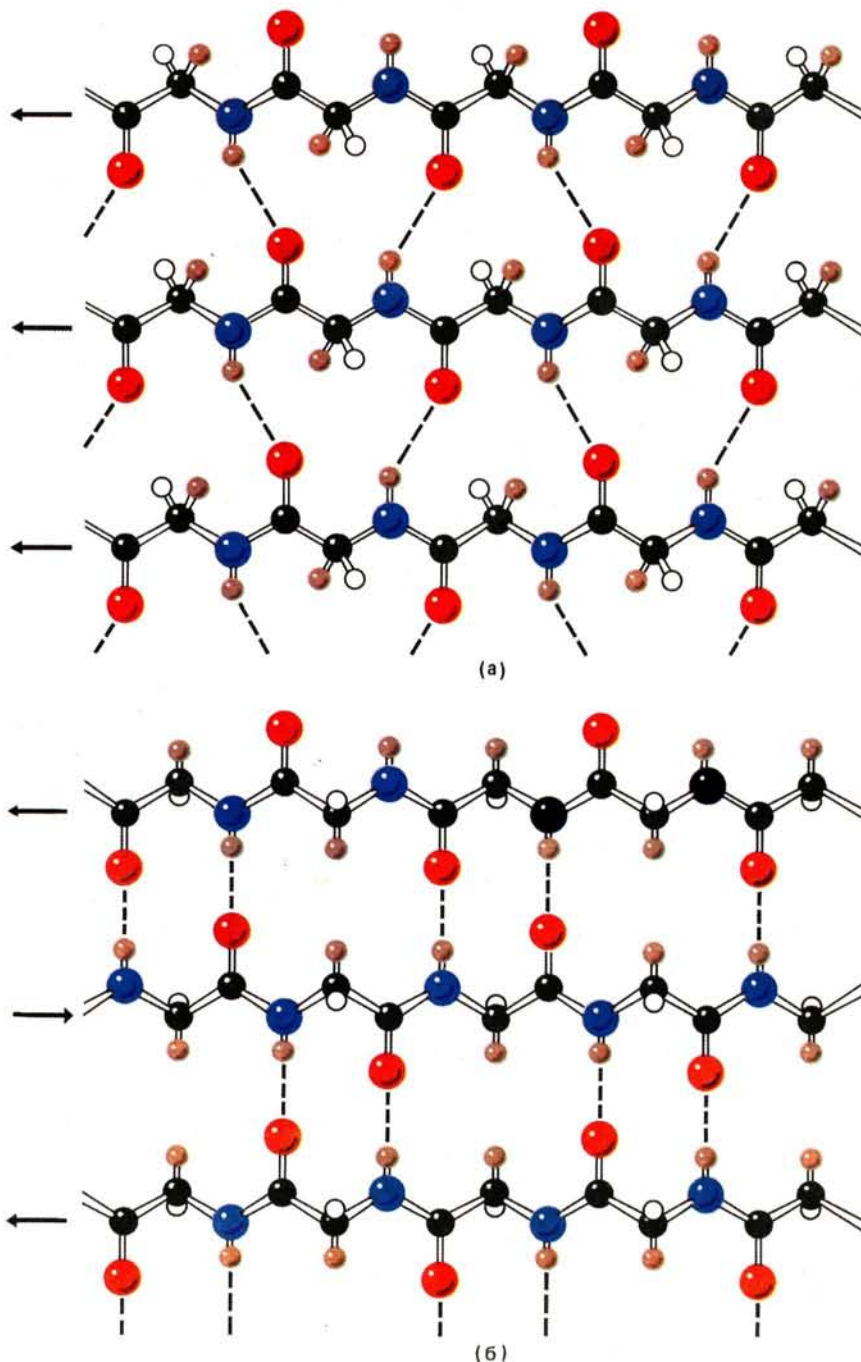


Рис. 39. Параллельная (а) и антипараллельная (б) β -структура.

В фиброине шелка полипептидные цепи расположены антипараллельно, а в β -кератине стягиваются дополнительно липопротеином серицином. Достаточно протяженные участки фиброина шелка имеют повторяющийся структурный фрагмент —Gly—Ala—Gly—Ser—Gly—Ala—, и так как остатки Ala и Ser оказываются расположенными по одну сторону средней плоскости «листа», а остатки Gly — по другую, то расстояние между слоями не одинаково и составляет 0,35 нм и 0,57 нм соответственно (а не 0,47 нм, как в канонической β -структуре). β -Структура (типа β -кератина) присутствует в синтетических полипептидах. Приблизительно 15% аминокислотных остатков глобулярных белков также входит в состав β -структур.

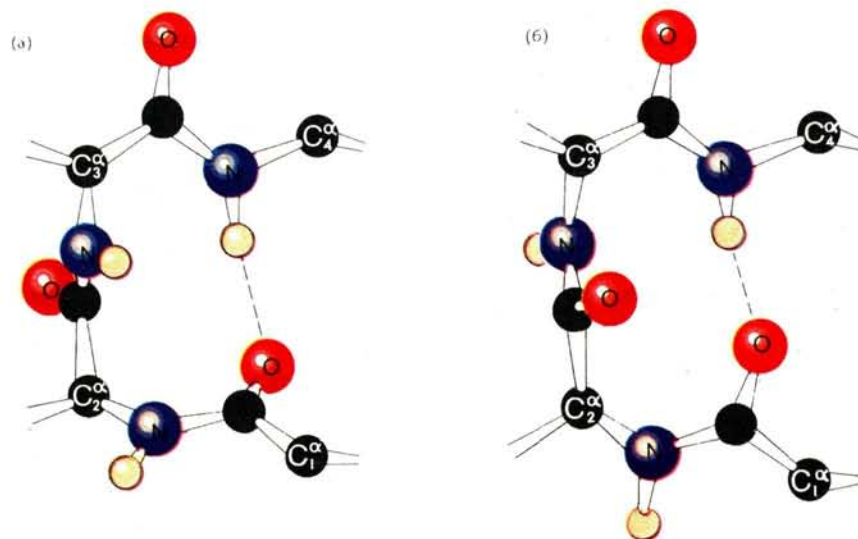


Рис. 40. Конформация β -изгибов типа I (а) и II (б).

Края антипараллельных β -структур образованы особым видом вторичной структуры, который называется β -изгибом (реверсивным поворотом). β -Изгибы образуются четырьмя последовательно расположенными аминокислотными остатками, как правило, образующими водородную связь $4 \rightarrow 1$. Анализ показывает, что возможны два основных вида β -изгибов (так называемые изгибы типа I и II, рис. 40), отличающихся ориентацией пептидного карбонила по отношению к средней плоскости 10-членного цикла. β -Изгибы — характерный элемент пространственной структуры природных и синтетических олигопептидов, как линейных, так и циклических. Фрагмент β -структуры из двух антипараллельных цепей с β -изгибом часто называют « β -шпилькой».

Одна из главных канонических форм полипептидной цепи была впервые обнаружена Л. Полингом и Р. Кори в 1951 г. и названа α -спиралью (рис. 41). В общем случае спиральная структура возникает, когда во всех звеньях полипептидной цепи углы поворота вокруг простых связей имеют одинаковые величину и знак, что и приводит к постепенному закручиванию цепочки. Структура α -спирали, помимо невалентных взаимодействий ближайших атомов, стабилизируется также внутримолекулярными водородными связями между C=O- и N—H-группами полипептидного остова. Радикалы аминокислотных остатков оказываются на периферии образованного спиралью цилиндра и могут, в зависимости от харак-

тера аминокислотных остатков, обеспечивать гидрофобную или гидрофильную природу этой цилиндрической поверхности. α -Спираль имеет следующие геометрические параметры: радиус $r = 0,23\text{нм}$, высота спирали (смещение) на один остаток $d = 0,15\text{нм}$; шаг α -спирали (период идентичности) $P = 0,54\text{нм}$ (рис. 42). Один виток α -спирали образуют 3,6 аминокислотных остатка. Как и любая другая спираль, α -спираль может быть правой или левой. В белках встречаются только правые α -спирали.

Рис. 41. Модель α -спиральной конформации полипептидной цепи.

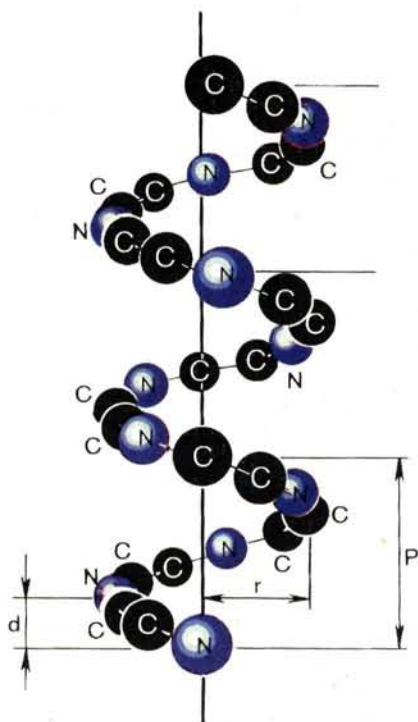
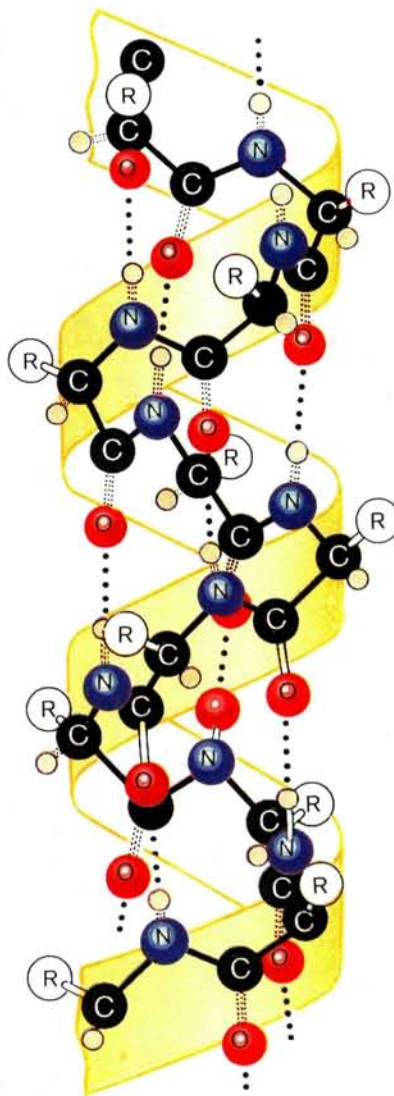


Рис. 42. Параметры спиральной конформации пептидной цепи.

Наряду с α -спиралью возможно существование и других спиралей, имеющих иные параметры, — содержащих меньшее (например, так называемая 3_{10} -спираль) или большее (π -спираль) число остатков на виток (рис. 43).

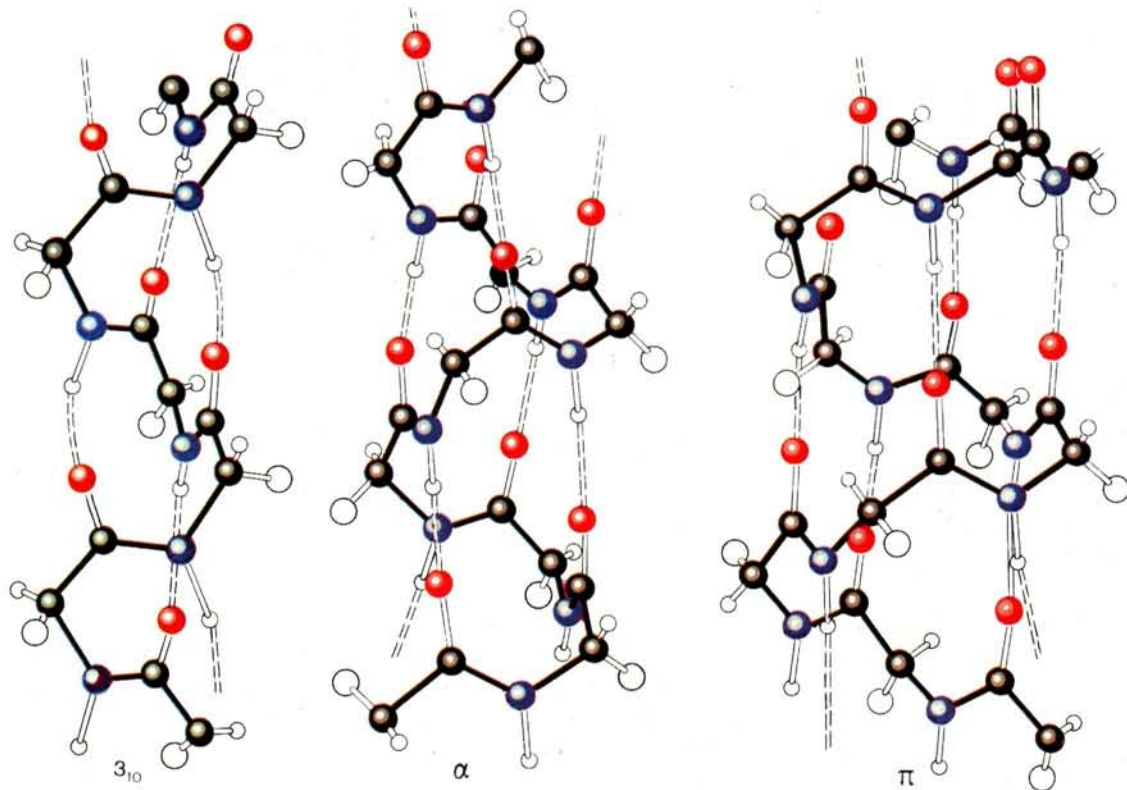
В α -спирали каждая NH-группа полипептидного остова соединяется водородной связью с группой CO четвертого от нее аминокислотного остатка ($5 \rightarrow 1$ связь), образуя 13-членный цикл. Так как в один виток α -спирали входит 3,6 остатка, то ее можно обозначить как $3,6_{13}$ -спираль. Аналогичным образом, с учетом размеров H-связанных циклов, обозначаются и другие теоретически возможные типы спиралей (рис. 44).

Спираль $2,2_7$ (2,2 остатка на виток, семичленный H-связанный цикл) оказывается весьма напряженной и в природных полипептидах и белках не реализуется. Спираль 3_{10} , хотя и является напряженной, тем не менее существует в природе, в частности найдена в миоглобине и лизоциме. Спирали $4,4_{16}$, или π -спирали, в белках практически не встречаются. В силу ограничений, вносимых структурой пролина (фиксированный угол φ), полипролин может существовать в специфических спиральных конформациях, обозначаемых как спираль полипролина I и спираль полипролина II (рис. 45). Такие спирали во многом подобны спирали коллагена. Параметры спиральных структур (рис. 42) приведены в таблице 4.

α -Спираль встречается в белках очень часто. Например, α -кератин является полностью α -спиральным белком, в миоглобине и гемоглобине содержание α -спирали составляет 75%, а в сывороточном альбумине — 50%. С другой стороны, имеются белки, в которых α -спиральные участки отсутствуют (например, нейротоксины змей, см. с. 280) или их содержание невелико. Так, в ферментах рибонуклеазе А и химотрипсине доля α -спиралей составляет 17 и 8% соответственно.

Завершая обсуждение вторичной структуры белков, следует отметить, что распространенность α -спирали и β -структуры связана

Рис. 43. Спиральные конформации полипептидных цепей с внутримолекулярными водородными связями.



с тем, что они являются энергетически предпочтительными конфигурациями полипептидной цепи. Это легко видеть и на конформационной карте (рис. 46), где для сравнения приведены параметры других регулярных форм.

Сверхвторичная структура. Следующий за вторичной структурой уровень организации полипептидной цепи связан с наличием

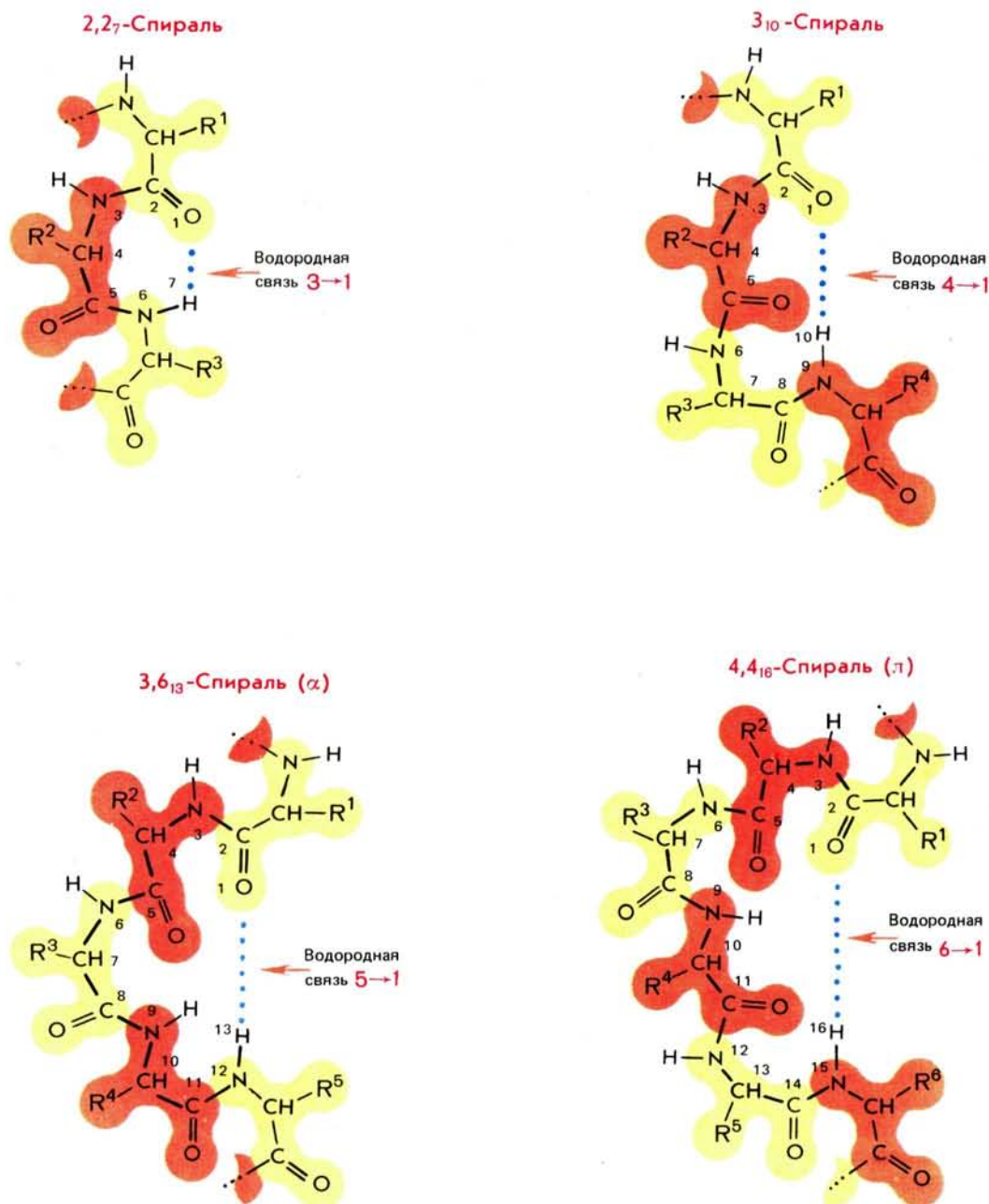


Рис. 44. Строение Н-связанных циклов в различных типах спиралей.

Параметры спиральных структур

Параметр спирали	Спираль 3_{10}	α -Спираль	π -Спираль	Полипролин I	Полипролин II
Число аминокислотных остатков на виток (n)	3,0	3,6	4,4	3,3	3 (лево-вращающаяся спираль)
Высота спирали на один аминокислотный остаток d (нм)	0,2	0,15	0,11	0,19	0,31
Высота спирали на один виток (шаг спирали) P (нм)	0,6	0,54	0,5	0,57	0,93
Углы (в градусах)					
φ	-49	-47	-57	-83	-76
ψ	-26	-57	-70	+158	+146
ω	+180	+180	+180	0	+180

Строение белков и пептидов

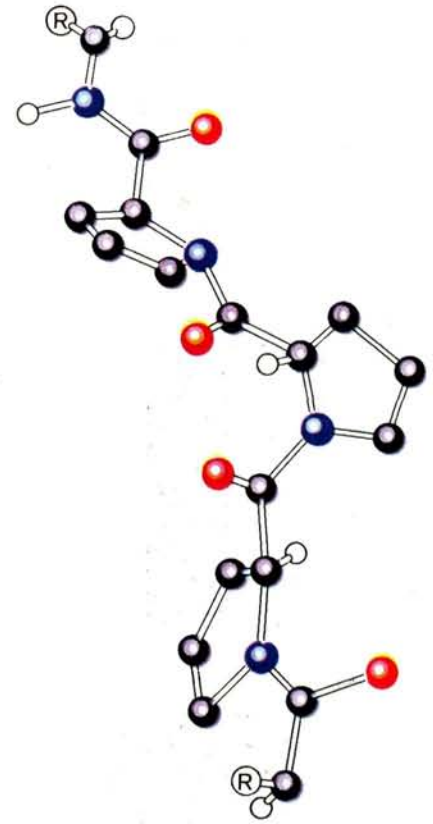


Рис. 45. Спираль полипролина II.

ансамблей взаимодействующих между собой вторичных структур. В частности, имеются примеры агрегации α -спиралей с образованием суперспирализованных систем.

Наиболее известна в этом отношении структура α -кератина шерсти. Три α -спиральные цепи кератина скручены в протофибриллы, которые, в свою очередь, объединены в микрофибриллу, обра-

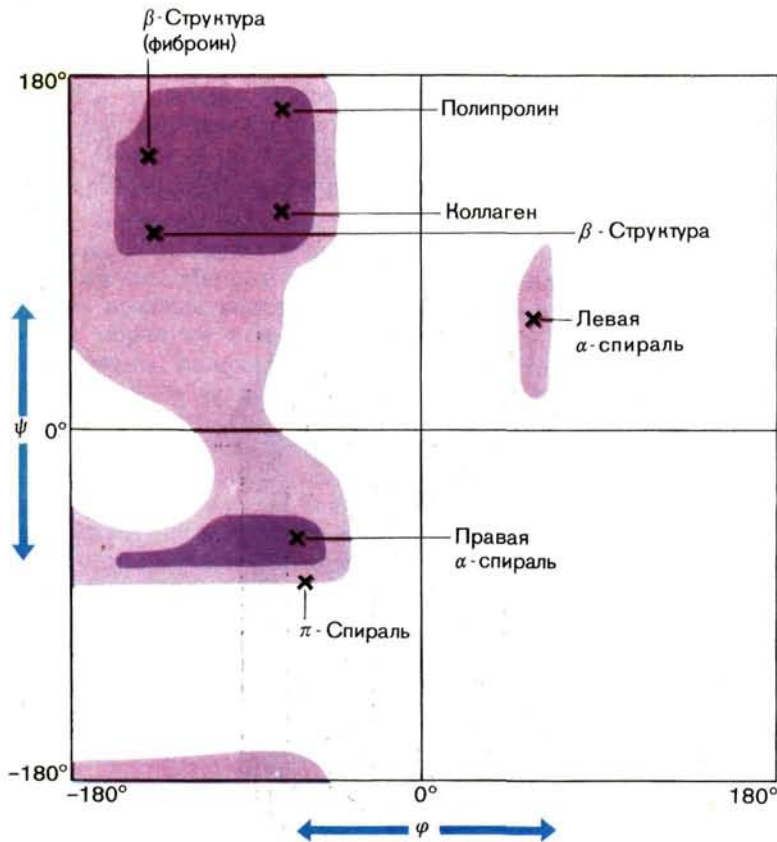


Рис. 46. Двугранные углы регулярных структур.

Рис. 47. Сборка α -кератина.

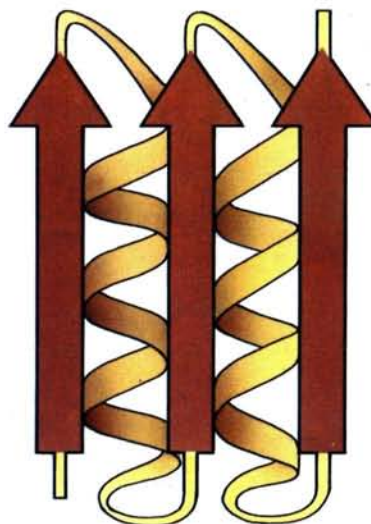
зующую волос (рис. 47). Такая сверхвторичная структура объясняет, почему шерсть эластична, легко растягивается и после снятия усилия постепенно восстанавливает свою длину. В силу того, что межмолекулярные связи слабы, шерсть непрочна. В волокнах шерсти период идентичности равен 0,51 нм (а не 0,54 нм, как в «канонической» α -спирали).

Короткие участки суперспирализованных антипараллельных α -спиралей присутствуют и в некоторых глобулярных белках. Весьма компактную левую тройную спираль образуют параллельные спирали типа полипролина в коллагене (см. с. 257). Другая распространенная группа супервторичных структур — различные варианты так называемой $\beta\alpha\beta$ -структуры, в которой α -спираль взаимодействует с β -складчатым листом. Чаще всего встречается структура $\beta\alpha\beta\alpha\beta$, показанная на рисунке 48.

Многие белки содержат относительно слабо взаимодействующие между собой участки, которые называют *доменами*. Средний размер домена обычно составляет 100 — 150 остатков, что отвечает глобуле с поперечником около 2,5 нм. Вместе с тем встречаются и значительно большие домены. Вероятнее всего, формирование пространственной структуры белка вначале происходит внутри будущих доменов, а взаимная укладка доменов, т. е. образование третичной структуры, происходит на заключительных этапах формирования глобулы.

Третичная структура белков

Полипептидная цепь, содержащая определенное число участков вторичной структуры, обычно укладывается в пространстве в относительно компактную систему, в которой элементы вторичной структуры взаимодействуют между собой и с участками неупорядоченной структуры, образуя глобулу (глобулярные белки) или достаточно вытянутое волокно (фибрилярные белки). В этих случаях

Рис. 48. Сверхвторичная $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -структура («греческий орнамент»).

принято говорить о формировании *третичной структуры*. Для многих белков третичная структура эквивалентна полной пространственной структуре. Каждый белок обладает своей уникальной пространственной структурой.

Главным методом, с помощью которого в настоящее время определяется третичная структура белка, является рентгеноструктурный анализ кристаллических образцов. Для рентгеноструктурного анализа необходимо получение монокристаллов белков. Проблема кристаллизации часто оказывается весьма сложной и требует не только соответствующего методического арсенала, но и высокого экспериментального искусства, а порой и просто везения. Для анализа кристаллов относительно простых соединений можно пользоваться так называемыми прямыми методами. В большинстве случаев оказывается необходимо ввести в молекулу белка тяжелый атом (например, атом ртути), причем так, чтобы пространственная структура белка существенно не искажалась — это известная проблема изоморфного замещения. Кристалл изоморфного производного белка и служит основным объектом исследования.

Рентгеноструктурный анализ сегодня является самым точным и мощным методом расшифровки пространственного строения белков (нередко разрешение достигает 0,15 — 0,2 нм). Основной вклад в разработку рентгеноструктурного анализа белков был внесен английской школой кристаллографов (Дж. Бернал, Д. Ходжкин, Дж. Кендрью, М. Перутц, Д. Филлипс и др.). Этим методом к настоящему времени расшифровано строение более 200 белков. Использование новейших методических подходов, наличие современной вычислительной базы позволяет резко сокращать сроки анализа и получать исчерпывающую информацию об упаковке белковой молекулы и ее динамических характеристиках.

На рисунках 49 — 52 приведены структуры некоторых белков, детально изученных на основе рентгеноструктурного анализа. Невольно приходит мысль, что многие из этих иллюстраций могли бы заслуженно занять место в коллекциях современной абстрактной живописи.

На рисунке 49 показана молекула цитохрома *c*: *a* — обычный ход пептидной цепи, где видны отдельные атомы (Р. Дикерсон, 1975); *b* — изображение той же конформации по методу Д. Ричардсон с акцентом на участки вторичной структуры. Как видно из рисунка, цитохром *c* имеет высокий процент α -спирализованных областей. Напротив, для преальбумина (рис. 50) характерно очень высокое содержание структур типа «складчатого листа», которые образуют основное ядро белковой молекулы. Еще более выразительны конформации ферментов триозофосфатизомеразы (рис. 51 *a, б*) и лактатдегидрогеназы (рис. 52), в которых упорядоченные «сгустки» β -структур в центре молекулы обрамлены α -спиралями различной длины.

Нередко возникает вопрос — правомочно ли оперировать структурой белка в кристалле, в то время как в реальных условиях белковая молекула находится в растворе или в среде со сложным составом и именно в таких условиях выполняет свою биологическую функцию? Хотя дискуссии не прекращаются, многочисленные экспериментальные данные позволяют утвердительно ответить на этот вопрос. Во-первых, кристаллы белков весьма своеобразны по своей природе, они содержат большое количество растворителя (воды), иногда свыше 60% общей массы кристалла, и даже в кристалле молекулы белка оказываются в «плавающем» состоянии. Во многих случаях показано, что структура белка в кристалле соответствует его предпочтительной конформации, ибо межмолекулярные взаимодействия в кристаллической решетке не вносят существенных «возмущений» в структуру. Во-вторых, многие белки даже



Ходжкин (Кроуфут Ходжкин) [Crowfoot-Hodgkin] Дороти (р. 1910), английский кристаллограф, иностранный член АН СССР (1976). Окончила Оксфордский университет (1932), с 1932 г. работает в Кембриджском университете. Ей принадлежат основополагающие труды по рентгеноструктурному исследованию белков, витаминов и других биологически активных соединений. С помощью кристаллографического анализа определила пространственную структуру инсулина (1936), пеницилина (1946), витамина В₁₂ (1956). Лауреат Нобелевской премии по химии (1964).



Филлипс [Phillips] Дэвид Хилтон (р. 1924), английский биофизик и кристаллограф. Окончил Кардиффский университет (1951), с 1966 г. — профессор Оксфордского университета. Основные работы — по изучению пространственного строения белков методом рентгеноструктурного анализа. Установил структуру лизоцима и предположил механизм его действия.

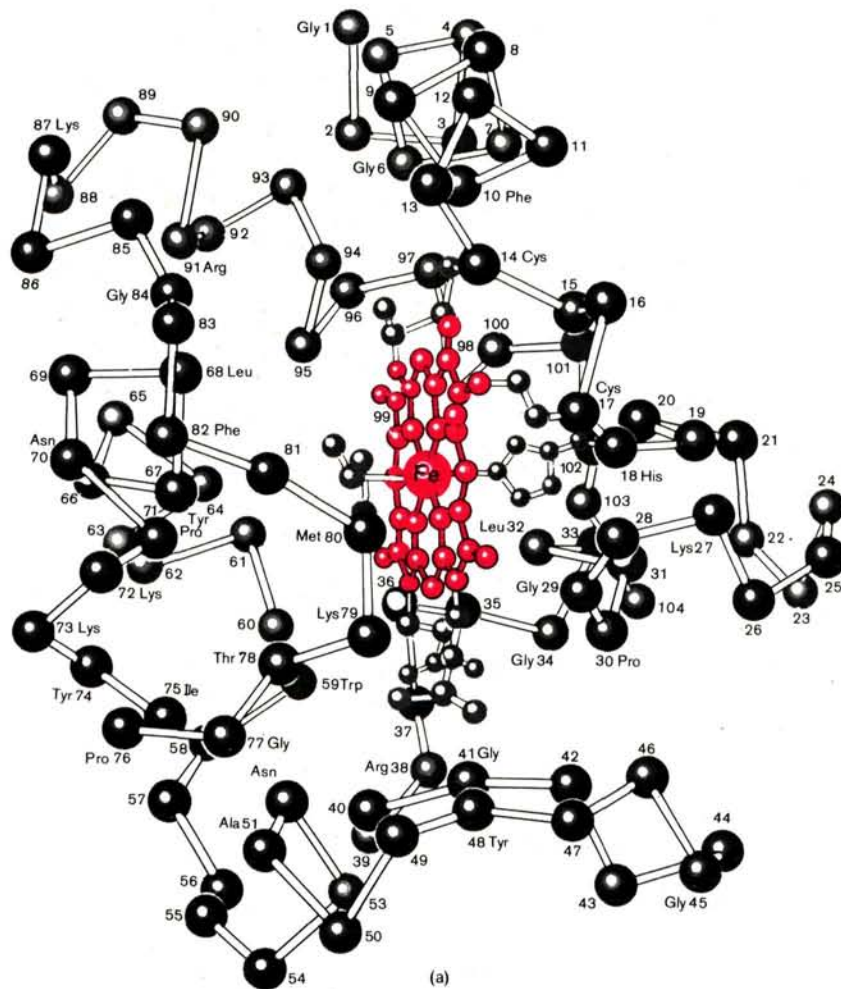


Рис. 49, а. Пространственная структура цитохрома с в кристалле; красным цветом выделен гем.

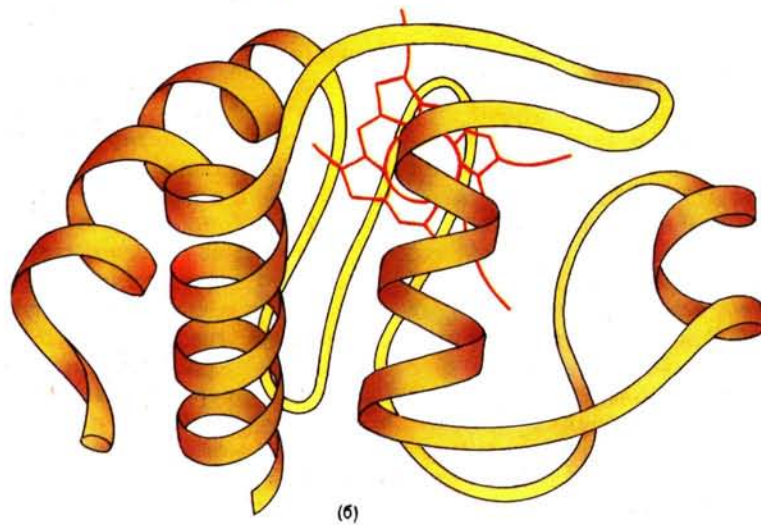


Рис. 49, б. Схематическое изображение укладки полипептидной цепи в цитохроме с.

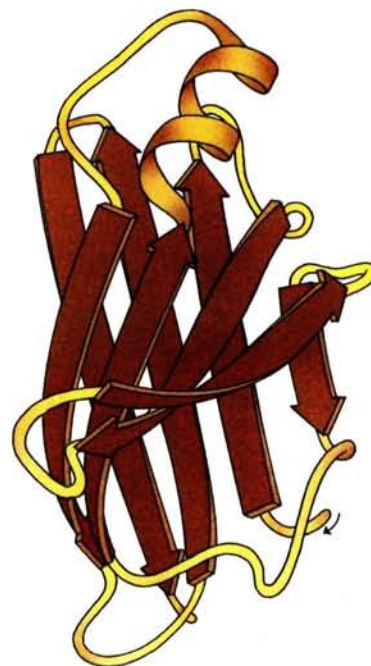
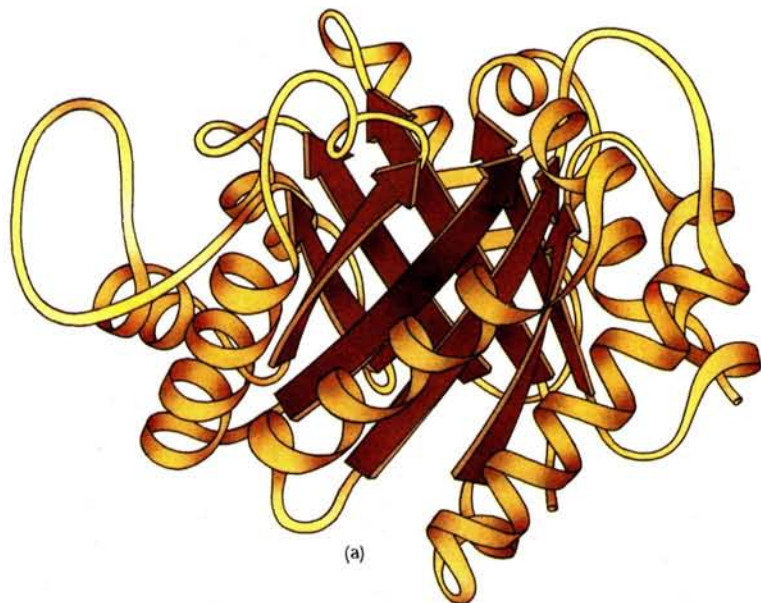


Рис. 50. Схема укладки полипептидной цепи в преальбумине.

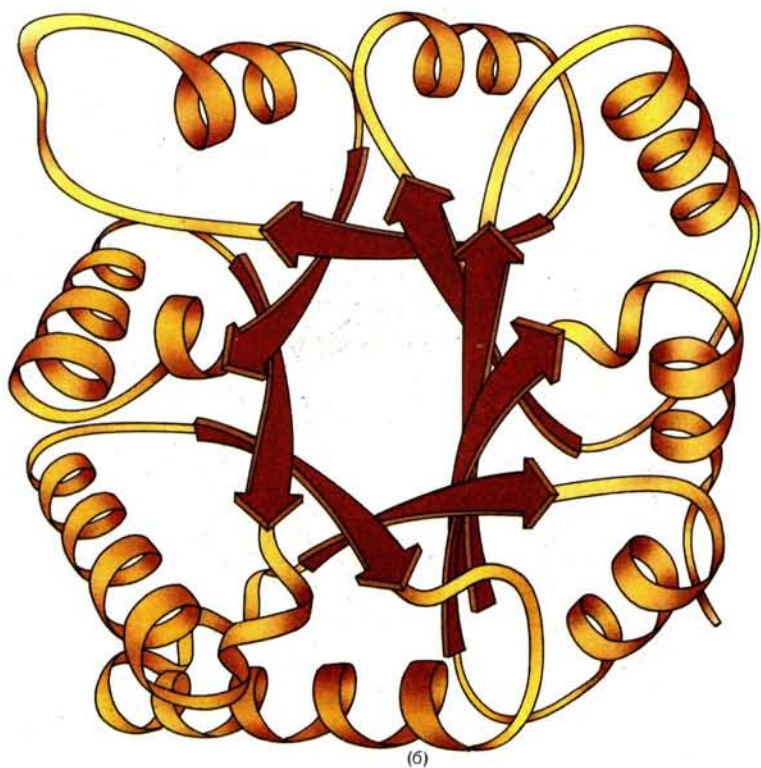


Рис. 51. Схема укладки полипептидной цепи в триозофосфатизомеразе: а — вид сбоку, б — вид сверху.



Кендрию (Kendrew) Джон Коудери (р. 1917), английский биофизик и биохимик. Окончил Кембриджский университет (1939); с 1946 г.— профессор Кембриджского университета, одновременно с 1975 г.— руководитель Европейской лаборатории молекулярной биологии в Гейдельберге. Основные работы — в области изучения строения белков. Впервые методом рентгеноструктурного анализа с применением ЭВМ определил пространственное строение молекулы миоглобина и предложил трехмерную модель его структуры (1960). Лауреат Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перутцем).

в кристалле сохраняют и проявляют биологическую активность, что подтверждается прямыми опытами с монокристаллами некоторых ферментов. Так, в ряде случаев удается внедрить непосредственно в кристалл фермента соответствующий субстрат (путем выдерживания кристалла в концентрированном растворе субстрата) и наблюдать расщепление субстрата, протекающее с достаточно высокой скоростью. Сопоставление рентгеноструктурных данных для свободных ферментов и их комплексов с ингибиторами (или псевдосубстратами) дает ценную информацию о конформационных превращениях и механизме функционирования белковых молекул (см. с. 190).

Следует отметить, что все выводы о зависимости между строением и биологической функцией многих белков, сделанные на основании рентгеноструктурных данных, до настоящего времени полностью оправдываются. Таким образом, можно утверждать, что белки, как правило, обладают достаточно устойчивой пространственной структурой, которая в кристалле или в растворе с определенными параметрами среды сохраняет свою компактность и, следовательно, «нативность» в биологическом смысле.

Своеобразная ситуация сложилась с исследованием третичной структуры мембранных белков. В силу гидрофобной природы они

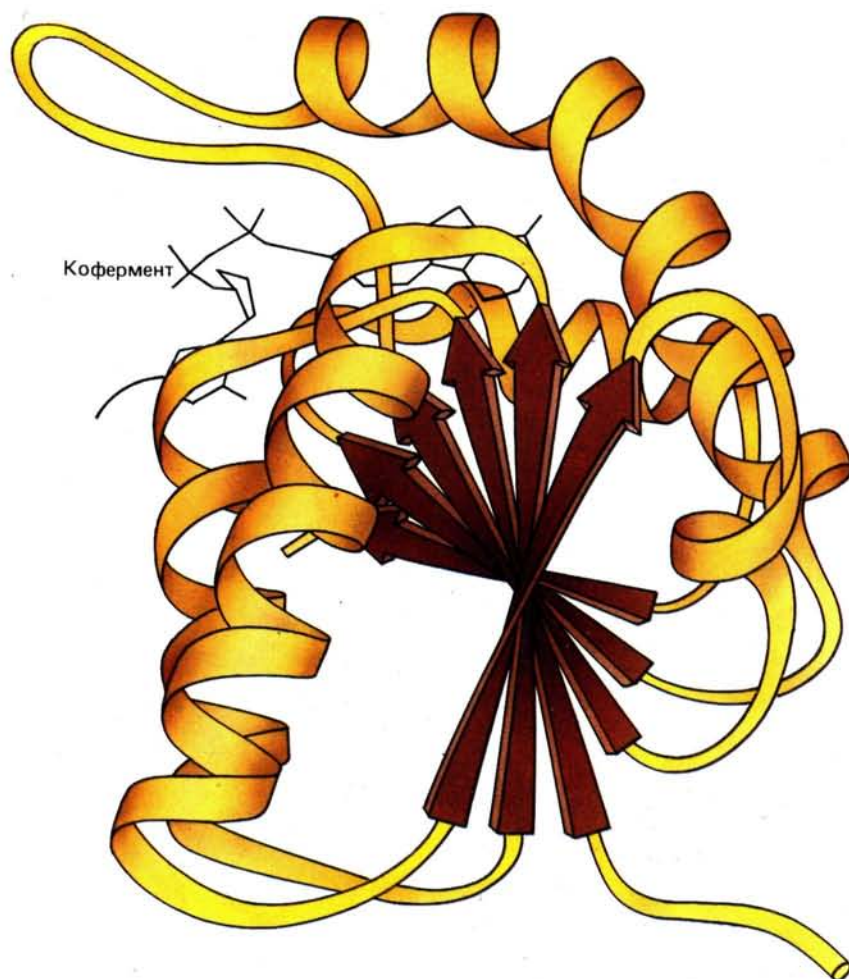


Рис. 52. Схема укладки полипептидной цепи в домене I лактатдегидрогеназы.

нерастворимы в воде, трудно поддаются выделению в индивидуальном состоянии и кристаллизации. Для определения пространственной структуры мембранных белков Р. Хендерсон предложил использовать анализ двумерных кристаллов с помощью электронной микроскопии. Двумерный кристалл — это, по существу, тонкая пленка, представляющая собой липидную мембрану с включенными в нее белками; такая пленка, получаемая с помощью особой техники, характеризуется упорядоченностью входящих в нее молекул. Получить трехмерную картину удается в результате анализа образца при различных углах наклона по отношению к направлению пучка электронов.

Точность собираемой таким путем информации зависит прежде всего от качества кристаллов; в большинстве случаев достигается разрешение не выше 1,5 — 2 нм. Тем не менее метод позволяет делать выводы о пространственной организации молекулы, особенно для больших белков, состоящих из нескольких субъединиц. Так, например, в ходе исследования трехмерной структуры цитохром-с-редуктазы — фермента системы окислительного фосфорилирования в митохондриях — удалось установить общую форму молекулы и взаимное расположение ее субъединиц (рис. 53). Размер молекулы фермента в перпендикулярном к плоскости мембраны направлении составляет около 15 нм. Центральная часть молекулы, толщиной около 5 нм, погружена в липидный бислой и составляет около 30% всего белка. С одной стороны мембраны участок молекулы фермента (~ 50% всего белка) выступает над плоскостью бислоя на 7 нм, с противоположной стороны (~ 20% белка) — на 3 нм. Фермент присутствует в кристалле в виде димеров; наиболее сильный контакт между мономерами наблюдается в центре мембраны.

Аналогичным путем определены также структуры таких мембранных белков, как цитохромоксидаза, K^+ , Na^+ -аденозинтрифосфатаза, белок межклеточных контактов, рецептор ацетилхолина и др.

Денатурация и ренатурация белков. До настоящего времени в белковой химии сохранился термин «неупорядоченная структура» или «неупорядоченный (статистический) клубок». Так называют любые пространственные формы полипептидной цепи, которые не охватываются каноническими конформациями. Принято говорить о переходах α -спираль \rightarrow клубок, β -структура \rightarrow клубок и т. п. Такого рода рассмотрение постепенно утрачивает свое значение, ибо неупорядоченная структура, если она входит в состав биологически активного белка, должна описываться в точных терминах (углы φ , ψ , χ , координаты атомов). Однако не канонические формы труднее поддаются характеристике с помощью физико-химических методов, что, по-видимому, и обусловило появление не очень точного термина «неупорядоченная структура».

Сложный процесс наблюдается при денатурации белка: специфическая пространственная структура (четвертичная, третичная и вторичная) разрушается, и с точки зрения конформационных характеристик денатурированный белок представляет собой «полный хаос». Денатурация — это такое изменение нативной конформации белковой молекулы, которое происходит при достаточно резком изменении внешних условий и сопровождается заметным изменением физико-химических свойств белка и полной потерей биологической активности.

В большинстве случаев белки денатурируют при 50 — 60 °С, а термостабильные белки — при температурах около 100 °С. Температура, при которой 50% нативного белка подвергается денатурации, называется температурой перехода. Наглядным примером такого рода тепловой денатурации является свертывание белка при варке яиц.



Анфинсен [Anfinsen] Кристиан Бемер (р. 1916), американский химик и биохимик. Окончил Пенсильванский университет (1939), с 1963 г. — руководитель лаборатории биохимии в Национальном институте здоровья в Бетесде (близ Вашингтона). Основные работы посвящены изучению структуры и функции, а также синтезу белков. Ему принадлежат основополагающие труды по расшифровке первичной структуры рибонуклеазы, механизму ее денатурации и ренатурации. Лауреат Нобелевской премии по химии (1972, совместно с С. Муром, У. Стейном).

В некоторых случаях денатурацию вызывает весьма незначительное изменение рН среды. Одни белки стабильны при кислых значениях рН (например, пепсин), другие — при щелочных (щелочные протеиназы), третьи — при нейтральных. Часто для денатурации белков используют 8М раствор мочевины или 6М раствор гидрохлорида гуанидина.

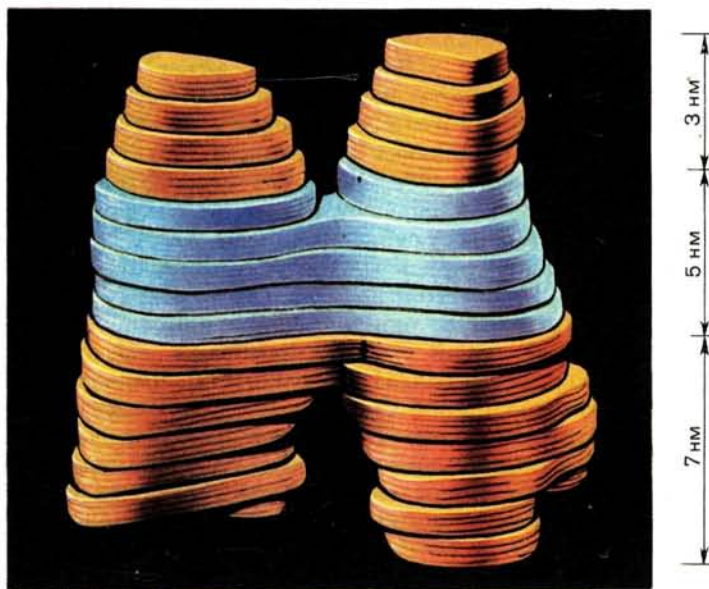


Рис. 53. Пространственная модель димера цитохром-*c*-редуктазы в мембране.

Нередко денатурация белка проводится с помощью детергентов. Существует четыре класса детергентов. Наиболее часто используемыми анионными детергентами являются додецилсульфат натрия, холат и дезоксихолат натрия. *Анионные* детергенты действуют при значениях рН ниже изоэлектрической точки белка. *Катионные* детергенты в основном представлены алкильными производными триметиламмонийбромидов или хлоридов (например, тетрадецил-, тридецил- и додециламмонийбромиды), которые вызывают осаждение белка при щелочных значениях рН. В настоящее время часто используются *цвиттер-ионные* детергенты (цвиттергернты), позволяющие работать в широких диапазонах рН. Сравнительно недавно вошел в практику 3-(3-холамидопропил)диметиламмоний-3-пропансульфонат (ЧАПС — фирменное название по первым буквам английского названия детергента) — цвиттер-ионное производное холевой кислоты. Наконец, широко применяются *неионные* детергенты, такие, как тритон X-100, твин-20, твин-60, твин-80, эмульфоен, дигитонин, алкиловые эфиры сахарозы (например, β -октилглюкозид).

Такие реагенты, как β -меркаптоэтанол и дитиотреитол, восстанавливающие дисульфидные связи, обычно облегчают денатурацию белков. В ряде случаев денатурации могут способствовать хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетрауксусная кислота), которые связывают двухвалентные катионы (Ca, Mg и др.),

играющие роль кофакторов ферментов. Напротив, добавление кофакторов или субстратов делает ферменты более устойчивыми к денатурации. В случае мембранных белков стабилизирующий эффект оказывает добавление липидов.

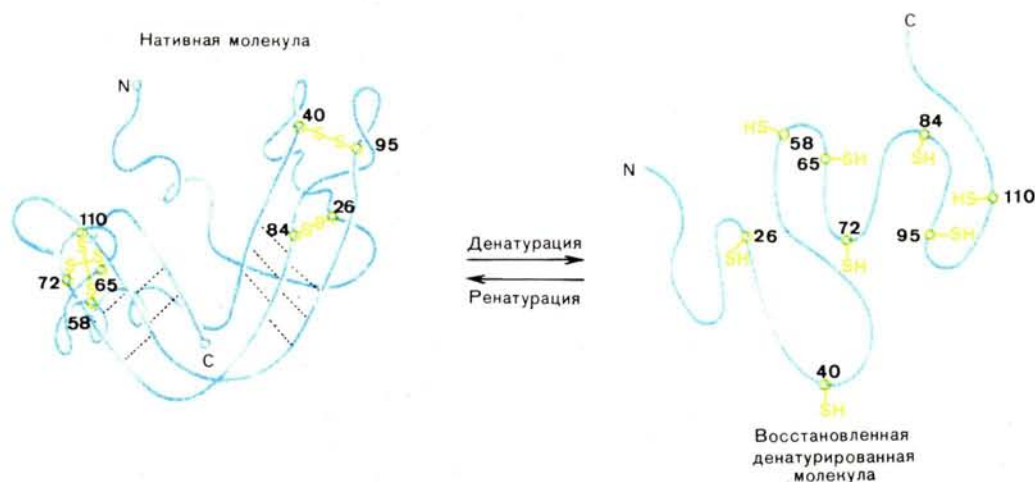
Важной является проблема обратимости денатурации, т. е. возможность вновь получить белок с исходной пространственной структурой и биологическими свойствами. Такой процесс называется ренатурацией. Впервые полную ренатурацию белка удалось осуществить на примере рибонуклеазы (К. Анфинсен, 1961).

Если полностью «развернуть» молекулу рибонуклеазы путем восстановления четырех ее дисульфидных мостиков при действии меркаптоэтанола в 8М растворе мочевины, а затем провести окисление в контролируемых условиях, то молекула вновь приобретает нативную конформацию и полностью восстанавливает ферментативную активность (рис. 54).

Эти опыты показывают, что программа «самосборки» белка закодирована в его первичной структуре. По всей вероятности, важное значение при ренатурации белка имеет образование «ядер», т. е. небольших участков упорядоченной вторичной структуры (стадия нуклеации). За этим сравнительно медленным процессом следует быстрое сворачивание цепи в нативную структуру. На первых этапах ренатурации белков, в поддержании нативной конформации которых участвуют дисульфидные мостики, образуются промежуточные производные с «правильными» и «неправильными» дисульфидными связями. В ряде случаев удавалось останавливать процесс ренатурации на определенных стадиях и выделять такие частично свернутые формы. Поскольку в целом сборка белка является достаточно быстрым процессом, можно сделать вывод о том, что природа не перебирает все возможные комбинации в очередности замыкания дисульфидных мостиков (при 4 S—S-связях их 105, а при 5 — уже 945), а сворачивание полипептидной цепи идет по ограниченному числу направлений и приводит к конформации, характеризующейся минимальной свободной энергией.

Изучение процессов денатурации и ренатурации, которое проводится с помощью разнообразных физико-химических методов (седиментация, оптические методы, метод ядерного магнитного резонанса, электрофорез, хроматография и др.), позволяет лучше

Рис. 54. Денатурация и ренатурация рибонуклеазы А.



понять конформационные особенности белков, устойчивость их пространственной структуры и природу взаимодействий, важных для стабилизации нативной конформации и проявления биологической активности.

Пространственная структура пептидов

Конформационные состояния пептидов определяются теми же силами и взаимодействиями, что и пространственная структура белков. Однако меньшие размеры молекул снижают число внутримолекулярных контактов в пептиде, что приводит к увеличению роли среды в стабилизации конформации пептида, уменьшению энергетической дифференциации форм и в целом к увеличению конформационной подвижности пептидов по сравнению с белками, фрагментами которых в ряде случаев они и являются. Этим обстоятельством можно объяснить тот факт, что для большинства природных и синтетических линейных пептидов исследования в растворах не обнаружили четко фиксированных структур. Как экспериментальные, так и расчетные данные свидетельствуют об участии в равновесии сложного ансамбля конформеров, из которых с большей или меньшей степенью надежности выявлялись характеристики отдельных форм. При этом оставался открытым вопрос о том, какая из выявленных форм отвечает «биологически активной»

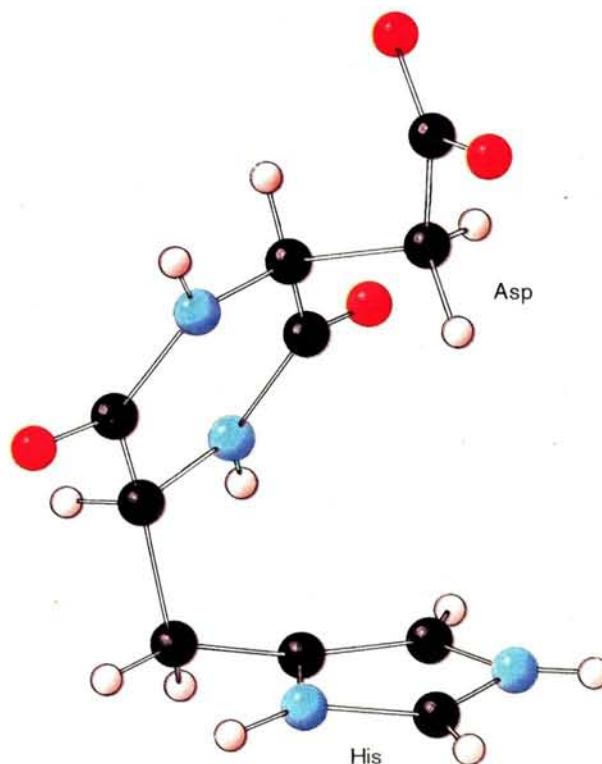


Рис. 55. Пространственная структура цикла (—His—Asp—) в кристалле.

структуре, т. е. структуре, ответственной за выполнение биологической функции.

Существенно иная ситуация сложилась при исследовании циклических пептидов. К ним относятся ряд физиологически активных пептидов, содержащих дисульфидные связи (гормоны, токсины), многие пептидные антибиотики, а также большое число модельных синтетических пептидов. На многочисленных примерах показано, что циклическая структура, существенно ограничивающая конформационную подвижность пептида, способствует формированию небольшого числа специфических конформаций.

Циклопептиды с относительно малым размером цикла (6—12 атомов) имеют весьма ограниченную подвижность циклического остова и часто содержат в своем составе *цис*-амидные связи (К. Блеха, 1967). В частности, широко распространенные циклодипептиды (например, 2,5-дикетопиперазины) (рис. 55) имеют исключительно *цис*-амидные связи (вторичные или третичные), аналогичным свойством обладают и циклотрипептиды (хотя их исследовано гораздо меньше), в циклических тетрапептидах обычно встречаются как *цис*-, так и *транс*-амидные связи. Несколько примеров приводится на рисунках 56 и 57. В циклах больших размеров *цис*-амидные связи встречаются значительно реже, притом только для третичных амидов, образованных с участием пролина, N-метиламинокислот или других N-замещенных аминокислот.

Начиная с циклических пентапептидов часто встречающимся элементом в циклических пептидах становятся β -изгибы (водородные связи типа 4 \rightarrow 1); кроме того, встречаются (хотя и реже) так называемые γ -изгибы (водородные связи типа 3 \rightarrow 1) (рис. 58).

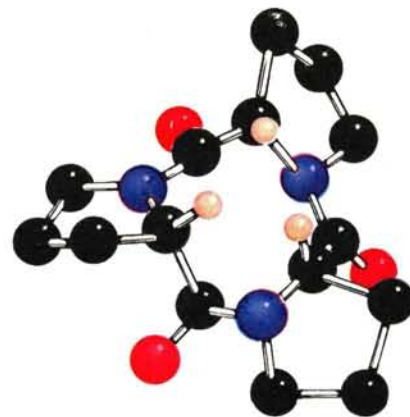


Рис. 56. Конформация цикло(-Pro)₃ в растворе и в кристалле.

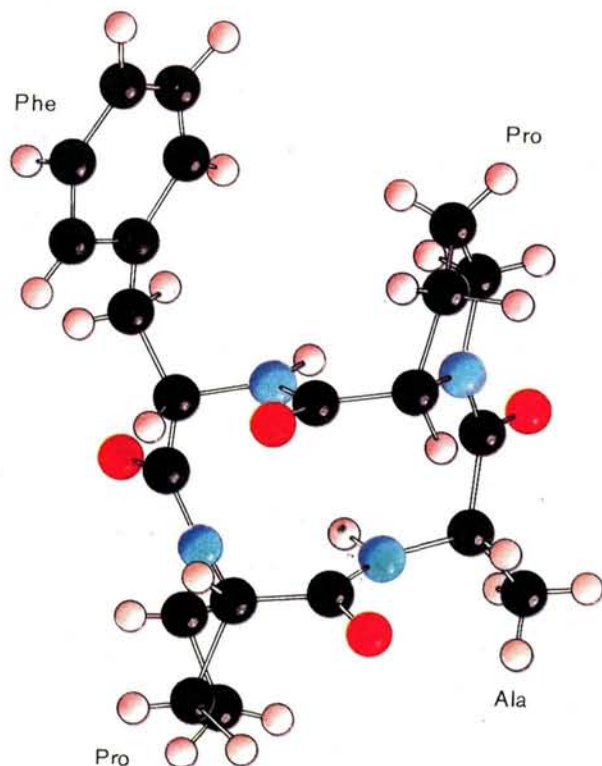


Рис. 57. Пространственная структура цикло(-Phe-Pro-Ala-Pro-).

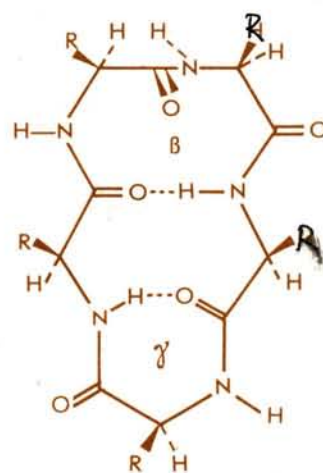


Рис. 58. Возможные типы внутримолекулярных водородных связей в циклических пентапептидах.

Обобщая теоретические представления о конформации средних циклов, И. Дале в 1963 г. пришел к выводу, что минимальным размером пептидного цикла, в котором становится возможной реализация свободной от напряжения алмазоподобной структуры, является гексапептидный 18-членный цикл. Действительно, циклогексапептиды образуются с высокими выходами из различных исходных продуктов; описаны сотни представителей этой группы, как синтетических, так и природных.

В циклопептидах с шестью (рис. 59) и большим числом остатков возможно образование конформации складчатого листа. Наиболее яркий пример — антибиотик грамицидин S (см. с. 285). В процессе синтеза грамицидина S (Р. Швицер, 1957) была впервые обнаружена так называемая реакция удвоения, представляющая собой частный случай реакции циклоолигомеризации:

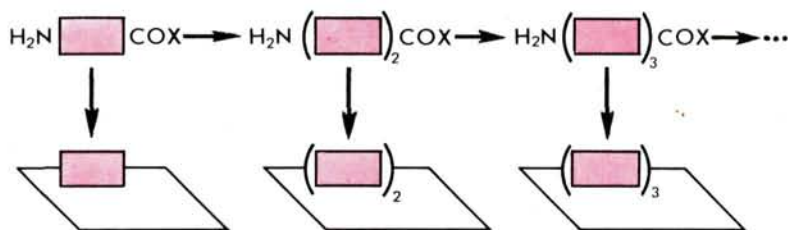
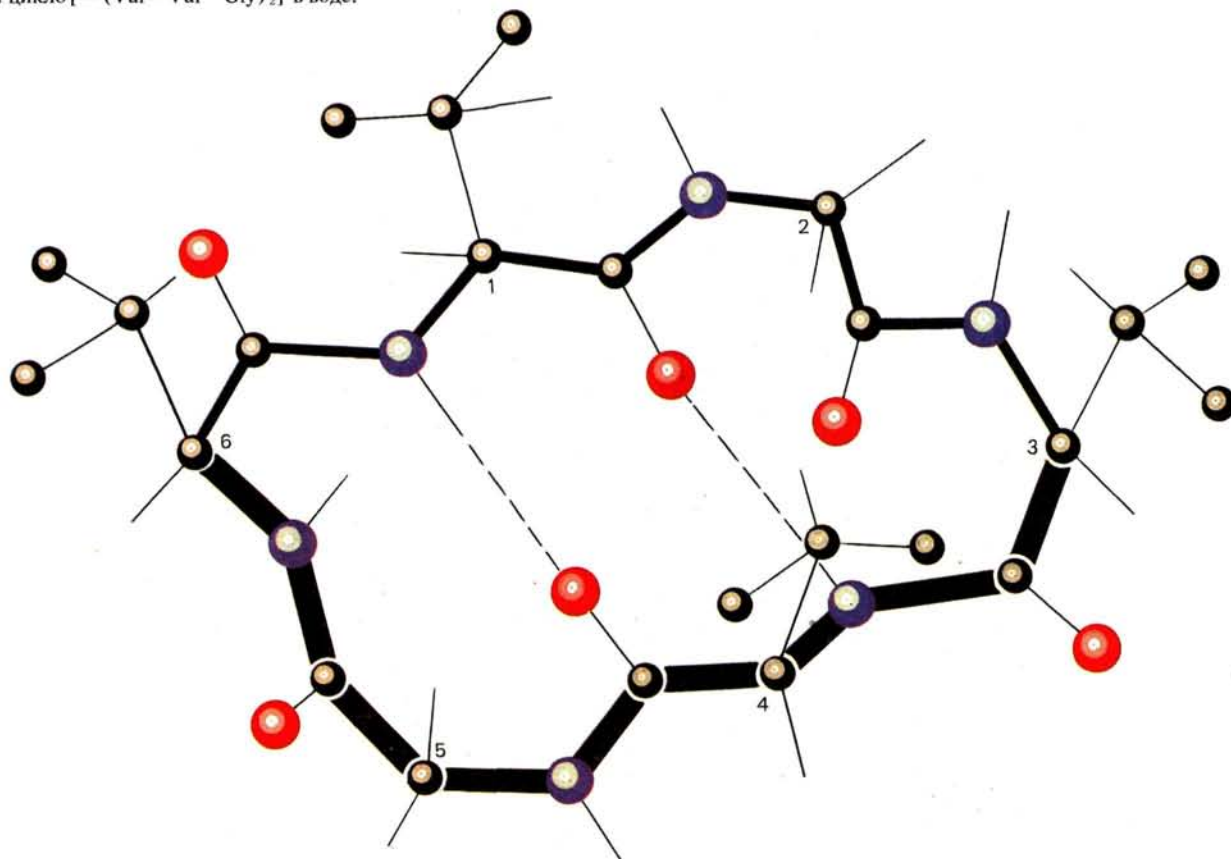


Рис. 59. Конформация складчатого листа цикло[—(Val—Val—Gly)₂] в воде.



Получение из линейного пентапептида грамицидина S, т. е. циклопептида с удвоенной длиной цепи, протекает особенно легко, что, по-видимому, объясняется конформационными факторами — образованием антипараллельных β -структурных ассоциатов (рис. 60, а, б) или β -шпилек (рис. 60, в) на стадии, предшествующей циклизации.

Аналогичные процессы наблюдаются и для линейных трипептидов, легко циклизующихся в циклогексапептиды.

Конформации циклопептидов, содержащих 15 — 20 и более атомов в цикле, хотя и ограниченные в своей подвижности, тем не менее имеют достаточно большое число степеней свободы, и обычно в равновесии находятся несколько форм близкой энергии. Наиболее устойчивы в конформационном отношении циклопептиды, имеющие добавочный ковалентный мостик, т. е. макробициклическую струк-

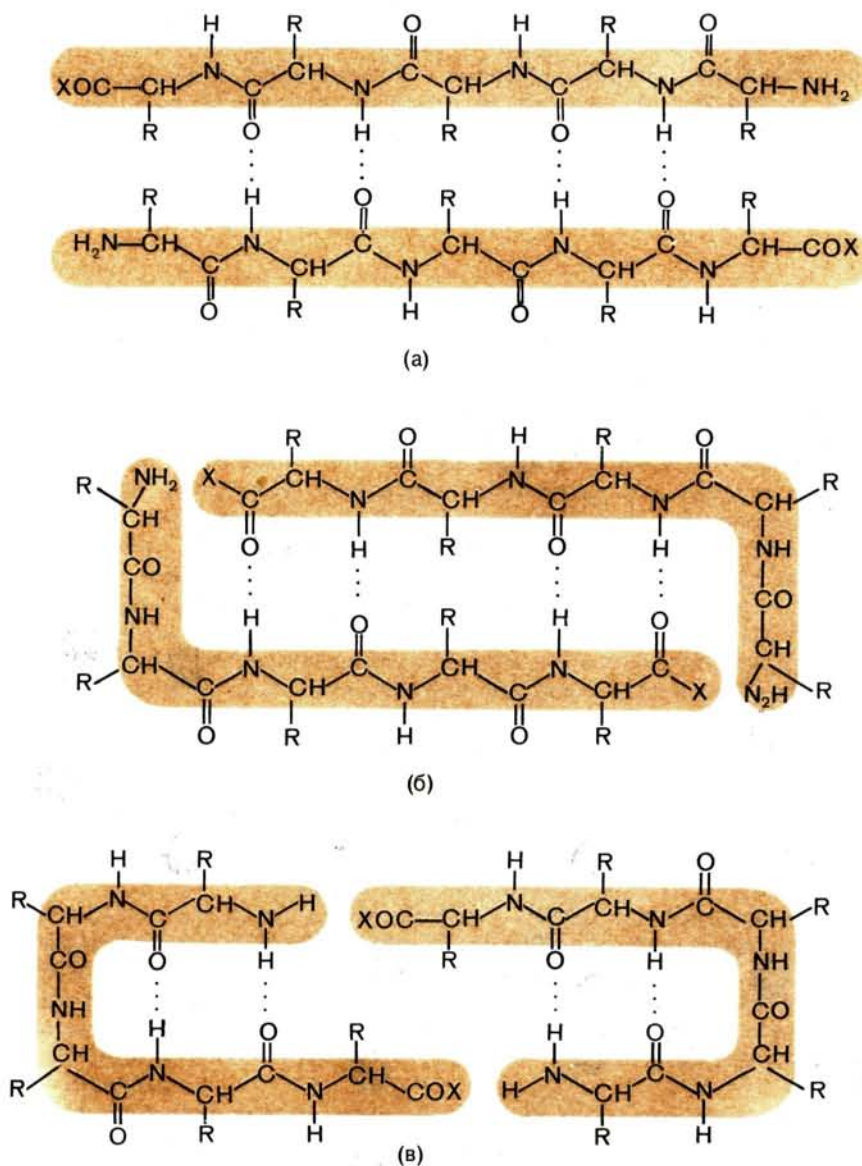


Рис. 60. Конформации линейных пентапептидов, способствующие реакции удвоения.

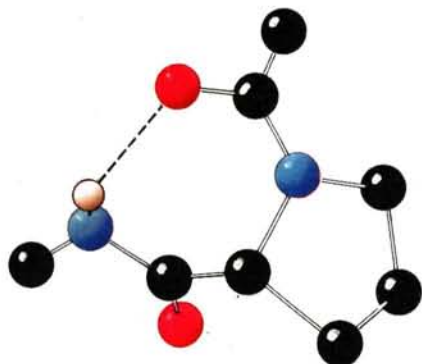


Рис. 61. Конформация метиламида ацетил-D-пролина в CCl_4 и гексане.

туру. Примером таких веществ служат аманидины — токсины бледной поганки и апамин — токсин из яда пчелы (см. с. 279).

Исследование пространственной структуры линейных пептидов в связи с уже упоминавшейся конформационной подвижностью является более сложной задачей, чем изучение циклопептидов. Простейшие модели — амиды ациламинокислот в неполярных средах (CCl_4 , гексан) образуют γ -изгибы (водородные связи $3 \rightarrow 1$) (рис. 61), удлинение цепи сопровождается появлением β -изгибов (связи $4 \rightarrow 1$) (рис. 62). Начиная с 10 — 12-членных пептидов повышается вероятность образования β -структурных ассоциатов и α -спиральных участков, однако переход к водным средам, как правило, разрушает внутримолекулярные водородные связи в коротких пептидах.

Большой интерес вызывает пространственная структура биологически активных олигопептидов. Большинство из них не образует четких пространственных форм в водном растворе. Вместе с тем в ряде случаев прослеживается присутствие свернутых форм со сближенными C- и N-концевыми участками. В неполярных средах или при взаимодействии с матрицей рецептора свернутые формы могут стабилизироваться электростатическими взаимодействиями противоположно заряженных группировок (рис. 63). Для многих биологически активных пептидов — брадикинина, тафцина, энкефалинов, пептида дельта-сна, фрагментов кортикотропина, меланотропина и др. — были получены циклические аналоги, в которых свернутые конформации фиксированы образованием ковалентных связей. Проявление этими аналогами высокой биологической актив-

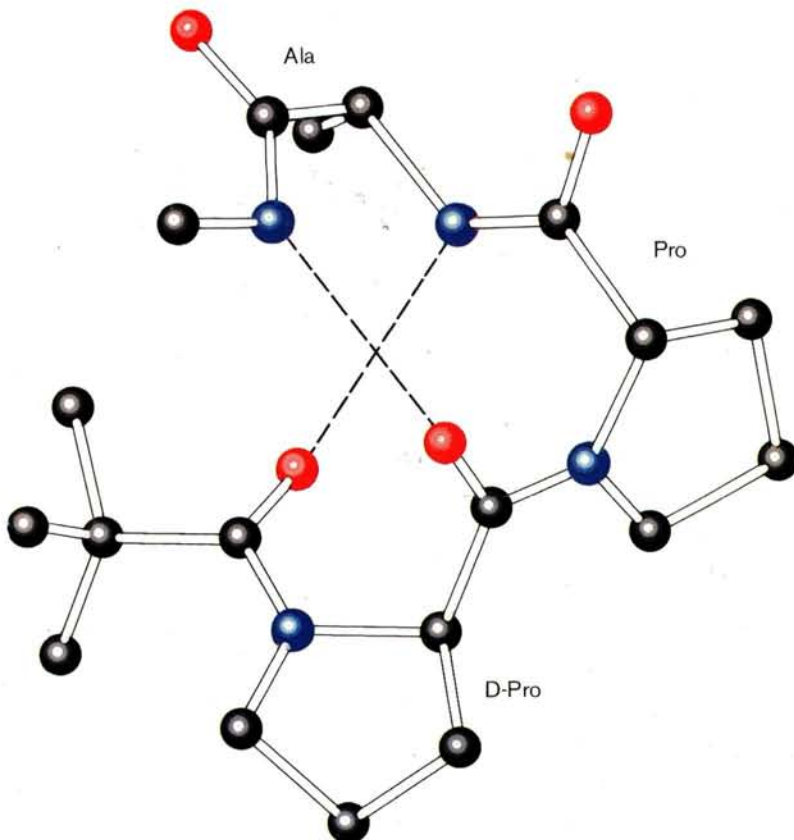


Рис. 62. Конформация $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{CO}-\text{D-Pro}-\text{Pro}-\text{Ala}-\text{NHCH}_3$ в кристалле.

ности подтверждало, что именно свернутые структуры взаимодействуют с биологической мишенью. Такой подход к созданию аналогов биологически активного пептида, учитывающий стереоэлектронную структуру молекулы в целом (в противовес локальным изменениям на отдельных участках), получил название топохимического (см. с. 173).

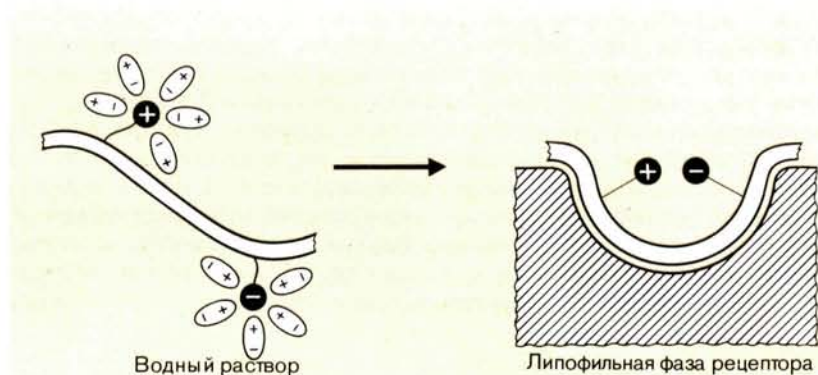


Рис. 63. Образование внутримолекулярных ионных пар при дегидратации ионогенных групп.

Методы исследования пространственного строения белков и пептидов в растворе. Конформационные состояния белков и пептидов в растворе исследуются различными методами, каждый из которых имеет свои достоинства и ограничения. Информацию о вторичной структуре можно получить из ультрафиолетовых спектров поглощения в области 180 — 210 нм: как показали исследования регулярных полипептидов (например, полилизина), α -спираль имеет меньшее (гипохромизм), а β -структура большее (гиперхромизм) поглощение, чем неупорядоченный клубок. В течение долгого времени процентное содержание α -спиральных структур оценивали по кривым дисперсии оптического вращения (уравнение Моффита, 1956). В настоящее время содержание различных типов вторичных структур определяется из спектров кругового дихроизма (КД) на основе сравнения спектров пептидов и белков с кривыми КД канонических вторичных структур, полученных для регулярных полипептидов (Э. Блоут, 1961) (рис. 64) или выведенных на основе анализа кривых КД ряда белков с установленной пространственной структурой в кристалле.

Инфракрасная спектроскопия (ИК) позволяет надежно различать *транс*- и *цис*-амидные связи в пептидах: наличие полосы при $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$ указывает на присутствие *транс*-пептидных связей, а отсутствие полос в этой области — на *цис*-конфигурацию всех амидных связей. ИК-спектры разбавленных растворов пептидов в растворителях, не являющихся сильными акцепторами протонов (например, CCl_4 или CHCl_3), дают информацию о внутримолекулярных водородных связях: полосы при $3420 - 3480 \text{ см}^{-1}$ отвечают свободным, а полосы при $3300 - 3380 \text{ см}^{-1}$ — водородносвязанным NH-группам.

Для количественных оценок различных типов вторичных структур пользуются спектроскопией комбинационного рассеяния, срав-



Блоут (Blout) Элкан Роджерс (р. 1919), американский биохимик, иностранный член АН СССР (1976). Окончил Принстонский университет (1939), с 1962 г. — профессор Гарвардского университета, член президиума Национальной Академии наук США. Основные работы — по изучению пространственного строения полипептидов. Предложил двойную спираль для полипептидов ряда грамицидина А.



Жардецкий (Jardetzky) Олег (р. 1929), американский физикохимик. Окончил Миннесотский университет (1954); в настоящее время — профессор Стэнфордского университета (1969), директор Стэнфордской лаборатории ядерного магнитного резонанса. Известен фундаментальными трудами в области ядерного магнитного резонанса биополимеров, в частности белков.

нивая спектр образца с набором реперных спектров, характерных для определенных типов вторичных структур (рис. 65). Преимуществом спектров комбинационного рассеяния является то, что они могут быть сняты как для образцов в твердом состоянии, так и в самых разнообразных растворителях, в том числе в обычной и тяжелой воде. Этот метод дает информацию не только о вторичной структуре, но и об элементах третичной структуры: о конфигурации дисульфидных связей, участии боковых цепей остатков тирозина в водородных связях, об экспонированном (доступном для растворителя) или спрятанном в белковой глобуле положении остатков триптофана.

Микроокружение ароматических остатков в белках исследуется методом флуоресценции. Для этих целей используются также анализ спектров КД в области 250 — 300 нм и дифференциальные УФ-спектры, получаемые при изменении рН водной среды, температуры или состава растворителей. По спектрам КД следят за конформационными превращениями белков и пептидов в процессе их функционирования, а также проверяют, сохранилась ли нативная конформация при изменении условий окружающей среды или при химической модификации природного соединения. Для изучения конформации белков, содержащих парамагнитные центры — такие, как гем в гемоглобине или спиновые метки (различные группы, имеющие неспаренный электрон), введенные с помощью хими-

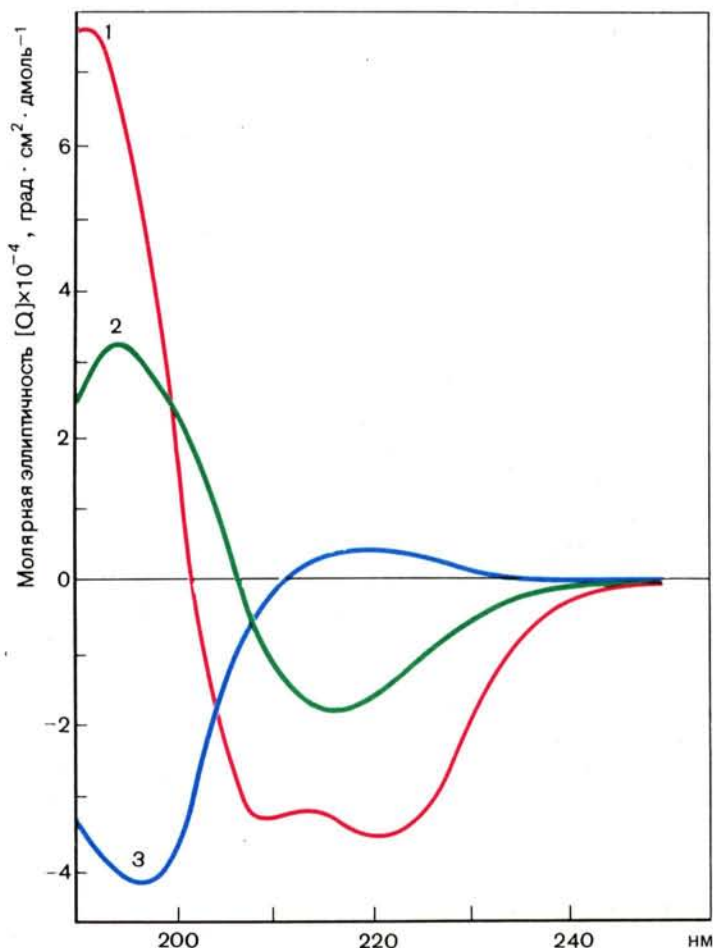


Рис. 64. Спектры КД поли-L-лизина в водных растворах в α -спиральной (1), β -структурной (2) и неупорядоченной (3) конформациях.

ческой модификации, используется метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Этим методом обычно удается определить ряд внутримолекулярных расстояний, получить сведения о форме молекулы.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) при использовании современных подходов позволяет полностью расшифровать пространственное строение пептида или небольшого белка с молекулярной массой до 10 000 — 15 000. Конечно, необходимыми условиями являются наличие хорошей приборной базы (прибор с рабочей частотой для протонов 300 — 500 МГц), правильная стратегия исследования применительно к конкретному объекту и достаточное количество вещества (~ 1 мкмоль пептида или белка). Большой вклад в изучение пептидов и белков методом ЯМР внесли О. Жардецкий, К. Коппл и К. Вютрих.

Важнейшим этапом является отнесение сигналов в спектре ^1H -ЯМР. Сначала анализируются двумерные спектры, например COSY (корреляционная спектроскопия химических сдвигов, COSY — сокращение от английского названия), которые содержат всю информацию о спин-спиновых взаимодействиях (передаваемых через химические связи) между протонами молекулы. Эффективность такого взаимодействия протонов, характеризующая константой спин-спинового взаимодействия, быстро падает с увеличением числа



Коппл [Kopple] Кеннет (р. 1930), американский химик-биоорганик, с 1970 г. — профессор Иллинойского технологического института. Один из ведущих специалистов в области изучения конформации пептидов. Исследовал реакции переноса электронов с целью создания полимерных полупроводников.

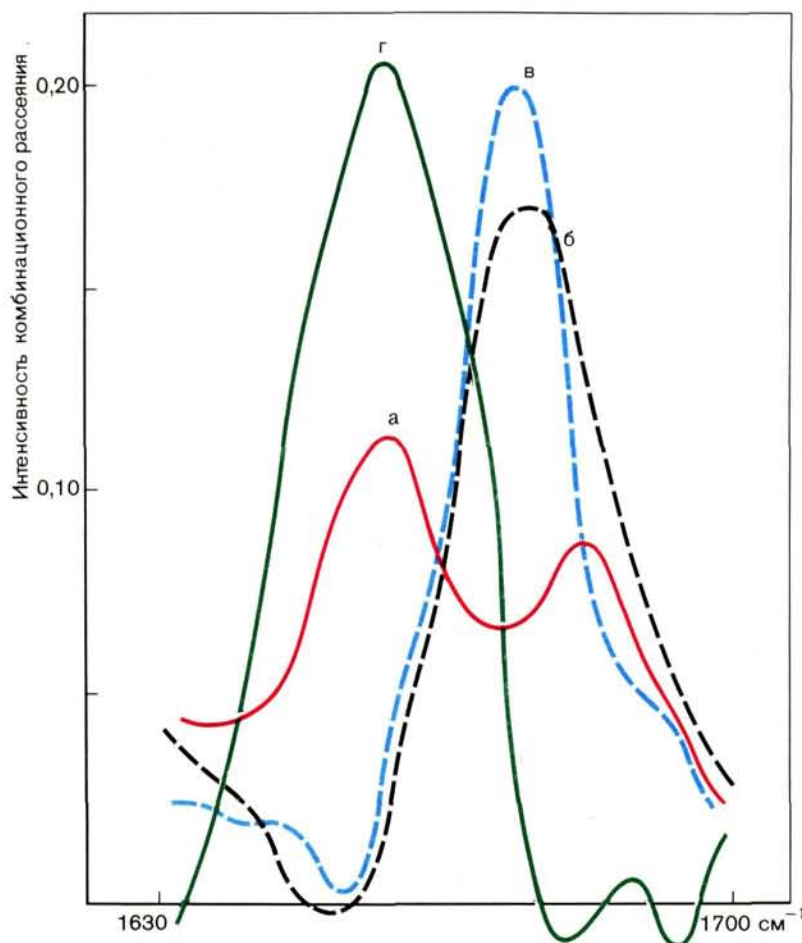
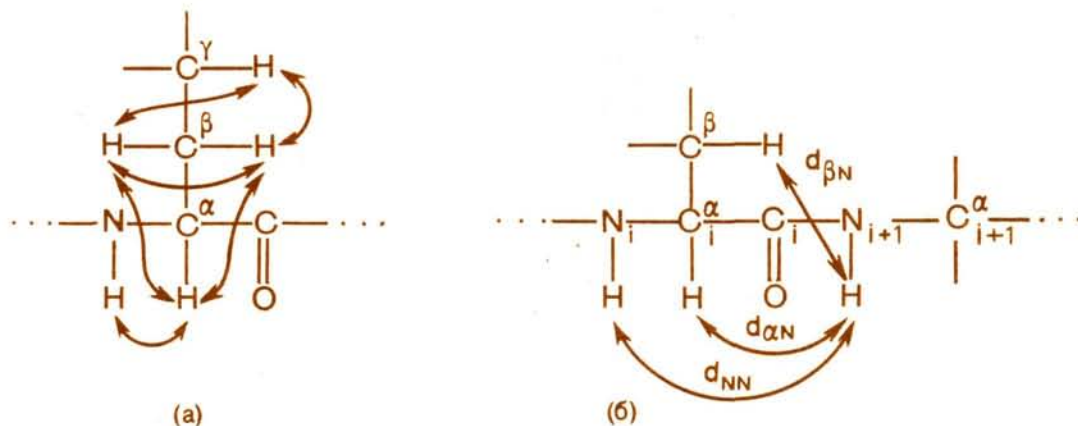


Рис. 65. Спектры комбинационного рассеяния: *а* — α -спираль, *б* — антипараллельная β -структура, *в* — параллельная β -структура, *г* — β -изгиб.



Вютрих [Wüthrich] Курт (р. 1938), швейцарский биофизик. Окончил Бернский университет, профессор биофизики Швейцарского федерального технологического института в Цюрихе. Основные научные интересы связаны с изучением пространственного строения белков и нуклеиновых кислот с применением метода ЯМР.

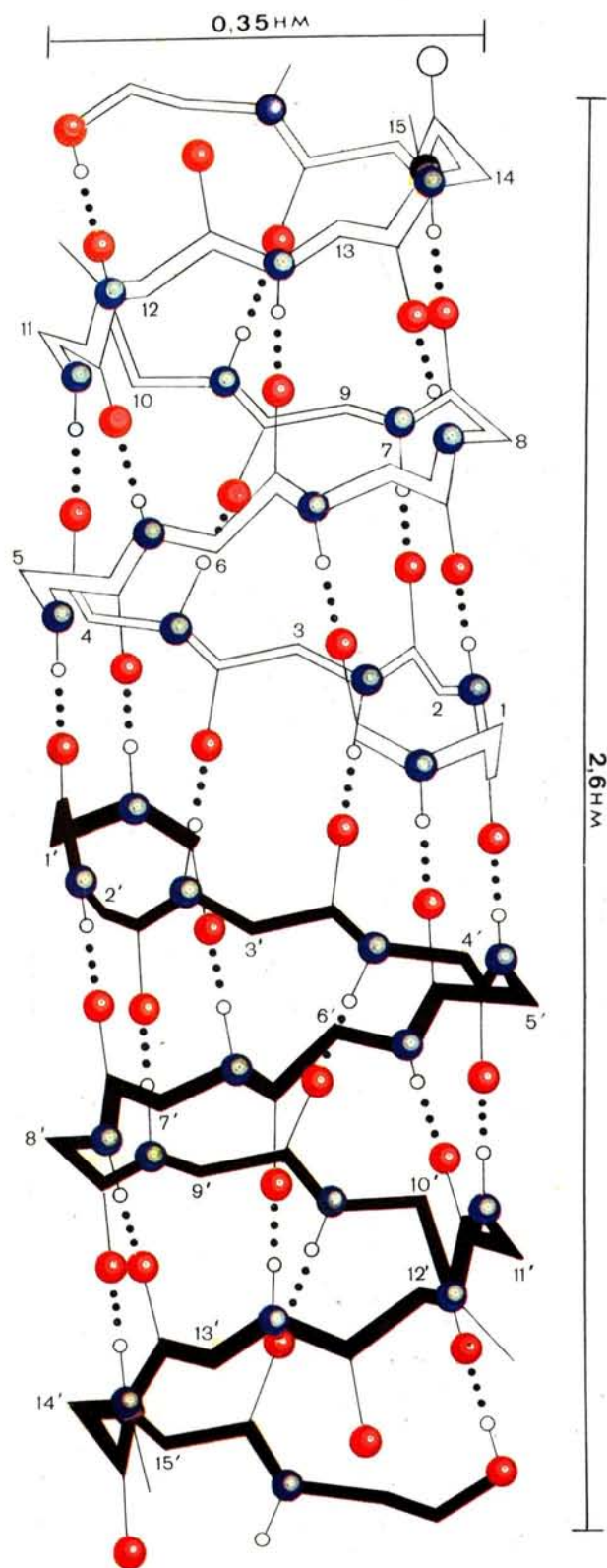
Рис. 66. Спин-спиновые взаимодействия в пептидном фрагменте, анализируемые с помощью спектров COSY (а) и NOESY (б).



разделяющих их ковалентных связей и обычно становится ненаблюдаемой уже для четырех связей. Поэтому сигналы протонов аминокислотных остатков можно классифицировать по типам спиновых систем в зависимости от числа атомов водорода при углеродных атомах C^α , C^β , C^γ и т. д. (рис. 66, а).

Затем анализируются двумерные спектры ядерного эффекта Оверхаузера (сокращенно NOESY), которые содержат всю информацию о диполь-дипольных взаимодействиях между пространственно сближенными протонами молекулы. Величина ядерного эффекта Оверхаузера обратно пропорциональна шестой степени расстояния между ядрами и для пептидов и для небольших белков становится пренебрежимо малой при расстояниях $\geq 0,4 - 0,5$ нм. Основываясь на известной аминокислотной последовательности белка или пептида, спиновые системы протонов (отнесенные к определенным типам аминокислотных остатков) «соединяют» между собой, выявляя диполь-дипольные взаимодействия между протоном NH ($i + 1$)-го остатка и протонами NH, $C^\alpha H$ и $C^\beta H$ предыдущего i -го остатка (рис. 66, б). Следуя таким образом вдоль полипептидной цепи, получают полное отнесение сигналов в спектре 1H -ЯМР к определенным остаткам аминокислотной последовательности.

Одновременно с отнесением сигналов в двумерных спектрах 1H -ЯМР получают практически всю необходимую информацию для реконструкции пространственной структуры белка в растворе. Так, константы спин-спиновых взаимодействий между протонами $H-NC^\alpha-H$ ($^3J_{HN C^\alpha H}$ характеризует угол φ), $H-C^\alpha C^\beta-H$ ($^3J_{HC^\alpha C^\beta H}$ угол χ^1) (М. Карплюс, В. Ф. Быстров) и величины ядерного эффекта Оверхаузера между протонами $C^\alpha H \dots HN_{i+1}$ [$d_{\alpha N}(\psi_i)$], $C^\beta H \dots HN_{i+1}$ [$d_{\beta N}(\chi^1 \psi_i)$] и $N_i H \dots HN_{i+1}$ [$d_{NN}(\varphi_i, \psi_i)$] позволяют определить торсионные углы φ_i , ψ_i , χ^1 , χ^2 -го аминокислотного остатка. Анализ ядерного эффекта Оверхаузера между протонами удаленных по аминокислотной последовательности остатков дает возможность выявить элементы вторичной структуры белка (α -спирали, β -структуры, β -изгибы). Существенное значение имеет обнаружение внутримолекулярных водородных связей, характерных для вторичной структуры белков и пептидов. Для этого изучают скорость обмена атомов водорода группы NH с растворителем (например, дейтерообмен в растворах 2H_2O) и таким образом получают данные об их доступности внешней среде. На заключительном этапе



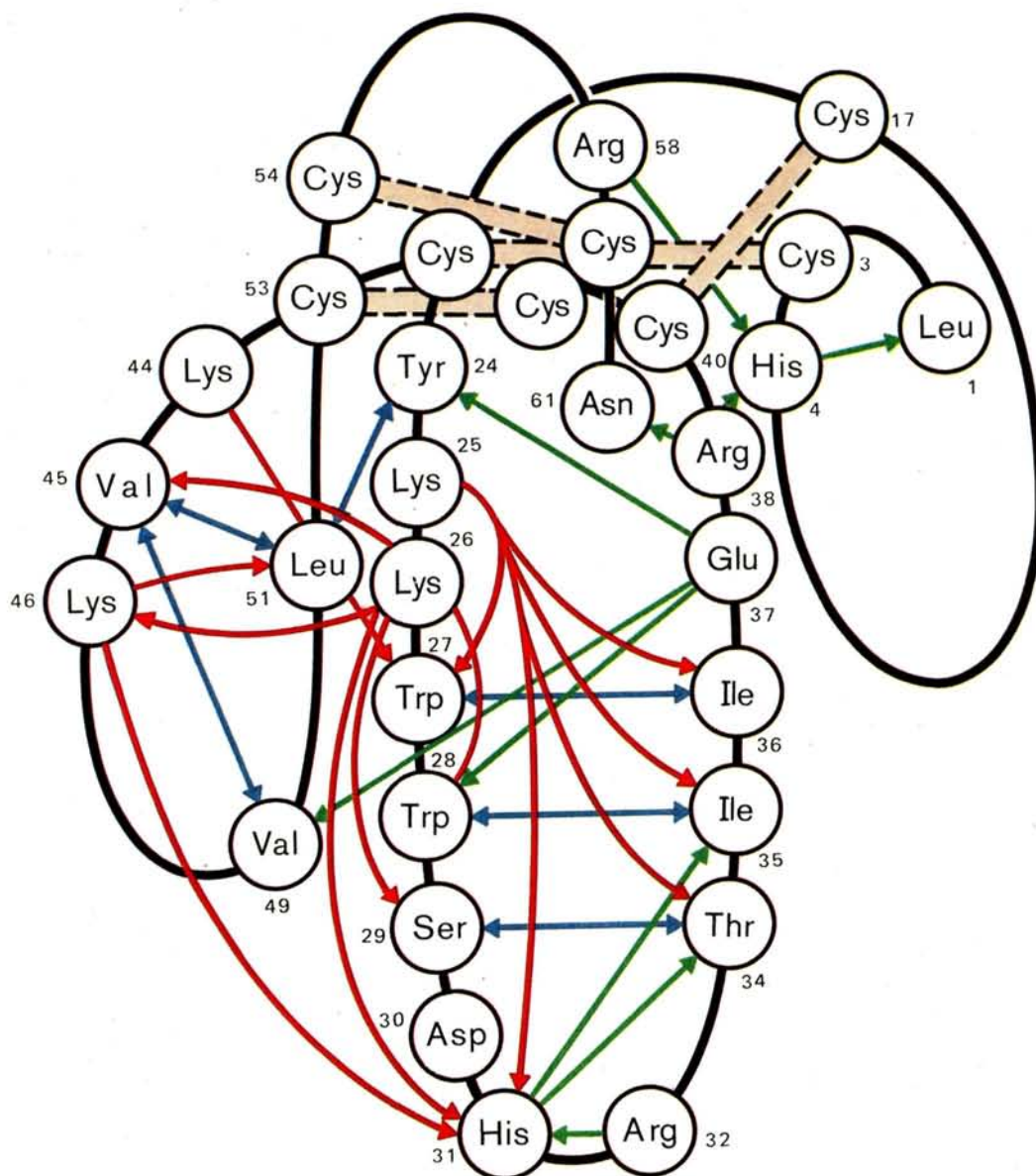
Быстров Владимир Федорович (р. 1935), советский биофизик, член-корреспондент АН СССР (1979). Окончил Московский университет (1959), с 1964 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шенякина АН СССР. Разрабатывает общие принципы применения спектроскопии ЯМР высокого разрешения для конформационного анализа белков и пептидов в растворах. Лауреат Государственной премии СССР (1985).

Рис. 67. Пространственная структура грамицидина А в мицеллах додецилсульфата натрия.

вся совокупность полученных данных (константы спин-спинового взаимодействия, ядерный эффект Оверхаузера, доступность протонов NH внешней среде) анализируется с помощью специальных программ на ЭВМ, учитывающих длины валентных связей, валентные углы, ван-дер-ваальсовы радиусы атомов и т. д. Как правило, при этом удается достаточно точно выяснить конформацию основной полипептидной цепи и наиболее вероятную ориентацию боковых радикалов.

Особую ценность представляет информация, получаемая с помощью спектроскопии ЯМР, о динамических характеристиках пространственной структуры молекулы, ее изменениях в результате изменения среды (рН, температура, ионная сила) или взаимодействия с другими молекулами.

Рис. 68. Схема укладки полипептидной цепи нейротоксина II *Naja paja oxiana* в растворе.



Для грамицидина А, представляющего собой линейный пентадекапептид, путем анализа двумерных спектров ^1H -ЯМР была установлена пространственная структура (рис. 67) в мицеллах додецилсульфата натрия. Такие мицеллы хорошо моделируют свойства липидного бислоя мембраны, в которых грамицидин А образует трансмембранный ионный канал. Канал построен из двух правых одиночных спиралей ($\pi_{LD}^{6,3}$ -спираль), ассоциированных по типу N-конец к N-концу («голова к голове»), имеет длину $\sim 2,6$ нм и внутреннюю полость диаметром около 0,35 нм.

В качестве примера комплексного использования различных методов рассмотрено определение конформации «короткого» белкового нейротоксина II (61 аминокислотный остаток) из яда среднеазиатской кобры.

Спектры КД показали, что нейротоксин II сохраняет свою конформацию в широком диапазоне температур, pH, а также при химической модификации ряда аминокислотных остатков. С помощью лазерных спектров комбинационного рассеяния было установлено, что нейротоксин II не имеет α -спиральных участков, а содержание β -структуры составляет 30%.

Параллельное изучение методом флуоресценции природного нейротоксина и его химически модифицированных производных, содержащих дансильные и спиновые метки, позволило охарактеризовать микроокружение остатков триптофана и введенных меток и определить ряд внутримолекулярных расстояний.

Исследования методом ЭПР дали информацию о подвижности спиновых меток, селективно введенных в различные участки молекулы. Из анализа спектров ЭПР застеклованных растворов (-196 °C) производных нейротоксина, содержащих по две спиновые метки, были определены внутримолекулярные расстояния между несвязанными электронами этих меток (в частности, таким образом показана близость боковых цепей некоторых остатков, удаленных в аминокислотной последовательности).

Наиболее детальная информация о пространственной структуре нейротоксина II в растворе получена методом ^1H -ЯМР. Было проведено отнесение сигналов к типам остатков и к конкретному положению в аминокислотной последовательности. Изучение скоростей водородного обмена амидных протонов выявило наличие плотной упаковки основной полипептидной цепи нейротоксина II. Анализ зависимости положения сигналов от pH позволил определить rK практически всех ионогенных группировок и идентифицировать пространственно сближенные с ним аминокислотные остатки (рис. 68, зеленая линия). Значительное число внутримолекулярных расстояний определено с помощью ядерного эффекта Оверхаузера (рис. 68, синяя линия), а также при исследовании спектров ^1H -ЯМР производных нейротоксина, содержащих спиновые метки (оценка расстояний на основе анализа уширений, вызываемых несвязанным электроном спиновой метки (рис. 68, красная линия).

В целом сумма полученных данных позволила установить конформацию нейротоксина II в растворе (рис. 68), которая близка кристаллической структуре родственного вещества — эрабутоксина *b* из яда морской змеи.



Бернал [Bernal] Джон Десмонд (1901—1971), английский физик, кристаллограф, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Кембриджский университет (1922), с 1937 г. — профессор Лондонского университета. Ему принадлежат основополагающие труды по рентгеноструктурному анализу вирусов, белков, гормонов. Лауреат Международной Ленинской премии «За укрепление мира между народами» (1953).

Четвертичная структура белков

Многие белки состоят из субъединиц, одинаковых или различных, образующих трехмерные ассоциаты или более сложные ансамбли. В этом случае принято говорить о *четвертичной структуре* белков. Специфичность четвертичной структуры данного белка обуславливается выполняемой им биологической функцией, а взаимодействие субъединиц обеспечивает дополнительный механизм ее регуляции.

Термин «четвертичная структура» был предложен в 1958 г. английским кристаллографом Дж. Берналом как необходимое дополнение к принятому понятию о первичной, вторичной и третичной структурах белка (К. У. Линдерстрём-Ланг, Л. Полинг, 1952). Однако субъединицы в составе белков были обнаружены с помощью седиментационного метода еще в 1926—1929 гг. Т. Сведбергом, который считал, что все белки построены из определенного числа небольших стандартных субъединиц. В 1965 г. Ж. Моно предложил понятие «протомер» для наименьшей структурной



Сведберг [Svedberg] Теодор (1884—1971), шведский физикохимик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Упсальский университет (1907), с 1921 г.— профессор Упсальского университета. Основные работы — в области коллоидной химии, определения размеров и форм молекул. Создал метод ультрацентрифугирования (1919) и впервые построил ультрацентрифуги для исследования высокодисперсных зольей. С помощью этого метода определил молекулярную массу гемоглобина и других белков. Лауреат Нобелевской премии по химии (1926).

единицы сложного белка, формирующей путем ассоциации с целым числом идентичных единиц (одной или несколькими субъединицами) полную четвертичную структуру белка. Например, в белке из 6 одинаковых субъединиц (α_6) протомером является мономер (α), а в белке из двух типов субъединиц ($\alpha_2\beta_2$) протомер имеет состав ($\alpha\beta$). Детальное изучение четвертичной структуры белков началось, по существу, с работ М. Перутца и Дж. Кендрию по гемоглобину (конец 50-х годов).

Первый этап исследования четвертичной структуры белка — анализ его субъединичного состава. Для этого необходимо провести диссоциацию белка на отдельные субъединицы, что обычно достигается с помощью гидрохлорида гуанидина, мочевины или додецилсульфата натрия (с добавлением меркаптоэтанола для восстановления дисульфидных связей). Во многих случаях диссоциации способствуют изменение pH среды, добавление соли, замена воды на органические растворители, а также химическая модификация белка. Субстраты, различные метаболиты и кофакторы в разных белках влияют как на ассоциацию, так и диссоциацию субъединиц. Субъединичный состав белка может быть выяснен путем сопоставления его суммарной молекулярной массы с молекулярными массами отдельных субъединиц (установленными с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), а также с числом N- и C-концевых аминокислотных остатков. Другой метод анализа заключается в сравнении числа пептидов (N), ожидаемых на основании данных аминокислотного состава, с числом реально образующихся при том или ином специфическом гидролизе молекулы белка. Пример подобного рода анализа триптических гидролизатов субъединичных белков методом пептидных карт приведен на рисунке 69.

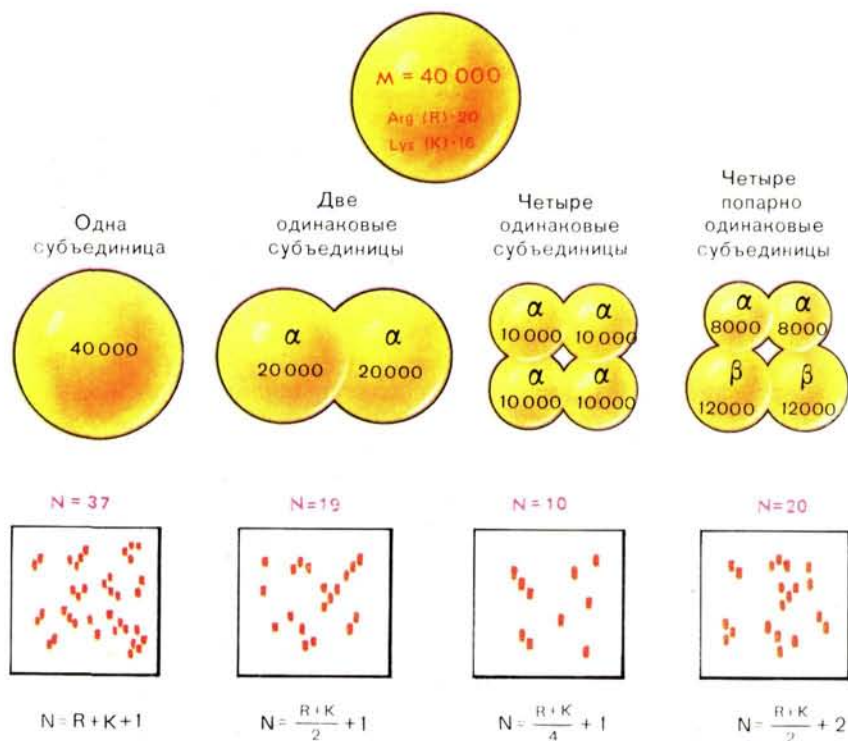


Рис. 69. Анализ субъединичной структуры белка методом пептидных карт.

Процесс формирования четвертичной структуры белков проходит в соответствии со строгими законами термодинамики. Силы, способствующие ассоциации белка, должны быть скомпенсированы таким образом, чтобы активные группировки, расположенные в областях, имеющих тенденции к ассоциации, не оставались экспонированными наружу. В белках, построенных из одинаковых субъединиц, последние практически всегда находятся в эквивалентном (или идентичном) окружении. На рисунке 70 представлены возмож-

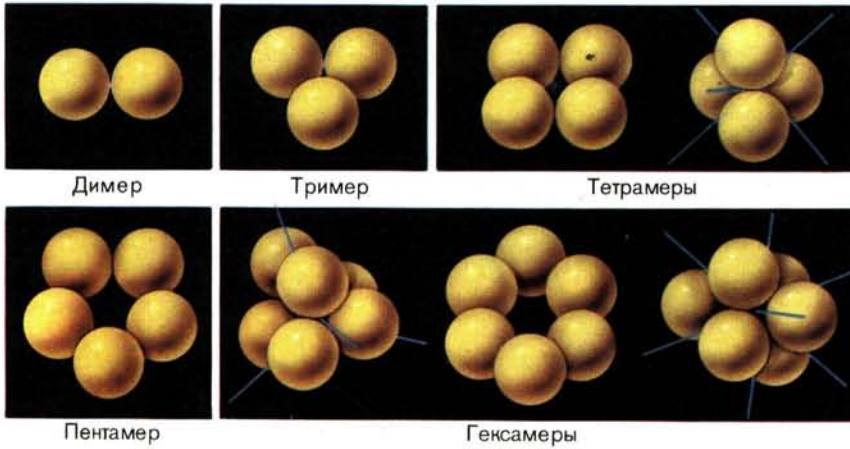


Рис. 70. Пространственные формы белков, состоящие из идентичных субъединиц.

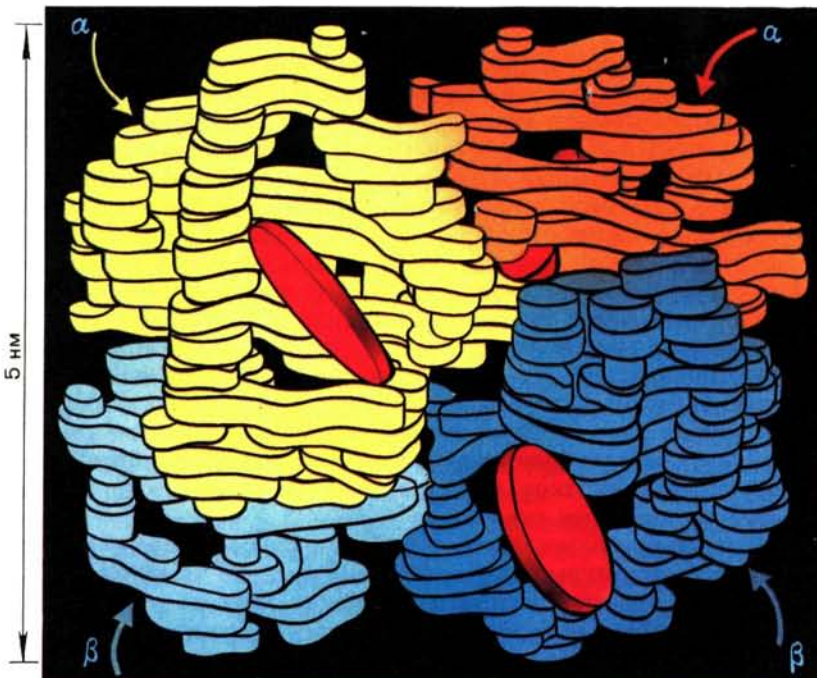


Рис. 71. Четвертичная структура оксигемоглобина.

ные пространственные формы белков, состоящих из разного числа (до 6) идентичных субъединиц. Для ди-, три- и пентамеров в каждом случае имеется только одна форма, причем следует подчеркнуть, что олигомерные белки с нечетным числом субъединиц крайне редки. У тетрамеров существует две формы — квадрат и тетраэдр, а у гексамеров — три формы (трехгранная призма, шестиугольник и октаэдр).

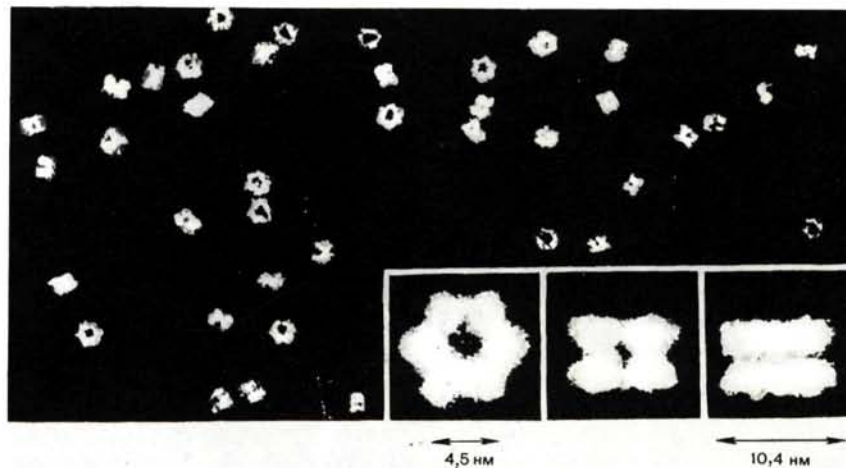


Рис. 72. Электронная микрофотография глутаминсинтетазы *E. coli*.

Взаимодействие между комплементарными участками субъединиц в четвертичной структуре осуществляется с помощью ван-дер-ваальсовых сил, ионных и водородных связей.

Формирование четвертичной структуры из трех и более субъединиц протекает с промежуточным образованием агрегатов меньшего размера. Агрегация первых мономеров часто облегчает присоединение последующих — в этом смысле образование четвертичной структуры является кооперативным процессом.

Имеется ряд физико-химических методов исследования геометрии субъединиц в белках, обладающих четвертичной структурой. Наиболее информативный среди них — метод рентгеноструктурного анализа. Классическими являются рентгеноструктурные исследования гемоглобина, проводившиеся в Кембридже М. Перутцем и сотр. в течение 25 лет, начиная с 1937 г. Была установлена субъединичная структура гемоглобина — $\alpha_2\beta_2$. С каждой субъединицей связано по одной гем-группе (см. с. 205), атом железа которой может обратимо связывать молекулу O_2 . На рисунке 71 представлена четвертичная структура оксигемоглобина. Можно видеть, что контакты образуются преимущественно между α - и β - и в меньшей степени между α - α - и β - β -цепями белка. Большинство контактов возникает за счет взаимодействия гидрофобных боковых цепей аминокислотных остатков, часть из них обусловлена водородными и электростатическими связями.

Электронная микроскопия — информативный метод анализа четвертичной структуры белков, особенно крупных молекул со многими субъединицами. Главные ограничения метода — сравнительная «прозрачность» белков по отношению к пучку электронов и их недостаточная стабильность в условиях эксперимента. Обычно

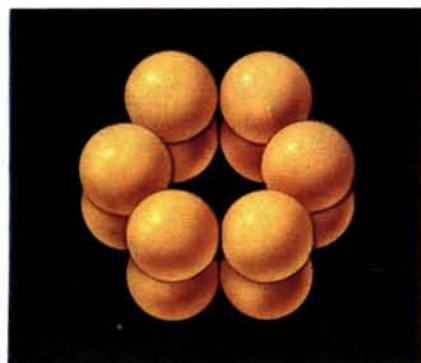


Рис. 73. Модель четвертичной структуры глутаминсинтетазы *E. coli*.

удается проводить структурный анализ с разрешением до 2 нм, а при соблюдении определенных предосторожностей — до 1 нм. На рисунке 72 представлена электронная микрофотография глутаминсинтетазы *E.coli* — фермента, осуществляющего синтез глутамина из глутаминовой кислоты, NH_4^+ и АТФ и играющего ключевую роль в метаболизме азота. Глутаминсинтетаза состоит из 12 идентичных субъединиц с молекулярной массой 50 000 каж-

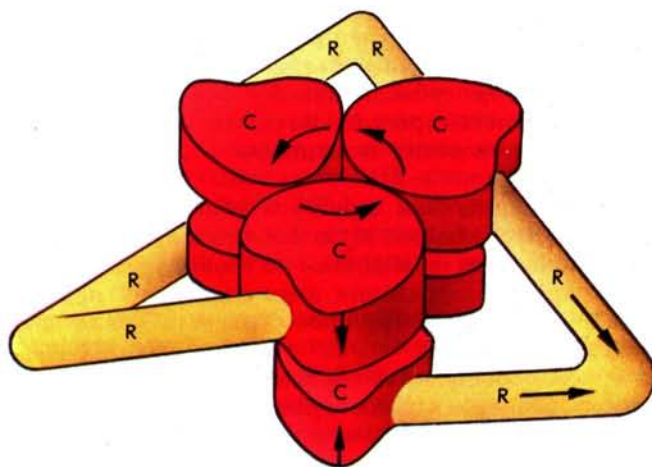


Рис. 74. Модель четвертичной структуры аспартат-транскарбамоилазы.

дая, уложенных в два параллельных гексагональных кольца. На рисунке 73 изображена пространственная модель фермента, полученная на основании данных электронной микроскопии.

Совместное использование электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа дало возможность установить четвертичную структуру еще более сложно устроенного фермента — аспартат-транскарбамоилазы *E.coli*, катализирующего основную реакцию в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов — образование N-карбамоиласпарагиновой кислоты из аспарагиновой и карбамоилфосфорной кислот. В состав фермента входит 12 субъединиц — 6 каталитических (С-субъединицы) и 6 регуляторных (R-субъединицы) с молекулярными массами 33 500 и 17 000 соответственно. Согласно пространственной модели (Х. Шахман, 1972), С-субъединицы объединены в тримеры, расположенные один над другим, а R-субъединицы находятся на периферии молекулы, взаимодействуют друг с другом и с С-субъединицами (рис. 74).

Для исследования четвертичной структуры белков широко используется химическая модификация, в частности, бифункциональными реагентами (см. с. 168). С помощью такого подхода была изучена пространственная структура ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E.coli*, состоящей из пяти субъединиц (две идентичные α -субъединицы по 36500, β_1 , β' и δ -субъединицы — 150 000, 155 000 и 70 000 соответственно). Проводилась модификация бифункциональными реагентами как самого фермента, так и его комплекса с фрагментами ДНК-матрицы, содержащими промоторные участки. В последнем случае использовались фрагменты ДНК, несущие фоточувствительные группировки (частично депурированные или содержащие остатки 5-бром урацила). На основании этих данных была



Перуц [Perutz] Макс Фердинанд (р. 1914), английский биохимик. Окончил Венский университет (1936), с 1962 г. — руководитель лаборатории молекулярной биологии Кембриджского университета. Расшифровал с помощью рентгеноструктурного анализа пространственное строение молекулы гемоглобина и предложил ее модель (1960). Лауреат Нобелевской премии по химии (1962, совместно с Дж. Кендрию).

предложена пространственная модель расположения субъединиц РНК-полимеразы в бинарном комплексе с промоторным участком ДНК (А. Д. Мирзабеков, 1981) (рис. 75).

Возникает вопрос: почему многие белки состоят из субъединиц? Какие преимущества это дает по сравнению с одной длинной пептидной цепью? Во-первых, наличие субъединичной структуры позволяет «экономить» генетический материал. Для олигомерных белков, состоящих из идентичных субъединиц, резко уменьшается размер структурного гена и соответственно длина матричной РНК.

Во-вторых, при сравнительно небольшой величине цепей уменьшается влияние случайных ошибок, которые могут возникнуть в процессе биосинтеза белковых молекул. Кроме того, возможна дополнительная выбраковка «неправильных», ошибочных полипептидов в процессе ассоциации субъединиц в единый комплекс.

В-третьих, наличие субъединичной структуры у многих белков позволяет клетке легко регулировать их активность, например, путем смещения равновесия ассоциация — диссоциация в ту или иную сторону.

Наконец, субъединичная структура облегчает и ускоряет процесс молекулярной эволюции. Мутации, приводящие лишь к небольшим конформационным изменениям на уровне третичной структуры за счет многократного усиления этих изменений при переходе к четвертичной структуре, могут способствовать появлению у белка новых свойств.

Характерной особенностью белков с четвертичной структурой является их способность к самосборке. Легко происходит, например, самосборка гемоглобина из смеси α - и β -цепей. Таким образом, в аминокислотной последовательности полипептидных цепей олигомерного белка закодированы как бы два уровня информации: один

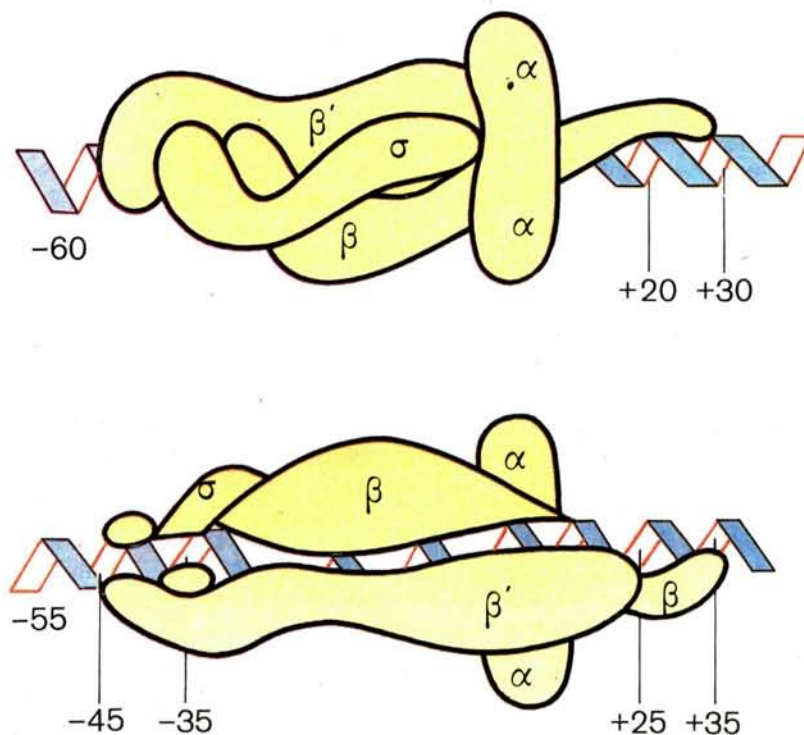


Рис. 75. Пространственная модель комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с фрагментом ДНК-матрицы. Цифрами обозначены местоположения нуклеотидных звеньев вдоль цепи ДНК (отсчет от точки инициации транскрипции).

из них определяет трехмерную структуру отдельных полипептидных цепей, а второй, поскольку каждая субъединица содержит специфические участки связывания с другими субъединицами, определяет четвертичную структуру всей многокомпонентной молекулы в целом.

Крупные надмолекулярные белковые комплексы являются самоорганизующимися системами. Характерный пример такого рода — система синтетаз жирных кислот (из дрожжей), состоящая из 7 различных ферментов. Каждый из этих ферментов, в свою очередь, построен из 3-х, по-видимому, идентичных субъединиц. Показано, что по отдельности все компоненты системы неактивны, но при их смешении образуется активный мультиферментный комплекс (Ф. Линен, 1964).

Высокая способность к самоорганизации присуща таким надмолекулярным системам, как вирус табачной мозаики (ВТМ) и рибосома (см. с. 403). Частица ВТМ построена из 2130 идентичных белковых субъединиц (каждая из которых содержит 158 аминокислотных остатков) и одной цепи РНК длиной около 6400 нуклеотидов. Х. Френкель-Конрат в 1962 г. получил активные вирусные частицы, способные заражать растения табака, при смешении очищенных субъединиц белка оболочки и молекулы вирусной РНК.

Электронно-микроскопические исследования позволили установить последовательность реконструкции вирусных частиц (рис. 76). Субъединицы образуют двойной диск с 17-кратной вращательной симметрией, который присоединяется к молекуле РНК ВТМ у ее 3-конца. Последующие субъединицы полимеризуются на этом диске, наращивая спираль (16 $\frac{1}{3}$ субъединицы на один оборот) до тех пор, пока не закроется 5'-конец РНК ВТМ.

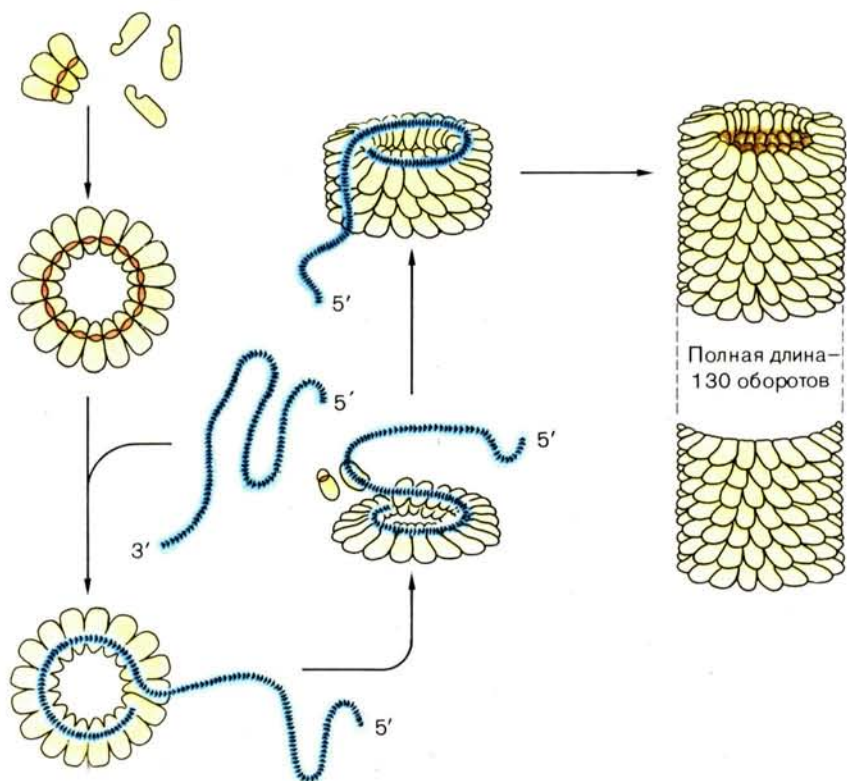


Рис. 76. Реконструкция частиц ВТМ из субъединиц белка оболочки и молекулы вирусной РНК.

Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов

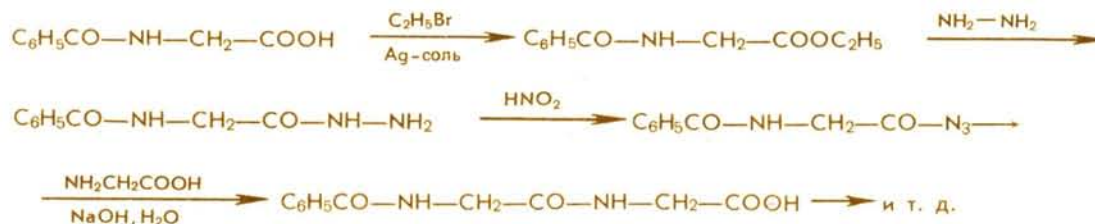
Химический синтез пептидов и белков

Пептидный синтез — это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов. Обычно речь идет о получении пептидов, содержащих до 40 — 45 аминокислот, таким способом можно осуществить синтез и небольших белков.

Пептидный синтез служит надежным средством доказательства строения природных пептидно-белковых веществ. Синтетические пептиды широко используются для структурно-функциональных исследований. С помощью химических методов удается получать аналоги биологически активных пептидов, в том числе циклические производные с заданными свойствами (например, с пролонгированным, усиленным или избирательным действием), а также аналоги с остатками небелковых аминокислот. Синтетические пептидные фрагменты белков применяются для изучения их антигенных свойств и получения специфичных к отдельным участкам полипептидных цепей антител, используемых в структурно-функциональном анализе и в создании диагностикумов и вакцин. Методами пептидного синтеза получают (в том числе и в промышленном масштабе) многие практически важные препараты для медицины и сельского хозяйства.

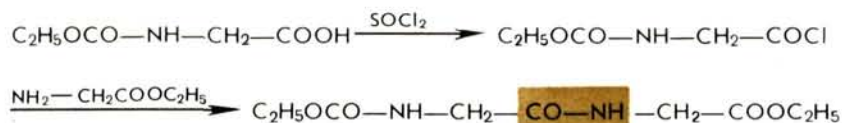
Исторический очерк. Первое производное пептида было получено синтетически в 1882 г. Т. Курциусом при обработке серебряной соли глицина бензоилхлоридом; в продуктах реакции наряду с другими соединениями был обнаружен кристаллический N-бензоилглицилглицин. Однако «отцом пептидного синтеза» считают Э. Фишера, впервые получившего в 1901 г. свободный глицилглицин при частичном гидролизе дикетопиперазинов (последние легко образуются из эфиров аминокислот). Э. Фишер первым понял значение пептидного синтеза как средства доказательства строения белка и необходимость разработки специфических методических приемов.

Т. Курциус не признавал приоритета Э. Фишера и в 1902 г., вновь обратившись к проблеме пептидного синтеза, предложил

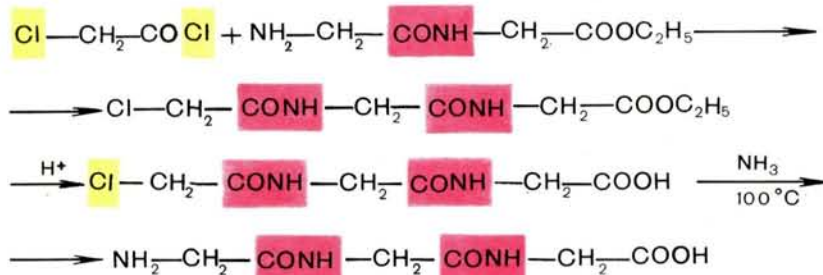


эффективный метод конденсации, основанный на использовании азидов аминокислот. Метод состоял в превращении N-бензоилглицина в этиловый эфир, затем в гидразид обработкой гидразином и далее в азид с помощью азотистой кислоты. Реакционноспособный азид легко реагировал с глицином или глицилглицином. Таким способом были получены пептиды, содержащие до 7 аминокислотных остатков, однако селективно отщепить N-бензоильную группу не удалось и это существенно ограничивало возможности метода. Азидный метод сохранил свое значение до настоящего времени, что подтверждает основополагающий вклад Т. Курциуса в становление пептидной химии.

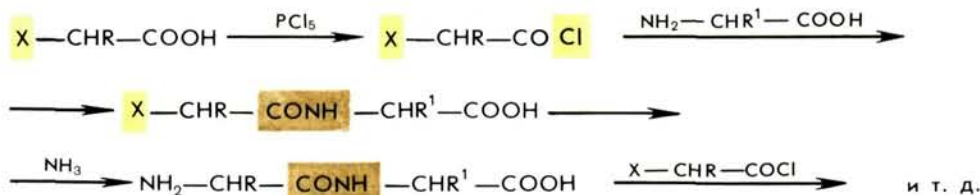
В 1903 г. Э. Фишер предложил хлорангидридный способ получения пептидов: карбэтоксиглицин с помощью хлористого тионила превращался в хлорангидрид, которым ацилировался этиловый эфир глицина:



Щелочная обработка продукта реакции не привела к свободному пептиду. Отсутствие N-ацильных группировок, удаляемых без расщепления пептидных связей, побуждало искать новые варианты этого способа, в одном из которых в качестве ацилирующего компонента был использован хлорацетилхлорид:



Дальнейшее усовершенствование галогенацильного метода связано с применением галогенангидридов разнообразных α -галогенкарбоновых кислот, например:



Фишер [Fischer] Эмиль Герман (1852—1919), немецкий химик-органик, иностранный почетный член Петербургской АН (1913). Образование получил в Боннском и Страсбургском университетах. Выполнял фундаментальные исследования по химии различных природных соединений. Разработал методы синтеза производных пурина, углеводов, пептидов, обнаружил и объяснил специфичность действия ферментов. Провел первые исследования аминокислотного состава белков. Экспериментально доказал (1902), что аминокислоты связываются между собой посредством карбоксильной группы и аминогруппы, образуя пептиды. Лауреат Нобелевской премии по химии (1902).

Э. Фишеру удалось получить (совместно с его учеником О. Варбургом) L- α -бромпропионилхлорид и перейти к синтезу оптически активных пептидов. Им было установлено, что превращение производных α -галогенкарбоновых кислот в производные аминокислот может протекать как с сохранением конфигурации, так и с ее обращением (впоследствии это явление было названо вальденовским обращением, по имени П. И. Вальдена).

В 1906 г. сочетанием галогенацильного и diketопиперазинового методов Э. Фишер получил первый крупный пептид, состоящий из 10 аминокислотных остатков: $\text{H}-(\text{D,L})\text{-Leu}-(\text{Gly})_8\text{Gly}-\text{OH}$. Несколько позже комбинацией различных методов ему удалось синтезировать оптически активный 18-членный пептид следующего строения:



Это было выдающееся достижение своего времени, и Э. Фишер даже утверждал, что он близок к синтезу белка. Однако, хотя им и был осуществлен синтез более 100 пептидов, проблема получения пептидов заданного строения в тот период не могла быть решена из-за чрезвычайной ограниченности и несовершенства используемых методов.

Заметным событием в истории пептидного синтеза является открытие Г. Лейксом в 1906 г. N-карбоксиангидридов аминокислот, легко полимеризующихся с образованием полиаминокислот. Несмотря на то, что полиаминокислоты существенно отличаются от обычных пептидов, они сыграли важную роль в качестве модельных соединений в исследовании пространственного строения белков. Значение N-карбоксиангидридов резко возросло после 1947 г., когда Р. Вудворд и К. Шрамм показали возможность получения с их помощью сополимеров различных аминокислот. В 1966 г. Р. Хиршман использовал N-карбоксиангидриды и для регулируемого синтеза биологически активных белков (см. с. 143).

В течение длительного времени главным препятствием на пути дальнейшего прогресса в пептидном синтезе являлось отсутствие селективно удаляемых защитных групп. И хотя поиски велись весьма интенсивно и в 1926 г. Р. Шёнхаймер предложил использовать *p*-толуолсульфонильную (тозилную) группу для защиты NH_2 -группы, подлинная революция совершилась лишь в 1932 г., когда ученик Э. Фишера М. Бергманн и Л. Зервас открыли карбобензоксигруппу $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OSO}$.

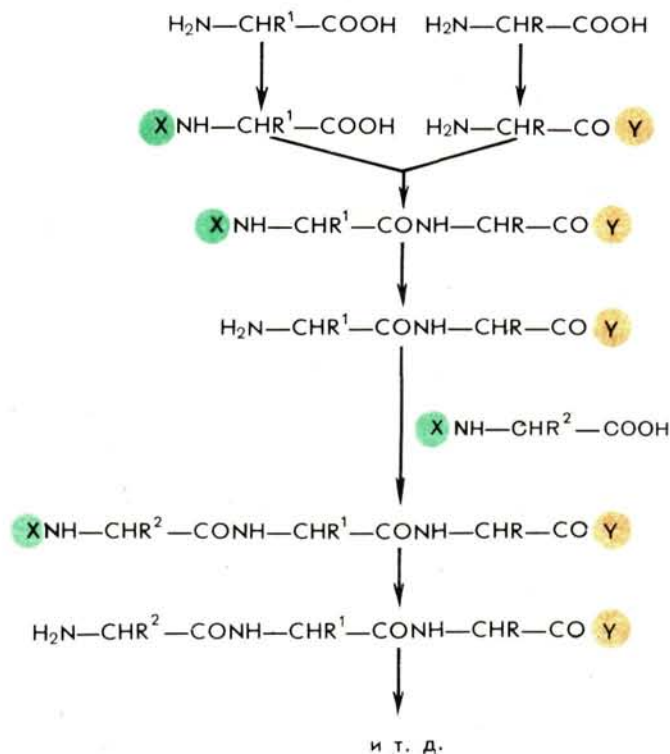
Эра химического синтеза биологически активных природных пептидов началась с работ В. Дю Виньо по синтезу пептидных гормонов окситоцина и вазопрессина (1953). Через десять лет, в 1963—1965 гг., были осуществлены полные синтезы инсулина (Х. Цан, П. Катсояннис, Я. Кунг); в 1963 г. Р. Швицер и П. Зибер завершили полный синтез 39-членного гормона кортикотропина. Несколько раньше, в 1956 г., Р. Швицером был получен первый природный циклический пептид — грамицидин S. Эти достижения стимулировали усилия по поиску новых эффективных методов создания пептидной связи, защитных группировок, способов очистки и идентификации пептидов.

Современный пептидный синтез располагает богатым арсеналом методических возможностей и представляет собой высокоразвитую область биоорганической химии.

В общем случае синтез любого пептида состоит из трех основных стадий: блокирования (защиты) не участвующих в реакции функ-



Курциус [Curtius] Теодор (1857—1928), немецкий химик. Образование получил в Гейдельбергском и Лейпцигском университетах; профессор Кильского (1889), Боннского (1897) и Гейдельбергского (1898) университетов. Ему принадлежат основополагающие труды в области органического синтеза — получение гидразина, гидразидов, азидов кислот. Описал (1890) реакцию превращения азидов кислот в первичные амины (реакция Курциуса). Выполнил первые синтезы пептидов и ввел в практику пептидной химии азидный метод.



Бергманн [Bergmann] Макс (1886—1944), немецкий химик-органик, ученик Э. Фишера. С 1934 г. работал в Рокфеллеровском институте в Нью-Йорке (США). Разработал ряд методов получения пептидов. Открыл реакцию циклизации N-галогенациламино кислот с образованием азлактонов (реакция Бергманна). Совместно с Л. Зервасом предложил способы получения ряда производных аминокислот, в частности N-карбобензоксипроизводных (1932—1934).



Зервас [Zervas] Леонидас (1902—1980), греческий химик-органик, иностранный член АН СССР (1976). Образование получил в Афинском и Берлинском университетах, с 1939 г. — профессор Афинского университета. Основные работы посвящены химии пептидов. Разработал ряд методов защиты и активирования функциональных групп в ходе синтеза пептидов (совместно с М. Бергманном), в частности метод получения и применения N-карбобензоксипроизводных. Предложил способ введения о-нитрофенилсульфенильной группы.

циональных групп аминокислоты или пептида; конденсации активированной карбоксильной группы одного компонента с аминогруппой другого; селективного или полного удаления защитных групп для продолжения синтеза или получения свободного пептида.

В зависимости от используемых методических приемов и характера синтезируемого конечного продукта различают следующие типы пептидного синтеза:

1. Классический пептидный синтез в растворе, подразделяемый на ступенчатый синтез линейных пептидов, осуществляемый последовательным присоединением аминокислот от С-конца к N-концу цепи, и на блочный синтез линейных пептидов, когда построение цепи ведется из предварительно синтезированных фрагментов.

2. Синтез пептидов на полимерном носителе, при этом растущая полипептидная цепь ковалентно присоединена к нерастворимому или растворимому полимеру и отделение ее от полимера осуществляется на завершающей стадии синтеза. При использовании нерастворимого носителя принято говорить о твердофазном синтезе, существующем в настоящее время в полностью автоматизированном варианте. Созданные для этих целей приборы получили название синтезаторов. В некоторых случаях оказывается целесообразным использовать жидкофазный синтез на основе растворимых полимеров.

3. Синтез гомо- и гетерополиаминокислот, построенных из повторяющихся остатков одной-двух аминокислот путем полимеризации или сополимеризации производных аминокислот (N-карбоксиангидридов и т. п.).



Вальден (Walden) Пауль (Павел Иванович) (1863—1957), известный физико-химик, академик Петербургской АН (1910), иностранный почетный член АН СССР (1927). Окончил Рижский политехнический институт (1889) и Лейпцигский университет (1891); с 1902 г. — профессор Рижского политехнического института, затем — профессор Ростокского университета и университетов Франкфурта-на-Майне и Тюбингена. Основные работы — в области стереохимии и физической химии. Открыл явление обращения конфигурации у асимметрического атома углерода при замещении (1898, вальденовское обращение). Обнаружил оптически активные соединения в нефти.

4. *Ферментативный пептидный синтез*, т. е. синтез пептидов с помощью ферментов. Хотя идея такого синтеза весьма привлекательна и многие ферменты способны катализировать образование пептидной связи (реакции, обратной протеолизу), существенных результатов пока этим методом получить не удалось.

5. *Полусинтез пептидов* заключающийся в использовании методов пептидного синтеза для модификации природных пептидов. Обычным приемом является отщепление в молекуле природного пептида или белка небольшого фрагмента, а затем введение новой аминокислотной последовательности.

6. *Синтез циклических пептидов*, осуществляемый замыканием линейного пептида в цикл соответствующей величины различными способами.

7. *Синтез гетеродетных пептидов*, построенных с участием как амидных связей, так и связей другого типа — сложноэфирных, тиоэфирных, дисульфидных.

Защитные группы, используемые в пептидном синтезе

В пептидном синтезе существуют два типа защитных групп — постоянные и временные. Постоянными называют группировки, используемые для защиты боковых функциональных групп и удаляемые на заключительном этапе синтеза пептида. Временными являются защитные группы для N^α-концевой аминогруппы и С-концевого карбоксила, снимаемые соответственно перед каждой стадией удлинения цепи или конденсации фрагментов.

Защитные группы, используемые в синтезе пептидов, должны удовлетворять следующим условиям:

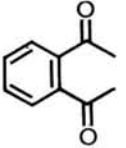
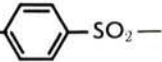
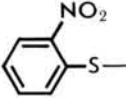
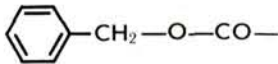
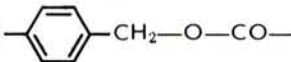
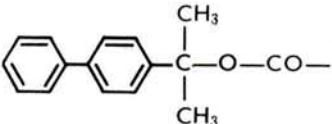
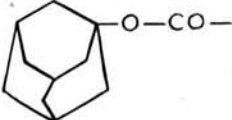
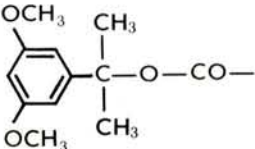
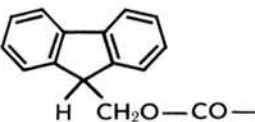
- полностью блокировать соответствующую группировку от участия в проводимых химических реакциях;
- быть устойчивыми в ходе удаления других защитных групп;
- не вызывать побочных реакций и рацемизации при введении, удалении и при образовании пептидных связей;
- защищенные производные должны быть устойчивыми идентифицируемыми соединениями;
- не вызывать осложнений с растворимостью и выделением пептидов из реакционных смесей.

NH₂-Защитные группировки. В таблице 5 приведены наиболее распространенные защитные группы для N-концевых и N^ε-аминогрупп.

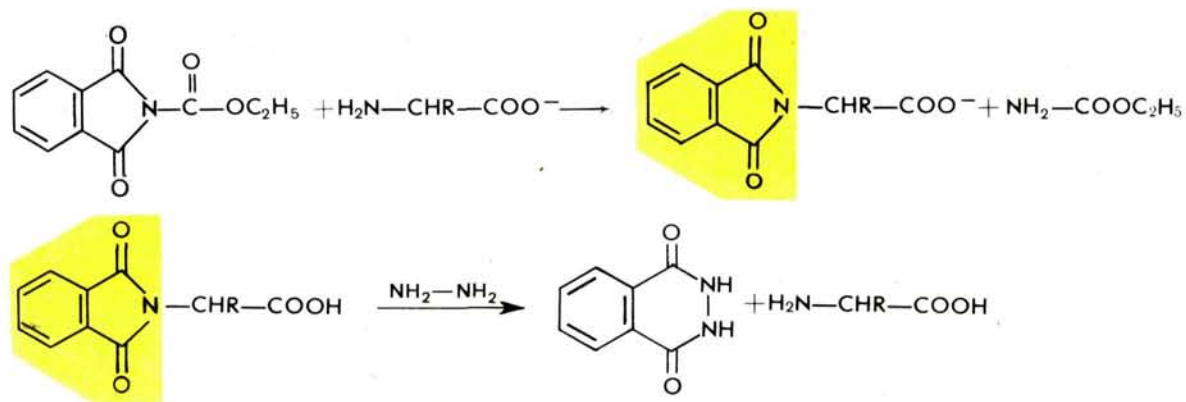
Таблица 5

NH₂-Защитные группы

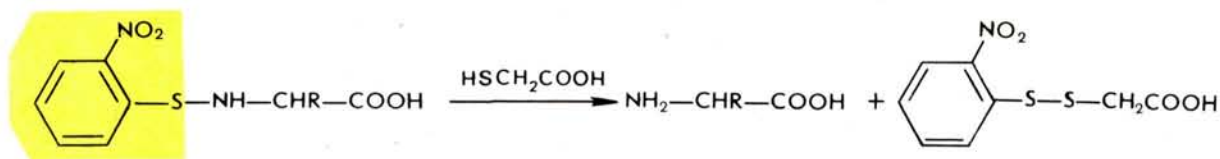
№ п/п	Группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	Формильная	HCO—	Form	1 н. HCl/CH ₃ OH; гидразиндиацетат в CH ₃ OH; фенилгидразин; H ₂ O	1905	Э. Фишер, О. Варбург
2	Трифторацетильная	CF ₃ CO—	Tfa	0,2 н. NaOH; разб. NH ₄ OH	1952	Ф. Вейганд, Е. Ксенде

№ п/п	Группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год от-крытия	Авторы
3	Фталильная		Pht	Гидразинолиз	1948	Д. Кидд, Ф. Кинг
4	п-Толуолсульфонильная (тозилъная)	CH_3 -  - SO_2 -	Tos	Na/NH_3	1926	Р. Шёнхаймер
5	о-Нитрофенилсульфенильная		Nps	Мягкий ацидолиз, тиолиз (тиоацетамид, тиогликолевая кислота)	1963	Л. Зервас, Д. Боровас, Е. Газис
6	Бензилоксикарбонильная (карбобензокси-)		Z	H_2/Pd ; $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$; HF	1932	М. Бергманн, Л. Зервас
7	трет-Бутилоксикарбонильная	$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-$	Boc	CF_3COOH ; 2 н. HCl /диоксан; $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ / CH_3COOH ; HCOOH ; HF	1957	Ф. Мак-Кей, Н. Албертсон
8	п-Метоксибензилоксикарбонильная	CH_3O -  - $\text{CO}-$	MZ	То же	1957	Ф. Мак-Кей, Н. Албертсон
9	2-(4-Бифенилил)пропил-2-оксикарбонильная		Bpsc	1% CF_3COOH	1968	П. Зибер, Б. Изелин
10	1-Адамантил-оксикарбонильная		Adoc	CF_3COOH	1966	Б. Хаас, Э. Крамкалис, К. Герзон
11	Метилсульфонилэтил-оксикарбонильная	$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CO}-$	Msc	NaOH , pH 10,0–12,0; 0°C	1975	Г. Тессер, И. Бальверт-Гирс
12	α,α-Диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонильная		Ddz	5% CF_3COOH , фотолиз	1972	Х. Бирр, В. Лохингер, С. Штапке, П. Ланг
13	9-Флуоренилметил-оксикарбонильная		Fmoc	Морфолин или пиперидин в ДМФА	1970	Л. Карпино, Г. Хен

Защитные группы ацильного типа не используются в качестве временных защитных группировок из-за невозможности их удаления без расщепления пептидных связей (например, бензоильная или ацетильная группы) и легко происходящей рацемизации при получении активированных производных. Формильная и трифтор-ацетильная группы (1 — 2) находят применение для защиты N^ε-групп лизина. Фталильную (3) и тозилльную (4) группы используют редко из-за жесткости условий их удаления (гидразинолизом и обработкой Na в жидком аммиаке соответственно). Для получения фталиламино кислот свободные аминокислоты ацилируют в водно-щелочном растворе при 20 °С карбэтоксифталимидом:



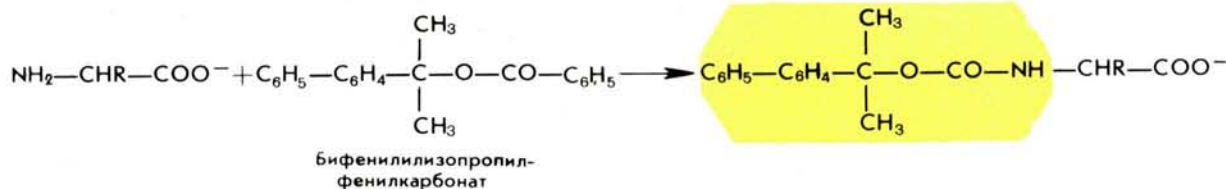
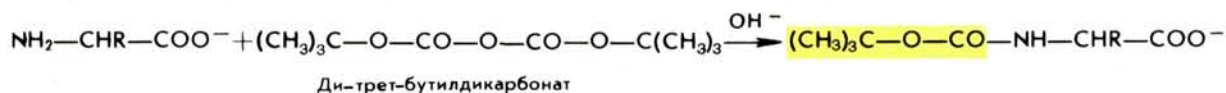
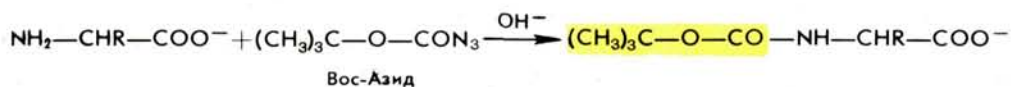
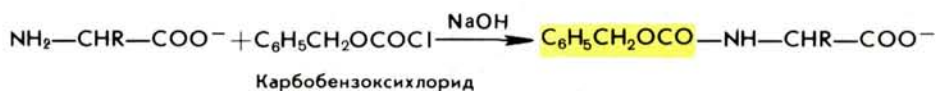
Защитные группы алкильного (арильного) типа также используются сравнительно редко. Исключением является Nps-группа (5), которая легко вводится с помощью соответствующего хлорида, а удаляется с помощью ацидолиза или тиолиза.



Наиболее широко применяются защитные группы уретанового типа (6 — 13). Они вводятся с помощью соответствующих хлоридов, азидов или карбонатов (см. с. 131). Удаление их проводится каталитическим гидрогенолизом (в случае серосодержащих пептидов — гидрированием в жидком аммиаке) или так называемым «переносным гидрированием» с использованием в качестве донора

1,4-циклогександиена, циклогексена, муравьиной кислоты или формиата аммония. Часто применяется и ацидолиз в различных условиях (HBr/CH₃COOH, CF₃COOH, 2н. HCl в диоксане, HF и т. п.).

Среди уретановых группировок несомненный интерес представляют устойчивые к ацидолизу, но удаляемые мягким щелочным гидролизом 9-флуоренилметилоксикарбонильная (Fmoc, 13) и метилсульфонилэтилоксикарбонильная (Msc, 11). Fmoc-Группа широко применяется, в частности, в твердофазном синтезе пептидов.



COOH-Защитные группировки. В таблице 6 приведены сложно-эфирные группировки, используемые в настоящее время для защиты карбоксильной функции.

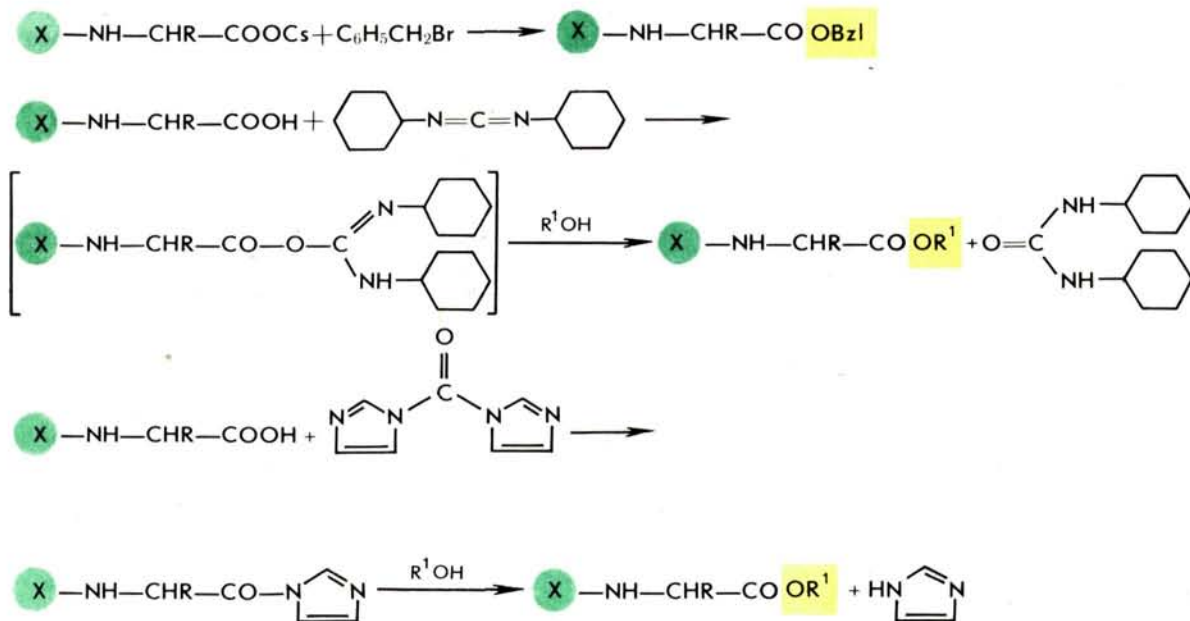
Наиболее широко применяются бензиловые и трет-бутиловые эфиры, реже — метиловые и этиловые эфиры. Бензиловые эфиры и их производные получают прямой этерификацией аминокислот в присутствии кислотных катализаторов или обработкой защищенных производных аминокислот бензилбромидом в щелочной среде. В тех случаях, когда этерификация не может быть использована, применяются специальные реагенты, обычно рекомендуемые для

COOH-Защитные группы

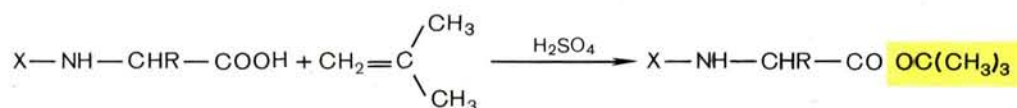
№ п/п	Сложный эфир	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	Бензиловый		OBzl	H ₂ /Pd, OH ⁻	1929	П. Роччи, Р. Ратти, Е. Хенци
2	п-Нитробензиловый		OBzl(NO ₂)	H ₂ /Pd; OH ⁻	1955	Р. Швицер, Б. Изелин, М. Ферер
3	п-Метоксибензиловый		OBzl(OMe)	CF ₃ COOH, 0°; H ₂ /Pd	1962	Ф. Вейганд, К. Хунгер
4	трет-Бутиловый	-O-C(CH ₃) ₃	OBu ^t	CF ₃ COOH; HCl/CH ₂ Cl ₂	1959	Е. Ташнер, Б. Либер, К. Василевский
5	4-Пиколиловый		OPic	OH ⁻ ; H ₂ /Pd; Na/NH ₃	1969	Р. Кэмбл, Р. Гарнер, Г. Янг
6	Фенациловый	-O-CH ₂ -CO-C ₆ H ₅	OPac	H ₂ /Pd; тиофенолят натрия	1964	Дж. Шизен, Г. Дэвис
7	9-Флуоренилметило- вый		OFm	10%-ный пиперидин, вторичные или третичные амины в ДМФА	1983	М. Беднарек, М. Боданский
8	Фениловый	-O-C ₆ H ₅	OPh	OH ⁻ /H ₂ O ₂ (рН 10,5)	1972	Г. Кеннер, Дж. Сили

образования сложноэфирных связей, а именно: N,N'-дициклогексилкарбодиимид (часто в присутствии катализатора 4-диметиламинопиридина) и N,N'-карбонилдиимдазол.

Синтез
и химическая модификация
белков и пептидов



трет-Бутиловые эфиры аминокислот получают присоединением изобутилена в условиях кислотного катализа, например:



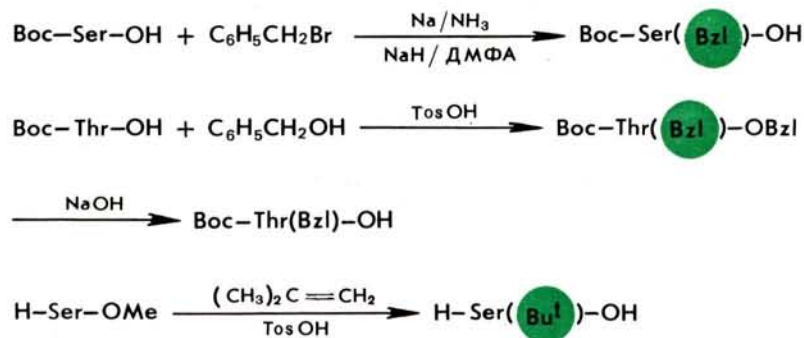
Для блокирования карбоксильных групп в ряде случаев применяют солеобразование, хотя при этом не исключаются побочные реакции в ходе синтеза. Выбор COOH-защитных групп в пептидном синтезе не столь велик и не всегда обеспечивает потребности экспериментатора, особенно в тех случаях, когда синтезируются пептиды, содержащие аспарагиновую и глутаминовую кислоты.

Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот. В ходе пептидного синтеза обычно оказывается необходимым защищать функциональные группы боковых цепей аминокислотных остатков; в любом случае следует блокировать ε-NH₂-группы лизина и SH-группы цистеина. Блокирование других боковых функциональных групп не всегда строго обязательно.

Существуют два различных тактических подхода к синтезу пептидов — с максимальной защитой боковых функций аминокислот и с минимумом защитных группировок. В первом случае удается резко ограничить возможность побочных реакций в ходе синтеза, а во втором — существенно облегчить конечное деблокирование защищенного производного пептида. Выбор соответствующего варианта определяется в основном природой синтезируемого пептида. Так как сохранение реакционноспособных функциональных групп в пептиде сокращает методические возможности экспериментатора, в подавляющем числе синтезов защищают боковые группы Ser, Thr, Tyr, Arg, His, Asp, Glu. Важнейшие из защитных группировок перечислены в таблице 7.

Для гидроксилсодержащих аминокислот наиболее употребительны бензильная и трет-бутильная защитные группы. Boc-Ser(Bzl)-OH получают прямым алкилированием Boc-Ser-OH бензилбромидом в присутствии натрия в жидком аммиаке или гидрида натрия в диметилформамиде (выход около 50%). Boc-Thr(Bzl)-OH более труднодоступен, выход его в тех же условиях составляет лишь 10%. С таким же низким выходом O-бензил-треонин получают и при этерификации карбоксильной и гидроксильной групп бензиловым спиртом в присутствии п-толуолсульфокислоты с последующим щелочным омылением сложного эфира.

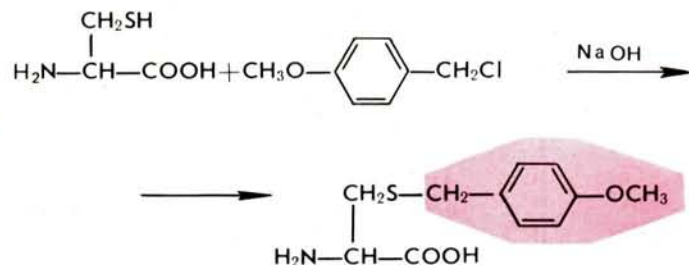
O-трет-Бутиловые эфиры гидроксиаминокислот образуются с хорошим выходом при обработке свободных аминокислот или их метиловых эфиров изобутиленом в присутствии кислоты (H_2SO_4 , $TosOH \cdot BF_3 \cdot Et_2O$). O-Бензилтирозин получается при алкилировании медного комплекса тирозина бензилбромидом:



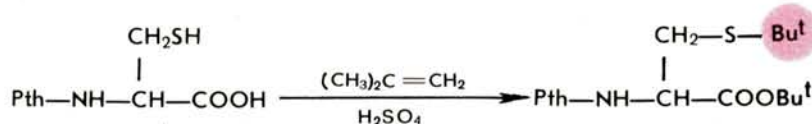
Основной побочной реакцией при ацидолитическом удалении бензильной группы тирозина является алкилирование (бензил-катионом) его ароматического кольца с образованием 3-бензилтирозина. Для уменьшения степени протекания этого процесса при обработке пептидов жидким HF обычно используют защитные добавки («скэвенджер») для реакционноспособных катионов. Ряд защитных групп для тирозина, хорошо зарекомендовавших себя в твердофазном синтезе (группа 3, 4 и особенно 5, табл. 7), отличаются существенно меньшей способностью алкилировать кольцо Туг при ацидолизе. Эти группы вводятся путем обработки производных тирозина соответствующим алкилгалогенидом (например, 2,6-дихлорбензилбромидом или циклогексенон в присутствии $BF_3 \cdot Et_2O$).

Для защиты меркаптогруппы цистеина широко употребляются группы 7 — 10, ранее применявшаяся S-бензильная группа (6) уступила место другим, более легко удаляемым группировкам.

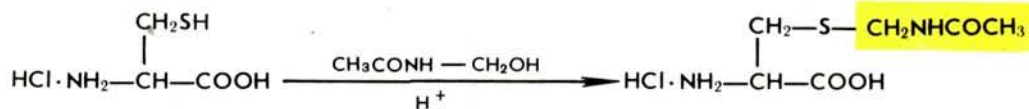
Обычным способом получения S-бензилцистеина, S-(п-метокси) бензилцистеина и S-третилцистеина является обработка цистеина в щелочной среде соответствующим хлоридом, например:



S-трет-Бутилпроизводные получают при действии изобутилена в присутствии кислых агентов H_2SO_4 , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, $\text{HBr}/\text{CH}_3\text{COOH}$ и др.):

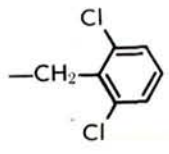
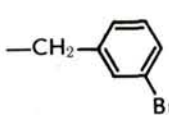

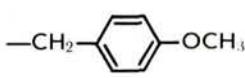


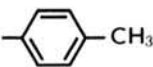

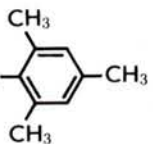
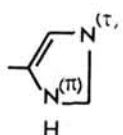
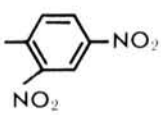
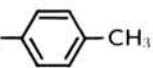
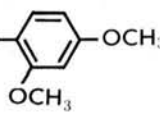
Широко применяемая ацетамидометильная группировка вводится обработкой цистеина в кислой среде ацетамидометанолом:



В силу высокой основности боковая цепь аргинина в большинстве случаев в условиях синтеза остается протонированной и протонирование является одним из вариантов защиты гуанидиновой группы. Защитные группы для гуанидиновой группировки, удовлетворяющие всем необходимым требованиям, пока не найдены. Нашедшие применение Arg(Tos)- или Arg(Mts)-производные получают обработкой Z-Arg, Boc-Arg или (MeO)Z-Arg соответствующим хлоридом (Tos-Cl или Mts-Cl) в сильнощелочной водно-органической фазе.

Защита функциональных групп

№ п/п	Защищаемая группа	Блокирующая группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
1	—OH (Ser, Thr, Tyr)	Бензильная	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Bzl	H_2/Pd ; $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$; $\text{HF}/\text{анизол}$	1954	К. Окава
2	— " —	трет-Бутильная	$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$	Bu ^t	CF_3COOH	1957	Г. Андерсон, А. Мак-Грегор
3	—OH (Tyr)	2,6-Дихлорбензильная		Cl ₂ Bzl	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин)	1973	Д. Ямаширо, Ч. Ли
4	— " —	3-Бромбензильная		BrBzl	То же	1975	С. Пена, Дж. Стюарт, А. Паладини и др.
5	— " —	Циклогексильная		cHex	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин)	1978	М. Энгельгард, Р. Меррифилд
6	—SH (Cys)	Бензильная	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Bzl	Na/NH_3 ; $\text{HF}/\text{анизол}$ (20 °C, 30 мин)	1935	Р. Зифферд, В. Дю Виньо
7	— " —	п-Метоксibenзильная		MBzl	$\text{HF}/\text{анизол}$ (0 °C, 30 мин); $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{Hg}^{2+}$; Na/NH_3	1964	С. Акабори, С. Сакакибара, Я. Шимониши и др.
8	— " —	Тритильная	$-\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$	Trt	Соли Hg^{2+} , Ag^+ ; I_2 ; CF_3COOH — $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ (1:1)	1956	Л. Зервас, Д. Теодоропулус
9	— " —	Ацетамидометильная	$-\text{CH}_2\text{NHCOCH}_3$	Acsm	Соли Hg^{2+} (20 °C, 60 мин, pH 4,0); I_2	1968	Д. Вебер, Д. Милковский, Р. Денкефальтер, Р. Хиршман

№ п/п	Защищаемая группа	Блокирующая группа	Формула	Сокращение	Условия отщепления	Год открытия	Авторы
10	-SH (Cys)	<i>tert</i> -Бутилтио	-S-C(CH ₃) ₃	SBu	Тиолиз (тиофенол; HS-CH ₂ COOH; HO-CH ₂ -CH ₂ -SH)	1969	Э. Вюнш, Р. Спангенберг
11	-NH-C-NH ₂ NH (N ^G , Arg)	N ^ω -Нитро	-NO ₂	NO ₂	H ₂ /Pd; Na/NH ₃ , HF/анизол	1934	М. Бергманн, Л. Зервас, Х. Ринке
12	- " -	N ^ω -Тозильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Tos	Na/NH ₃ ; HF/анизол (0°C, 30 мин)	1958	Р. Швицер, Ч. Ли
13	- " -	N ^ω -Моно-или N ^{ω,δ} -дифенил-зидоксикарбонильная	-CO-O-CH ₂ - 	Z	H ₂ /Pd; HBr/CH ₃ COOH	1957	Л. Зервас, М. Виниц, Дж. Гринштейн
14	- " -	N ^ω -Мезитилен-2-сульфонильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Mts	HF/анизол; CF ₃ CO ₂ H; CH ₃ SO ₃ H	1978	Х. Яджима, М. Такеяма, Дж. Канаки, К. Митани
15		Динитрофенильная		Dnp	Тиолиз (меркаптоэтанол, pH 8,0)	1967	С. Шалтиел
16	- " -	Тозильная	-SO ₂ -  -CH ₃	Tos	HF (0°C, 30 мин) HOBT	1969	С. Сакакибара, Т. Фуджи
17	- " -	N ^π -Бензил-оксиметильная	-CH ₂ -OCH ₂ C ₆ H ₅	Bom	H ₂ /Pd	1981	Т. Браун, Дж. Джонс
18	-CONH ₂ (Asn, Gln)	Бензгидрильная	-CH(C ₆ H ₅) ₂	Bzh	HF/анизол	1967	С. Сакакибара и сотр.
19	- " -	2,4-Диметоксибензильная	-CH ₂ -  -OCH ₃	Dml	CF ₃ COOH/анизол; HF/анизол	1968	Ф. Вейганд, В. Стеглих, Дж. Бьёрнсон

При введении защитных групп в боковую цепь гистидина возможно образование двух производных по л- или т-атому азота имидазольного кольца; в условиях обычной обработки N^α-защищенного гистидина арил-, алкил- или ацилгалогенидами в щелочной среде образуются в основном т-производные.

Наиболее распространенной, хотя и не идеальной, защитной группой для имидазольного кольца гистидина является тозилная (Tos, 16).

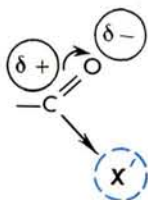
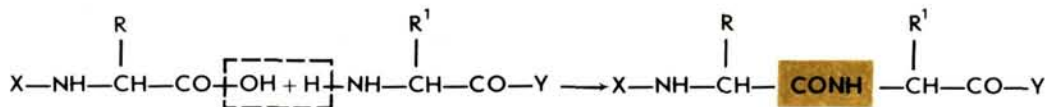
Предложенная в 1981 г. Т. Брауном и Дж. Джонсом N^{im}-(л)-бензилоксиметильная группировка (Bom, 17) оказалась наиболее удовлетворяющей всем требованиям, так как получающиеся производные устойчивы к рацемизации, действию нуклеофилов и щелочей. Boc—His(Bom)—OH синтезируют обработкой Boc—His(τ-Boc)—OMe бензилхлорметилловым эфиром с последующим омылением метилового эфира:



Блокирование боковых N-карбоксамидных групп аспарагина и глутамина в пептидном синтезе применяется сравнительно редко. В некоторых случаях все же приходится использовать защитные группировки, наиболее употребительны из них группы 18 и 19.

Методы создания пептидной связи

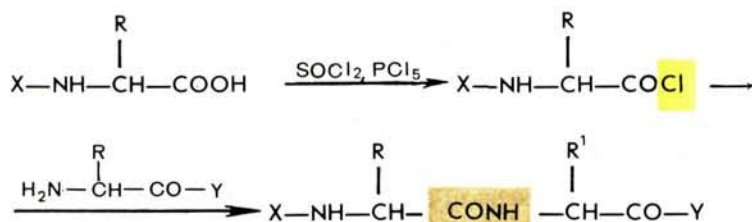
Образование пептидной связи в общем сводится к отщеплению элементов воды.



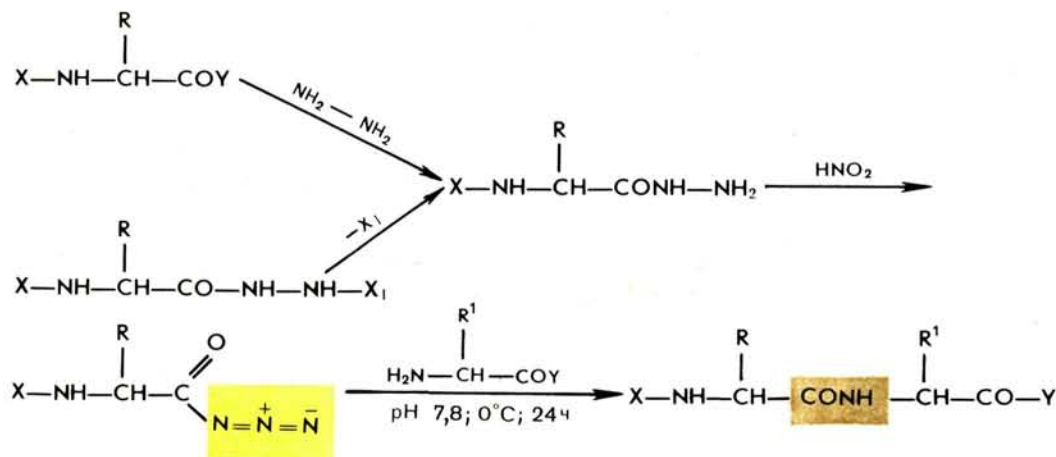
Для того чтобы сделать эту реакцию возможной и, более того, обеспечить ее высокую скорость и полноту, необходимо «активировать» карбоксильную группу. Такая активация должна сводиться к увеличению электрофильности карбонильного углерода (C^{δ+}).

Как легко видеть, важная роль в этом случае принадлежит группе X', которая в конечном счете определяет эффективность активации. Методы конденсации обычно и различаются природой группы X'.

Хлорангидридный метод. Хлорангидридный метод, упоминавшийся в историческом очерке, в настоящее время применяется редко, так как сопровождается рацемизацией и образованием побочных продуктов. Хлорангидриды получаются обычно обработкой производных аминокислот и пептидов хлористым тионилем или пятихлористым фосфором.

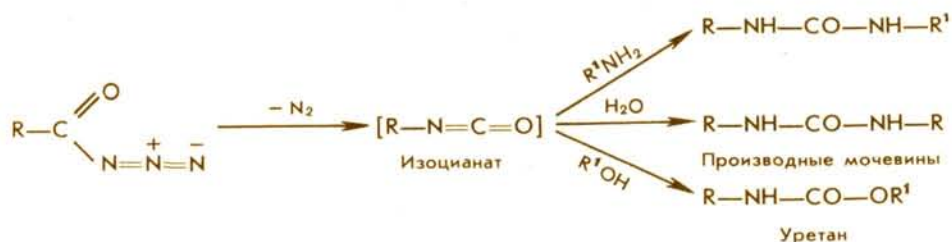


Азидный метод. Метод Т. Курциуса находит широкое применение в синтезе пептидов.



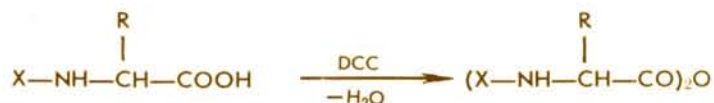
Гидразиды получают либо прямым гидразинолизом эфиров защищенных аминокислот или пептидов, либо из защищенных гидразидов ($-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{Z}-$, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}-\text{Woc}$ и т. д.). Перевод в азиды осуществляется обработкой водным раствором нитрита натрия в кислой среде при -5°C или действием изоамилнитрита или трет-бутилнитрита при -20°C в органическом растворителе (модификация Хонцля и Рудингера, 1961). Азиды можно получать и непосредственно из HOOC -производных с помощью дифенилфосфорилиазида $\text{N}_3\text{PO}(\text{OC}_6\text{H}_5)_2$, применяемого в качестве конденсирующего агента (в частности, для получения циклопептидов).

Азидный метод не свободен от недостатков. Основная побочная реакция — перегруппировка Курциуса:

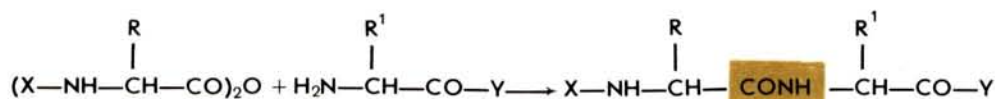


Направление и степень протекания этой перегруппировки определяется структурой азиды и условиями реакции. Хотя при азидной конденсации рацемизация сведена к минимуму, ее нельзя не учитывать, особенно при блочном синтезе; в качестве основания рекомендуется использовать не триэтиламин-, а N-метилморфолин или N-этилдиизопропиламин.

Метод ангидридов. Симметричные ангидриды ациламино кислот легко получают обработкой последних дициклогексилкарбодиимидом (ДСС) или этоксиацетиленом, например:

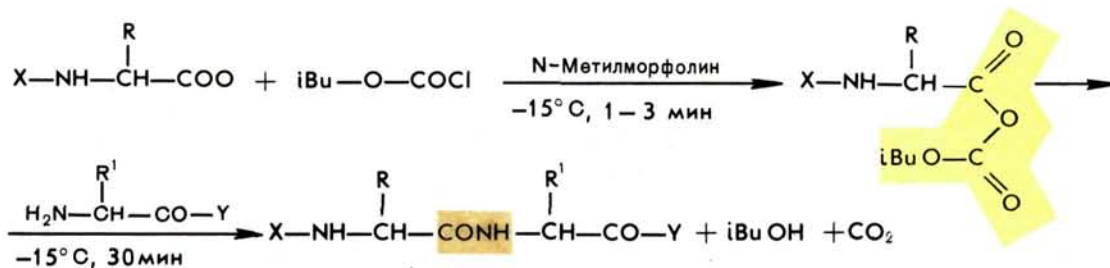


При реакции с аминок компонентом образуются пептиды:



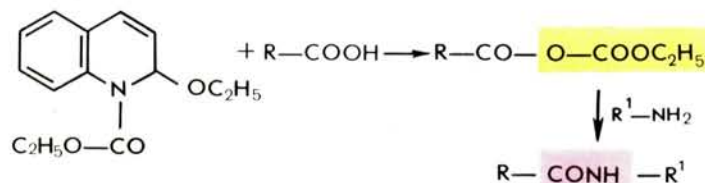
Метод в последнее время используется в твердофазном синтезе (см. с. 65).

Более распространенным является применение смешанных ангидридов, в частности с производными угольной кислоты, получаемых с помощью изобутилхлоркарбоната (Р. Воган, 1951).



Быстрый ступенчатый метод синтеза пептидов с использованием избытка смешанных ангидридов носит название *REMA-синтеза*.

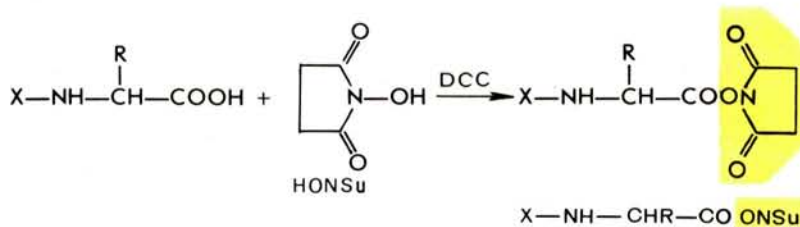
К этой группе методов можно отнести и синтез пептидов с применением в качестве конденсирующего средства 1-этоксикарбонил-2-этокси-1,2-дигидрохинолина. Перспективны также смешан-



ные ангидриды на основе производных ацилоксифосфония, получаемые с помощью дифенилфосфорилхлорида $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2\text{POCl}$, тетраэтилпирофосфита $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{POPO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ или дифенилфосфинилхлорида $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{POCl}$. Основные побочные процессы при их использовании — это образование уретанов или оксазолонов и диспропорционирование.

Метод активированных эфиров. Среди арильных активированных эфиров наиболее широко используются *p*-нитрофениловые ($-\text{ONp}$) (М. Боданский, 1956), 2,4-динитрофениловые, *o*-нитрофениловые и *o*-нитротиафениловые, 2,4,5-трихлорфениловые ($-\text{OTcp}$), пентахлорфениловые ($-\text{OPcp}$). Особое значение приобрели недавно предложенные Л. Кишфалуди высокорекреационноспособные пентафторфениловые эфиры ($-\text{OPfp}$). Ариловые эфиры этих типов получают обычно из соответствующих фенолов с помощью карбодиимида.

В последние годы большое распространение получили активированные эфиры на основе производных гидроксимида, и прежде всего *N*-гидроксисукцинимидные эфиры, например:



Кишфалуди (Kisfaludy) Лайош (р. 1924), венгерский химик-органик. Окончил Будапештский технический университет (1948), с 1956 г. возглавляет исследовательскую лабораторию фармацевтической фирмы «Гедеон Рихтер». Основные работы посвящены химии пептидов. Предложил применить высокорекреационноспособные пентафторфениловые эфиры для синтеза пептидов в растворе.

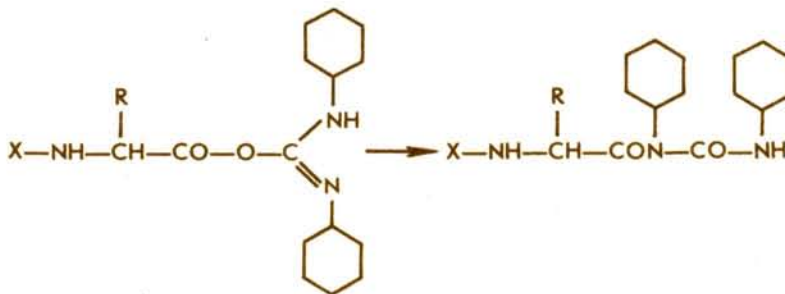
Разновидностью метода активированных эфиров является конденсация с помощью дициклогексилкарбодиимида в присутствии добавок — *p*-нитрофенола, *N*-гидроксисукцинимиды, 1-гидроксибензотриазола (HOBT) или пентафторфенола; часто в этом случае используется так называемый «F-комплекс», состоящий из трех молекул пентафторфенола и одной молекулы дициклогексилкарбо-



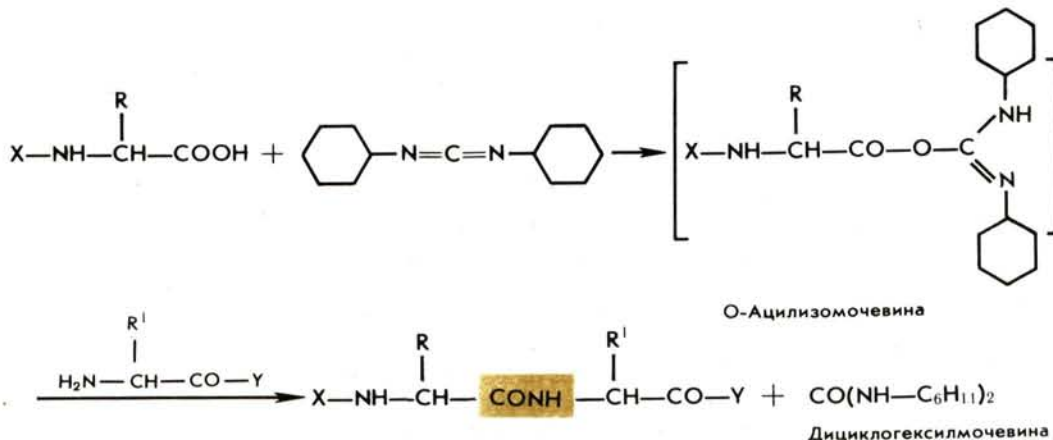
Шизн (Sheehan) Джон Кларк (р. 1915), американский химик-органик. Окончил Мичиганский университет (1941), в 1952—1971 гг. — профессор Массачусетского технологического института в Кембридже (США). Основные работы посвящены синтетической органической химии. Разработал карбодиимидный метод синтеза пептидов (1955—1958). Синтезировал пенициллин (1957). Исследовал структуру ряда важных антибиотиков.

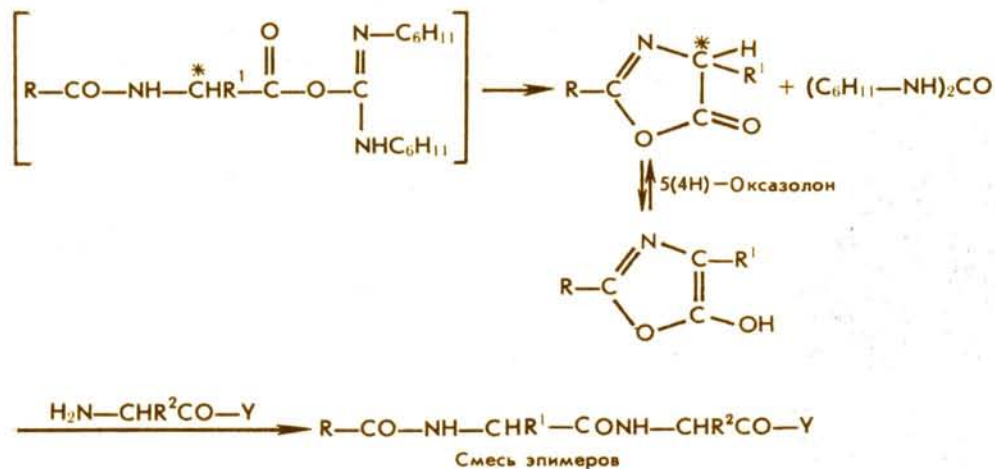
диимида. Специально можно отметить конденсацию с помощью дициклогексилкарбодиимида и 1-гидроксибензотриазола, которая позволяет получать продукты высокой степени оптической чистоты, в том числе и в случае производных гистидина (что обычно трудно достигается другими методами).

Карбодиимидный метод. Дициклогексилкарбодиимид предложен в 1955 г. Дж. Шизном и Г. Хессом при синтезе пенициллина (см. с. 724). Первой стадией реакции является активирование карбоксильного компонента путем образования реакционноспособного производного O-ацилизоомочевина.

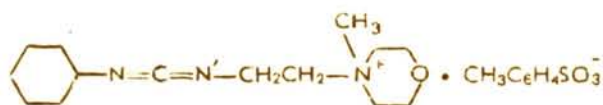
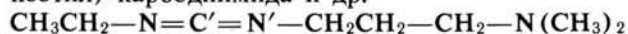


Производное O-ацилизоомочевина превращается в пептид непосредственно или через соответствующий симметричный ангидрид. Главным побочным процессом является O → N-ацильный сдвиг, приводящий к получению неактивных побочных продуктов — N-ацилизоомочевин.





В настоящее время широко применяются так называемые водорастворимые карбодиимиды: 1-этил-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид, *p*-толуолсульфонат (1-циклогексил-3-(2-метилморфолиноэтил)-карбодиимида и др.

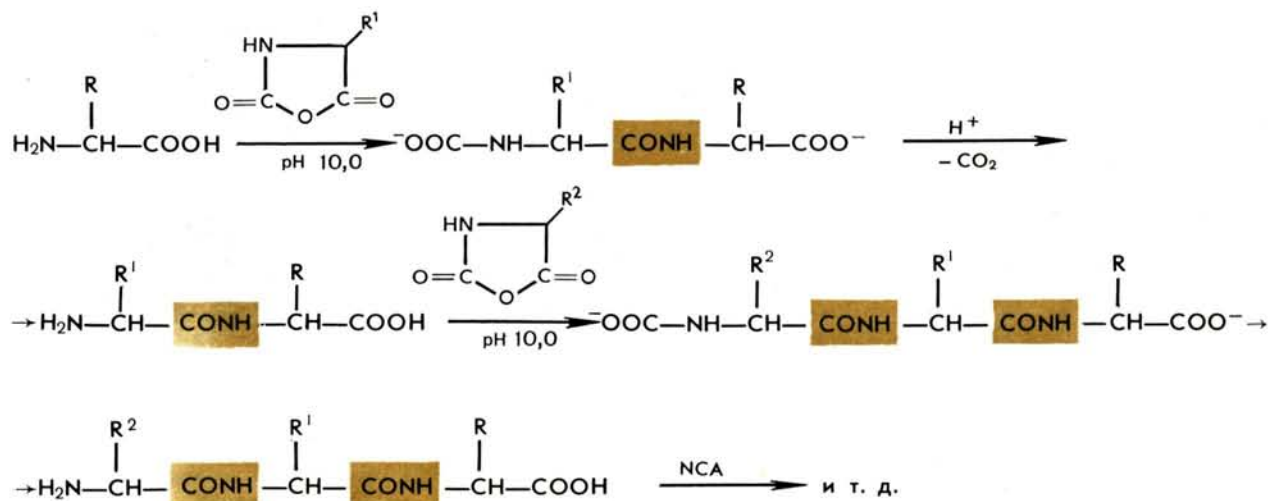


Поразительно, что в этом случае речь идет о водоотнимающих реагентах, успешно функционирующих и в водных растворах.

Карбоксиангидридный метод. В 1966 г. Р. Хиршман предложил использовать для направленного синтеза пептидов в водной среде *N*-карбоксиангидриды (NCA, ангидриды Лейкса, оксазолидиндионы).

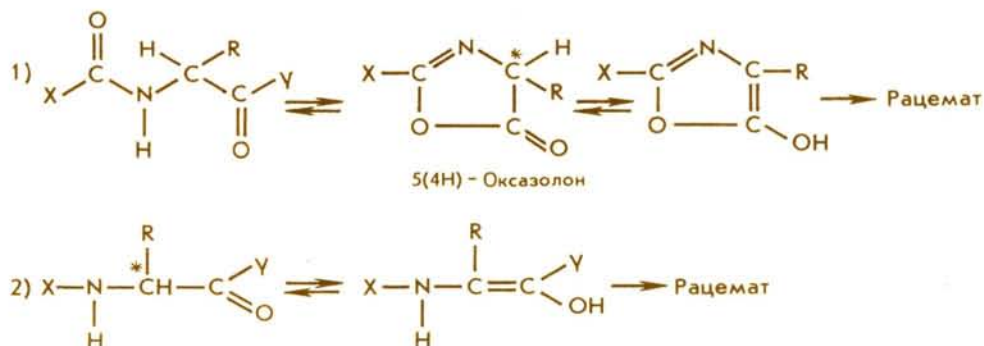
Суть предложенного им приема заключается в точном регулировании pH среды: конденсация *N*-карбоксиангидрида с аминокислотой проводится при pH 10,2, при подкислении осуществляется *N*-декарбоксилирование производных карбаминоновой кислоты, и затем цикл реакций повторяется (иногда такой прием обозначается

как «pH-весы»). Этим методом, в котором построение цепи ведется от C- к N-концу, Р. Хиршман получил весьма длинные пептидные фрагменты S-белка рибонуклеазы (см. с. 191).



Рацемизация, т. е. полная или частичная потеря оптической чистоты одного или более аминокислотных остатков, является главной побочной реакцией в пептидном синтезе, накладывающей жесткие ограничения на выбор защитных групп и методов конденсации. Рацемизация приводит к образованию оптически неоднородных продуктов, разделение которых по мере удлинения цепи резко осложняется и превращается в практически неосуществимую задачу.

Реакция рацемизации протекает по двум механизмам: 1) через образование 5(4Н)-оксазолонов (часто называемых азлактонами) или 2) через енолизацию:



В общем случае степень инверсии у α -углеродного атома (рацемизации) определяется природой заместителей X, R, Y, температурой и рН среды.

Аминокислоты и их неактивированные производные заметно рацемизируются в сильноокислой или щелочной среде, особенно при нагревании. Активированные производные аминокислот более подвержены рацемизации как в процессе их получения, так и в ходе аминолиза. Особенно легко рацемизируются производные пептидов, что осложняет проведение конденсации фрагментов. Следует отметить, что уретановые N-защитные группировки аминокислот (в том числе наиболее популярные Z- и Boc-группы) обладают низкой склонностью к образованию оксазолонов. Поэтому ступенчатый синтез с использованием этих групп — один из наиболее надежных путей избежать рацемизации при синтезе пептидов.

Синтез на полимерном носителе. Пептидный синтез в классическом варианте сопряжен со значительными затратами труда и времени. С целью создания более эффективной методологии Р. Меррифилд в 1963 г. предложил твердофазный метод синтеза пептидов. Идея его состоит в закреплении растущей полипептидной цепи на полимерном нерастворимом носителе. При этом значительно упрощаются операции выделения промежуточных продуктов, которые сводятся к экстракции и фильтрованию полимера, полностью снимается проблема нерастворимости пептидов и создаются предпосылки для автоматизации процесса. Определяющим фактором в твердофазном синтезе является полнота протекания всех химических реакций, которая достигается за счет применения избытка конденсирующего агента и N-защитной аминокислоты, отделяемых экстракцией. Естественно, выбор защитных группировок и методов конденсации должен обеспечить полное отсутствие рацемизации. Наилучшие результаты достигаются при использовании



Меррифилд (Merrifield) Роберт (р. 1921), американский химик-биоорганик. Окончил Калифорнийский университет в Лос-Анжелесе (1943), с 1966 г. — профессор Рокфеллеровского университета (Нью-Йорк). Разработал известный метод твердофазного синтеза пептидов (1962) и осуществил синтез брадикинина, ангиотензина и рибонуклеазы. Лауреат Нобелевской премии по химии (1984).

Рис. 77. Схема твердофазного синтеза пептидов.

1. Получение полимера с активной группировкой

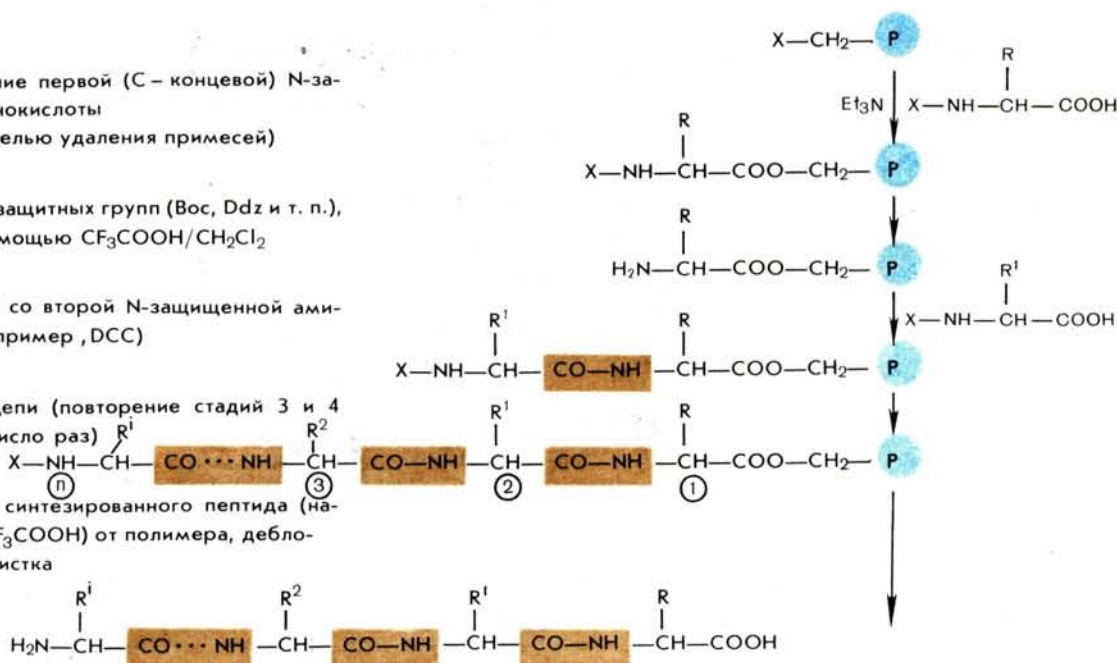
2. Присоединение первой (С-концевой) N-защитной аминокислоты
(и промывка с целью удаления примесей)

3. Удаление N-защитных групп (Boc, Ddz и т. п.), например с помощью $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$

4. Конденсация со второй N-защитной аминокислотой (например, DCC)

5. Удлинение цепи (повторение стадий 3 и 4 необходимое число раз)

6. Отщепление синтезированного пептида (например, $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$) от полимера, деблокирование и очистка





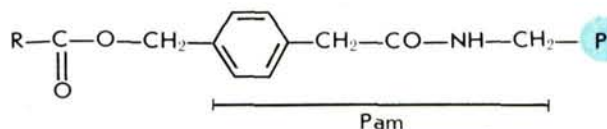
Хиршман [Hirschman] Ральф Ф. (р. 1922), американский химик-органик. Окончил Висконсинский университет (1948), работает в исследовательской лаборатории фирмы «Мерк». Известен работами по синтезу пептидов и выяснению связи между структурой и функцией пептидных гормонов (тиролиберин, соматостатин). Применил N-карбоксиянгидриды для направленного синтеза пептидов.

Вос-, Врос- и Fтос-защитных групп, методов симметричных ангидридов и дициклогексилкарбодиимидного. Успешное проведение синтеза на твердом полимере требует применения высокоочищенных реагентов и растворителей на всех стадиях процесса. Первый твердофазный синтез гормона брадикинина был проведен Р. Мерфилом с общим выходом 70%.

В качестве носителя наиболее широко используется микропористый хлорметилированный сополимер стирола и дивинилбензола, хорошо набухающий в органических растворителях и обладающий химической и механической прочностью.

Нагрузка полимера растущими пептидными цепями, как правило, невелика и составляет 0,1 — 0,3 ммоль пептида на 1 г полимера. Полнота реакции ацилирования оценивается на основании реакции с нингидрином или флуорескамином (см. с. 35 и 36) или физико-химическими методами.

С целью повышения кислотоустойчивости «якорных» группировок, связывающих пептид с полимером, в настоящее время применяются полимерные смолы с фенилацетамидометильными группами (Pam-полимеры).



Отщепление пептида от смолы проводится с помощью жидкого HF в присутствии анизола, раствора HF в пиридине, трифторметансульфокислоты, реактива Плесса [(CF₃COO)₃B в CF₃COOH], а так-

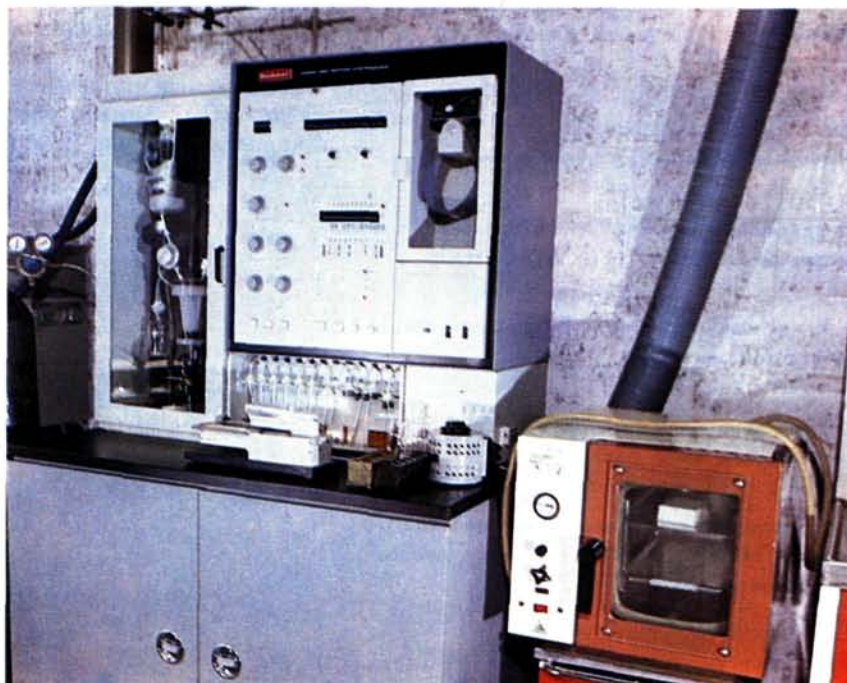


Рис. 78. Твердофазный синтезатор пептидов 990 (Beckman, США).

же $\text{HBr}/\text{CF}_3\text{COOH}$ и других реагентов; иногда применяется аммонолиз, гидраинолиз, омыление и т. п.

Автоматический твердофазный синтез пептидов осуществляется на специальных приборах, называемых синтезаторами (рис. 78).

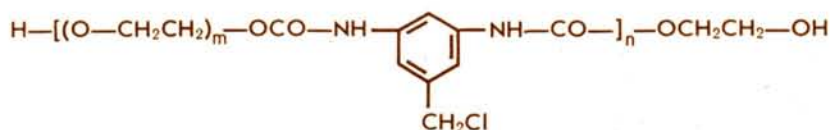
В последние годы создан колоночный вариант твердофазного синтеза пептидов. В качестве матрицы вначале использовалась полярная полиамидная смола. Этот желатинообразный полимер хорошо проницаем и сольватируется многими растворителями, включая воду и диметилформамид. Мягкие полимеры такого типа в колоночном варианте имели неудовлетворительные физико-химические и механические свойства. Р. Шеппард и сотр. предложили использовать жесткий макропористый неорганический носитель — силикагель, в порах которого заполимеризован полидиметилакриламидный гель. Этот носитель, сочетающий в себе свойства жесткой матрицы и хорошо набухающего органического геля, нашел успешное применение в колоночном твердофазном синтезе. На его основе создан и синтезатор колоночного типа.

Жидкофазный способ синтеза пептидов предусматривает использование в качестве носителей растворимых полимеров (М. М. Шемякин, 1965). Одним из недостатков твердофазного синтеза является изменение степени набухания полимера по мере роста пептидной цепи, которое может приводить к периодическому «маскированию» концевых NH_2 -групп растущей пептидной цепи. Это, в свою очередь, вызывает неполное протекание реакций конденсации на той или иной стадии, и в результате образуются «ложные пептиды», т. е. пептиды с пропуском отдельных аминокислотных остатков. Разделение смеси пептидов на конечном этапе синтеза в этом случае оказывается затруднительным. При жидкофазном способе пептидного синтеза на полимере снимаются некоторые осложнения, вызываемые гетерогенностью среды.

В качестве растворимого полимера используется полистирол (молекулярная масса около 200 000), а избыток реагентов удаляется осаждением полимера из органического раствора с последующим фильтрованием. Лучшие результаты получены при применении в качестве носителей полиэтиленгликолей с молекулярной массой 2000 — 20 000 и блок-сополимеров полиэтиленгликоля с диизоцианатами (Э. Байер, 1978).



Байер (Bayer) Эрнст (р. 1927), немецкий химик. Окончил Гейдельбергский университет (1954), с 1962 г. — профессор университета и директор Института органической химии в Тюбингене. Известен работами по структуре металлопротеинов и синтезу полипептидов на полимерных носителях.



Жидкофазный способ синтеза пептидов используется в некоторых типах автоматических синтезаторов для получения относительно небольших пептидных молекул (в случае высокомолекулярных пептидов синтез нередко осложняется из-за изменения растворимости полимера).

Завершая обсуждение методов синтеза пептидов на полимерном носителе, отметим возрастающую роль *полимерных реагентов*. В частности, часто применяются полимерные активированные эфи-

ры защищенных аминокислот типа нитрофениловых, N-гидроксисукцинимидных, 1-гидросибензотриазоловых (А. Патчорник, Т. Виланд).

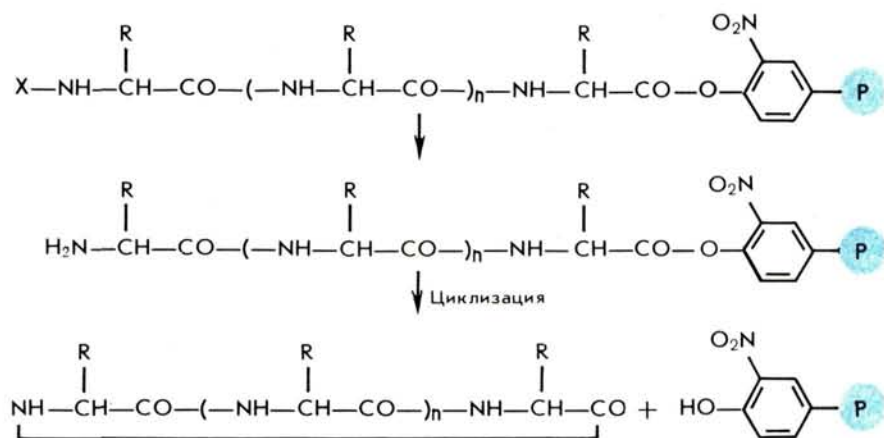
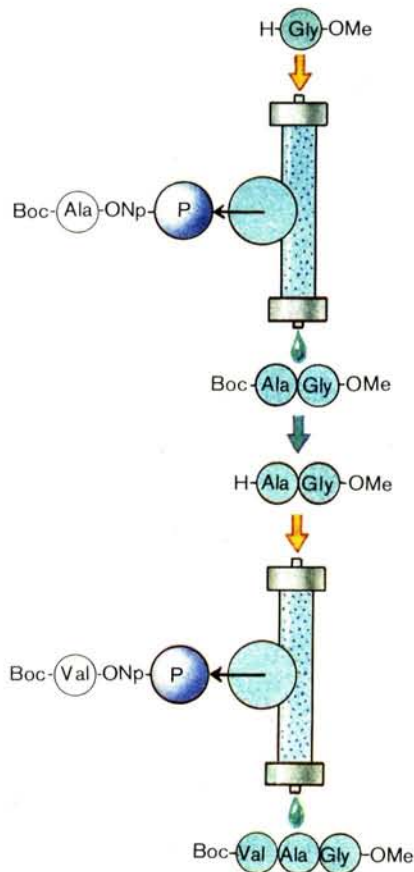
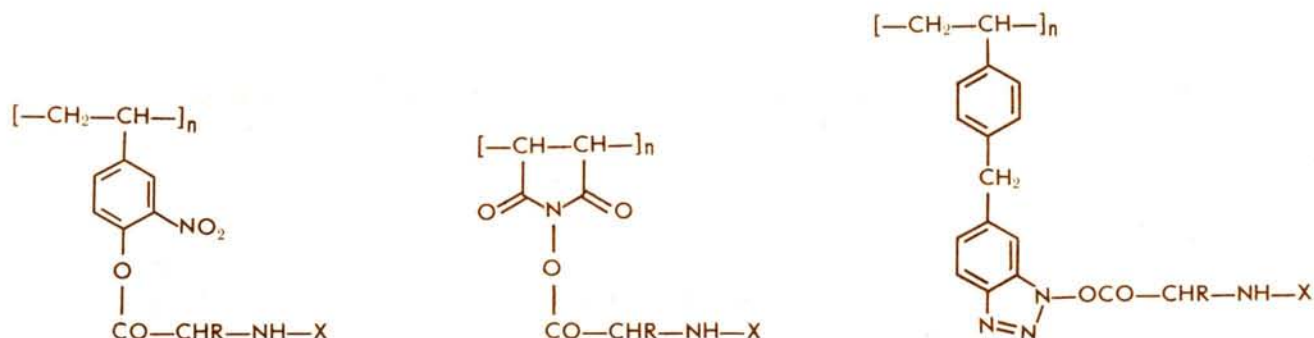
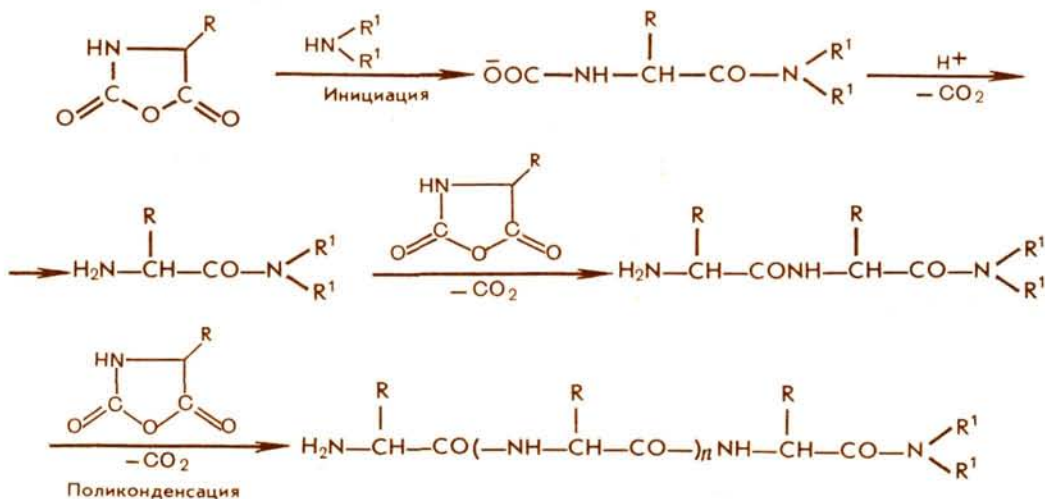


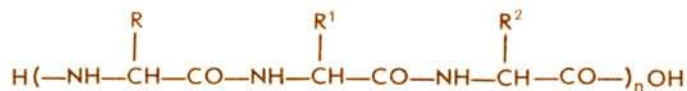
Рис. 79. Принцип синтеза пептидов с использованием полимерных активированных эфиров аминокислот.

Синтез полиаминокислот. Как уже отмечалось (с. 127), для синтеза полиаминокислот лучше всего использовать N-карбоксииан-

гидриды. Если последние являются достаточно стабильными, для ускорения реакции применяют инициаторы (спирты, амины и др.), например:

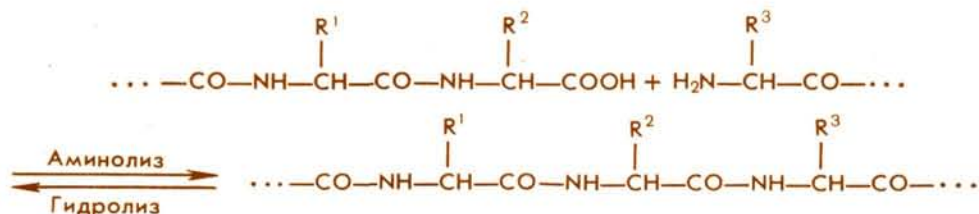


В случае смеси двух N-карбоксиянгидридов образуется сополимер аминокислот. Распределение аминокислот в цепи при этом оказывается не статистическим, а определяется природой аминокислот. На основе тех же принципов могут быть получены полимеры, состоящие из повторяющихся коротких последовательностей аминокислот. В частности, при поликонденсации с помощью различных методов линейных ди-, три-, тетра- и пентапептидов образуются соответствующие регулярные полипептиды из 30 — 50 повторяющихся единиц:



Ферментативный синтез пептидов и белков. Сложность и трудоемкость синтеза пептидов с помощью химических методов настоятельно побуждают искать принципиально иные подходы к синтезу пептидно-белковых веществ. Одним из таких подходов является синтез пептидов с использованием в качестве катализаторов ферментов. Еще в 1937 г. М. Бергманн, Г. Френкель-Конрат и Дж. Фрутон впервые сообщили о возможности обращения протеолитической реакции в сторону образования пептидной связи, однако лишь недавно были проведены первые исследования по ферментативному синтезу пептидов.

Установлено, что протеолитические ферменты — химотрипсин, папаин, термолизин и др. в специфических буферных растворах, чаще всего в водно-органических смесях, в принципе способны катализировать образование пептидных связей между аминокислотами и пептидами. Схематически катализируемую ферментами реакцию гидролиза-аминолиза можно представить следующим образом:



В водной среде равновесие такой реакции обычно сдвинуто в сторону гидролиза, однако направленное изменение условий реакции (ее термодинамических и кинетических параметров) позволяет сместить равновесие в сторону синтеза. В частности, необходимо обеспечить низкую растворимость синтезируемого пептида и/или высокую концентрацию исходных компонентов. Для этого используют соответствующие комбинации защитных групп, смешивающиеся или несмешивающиеся водно-органические смеси (такие, как ДМФА — вода, диоксан — вода, хлороформ — вода, этилацетат — вода), pH-контроль, иммобилизованные ферменты.

В качестве примера рассмотрим синтез дипептида $\text{Ac}-\text{Phe}-\text{Ala}-\text{NH}_2$ под действием химотрипсина. Известно, что химотрипсин расщепляет амидные и сложноэфирные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот Phe, Tug, Tгр. Реакция протекает через промежуточную стадию образования ацилфермента, который далее деацилируется с участием воды как нуклеофила. В присутствии других нуклеофилов — аминокислот, их амидов и пептидов можно получить продукты как гидролиза, так и аминолиза.



Соотношение констант скоростей гидролиза (k_3) и аминолиза (k_4) определяет направление реакции и зависит от концентрации нуклеофилов. Найдено, что при pH 10,0 и 1 М концентрации $RNH_2(Ala-NH_2)$ выход пептида $Ac-Phe-Ala-NH_2$ составляет 95%.

С помощью такого подхода в настоящее время можно синтезировать небольшие пептиды. Например, при использовании в качестве катализаторов химолипазы, термолипина и папаина был получен гексапептид последовательности 6 — 11 эледиозина: $Woc-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH_2$ (Х. Якубе). Преимуществами синтеза с участием ферментов являются отсутствие рацемизации, возможность работы с минимальным числом защитных группировок, высокая скорость протекания реакций. Однако не исключены побочные реакции транспептидации, гидролиза, приводящие к образованию сложных реакционных смесей.



Фрутон (Fruton) Джозеф С. (р. 1912), американский биохимик. Окончил Колумбийский университет (1934), с 1957 г. — профессор биохимии Йельского университета. Основные работы посвящены химии белков, пептидов и аминокислот, изучению специфичности и механизма действия протеолитических ферментов, истории биохимии.

Полусинтез пептидов и белков

Полусинтез (семисинтез, частичный синтез) — способ получения соединений, заключающийся в комбинировании природных пептидов и белков или их фрагментов с пептидами, полученными полным синтезом или модификацией природных объектов. Полусинтез можно рассматривать как методический прием, основанный на модификации природных соединений.

Известные в структурной химии белка способы ферментативного и химического расщепления пептидной цепи и разделение образующихся в результате фрагментов с помощью хроматографической техники позволяют получать гомогенные пептидные блоки. С помощью различных методов можно осуществить целенаправленное изменение нужного фрагмента (укорочение, удлинение, введение новых остатков и т. п.) и затем собрать из блоков новые, видоизмененные последовательности. Защитные группы при полусинтезе выбираются таким образом, чтобы их введение сохраняло способность производных растворяться в водных и водно-органических растворах. При сборке нужной последовательности из подготовленных пептидных блоков чаще всего используются такие методы, как DCC/NOBt, DCC/HOSu, а также азидный метод и метод активированных эфиров. Особое внимание уделяется при этом проблеме рацемизации.

Полусинтез как способ получения соединений пептидно-белковой природы можно проиллюстрировать на примере инсулина. В 1972 г. впервые было осуществлено превращение инсулина свиньи в инсулин человека (М. Руттенберг). Молекулы этих гормонов отличаются лишь одним аминокислотным остатком: в положении В 30 в инсулине свиньи находится Ala, а в инсулине человека — Thr. Предложенная схема (рис. 80) включала синтез гексаметилового эфира инсулина свиньи (обработкой diazometаном), расщепление В-цепи трипсином по остатку Arg-22, блокирование Woc-группой N-концевых остатков А- и В-цепей полученного «укороченного» инсулина, затем конденсацию продукта с синтетическим фрагментом В 23 — 30 инсулина человека (DCC/HOSu методом) и, наконец, удаление всех защитных групп. После интенсивной очистки удалось выделить инсулин человека с выходом около 10%.

Позднее (1980 — 1983) были предложены еще два способа ферментативного превращения инсулина свиньи в инсулин человека

(К. Морихара, Дж. Маркуссен). В 1983 г. разработан способ промышленного производства инсулина человека из инсулина свиньи, основанный на применении иммобилизованной протеиназы I из *Achromobacter lyticus* на стадиях гидролиза инсулина в дез-Ala B—30 инсулин и конденсации последнего с Thr—OBu¹ (Т. Ока).

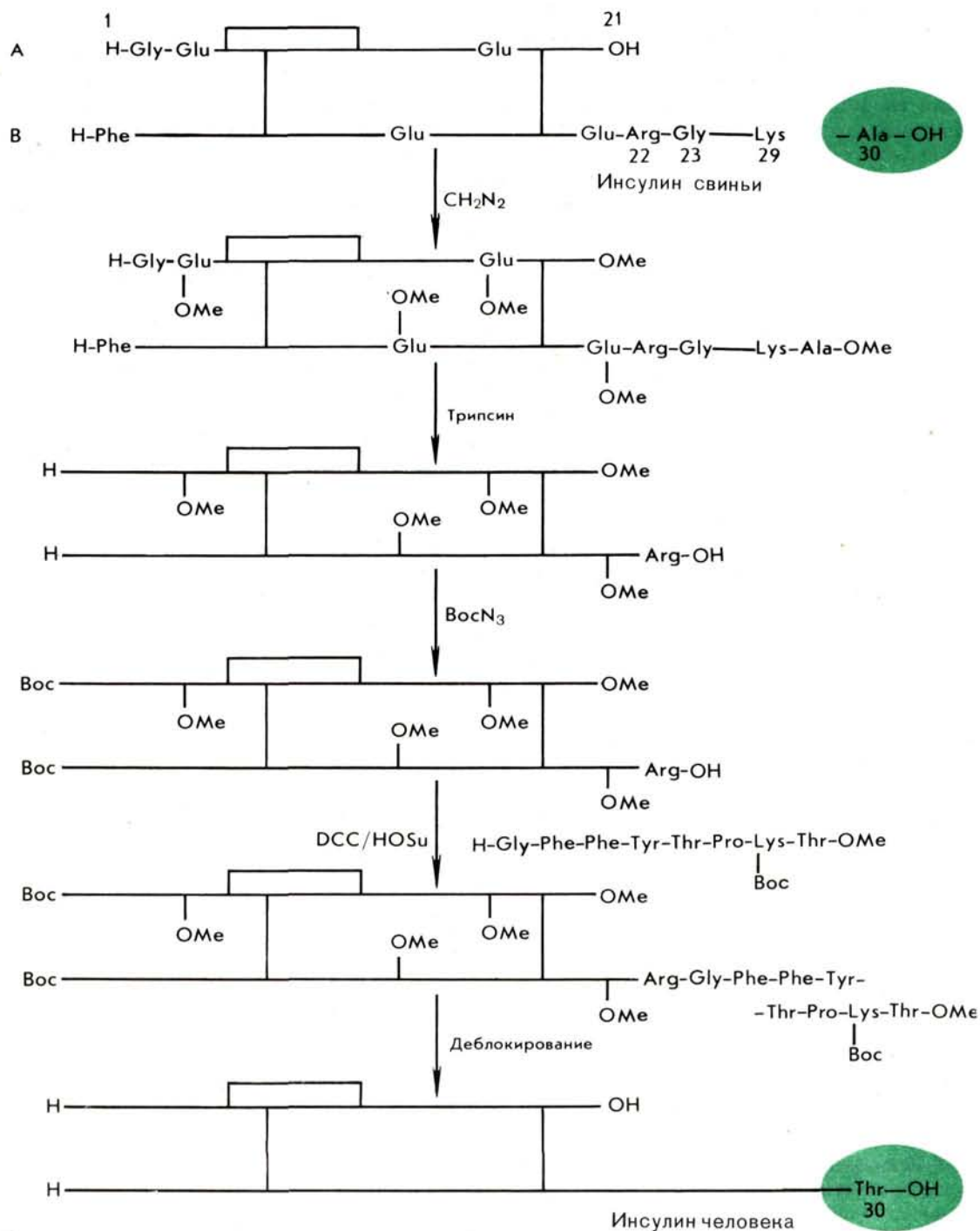
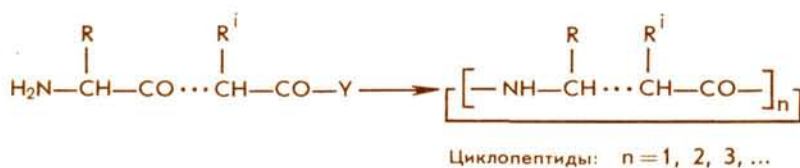


Рис. 80. Полусинтез инсулина человека из инсулина свиньи.

Для получения циклических пептидов используются обычные для пептидного синтеза методы создания амидной связи. Чаще всего первоначально создается линейный предшественник в виде защищенного пептида, активируется С-концевая карбоксильная группа, освобождается N-концевая аминогруппа и проводится реакция аминолиза собственной аминогруппой пептида. Для уменьшения межмолекулярных реакций аминолиза, приводящих к полимеризации и вследствие этого циклоолигомеризации, реакции циклизации проводят в условиях высокого разбавления в инертных растворителях. Однако, как правило, побочные реакции полимеризации всегда имеют место и уменьшают выход циклического продукта. Лучшие результаты дает метод получения циклопептидов на полимерном носителе (см. с. 148).



Выход циклических продуктов сильно зависит от стерических факторов: напряженности образующегося цикла, разветвленности боковых радикалов, термодинамических и конформационных параметров.

Синтез гетеродетных пептидов

Среди соединений пептидно-белковой природы нередко встречаются такие соединения, которые наряду с обычными амидными связями содержат и связи другого типа. Такие пептиды называются гетеродетными (гомодетные пептиды построены только из аминокислот, соединенных с помощью амидных связей). В группу гетеродетных пептидов входят: депсипептиды, в составе которых есть гидроксикислоты или гидроксиаминокислоты; S-пептиды, содержащие тиоэфирную связь между остатками; (S—S)-пептиды, содержащие дисульфидную связь; гликопептиды, содержащие N- или O-гликозидные связи, и т. д. (см. с. 472 и 474).

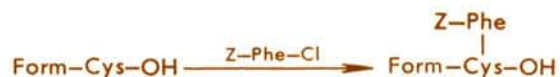
(S—S)-Пептиды. Остатки цистеина в пептидах и белках образуют дисульфидные связи, соединяющие участки одной цепи или отдельные пептидные цепи. (S—S)-Содержащие пептиды могут быть линейными и циклическими.

Создание дисульфидных связей обычно проводится на одном из последних этапов синтеза обработкой соответствующего тиольного предшественника с помощью подходящих окислителей: кислорода воздуха, иода, феррицианида калия $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Если в цепи имеется лишь два остатка цистеина, то при окислении SH-групп

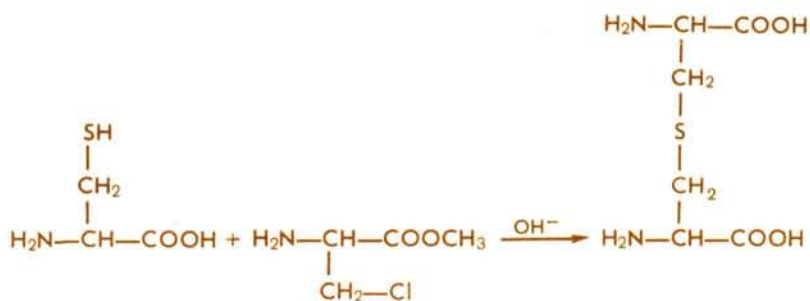
кроме циклического дисульфида получают циклические и линейные полимергомологи, степень образования которых можно уменьшить проведением процесса в условиях высокого разбавления.

Значительно более сложная ситуация возникает при синтезе соединений с несколькими дисульфидными связями. Например, если в пептиде содержится 6 остатков цистеина (3 дисульфидных связи, как в рибонуклеазе А), то формально возможно образование 105 структурных изомеров с разными дисульфидными связями. В этом случае направление и полнота реакции обычно определяются специфической укладкой пептидной цепи, что позволяет проводить самопроизвольное окислительное замыкание нужных дисульфидных связей. Естественно, здесь требуется тщательный подбор условий: окислитель, концентрация, рН среды, температура, причем даже в оптимальных условиях выход целевого продукта не высок и не исключается образование побочных соединений.

S-Пептиды. Продукты ацилирования меркаптогруппы Cys-содержащих пептидов производными аминокислот называют S-пептидами (или тиодепсипептидами). Их получают, используя различные активированные производные аминокислот (хлорангидриды, активированные эфиры и др.), например:

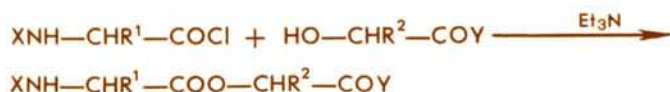


К S-пептидам относятся и пептиды, содержащие остатки лантионина или β-метиллантионина (антибиотики низин, субтилин, дурамицин, циннамицин). В. Дю Виньо и Г. Браун (1941) получили лантионин обработкой цистеина метиловым эфиром 2-амино-3-хлорпропионовой кислоты в щелочной среде:

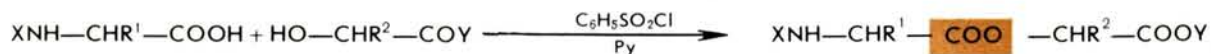


Депсипептиды. Депсипептиды составляют большую группу природных соединений, содержащих остатки гидроксикислот (в том числе и гидроксиаминокислот), связанных с другими остатками в цепи не только амидными, но и сложноэфирными связями. Особенность синтеза депсипептидов состоит в создании сложноэфирной связи. Для ацилирования малореакционноспособных вторичных

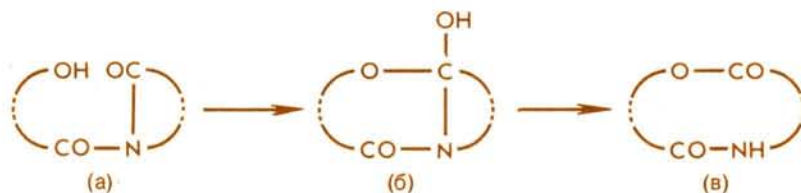
гидроксигрупп пригодны лишь методы с сильной активацией карбоксильного производного — хлорангидридный, дициклогексилкарбодиимидный, смешанных ангидридов, имидазолидный.



В синтезах природных депсипептидов для создания сложноэфирной связи широко использовались смешанные ангидриды производных аминокислот, полученные при действии бензолсульфохлорида в пиридине (Дж. Плесс, 1961):

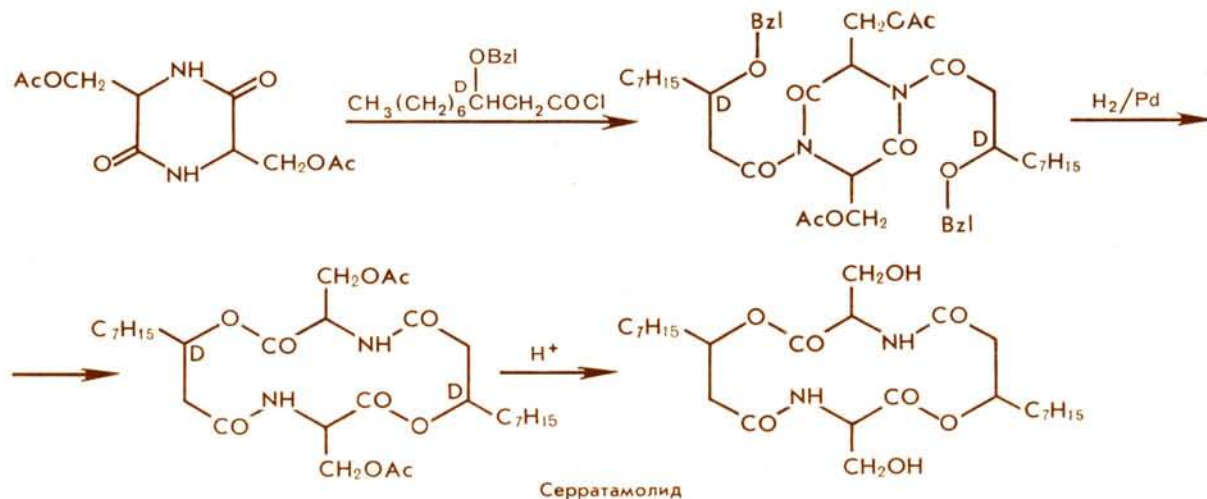


Стратегия синтеза депсипептидов предусматривает, как правило, сначала создание сложноэфирных связей, а затем соединение полученных блоков путем образования амидных связей. Такой подход более рационален, особенно при получении регулярных депсипептидов, так как для создания амидных связей можно использовать практически любой из обычных методов пептидного синтеза. Часто для этих целей применяется высокоэффективный хлорангидридный метод, причем при соблюдении соответствующих условий удастся избежать рацемизации. С помощью указанных методов синтезированы депсипептидные антибиотики — валиномицин, энниатины и множество их аналогов (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников с сотр., 1962 — 1977).



Принципиально другой метод синтеза депсипептидов основан на реакции гидроксиацильного включения (а → в) в амиды, ацилированные остатками гидрокси кислот (а), которая протекает через промежуточные циклолы (б) (М. М. Шемякин, В. К. Антонов с сотр., 1963).

С помощью этой реакции были синтезированы в три стадии антибиотик серратамолид и ряд его аналогов с модифицированными боковыми цепями. О,О-Диацетилованный 2,5-дикетопиперазин серина был N-ацелирован хлорангидридом О-бензил-3-гидроксидекановой кислоты, подвергнут гидрированию и далее продукт перегруппировки кислотным гидролизом превращен в серратамолид.



По энергетическим причинам реакция гидроксацильного включения легко проходит лишь в случае, если образующийся цикл содержит 10 или более атомов в кольце.

Примеры синтеза пептидов и белков

Классическим и твердофазным методами синтезировано большое число пептидов, в том числе природных.

Первым синтезом пептидного гормона был синтез окситоцина, осуществленный В. Дю Виньо с сотр. в 1953 г. Синтез проведен блочной конденсацией по схеме 2 + 7 (3 + 4). С-Концевой трипептид (7—9) Z-Pro—Leu—Gly—OEt (рис. 81) получался методом смешанных ангидридов и после удаления Z-группы гидрированием конденсировался с дихлорангидридом дикарбобензоксистицина. Образовавшийся симметричный бис-тетрапептид (6—9) после омыления эфира и обработки Na/NH₃ для удаления Z-группы S-бензилировался и переводился в соответствующий бензиловый эфир. Последний подвергался аммонолизу, в результате чего получался исходный С-концевой блок H—Cys(Bzl)—Pro—Leu—Gly—NH₂. Для синтеза следующего фрагмента хлорангидрид Tos-пироглутаминовой кислоты конденсировался с аспарагином, после удаления Tos-группы с помощью Na/NH₃ свободный пептид

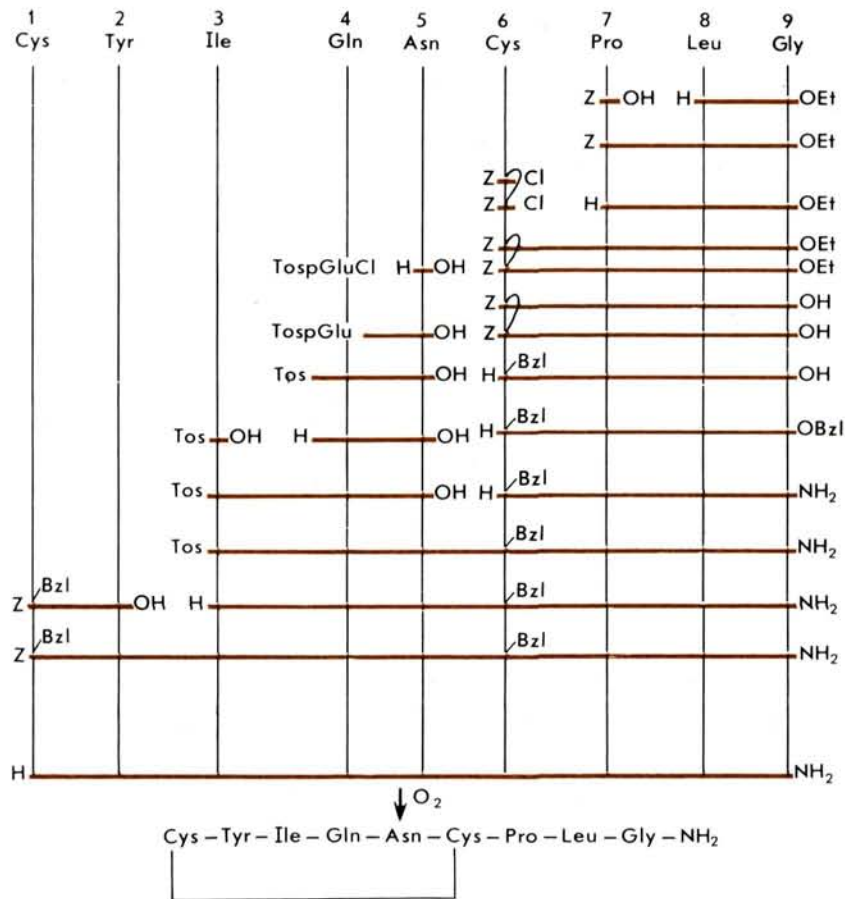
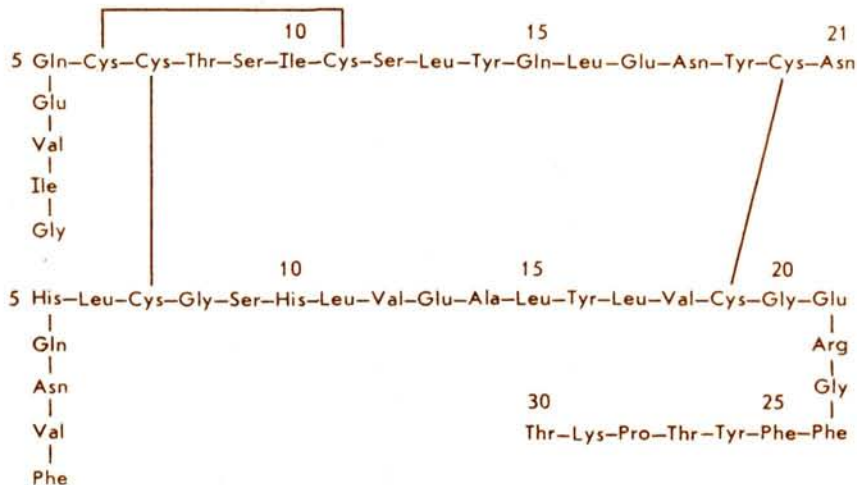


Рис. 81. Схема синтеза окситоцина по В. Дю Виньо.



Инсулин человека

H-Gln-Asn-OH обрабатывался Tos-Pe-Cl . Оба блока соединялись тетраэтилфосфитом в диэтилфосфите в защищенный гептапептид 3 — 9, который затем подвергался обработке Na/NH_3 , бензилировался и конденсировался с N-концевым дипептидом Z-Cys(Bzl)-Tyr-OH . Затем нонапептид деблокировался Na/NH_3 , окислялся кислородом воздуха для создания дисульфидной связи и очищался противоточным распределением. В результате был получен синтетический окситоцин, идентичный природному.

Успешные синтезы 39-членного пептида кортикотропина (вернее, его аналога, так как структуру АКГТ уточнили в 1971 г.) и его фрагментов (Р. Швицер, П. Зибер, 1963) позволили вплотную приступить к исследованиям по синтезу инсулина. В 1960 г. удалось соединить две разрозненные цепи в биологически активный инсулин, хотя и с низким выходом (2 — 5%), так что синтез гормона уже

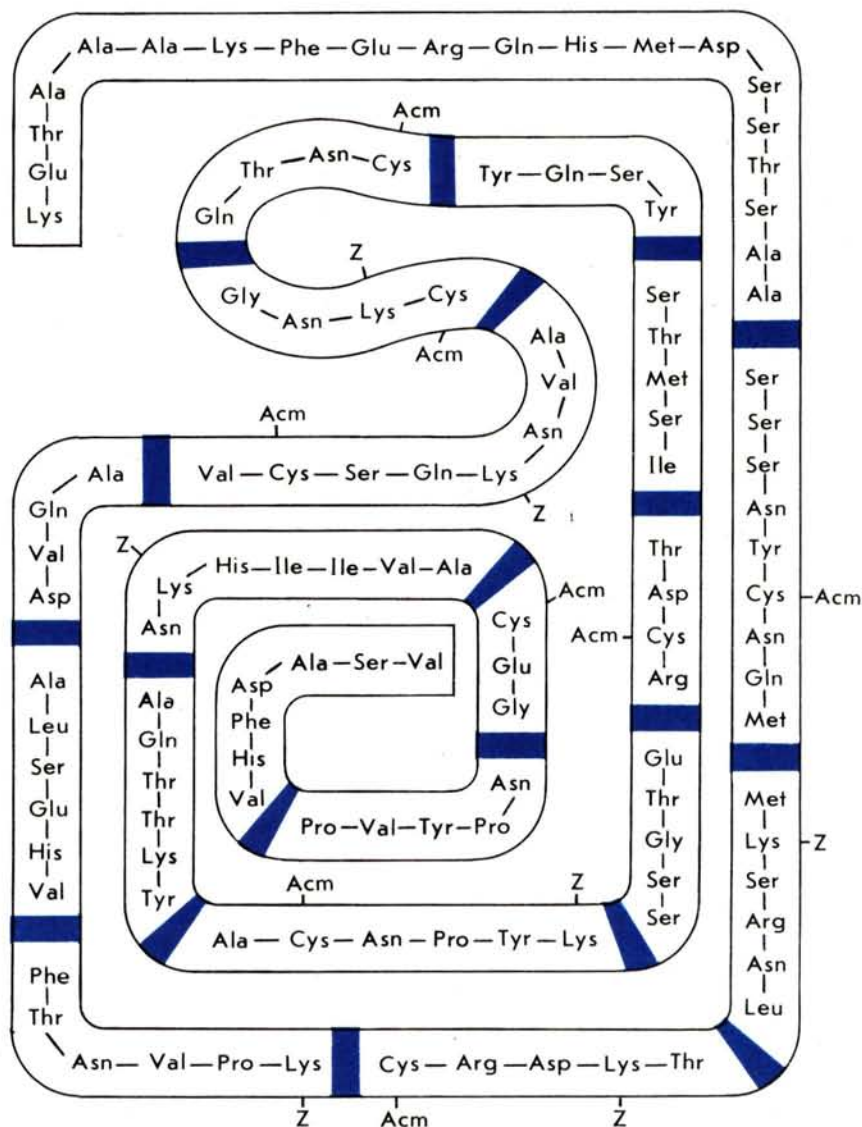


Рис. 82. Синтез рибонуклеазы А по Р. Хиршману.



Катсояннис (Katsoyannis) Панайотис (р. 1924), американский биохимик. Образование получил в Афинском университете, с 1952 г. работал в Корнеллском университете, затем в Брукхевенском центре медицинских исследований и Нью-Йоркском университете. Известный специалист в области синтеза пептидов. Осуществил (1964) один из первых полных синтезов инсулина.

представлялся реальной задачей. В начале 60-х годов одновременно в двух лабораториях — П. Катсоянниса (США) и Х. Цана (ФРГ) начались работы по синтезу цепей инсулина. Группа Х. Цана синтезировала фрагменты 1 — 9, 10 — 21 цепи А и фрагменты 1 — 8, 9 — 14, 15 — 20 и 21 — 30 цепи В, а П. Катсояннис получил такие же фрагменты цепи А и несколько другие для цепи В: 1 — 9, 10 — 13, 14 — 20, 21 — 30. Фрагменты были соединены в цепи А и В, освобождены от защитных групп и переведены в S-сульфонаты. Окисление смесей S-сульфонатов цепей привело к продуктам, обладающим активностью инсулина. Кристаллический образец чистого синтетического инсулина быка впервые получен китайскими химиками в 1965 г. в результате синтеза, проведенного по сходной схеме (Я. Кунг) (см. с. 157).

Синтезы инсулина, осуществленные тремя группами — П. Катсоянниса в США, Я. Кунга в КНР и Х. Цана в ФРГ в 1963 — 1965 гг., сыграли значительную роль в совершенствовании методологии синтетической пептидной химии.

Следующей вехой в развитии синтетических исследований был синтез S-белка рибонуклеазы А, предпринятый в США под руководством Р. Хиршмана (1963 — 1969). Стратегия синтеза (рис. 82) отличалась от применявшихся ранее подходов тем, что авторы стремились использовать минимальное число защитных группировок и упростить стадии конечного деблокирования. В ходе синтеза был предложен способ удлинения пептидной цепи N-карбоксиингидридами аминокислот (см. с. 143) и введена в практику ацетамидометильная группа для SH-функции. В итоге шестилетнего труда Р. Хиршман и сотр. получили продукт, обладающий в присутствии S-пептида 30% активности рибонуклеазы А и рядом ее физико-химических показателей.

Среди классических синтезов простейших белков необходимо отметить синтез рибонуклеазы А, состоящей из 124 аминокислотных остатков (Х. Яджима, 1980), и синтез нейротоксина II (61 остаток) из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (В. Т. Иванов и сотр., 1982).

Синтез рибонуклеазы А (Б. Гутте, Р. Меррифилд, 1969 — 1971) и β-липотропина, содержащего 91 аминокислотный остаток (Ч. Ли, Д. Ямаширо, 1978), был осуществлен твердофазным методом.

Химическая модификация белков и пептидов

Задачи химической модификации белково-пептидных веществ, как правило, связаны с выяснением связи между их структурой и биологической функцией. Естественно, при этом могут преследоваться и другие цели, например создание практически важных препаратов с заданными свойствами.

В зависимости от решаемых задач и применяемых методов принято различать следующие типы химической модификации белков и пептидов.

Замена одного или нескольких аминокислотных остатков на другие и получение на этой основе разнообразных аналогов природных соединений. Такая модификация пептидов достигается



Цан [Zahn] Хельмут (р. 1916), немецкий химик-органик, иностранный член АН СССР (1982). Окончил Высшую техническую школу в Карлсруэ (1940), работает в Институте исследования шерсти при Техническом университете в Аахене (ФРГ). Известен работами в области химии натуральных и синтетических волокон, один из ведущих специалистов по химии пептидов. Впервые синтезировал инсулин (1963).

методами пептидного синтеза (см. с. 151), а белков — посредством так называемого «направленного мутагенеза» (см. с. 379).

Модификация отдельных аминокислотных остатков с помощью селективных химических реагентов. Специфичность реакции определяется природой боковой цепи аминокислотного остатка, пространственным строением модифицируемого соединения и условиями реакции.

Модификация с помощью бифункциональных реагентов, взаимодействующих одновременно с двумя или более функциональными группами белков.

Направленная биоспецифическая модификация по «точному адресу», так называемое «аффинное мечение». Широко известно, например, применение субстратоподобных агентов для химического исследования природы и локализации активного центра ферментов или иных систем. Как биоспецифическую модификацию можно рассматривать и некоторые процессы модификации белков, такие, как фосфорилирование, ацилирование, гликозилирование, метилирование, протекающие в клетке с участием соответствующих ферментов.

Введение различных химических меток, репортерных групп, расширяющих возможности физико-химических методов (ЯМР- и ЭПР-спектроскопия, масс-спектрометрия, рентгеноструктурный анализ и др.) при исследовании структуры и функции белков (см. с. 111).

Ковалентное присоединение белка или пептида к полимеру с целью получения так называемых «иммобилизованных» препаратов (например, иммобилизованных ферментов) или создания высоко-селективных носителей для биоспецифической (аффинной) хроматографии.

Топохимическая модификация (трансформация) пептидных систем, используемая при конструировании биологически активных аналогов природных соединений.

Ниже более подробно рассматриваются некоторые из перечисленных типов химической модификации.

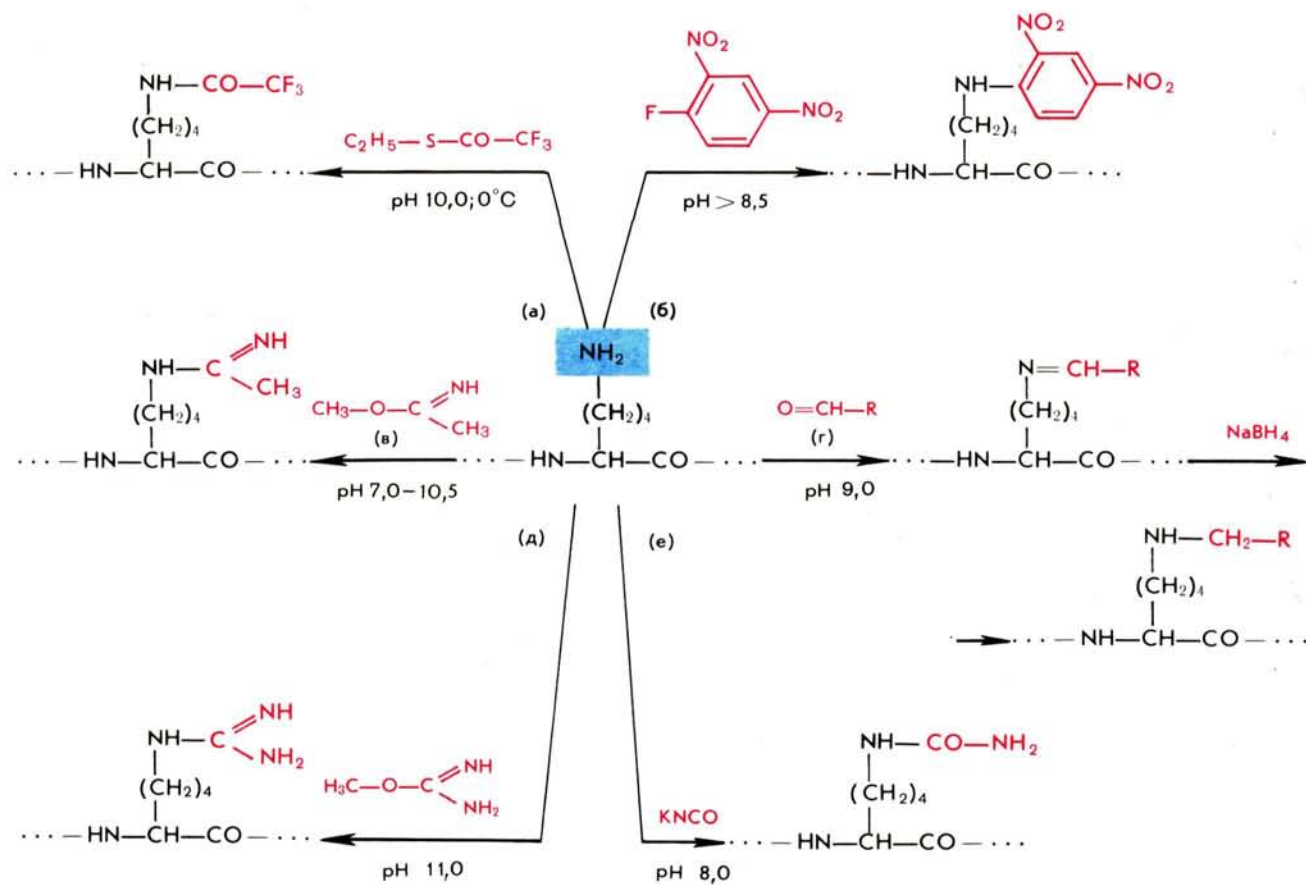
Селективная модификация аминокислотных остатков

Белок является полифункциональным соединением, в котором каждый аминокислотный остаток выполняет определенную роль в поддержании нативной конформации или проявлении биологической функции. Если используются модифицирующие агенты достаточно широкой специфичности, конечный результат зависит от доступности тех или иных функциональных групп белка в данных условиях. В частности, ацилирование с помощью радиоактивно меченного уксусного ангидрида было предложено в качестве метода локализации остатков лизина, расположенных на поверхности белковой глобулы (Б. Хартли). Этот прием широко применяется и для исследования топографии мембранных белков, когда доступными действием так называемых непроникающих реагентов оказываются лишь группировки, расположенные вне мембраны.

В настоящее время известно значительное число специфических реагентов, селективно модифицирующих боковые цепи аминокислот. Большинство из приведенных ниже реакций применяется для выявления функционально важных аминокислотных остатков. Многие

из них используются также при исследовании структуры белков и пептидов.

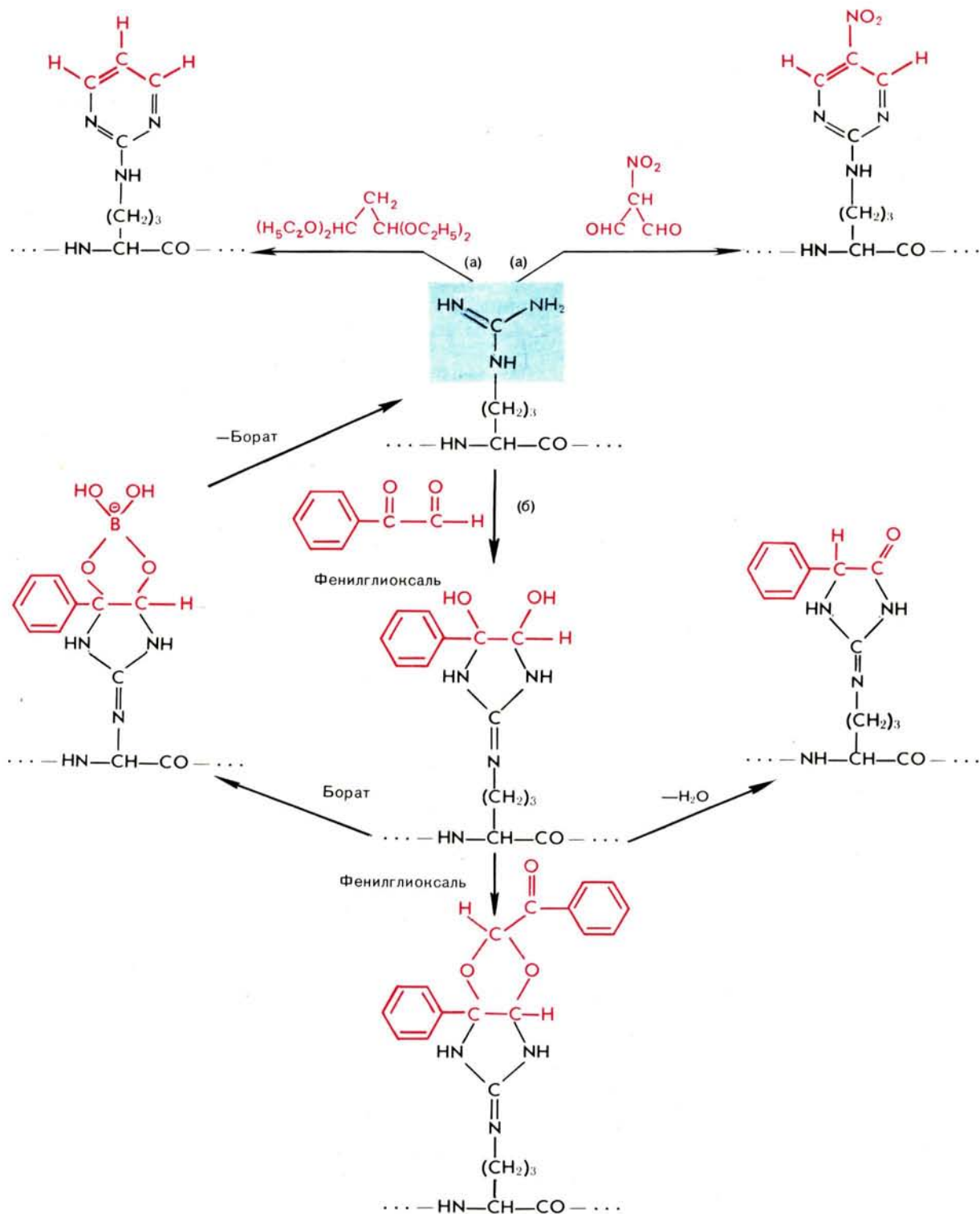
Лизин. ε-Аминогруппы остатков лизина являются весьма удобными мишенями для модификации. Наибольшее распространение при этом получили следующие методы: а) ацилирование с помощью уксусного, трифторуксусного или янтарного ангидридов, S-этилтрифторацетата; иногда применяется обратимое ацилирование малеиновым или цитраконовым ангидридами (см. с. 43); б) арилирование; в) реакция с имидоэфрами; г) образование шиффо-



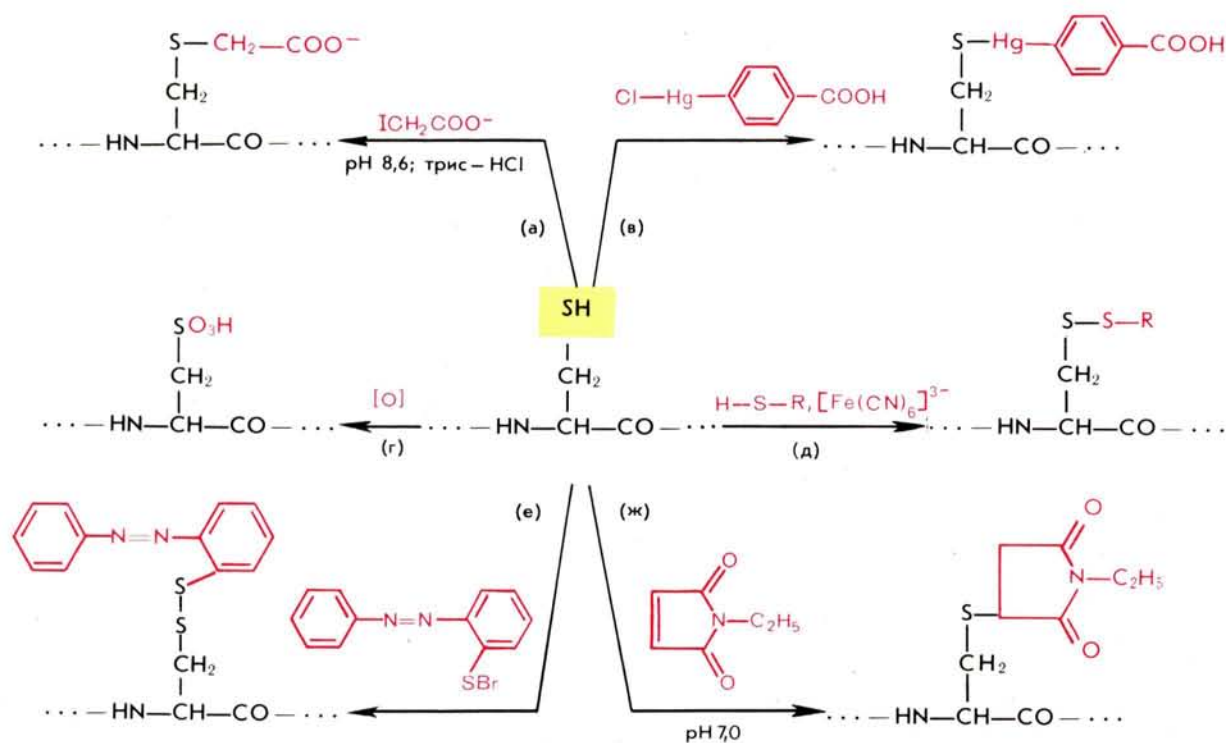
вых оснований с последующим восстановлением боргидридом натрия; д) гуанидирование (до производных гомоаргинина); е) карбамоилирование, а также дансилирование. Последняя реакция широко используется при анализе первичной структуры белков и пептидов (см. с. 37), а также для введения флуоресцентной метки в белки. Все перечисленные реакции могут применяться и для модификации N-концевой аминогруппы белков и пептидов.

Аргинин. Для модификации гуанидиногруппы остатков аргинина используются гидролиз до производных орнитина (см. с. 65) и конденсация с 1,2-дикетонами (например, 1,2-циклогександио-

ном), позволяющая обратимо модифицировать остатки аргинина (см. с. 44), а также указанные на схеме реакция с 1,3-дикарбонильными соединениями и их производными (нитромалоновый альдегид, тетраэтоксипропан) (а) и реакция с фенилглиоксалем (б).

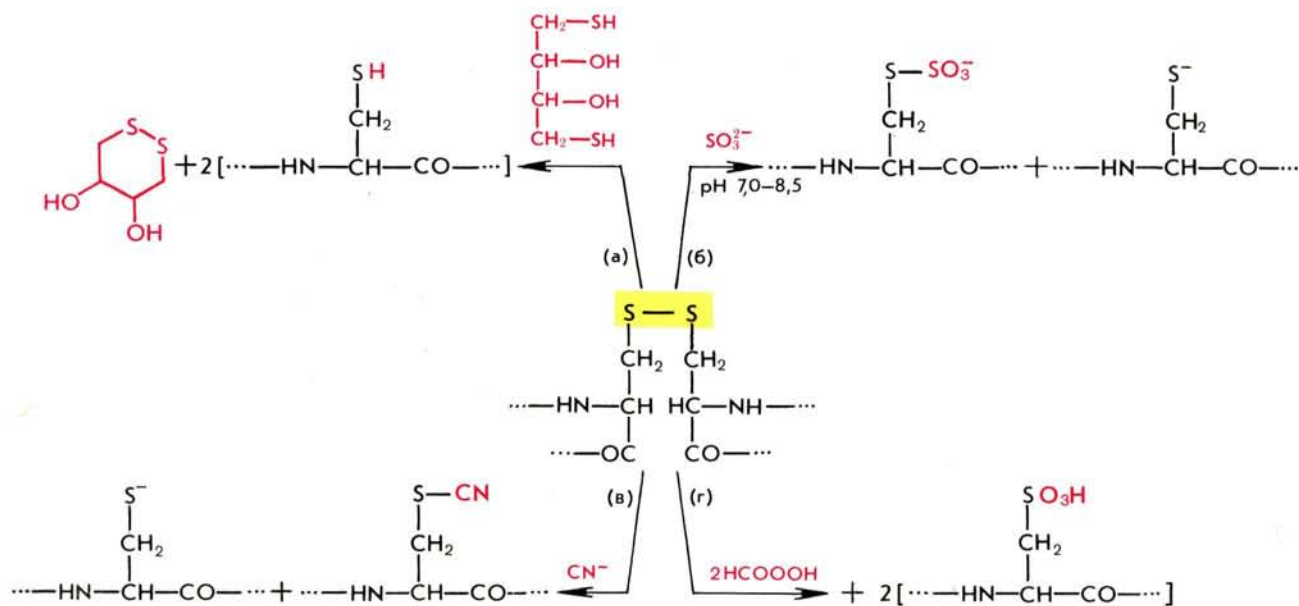


Цистеин. Сульфгидрильная группа остатка цистеина является одной из наиболее реакционноспособных в белках, и она особенно часто подвергается химической модификации. Для этой цели применяются: а) алкилирование иодуксусной кислотой или иодацета-



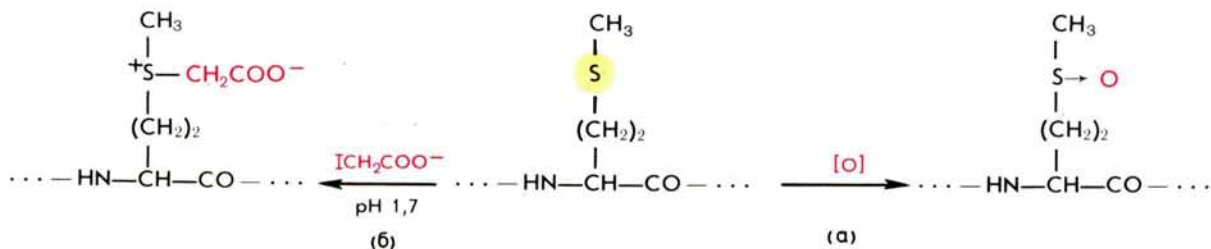
мидом (используется для защиты сульфгидрильных групп от окисления в ходе структурного изучения белков и пептидов); б) аминоэтилирование с помощью этиленimina (азиридина) (см. с. 44); в) реакция с *p*-хлормеркуриобензойной кислотой (П. Д. Бойер, 1954) (часто применяется для количественного определения SH-групп в белках и пептидах); г) окисление с помощью O_2 , H_2O_2 или надмуравьиной кислоты до производных цистеиновой кислоты (В. Хирш, 1956), одновременно могут подвергаться окислению остатки Trp (в формилкинуренин) и Met (в сульфоксид и сульфон); д) окисление в мягких условиях с образованием меж- или внутримолекулярных дисульфидных связей под действием иода, феррицианида $[Fe(CN)_6]^{3-}$, *o*-иодозобензойной кислоты, H_2O_2 ; е) реагенты, приводящие к получению несимметричных дисульфидов, в частности реагент Элмана, применяемый для количественного определения сульфгидрильных групп в белках (см. с. 75), и азобензол-2-сульфенилбромид (А. Фонтана, 1968); ж) конденсация с *N*-этилмалеимидом, модификации могут подвергаться также остатки His и Lys, но при pH 7,0 скорость реакции с SH-группой в 10^3 раз выше.

Цистин. Для модификации дисульфидных групп остатков цистина в основном применяются: а) восстановление тиолами, наиболее широко используется дитиотреитол (ДТТ — реактив Кле-ланда, 1964); образование циклического дисульфида при реакции с ДТТ термодинамически выгодно, скорость аналогичной реакции с β -меркаптоэтанолом в 10^4 раз ниже; б) окислительный сульфитолиз, реакция протекает в присутствии окисляющих агентов (O_2 , иодозобензойная кислота и т. п.) и катализируется цистеином или β -меркаптоэтиламино; в) расщепление цианидами (Р. Вуд, 1963), реакция обычно сопровождается циклизацией тиоцианопроизводных в ацилиминотазолидины (см. с. 52); г) окисление надмуравьиной кислотой (С. Энгер, 1949).



Метионин. Для модификации остатков метионина применяются: а) окисление H_2O_2 , надмуравьиной кислотой или фотоокисление (в присутствии метиленового синего) до сульфона; б) алкилирование иодуксусной кислотой, иодацетамидом или β -пропиолактоном с образованием сульфониевых солей.

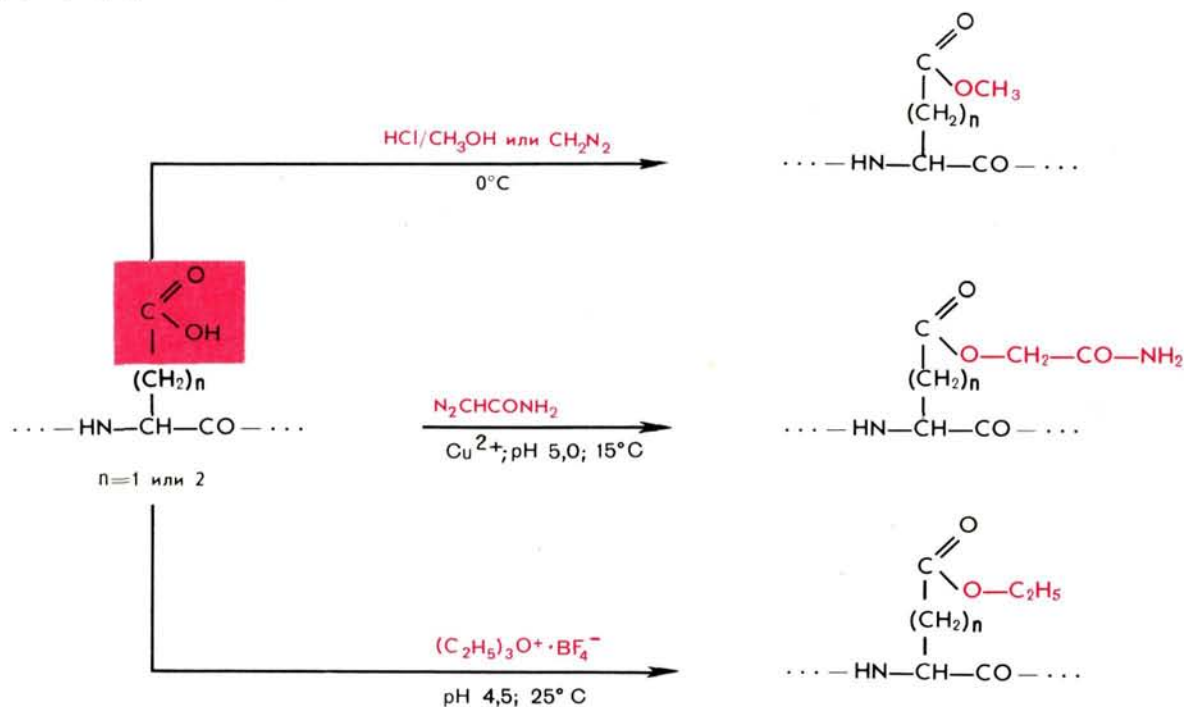
Деградация сульфониевых солей метионина в пептидах при кипячении в воде сопровождается расщеплением связи, образова-



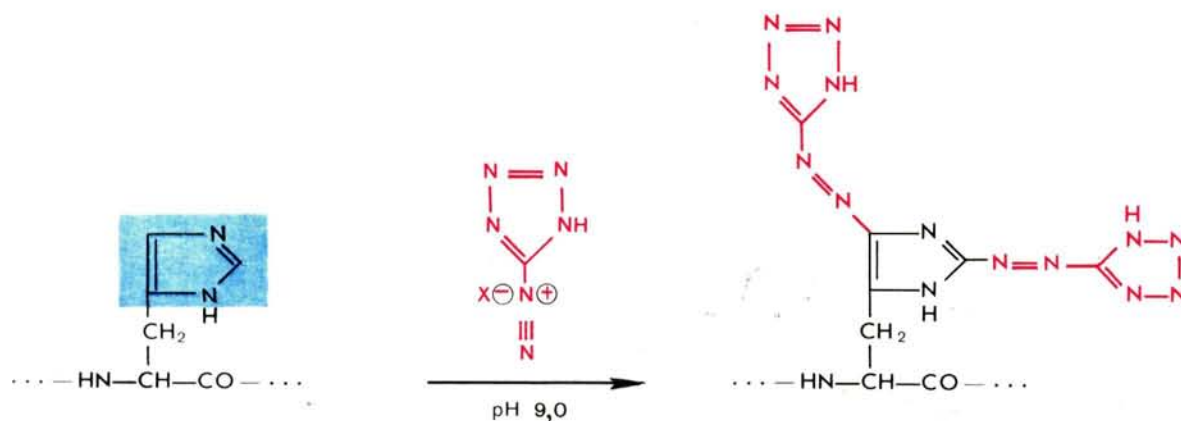
ной карбоксильной группой метионина (аналогично тому, как это происходит при действии бромциана, см. с. 48). Наилучший выход (50%) достигается при алкилировании иодацетамидом.

При действии на сульфониевые производные β -меркаптоэтанола происходит количественная регенерация метионина.

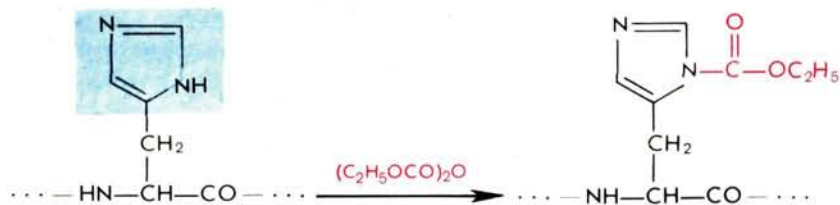
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Карбоксильные группы остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот обычно модифицируют путем превращения их в сложные эфиры (реакция этерификации) или продукты взаимодействия с водорастворимыми карбодиимидами (см. с. 131). Для этерификации используются: раствор хлористого водорода в метаноле, диазометан, диазоацетамид или борфторид триэтилоксония.



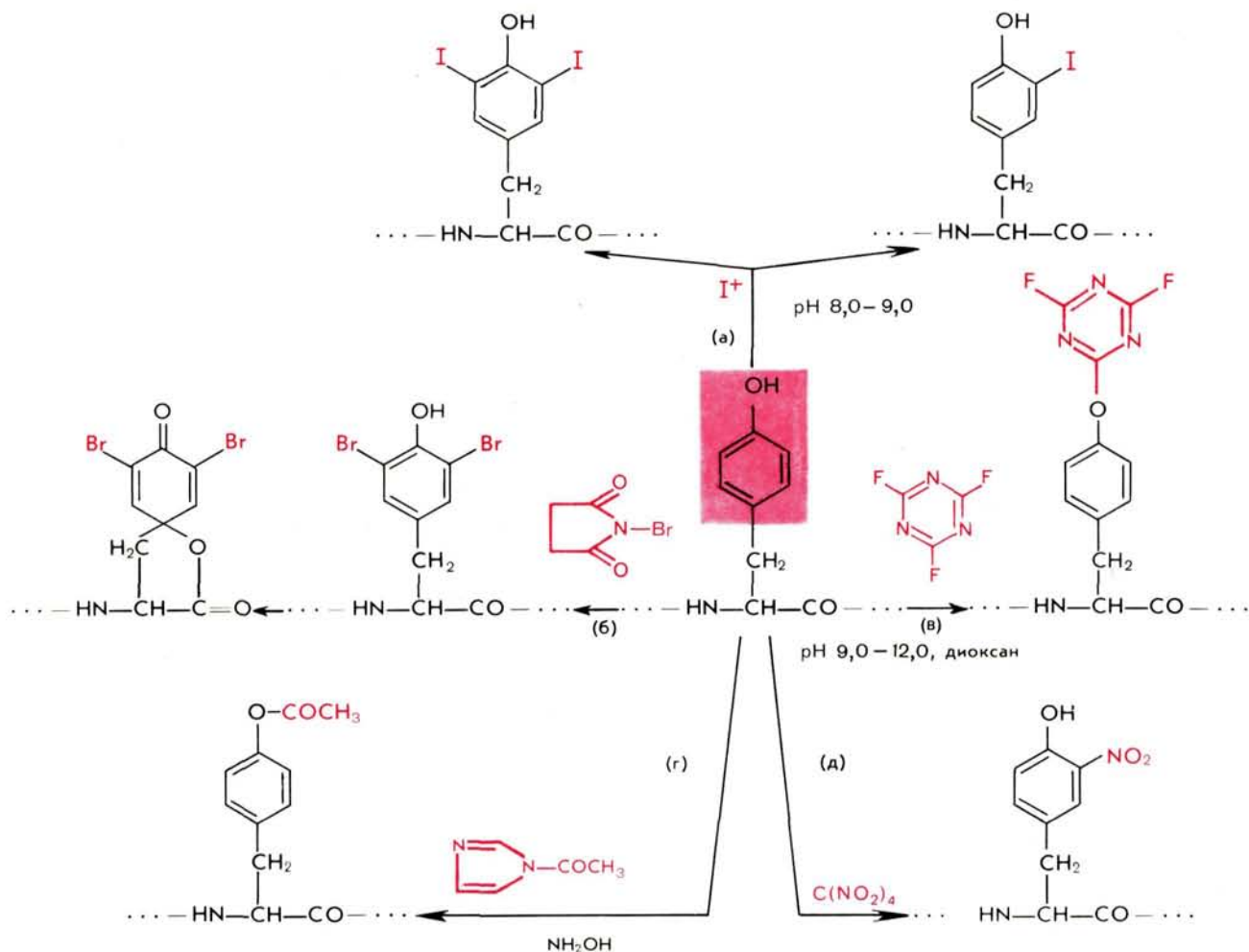
Гистидин. Имидазольное кольцо гистидина реагирует с 1-фтор-2,4-динитробензолом и α -галогенкислотами, но эти реакции мало-селективны. Лучшие результаты дает диазотирование с помощью диазотетразола.



Для модификации остатков гистидина в белках, особенно в активных центрах ферментов, ранее широко применялось сенсibilизированное красителями фотоокисление (В. Рей, 1967). В последнее же время предпочитают использовать диэтилпирокарбонат, который при pH 5,5 — 7,5 достаточно специфично реагирует с остатками гистидина.

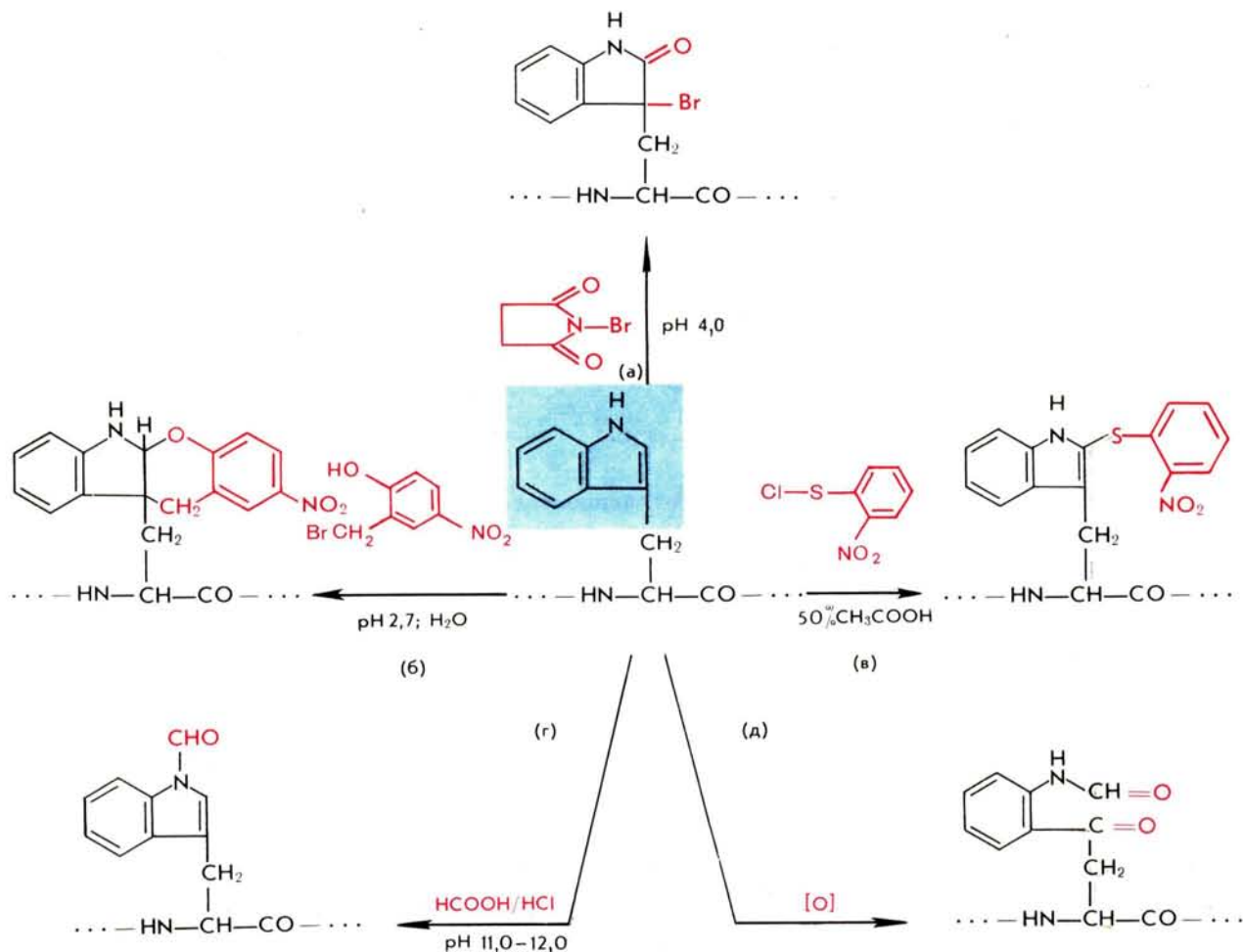


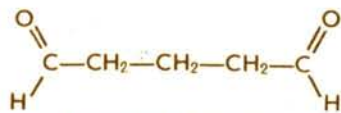
Тирозин. Остатки тирозина модифицируются достаточно легко и селективно. Для этого широко используются: а) иодирование, особенно с помощью радиоактивных изотопов ^{125}I и ^{131}I , в частности иодирование применяется для введения тяжелого атома при рентге-



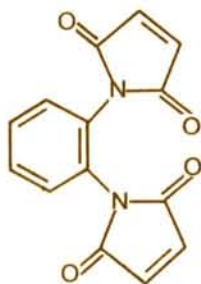
ноструктурных исследованиях; для электрофильного замещения протона ароматического кольца тирозина нужен катион I^+ , получаемый в реакционной смеси из иодид-аниона под действием химического окислителя — N-хлортолуолсульфамида натрия (хлорамины Т) или ферментной окислительной системы (лактопероксидаза, H_2O_2) (М. Моррисон, 1968); б) окислительное бромирование с помощью N-бромсукцинимидом; вначале образуется дибромпроизводное, а дальнейшее окисление приводит к разрыву пептидной связи и образованию дибромдиенон-спиролактона; г) реакция с цианурфторидом, позволяющая спектрофотометрически определять количество доступных остатков тирозина; д) ацелирование N-ацелимидазолом; е) нитрование с помощью тетранитрометана. Побочной реакцией в последнем случае может быть внутри- и межмолекулярная «сшивка».

Триптофан. а) Для модификации остатков триптофана используется реакция с N-бромсукцинимидом (Б. Виткоп, 1970); реакция может останавливаться на стадии бромпроизводного или приводить далее к расщеплению пептидной связи, образуемой карбоксильной группой остатка триптофана. В последнее время для этих целей более эффективно используется BNPS-скатол (см. с. 50). Среди других методов модификации остатка триптофана следует отметить: б) алкилирование 2-гидрокси-5-нитробензилбромидом (Д. Кошланд, 1964); в) реакция с 2-нитрофенилсульфенилхлоридом





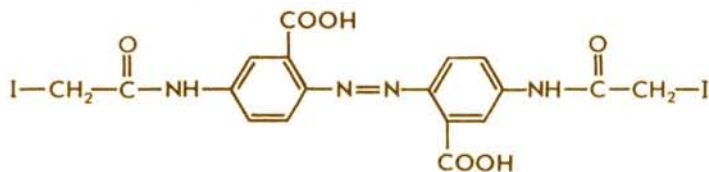
Глутаровый альдегид

N,N'-(1,2-Фенилен)-
бис-малеимид

(Э. Скоффоне, 1972); г) формилирование безводной муравьиной кислотой, насыщенной газообразным HCl; д) фотоокисление (98%-ная HCOOH в присутствии профлавина) или озонлиз (100%-ная HCOOH, резорцин).

Бифункциональные реагенты. К бифункциональным реагентам относят химические соединения, содержащие две (обычно одинаковые) пространственно разделенные реакционноспособные группировки. Бифункциональные реагенты широко используются для ковалентной «сшивки» пространственно сближенных участков как одной белковой молекулы, так и двух разных белков, функционирующих в едином комплексе. С помощью таких реагентов изучают третичную и четвертичную структуры белков и выясняют области контактов различных белковых молекул между собой или с другими биополимерами. К бифункциональным реагентам относятся, например, глутаровый альдегид, взаимодействующий с аминогруппами, и N-замещенные производные малеимида, реагирующие с сульфгидрильными группами белков.

Менее специфичны алкилгалогениды, способные модифицировать амино-, сульфгидрильную, а также имидазольную группы, и арилгалогениды, реагирующие, кроме того, и с фенольным гидроксидом.

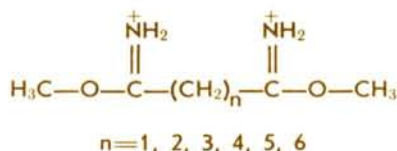


2,2'-Дикарбокси-4,4'-ди(иодацетиамидо)азобензол

 α,α' -Дибром-*p*-ксилолсульфоуксусная кислота

1,5-Дифтор-2,4-динитробензол

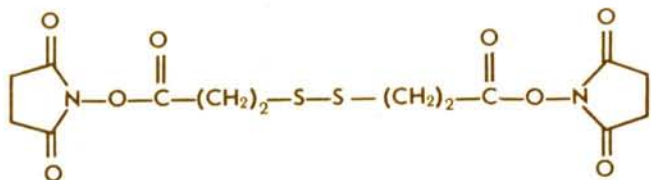
Широкое распространение в качестве бифункциональных реагентов находят диимидоэфир, модифицирующие аминогруппы белков:



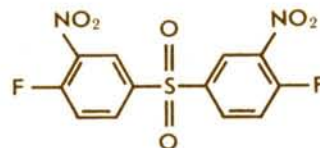
Особую группу составляют реагенты, содержащие дисульфидные связи или другие группировки (эфирные, азо-, сульфоновые), расщепляемые в достаточно мягких условиях (расщепляемые бифункциональные реагенты).

Использование расщепляемых реагентов облегчает процесс идентификации «сшиваемых» с их помощью белков при исследовании топографии многокомпонентных белковых систем.

Синтез
и химическая модификация
белков и пептидов



Бис-сукцинимидный эфир 3,3'-дитио -бис (пропионовой кислоты)

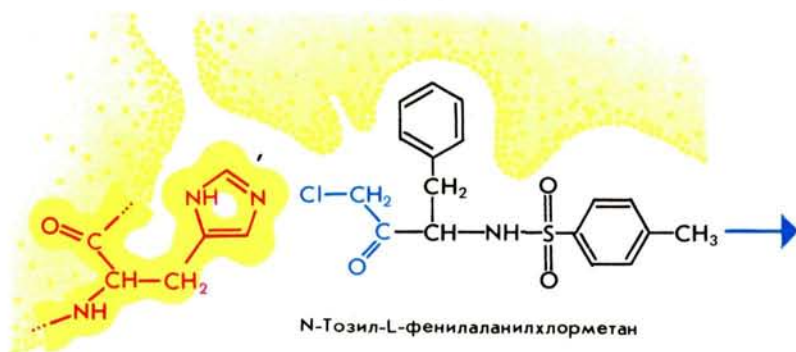


p,p'-Дифтор-м,м'-динитрофенилсульфон

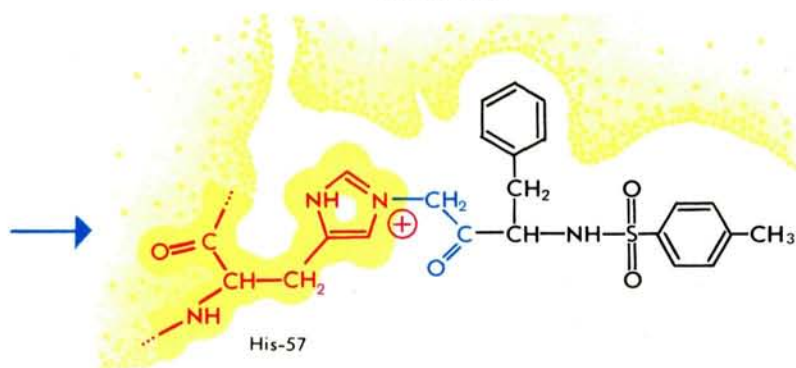
Биоспецифическая модификация белков

Реакционноспособные аналоги субстратов или других биоспецифических лигандов (гормонов, медиаторов и т. п.) могут преимущественно или даже исключительно взаимодействовать с аминокислотными остатками, расположенными в активном центре фермента или белка-рецептора. В общем случае такие реагенты называются субстратоподобными.

Химотрипсин



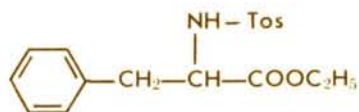
Химотрипсин



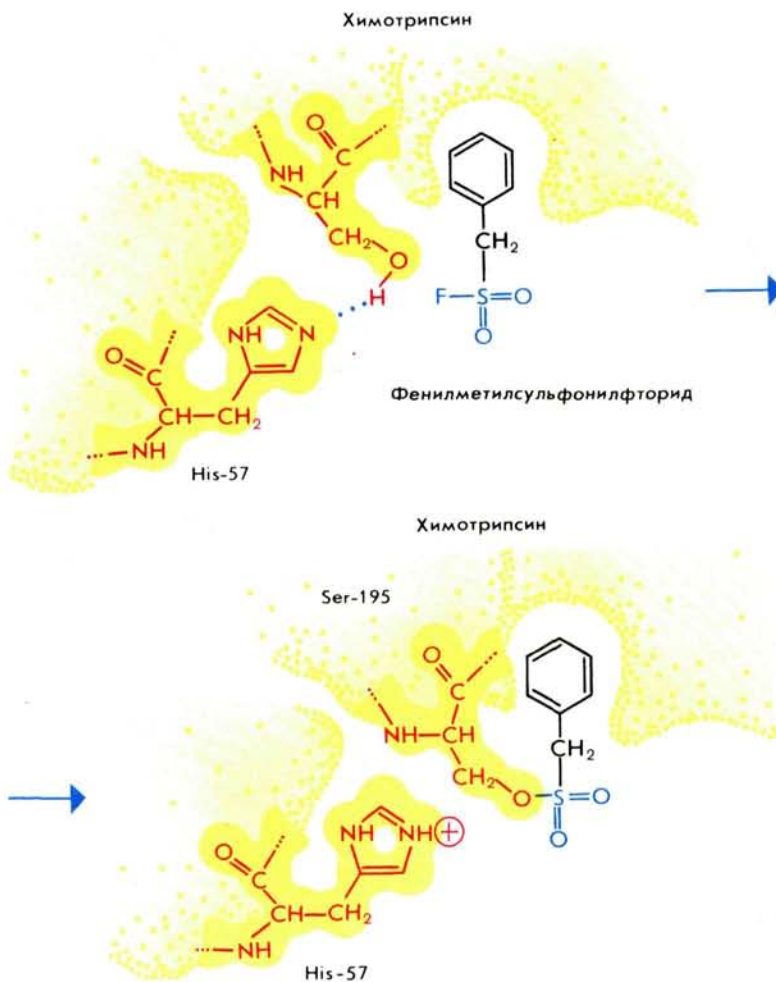


Кошланд (Koshland) Дэниел Е. (р. 1920), американский химик-биоорганик. Окончил Калифорнийский университет в Беркли (1941), с 1965 г. — профессор того же университета. Внес значительный вклад в химию белков и изучение механизма действия ферментов. Исследовал молекулярные механизмы поведенческих реакций.

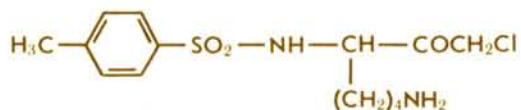
Так, например, этиловый эфир N-тозил-L-фенилаланина является субстратом химотрипсина:



Аналог этого соединения — N-тозил-L-фенилаланилхлорметан был предложен в 1963 г. Е. Шоу в качестве специфического ингибитора. Оказалось, что этот реагент селективно алкилирует остаток гистидина (His-57), расположенный в активном центре химотрипсина.



Активным ингибитором трипсина является аналогичный по структуре хлорметилкетон—N-тозил-L-лизилхлорметан:



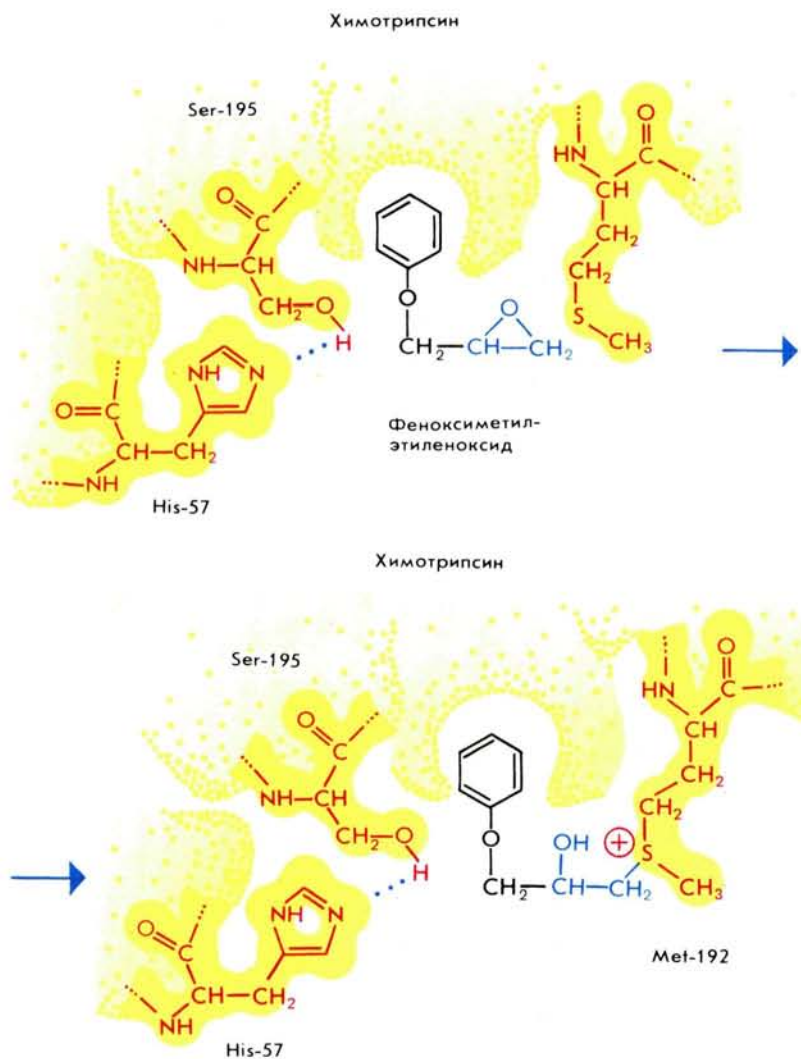
Д. Фарни и А. Толу (1963) использовали для исследования активного центра химотрипсина фенолметилсульфонилфторид, который избирательно реагирует с остатком серина (Ser-195).

Реагенты для биоспецифической модификации белков часто содержат эпоксидную и диазогруппы. Так, Б. Хартли (1964) применил для модификации химотрипсина феноксиметилэтиленоксид, специфично взаимодействующий с остатком метионина (Met-192).

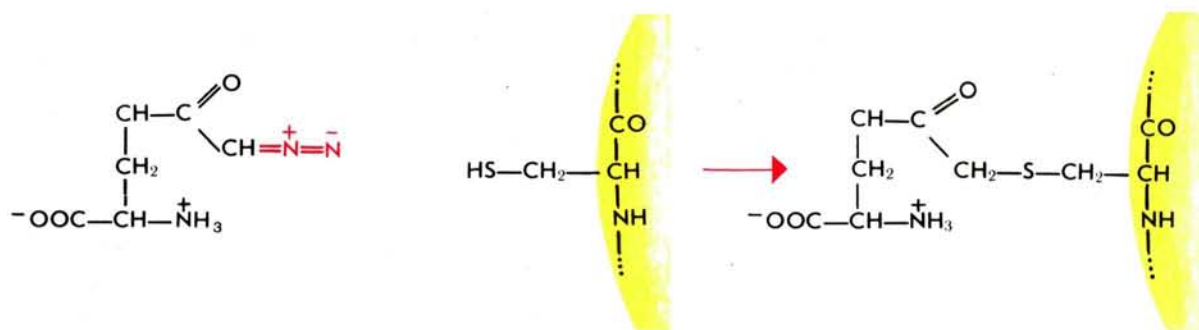
Синтез и химическая модификация белков и пептидов



Скоффоне [Scoffone] Эрнесто (1923—1973), итальянский химик-органик. Окончил университет в Болонье (1946); с 1964 г.— директор Института органической химии в Падуе и профессор (1966) Падуанского университета. Ему принадлежат труды по синтезу природных полипептидов, методам избирательной модификации, выяснению их пространственного строения.



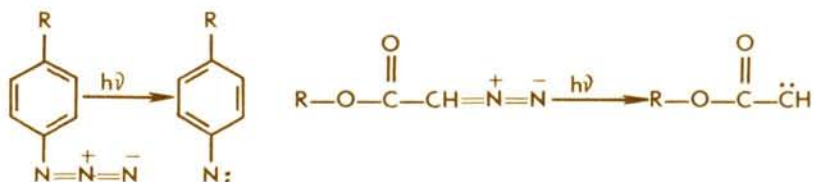
Т. К. Хартман (1963) показал, что структурный аналог глутамина — 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин реагирует с сульфгидрильной группой цистеина в фосфорибозилпирофосфат-аминотрансферазе:



Аналогично метиловый эфир N-диазоацетилфенилаланина избирательно взаимодействует с остатком аспарагиновой кислоты (Asp-215) в активном центре пепсина, что приводит к полной инактивации фермента.

Частным случаем биоспецифической модификации является *фотоаффинная модификация*, основанная на использовании производного природного лиганда, содержащего фотореактивную группировку. При облучении УФ-светом происходит образование свободных радикалов, способных реагировать с самыми различными группировками белковой молекулы (в том числе и с СН-группой) в местах наиболее тесных контактов с лигандом.

В качестве предшественников активированных соединений обычно применяют разнообразные производные арилазидов и диазосоединений, генерирующие при фотолитическом разложении нитрены и карбены, соответственно:

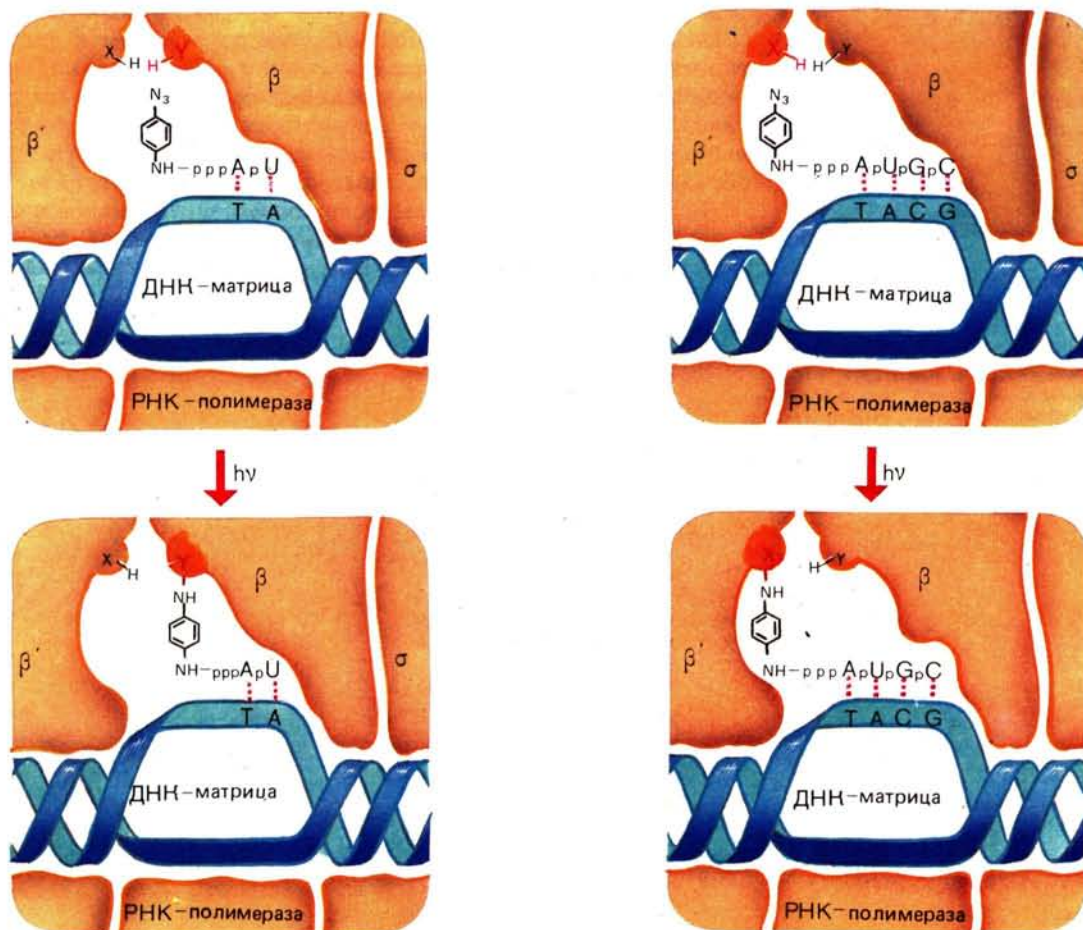


Преимущество метода заключается в возможности проводить модификацию на определенном этапе функционирования системы, однако выход «целевых» продуктов взаимодействия, как правило, низок из-за внутримолекулярных перегруппировок радикалов и других конкурирующих процессов. Поэтому при идентификации продуктов сшивок необходимо использовать радиоактивно меченные фотоаффинные реагенты.

В качестве примера фотоаффинной модификации рассмотрим локализацию в ДНК-зависимой РНК-полимеразе участков, контактирующих с 5'-концевой группой синтезируемой РНК. Были отработаны условия, в которых РНК-полимераза способна синтезиро-

вать олигонуклеотиды определенной длины, содержащие на 5'-конце фотореактивную (γ -азидоанилидную) группу. После облучения светом транскрипционного комплекса (РНК-полимераза — ДНК — РНК) в зависимости от длины синтезированного олигорибонуклеотида модифицировались различные субъединицы фермента. В частности, в случае динуклеотида главным образом модифицировалась β -субъединица, а в случае тетра-нуклеотида — β' -субъединица (рис. 83). Полученные результаты свидетельствовали о том, что центр связывания продукта изменяется в процессе синтеза РНК (Е. Д. Свердлов, 1980).

Рис. 83. Фотоаффинная модификация РНК-полимеразы аналогами РНК-продукта.



Топохимические трансформации пептидных систем

Общепринятый путь исследования зависимости между строением и биологическим действием природных пептидов заключается в получении их аналогов заменой одних аминокислотных остатков на другие и в сравнительном изучении биологических свойств синтезированных соединений.



Гудмэн [Goodman] Мюррей (р. 1928), американский биохимик. Окончил Калифорнийский университет в Беркли (1952); с 1964 г. — профессор Бруклинского политехнического института, а с 1970 г. — Калифорнийского университета в Сан Диего. Область научных интересов включает синтез и конформационный анализ пептидов и белковых систем. Получил ряд важных лекарственных препаратов.

Другой подход основан на модификации молекул с использованием особых приемов и приводит к аналогам нового типа, в которых при радикальном изменении молекулы как системы в целом сохраняются многие стереоэлектронные характеристики природного соединения. Такие аналоги, нередко успешно имитирующие исходный пептид и эффективно взаимодействующие с соответствующим рецептором или иным партнером в биохимическом процессе, называются топохимическими (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников, В. Т. Иванов, 1967).

Примерами могут служить пептиды, полученные изменением направления ацилирования в пептидной цепи — так называемые ретро-изомеры (рис. 84, пара б — г), аналоги, образованные полным обращением конфигурации всех аминокислотных остатков (энантио-изомеры) (рис. 84, пара а — б), и особенно аналоги, сконструированные комбинацией этих двух приемов (ретро-энантио-изомеры) (рис. 84, пара а — г или а — в, рис. 85). Такого рода модификации касаются как циклических, так и линейных пептидов, однако в последнем случае для топохимического подобия аналогов необходимо, чтобы N- и C-концевые группы были соответствующим образом блокированы (рис. 86).

К числу топохимических операций следует отнести и циклизацию биологически активных линейных пептидов за счет амидных, дисульфидных или иных ковалентных связей. Такая модификация

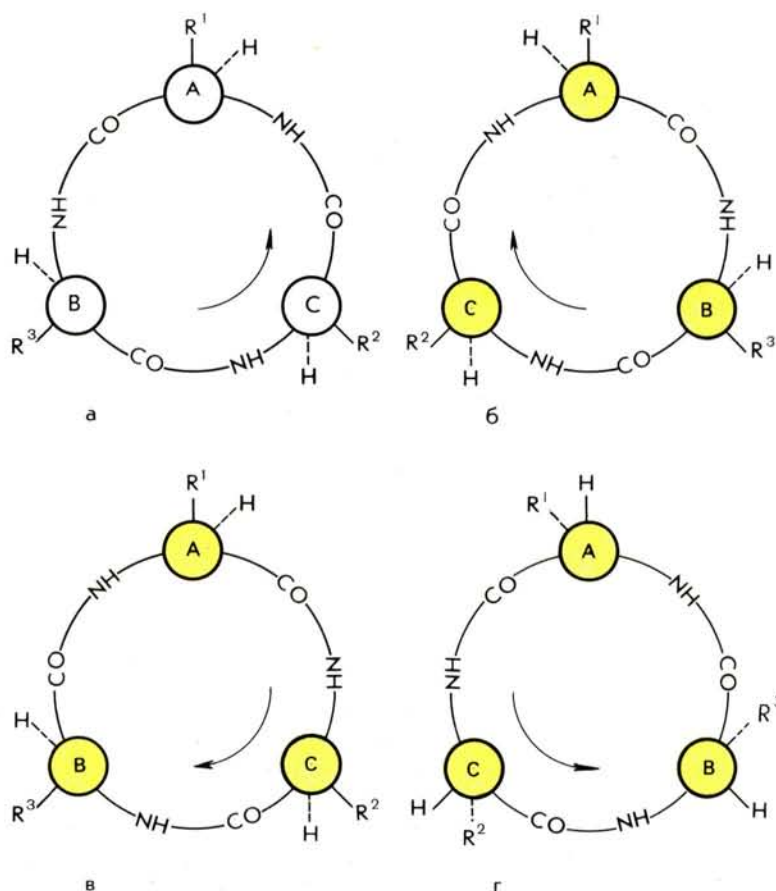


Рис. 84. Циклопептид А—В—С (а), его энантио-изомер (б) и ретро-энантио-изомер (в-г). Светлый кружок обозначает асимметрический атом C^{*}-L-аминокислотного остатка, затенённый — D-остатка.

оказывается особенно эффективной, если предварительно удастся доказать, что природный пептид взаимодействует с соответствующим рецептором в свернутой или квазициклической конформации. С другой стороны, если полученное циклическое производное обладает высокой биологической активностью, это служит веским аргументом в пользу того, что исходный линейный пептид имеет свернутую «биоспецифическую» конформацию. Особенностью такого рода трансформаций является возможность, при сравнительно небольшом изменении отдельных функциональных групп пептида, зафиксировать с разной степенью жесткости (в зависимости от величины образованного цикла) конформационные характеристики исследуемого соединения, т. е. получить в относительно «замороженном» состоянии одну из предпочтительных конформаций пептидной цепи.

Нельзя не отметить и такой прием, как замена в природном пептиде амидных связей на близкие им в стереоэлектронном отношении сложноэфирные; в случае биологически активных депептидов возможна и обратная замена — сложноэфирных связей на амидные, а также комбинация этих приемов.

Наконец, следует упомянуть и возможность модификации целых фрагментов пептида или белка без разрушения его общей биологически активной конформации: замену отдельных участков полипептидной цепи на углеводородные звенья ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\dots$),

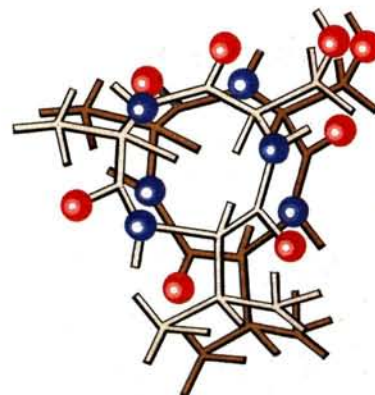
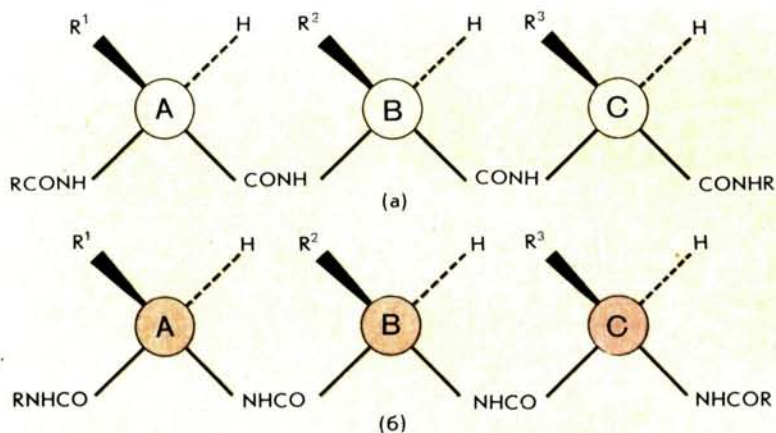


Рис. 85. Гипотетический циклотрипептид Ala—Val—Ser— (светлые линии) и его ретро-энантио-изомер D-Ala—D-Ser—D-Val— (тёмные линии), совмещенные в пространстве.



взаимную перестановку в молекуле пептида функционально важных фрагментов или получение биологически активных гибридных молекул, сочетающих в себе элементы структур близких по функции природных пептидов. Термин «топохимические аналоги» в этом случае сохраняет свое значение.

Топохимический принцип трансформации природных пептидов оказался весьма плодотворным при получении интересных в биологическом отношении аналогов пептидных антибиотиков (М. М. Шемякин, Ю. А. Овчинников), пептидных гормонов (Г. И. Чипенс, Р. Хиршман), нейропептидов (М. Гудмэн) и т. п.

Рис. 86. Трипептид RCO—A—B—C—NHR (a) и его ретро-энантио-изомер (б). Обозначения кружков те же, что и на рис. 84.

Биологическая роль белков

Ферменты



Берцелиус [Berzelius] Йенс Якоб (1779—1848), шведский химик, иностранный почетный член Петербургской АН (1820). Окончил Упсальский университет (1801), в 1807—1832 гг. — профессор Медико-хирургического института в Стокгольме. Один из основателей современной химии. Ввел в химию атомистику, составил таблицу атомных масс большинства элементов. Развил основы электрохимической теории. Впервые распространил основные законы химии на органическую химию.

Ферменты — наиболее важный класс белковых веществ, универсальный по своей биологической функции. Ферменты представляют собой специфические и высокоэффективные катализаторы химических реакций, протекающих в живой клетке. Изучение ферментов, их строения, свойств и механизма биологического действия составляет один из главных разделов биохимии и биоорганической химии. К настоящему времени охарактеризовано несколько тысяч ферментов, свыше тысячи из них получены в индивидуальном состоянии. Для многих сотен белков-ферментов выяснена аминокислотная последовательность, а самые известные из них расшифрованы с помощью рентгеноструктурного анализа до уровня полной пространственной структуры. Изучение любой проблемы в области познания механизмов жизнедеятельности обязательно связано с исследованием соответствующих ферментных систем. Кроме того, ферменты широко используются как мощные инструменты при выяснении строения биополимеров и при генно-инженерных разработках. Они находят широкое практическое применение в медицине и пищевой промышленности.

Исторический очерк. Ферментативные процессы известны человеку с глубокой древности. В частности, брожение широко использовалось греками для получения вина (открытие этого способа приписывалось богу Бахусу). Народы многих стран издавна владели искусством приготовления хлеба, сыра, уксуса на основе переработки растительного и животного сырья. Однако современный этап в развитии энзимологии относится к началу прошлого века. В 1814 г. член Петербургской Академии наук К. Кирхгоф установил, что крахмал превращается в сахар под действием некоторых веществ, находящихся в прорастающих зернах ячменя. Дальнейший шаг вперед в этом направлении был сделан французскими химиками А. Пайеном и Ж. Пирсо, которые в 1833 г. показали, что термолабильный фактор, получаемый из солодового экстракта путем осаждения спиртом, обладает способностью гидролизовать крахмал; они назвали его диастазой. Вскоре разгорелся спор о природе брожения, в котором участвовали крупнейшие представители естествознания того времени. В частности, Л. Пастер придерживался мнения, что брожение вызывается живыми микроорганизмами и, следовательно, связано исключительно с их жизнедеятельностью. С другой стороны, Ю. Либих и К. Бернар отстаивали химическую природу брожения, считая, что оно связано с особыми веществами, подобными диастазе (амилазе). Й. Берцелиус в 1837 г. показал, что ферменты — это катализаторы, поставляемые живыми клетками. Именно тогда появились термины «фермент» (от лат. *fermentatio* — брожение) и «энзим» (от греч. *εν ζυμη* — в дрожжах). Спор был окончательно разрешен лишь в 1897 г., когда немецкие ученые братья Ганс и Эдвард Бухнеры показали, что дрожжевой бесклеточный сок (полученный при растирании дрожжей с инфузورной землей) способен сбраживать сахар с образованием спирта и CO_2 . Стало ясным, что дрожжевой сок содержит сложную смесь ферментов (названную зимазой) и эти ферменты способны функционировать как внутри, так и вне клеток. По словам одного из историков,

появление пузырьков углекислого газа в опыте Бухнеров означало рождение современной биохимии и энзимологии.

Попытки выделить ферменты в индивидуальном состоянии предпринимали многие исследователи, среди которых следует упомянуть А. Я. Данилевского, Р. Вильштеттера и др. Белковая природа ферментов была однозначно доказана в 1926 г. американским биохимиком Дж. Самнером, выделившим в кристаллическом виде фермент уреазу из семян канавалии. В 1930 г. Дж. Норттроп получил кристаллический пепсин, а затем трипсин и химотрипсин. С этого периода стало общепринятым утверждение, что все ферменты являются белками.

В конце XIX в. на базе достижений в области исследования структуры органических соединений биологического происхождения появилась возможность изучения специфичности ферментов. В это время Э. Фишером было выдвинуто знаменитое положение о необходимости стерического соответствия между ферментом и субстратом; по его образному выражению, «субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку». В начале нашего века были заложены основы исследования кинетики действия ферментов.



Самнер [Sumner] Джеймс Бетчеллер (1887—1955), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1910), с 1929 г. — профессор Корнеллского университета. Основные работы — в области химии ферментов. Получил первые кристаллические препараты ферментов с высокой биологической активностью, в том числе уреазу, и доказал, что они являются белками. Лауреат Нобелевской премии по химии (1946, совместно с У. Стэнли и Дж. Норттропом).

Общая характеристика ферментов

Ферменты имеют различные молекулярные массы — от 10 000 до 1 000 000 и выше. Они могут быть построены из одной полипептидной цепи, нескольких полипептидных цепей или представлять собой сложные (иногда полиферментные) комплексы. В состав фермента входят и небелковые компоненты, получившие название коферментов (кофакторов), — ионы металлов, небольшие органические молекулы типа витаминов и т. п.

Ферменты являются высокоэффективными катализаторами: они способны увеличивать скорости реакций в миллионы и миллиарды раз. Так, например, уреазы (при pH 8,0, 20 °C) ускоряет гидролиз мочевины примерно в 10^{14} раз.

Ферменты являются высокоспецифичными катализаторами. Они проявляют специфичность в отношении типа катализируемой химической реакции, причем образования побочных продуктов не происходит. Кроме того, они обладают выраженной субстратной специфичностью и, как правило, высокой стереоспецифичностью.

Классификация ферментов. Ранее при наименовании ферментов за основу брали название субстрата с добавлением суффикса «аза»; так появились, в частности, протеиназы, липазы, карбогидразы. По сходному принципу обозначали ферменты, катализирующие окислительные реакции (дегидрогеназы). Некоторые ферменты получили специальные названия — трипсин, пепсин и др. В настоящее время принята классификация, в которой ферменты сгруппированы в 6 классов в соответствии с типом катализируемых реакций:

1. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные реакции).
2. Трансферазы (реакции переноса функциональных групп).
3. Гидролазы (реакции гидролиза).
4. Лиазы (реакции отщепления групп негидролитическим путем).
5. Изомеразы (реакции изомеризации).
6. Лигазы (реакции синтеза за счет энергии АТФ).



Бухнер (Buchner) Эдуард (1860—1917), немецкий химик. Окончил Мюнхенский университет (1888), с 1893 г.— профессор Кильского, Тюбингенского университетов, затем университетов в Бреслау и Вюрцбурге. Основные работы — в области органической химии и энзимологии. Установил (1897), что процесс брожения может протекать без участия низших организмов (в присутствии дрожжевого сока, содержащего энзим, названный им зимазой). Лауреат Нобелевской премии по химии (1907).

В пределах классов ферменты группируются в подклассы и подподклассы в соответствии с особенностями катализируемых реакций; на этой основе составлена кодовая нумерация (шифры) ферментов и их систематические названия. Шифр фермента состоит из четырех разделенных точками чисел: первое число означает класс фермента, второе и третье числа — подкласс и подподкласс соответственно, а четвертое число — порядковый номер фермента в его подподклассе. Например, кислая фосфатаза имеет шифр 3.1.3.2; это означает, что она относится к классу гидролаз (3.1.3.2), подклассу этих ферментов, действующих на сложноэфирные связи (3.1.3.2), к подподклассу ферментов, гидролизующих моноэфиры фосфорной кислоты (3.1.3.2), а порядковый номер фермента в данном подподклассе — 2 (3.1.3.2).

Ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но выделенные из разных видов живых организмов, различаются между собой. В номенклатуре же они имеют общее название и один кодовый номер. Различные формы того или иного фермента нередко встречаются и у одного биологического вида. Для наименования группы ферментов, катализирующих одну и ту же реакцию и находящихся в организмах одного вида, рекомендуется термин *множественные формы фермента*. Для тех ферментов одной группы, которые имеют генетически обусловленные различия в первичной структуре, используют термин «изоферменты».

Принципы ферментативной кинетики

Определение скоростей ферментативных реакций и исследование влияния на них различных факторов составляют содержание ферментативной кинетики. Кинетические исследования широко используются для определения сродства субстратов и ингибиторов к ферментам, для установления механизма их действия.

К числу главных факторов, влияющих на скорости ферментативных реакций, относятся: концентрация фермента, концентрация

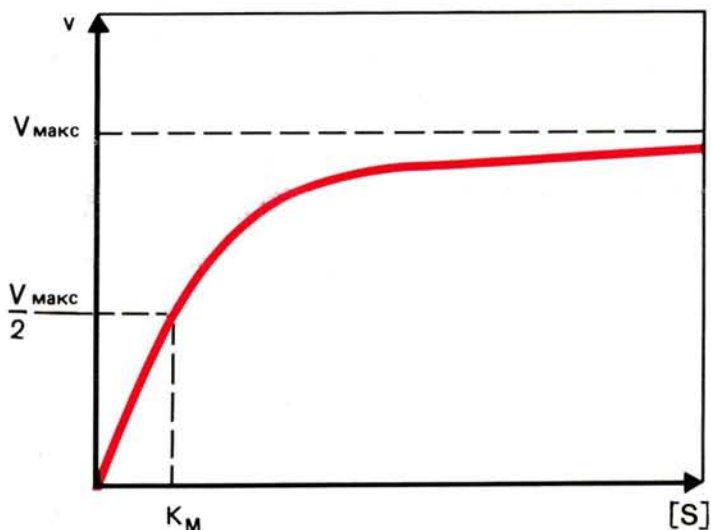


Рис. 87. График зависимости скорости реакции v от концентрации субстрата $[S]$.

субстрата, присутствие ингибиторов или активаторов, pH и температура среды.

В подавляющем большинстве случаев скорость ферментативной реакции v прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]$:

$$v = k[E].$$

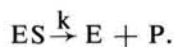
Один из наиболее важных факторов, определяющих скорость ферментативной реакции,— концентрация субстрата. При исследовании зависимости скорости реакции от концентрации субстрата $[S]$ во многих случаях наблюдается следующая характерная картина (рис. 87): при относительно небольших значениях $[S]$ величина v пропорциональна $[S]$, а при достаточно больших $[S]$ величина v приближается к предельному постоянному значению, называемому *максимальной скоростью* ($V_{\text{макс.}}$).

На основании анализа зависимости v от $[S]$ Л. Михаэлис и М. Ментен сформулировали в 1913 г. общую теорию кинетики действия ферментов.

Они постулировали, в частности, что ферментативная реакция является двухстадийной. На первой стадии фермент вступает в быстрое обратимое взаимодействие с субстратом; в результате образуется фермент-субстратный комплекс ES:



На второй стадии ES распадается с образованием продукта реакции P:



Вторая стадия лимитирует скорость процесса; последняя определяется концентрацией комплекса ES и константой скорости его распада k . На основании этих предпосылок было выведено уравнение, связывающее v и $[S]$, известное под названием уравнения Михаэлиса:

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M + [S]},$$

где v — начальная скорость реакции, т. е. скорость, регистрируемая в течение периода времени, за который убыль субстрата не превышает $\sim 10\%$. В этот период времени скорость реакции можно считать приблизительно постоянной, поскольку, во-первых, убыль субстрата невелика, а, во-вторых, концентрация продукта, который в ряде случаев может оказывать ингибирующее действие, незначительна.

В уравнение входят две постоянные величины: $V_{\text{макс.}}$ — максимальная скорость, т. е. скорость реакций в условиях насыщения фермента субстратом, и K_M — константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент — субстрат.

Легко показать, что для одностадийной реакции, протекающей по схеме:



где k_{+1} — константа скорости образования ES, k_{-1} — константа скорости обратного распада ES на E и S, k_{+2} — константа скорости распада ES с образованием продукта P, уравнение Михаэлиса справедливо и без допущения о том, что на стадии образования ES устанавливается равновесие и что стадия распада ES с образованием



Нортроп (Northrop) Джон Хоуард (р. 1891), американский биохимик. Окончил Колумбийский университет (1912), с 1915 г.— в Рокфеллеровском институте медицинских исследований. Основные работы — по изучению механизма и кинетики ферментативных реакций, свойств ферментов. Доказал белковую природу ферментов (1937, наряду с Дж. Самнером). Впервые выделил в кристаллическом виде химотрипсин, пепсин, трипсин. Лауреат Нобелевской премии по химии (1946, совместно с У. Стэнли и Дж. Самнером).



Михаэлис (Michaelis) Леонор (1875—1949), немецкий химик и биохимик. Окончил Берлинский университет (1896), с 1929 г. работал в Рокфеллеровском институте медицинских исследований в Нью-Йорке. Основные работы посвящены изучению ферментативных реакций. Ввел (1913) константу в уравнение зависимости скорости ферментативного процесса от концентрации субстрата (константа Михаэлиса). Разработал теорию образования фермент-субстратных комплексов (теория Михаэлиса — Ментена, совместно с М. Ментеном).

продукта является лимитирующей. При этом K_M может быть выражена через константы скоростей отдельных стадий:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$$

Величины $V_{\text{макс.}}$ и K_M можно определить по графику зависимости v от $[S]$ (рис. 87); $V_{\text{макс.}}$ находим на графике как предел, к которому стремится v при увеличении $[S]$. Из уравнения Михаэлиса следует, что при достаточно высокой концентрации субстрата (когда $[S] \gg K_M$)

$$v = V_{\text{макс.}}$$

т. е. скорость постоянна и максимальна; реакция протекает по кинетическому закону нулевого порядка.

При низких концентрациях субстрата v прямо пропорциональна $[S]$; действительно, при $[S] \ll K_M$ по уравнению Михаэлиса оказывается, что

$$v = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M};$$

в таких условиях реакция протекает по кинетическому закону первого порядка. На графике (рис. 87) это соответствует начальному линейному участку.

Для определения величины K_M снова обратимся к уравнению Михаэлиса; из него следует, что K_M численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной; действительно, при условии, что $v = \frac{V_{\text{макс.}}}{2}$, имеем:

$$\frac{V_{\text{макс.}}}{2} = \frac{V_{\text{макс.}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \text{ и } K_M = [S].$$

Для графического определения K_M сначала требуется найти величину $v = \frac{V_{\text{макс.}}}{2}$, а затем через соответствующую точку на ординате провести прямую, параллельную оси абсцисс до пересечения с гра-

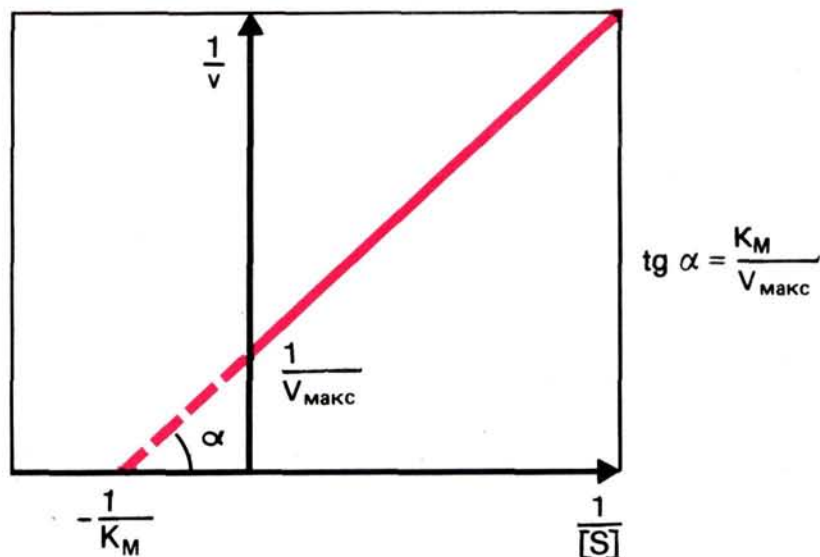


Рис. 88. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации субстрата $\frac{1}{[S]}$.

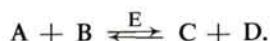
филом; перпендикуляр, опущенный из точки пересечения на ось абсцисс, покажет величину $[S]$, численно равную K_M (рис. 87).

Более удобно для определения величин $V_{\text{макс.}}$ и K_M использовать графики линеаризованных форм уравнения Михаэлиса. Одной из таких форм является уравнение, обратное уравнению Михаэлиса:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{макс.}}} + \frac{K_M}{V_{\text{макс.}}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

его называют уравнением Лайнуивера — Берка. График зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ (рис. 88) представляет собой прямую, имеющую наклон $K_M/V_{\text{макс.}}$ и отсекающую на оси ординат отрезок, равный $\frac{1}{V_{\text{макс.}}}$, а на оси абсцисс отрезок, равный $\frac{1}{K_M}$.

Большинство ферментов катализируют реакции с участием двух (или более) субстратов:



Исследование кинетики таких реакций позволяет определить величины K_M и $V_{\text{макс.}}$ для каждого из субстратов; для этого строят графики зависимости скорости реакции от концентрации одного из субстратов при фиксированной (обычно насыщающей) концентрации другого.

Единицы активности ферментов. Активность препаратов ферментов обычно выражают в международных единицах активности. Активностью, равной одной международной единице, обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин в стандартных (обычно оптимальных) условиях. Удельная активность — это число единиц активности на 1 мг белка препарата фермента. Удельная активность отражает степень очистки фермента; она максимальна у чистого фермента.

Международный биохимический союз предложил использовать в качестве единицы активности «катал» (кат); активностью 1 кат обладает такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 моль субстрата в продукт за 1 с. Следовательно, 1 кат = $60 \cdot 10^6 = 6 \cdot 10^7$ международных единиц. Рекомендовано использовать также единицу значительно меньшего масштаба — нанокатал (нкат), равную 10^{-9} кат.

Ингибиторы ферментов. Действие многих ферментов может быть заторможено определенными химическими соединениями — ингибиторами. С помощью ингибиторов получают ценную информацию о специфичности ферментов, природе функциональных групп их активных центров и о механизме действия.

По характеру действия ингибиторы разделяют на *необратимые* и *обратимые*.

Необратимые ингибиторы химически модифицируют важные для активности функциональные группы фермента. Естественно, что после удаления свободного ингибитора путем диализа активность модифицированного фермента не восстанавливается. Эффективность действия необратимого ингибитора характеризуется константой скорости процесса ингибирования. В ряде случаев активность модифицированного фермента можно восстановить, удалив присоединившийся необратимый ингибитор путем соответствующей химической реакции; этот процесс принято называть реактивацией.

Примерами необратимых ингибиторов являются диизопропилфторфосфат (ДФФ) и иодацетамид. ДФФ инактивирует ряд гидролаз (химотрипсин, трипсин, ацетилхолинэстеразу), модифицируя важный для активности этих ферментов остаток серина (рис. 89). Иодацетамид инактивирует ферменты, функционально значимой группой которых является остаток цистеина (глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, папаин).

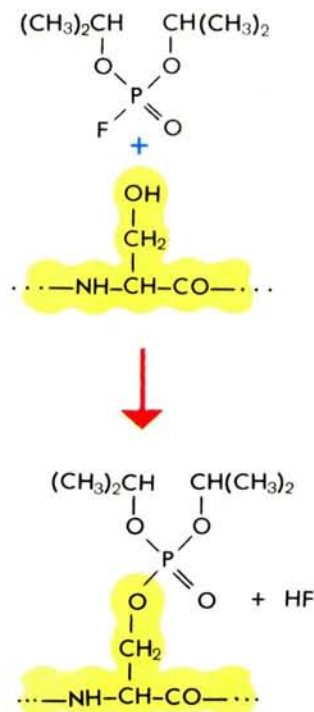


Рис. 89. Инактивация диизопропилфторфосфатом сериновой протеиназы.

Обратимые ингибиторы взаимодействуют с ферментом без образования ковалентной связи. После инкубации с обратимым ингибитором активность фермента восстанавливается при удалении свободного ингибитора путем диализа. Характерная для соответствующей системы степень ингибирования достигается в общем случае относительно быстро и далее не зависит от времени, что указывает на наличие равновесия при образовании комплекса ингибитора I с ферментом $E + I \rightleftharpoons EI$.

Константа ингибирования K_i при обратимом ингибировании — это константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Она является величиной, обратной величине сродства ингибитора к ферменту.

Различаются два вида обратимых ингибиторов — конкурентные и неконкурентные. Конкурентные ингибиторы по строению обычно сходны с субстратом; они конкурируют с ним за связывание с ферментом. Скорость реакции в присутствии конкурентного ингибитора определяется выражением

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

Характерная черта конкурентного ингибирования состоит в том, что эффективность ингибирования зависит от соотношения концентраций субстрата и ингибитора (а не от абсолютной концентрации ингибитора).

Неконкурентные (обратимые) ингибиторы, как правило, не имеют сходства с субстратом. Они могут обратимо связываться как со свободным ферментом, так и с ES-комплексом и не конкурируют с субстратом, т. е. не вытесняют его из комплекса с ферментом. Скорость реакции в присутствии неконкурентного ингибитора может быть выражена уравнением

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(K_M + [S]) (1 + [I]/K_i)}$$

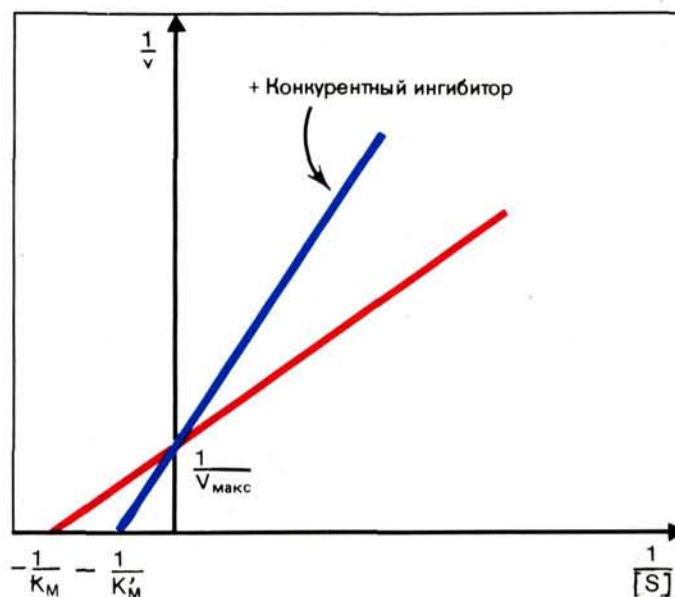


Рис. 90. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации $\frac{1}{[S]}$ в присутствии конкурентного ингибитора.

Эффективность неконкурентного ингибирования определяется концентрацией ингибитора и не зависит от соотношения концентраций ингибитора и субстрата.

Тип обратимого ингибирования (конкурентное или неконкурентное) устанавливается определением зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии ингибитора. Для выяснения типа ингибирования и величины K_i пользуются графиками зависимости обратной скорости реакции от обратной концентрации субстрата; в случае систем с обратимыми ингибиторами они являются линейными.

При конкурентном ингибировании выражение для величины обратной скорости реакции следующее:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} (1 + [I]/K_i) \frac{1}{[S]}.$$

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ в отсутствие и в присутствии конкурентного ингибитора приведены на рисунке 90. Об эффективности связывания конкурентного ингибитора можно судить по величине наклона графика.

При наличии в системе конкурентного ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси ординат ($\frac{1}{V_{\max}}$), не изменяется; в то же время изменяется величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс. Ее значение равно $\frac{1}{K'_M}$, где K'_M — кажущаяся величина K_M в присутствии ингибитора

$$K'_M = \frac{K_M}{1 + [I]/K_i},$$

откуда следует, что

$$K_i = \frac{1}{K'_M/K_M - 1}.$$

При неконкурентном ингибировании величина обратной скорости реакции выражается уравнением

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right).$$

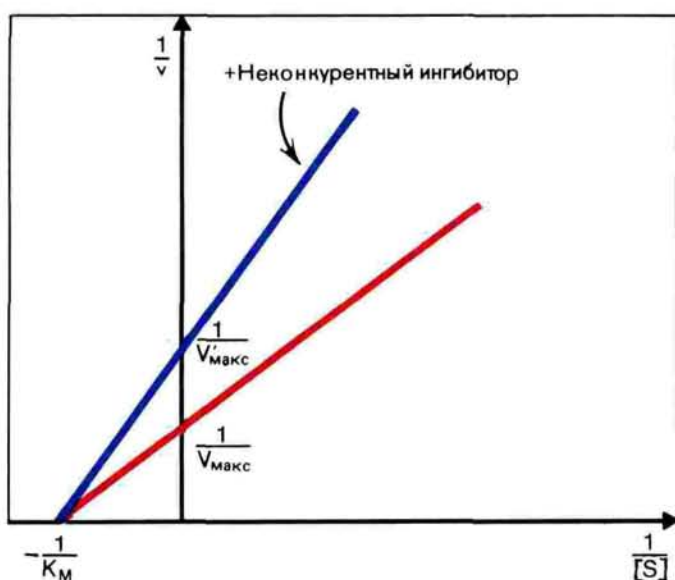


Рис. 91. График зависимости обратной скорости $\frac{1}{v}$ от обратной концентрации $\frac{1}{[S]}$ в присутствии неконкурентного ингибитора.

Графики зависимости $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ в отсутствие и в присутствии неконкурентного ингибитора приведены на рисунке 91. В присутствии ингибитора величина отрезка, отсекаемого на оси абсцисс, остается постоянной, т. е. величина K_M не меняется. Величина отрезка, отсекаемого на оси ординат, изменяется, она становится равной $\frac{1}{V'_{\max}}$, где V'_{\max} — кажущаяся величина V_{\max} в присутствии ингибитора

$$\frac{1}{V'_{\max}} = \frac{1 + [I]/K_i}{V_{\max}}$$

из чего следует, что

$$K_i = \frac{[I]}{V_{\max}/V'_{\max} - 1}$$

Активаторы ферментов. Активность некоторых ферментов может увеличиваться в результате их взаимодействия с определенными соединениями — активаторами. В том случае, когда активатор А, связываясь с ферментом, влияет на связывание субстрата, выражение для обратной скорости реакции имеет вид, формально сходный с соответствующим выражением для конкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right) \frac{1}{[S]}$$

где K_a — константа диссоциации комплекса фермент — активатор.

Если связывание активатора не влияет на связывание субстрата (и наоборот), зависимость $\frac{1}{v}$ от $\frac{1}{[S]}$ имеет вид, сходный с соответствующим выражением для неконкурентного ингибирования:

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{K_a}{[A]} \right)$$

Такой вид активации называют неконкурентным, поскольку при повышении концентрации активатора v увеличивается, а K_M не изменяется.

Кооперативные эффекты и регуляторные ферменты. Ферменты, имеющие один активный центр, обычно функционируют в соответствии с кинетикой Михаэлиса; при этом график зависимости v от $[S]$ имеет вид гиперболы (рис. 87). Для ферментов с олигомерной структурой, т. е. с несколькими активными центрами, кинетика функционирования не является однозначной.

В том случае, когда находящиеся в различных субъединицах активные центры кинетически независимы, график зависимости v от $[S]$ представляет собой гиперболу: если же между активными центрами имеется взаимодействие (они функционируют кооперативно), график будет иметь сигмоидальную форму. Такой тип функционирования наблюдается у ряда олигомерных внутриклеточных ферментов, выполняющих важные регуляторные функции. В качестве примера на рисунке 92 приведен график зависимости v от $[S]$ для аспартат-транскарбамоилазы. При повышении концентрации субстрата скорость реакции возрастает вначале относительно медленно, а затем значительно быстрее; прирост скорости резко уменьшается только перед достижением максимального значения. Благодаря сигмоидальному характеру зависимости v от $[S]$ оказывается возможным более эффективное регулирование скорости, чем в случае ферментов с «михаэлисовой» кинетикой.

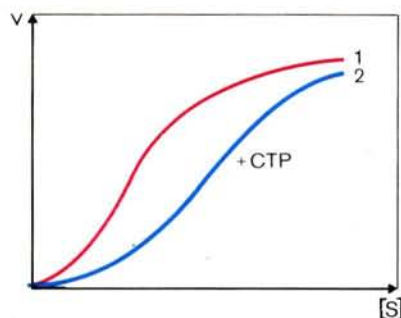


Рис. 92. Зависимость скорости реакции, катализируемой аспартат-транскарбамоилазой, от концентрации аспартата; влияние ингибирующего эффектора (СТР — цитидинтрифосфат): 1 — в отсутствие эффектора; 2 — в присутствии эффектора.

Активность регуляторных ферментов обратимо модулируется (ингибируется или стимулируется) определенными метаболитами, которые называют *аллостерическими* эффекторами. Название «аллостерические» (от греч. *αλλοζ* — другой, *ετεροζ* — пространство) эти эффекторы получили потому, что, как правило, они не имеют структурного сходства с субстратом (или продуктом) реакции, катализируемой соответствующим ферментом. Они связываются не с активным центром фермента, а со специальными участками, которые называют регуляторными центрами. По предложению Ж. Моно, ферменты, активность которых модулируется аллостерическими эффекторами, были названы аллостерическими.

Эффекторы аллостерических ферментов изменяют степень сигмоидальности графика зависимости v от $[S]$. Ингибирующий (отрицательный) эффектор смещает этот график вправо, и он становится более сигмоидальным; активирующий (положительный) эффектор смещает график в противоположную сторону, приближая его по форме к гиперболе. Влияние ингибирующего эффектора на активность аспартат-транскарбамоилазы показано на рисунке 92.

Влияние pH на активность ферментов. Ферменты, как и другие белки, имеют большое число ионных групп. Изменение состояния ионизации таких групп при сдвиге pH может оказывать сильное влияние на активность фермента. В первую очередь это касается групп, участвующих в катализе или в связывании субстрата.

Для каждого фермента имеется определенное значение pH, при котором скорость катализируемой реакции максимальна (оптимум pH). В таблице 8 приведены значения оптимумов pH для некоторых гидролитических ферментов. Видно, что эти значения сильно различаются; так, например, для пепсина оптимум находится при pH 1,5, а для щелочной фосфатазы — 9,0 — 10,0. Большинство ферментов имеют оптимум pH в нейтральной области (7,0 — 8,0).

Влияние температуры на активность ферментов. Согласно закону Вант-Гоффа скорость химических реакций увеличивается примерно в два раза при повышении температуры на 10 °C (коэффициент Q_{10}). Это правило справедливо также и для ферментативных реакций, однако только в ограниченной области значений температуры. При повышении температуры свыше 40 — 50 °C происходит инактивация белкового катализатора из-за тепловой денатурации. Следовательно, ферментативные реакции отличаются от реакций, катализируемых соединениями небелковой природы, наличием температурного оптимума. Причиной быстрого падения активности является высокая величина коэффициента Q_{10} для процесса тепловой денатурации белка. Следует отметить, что ферменты термофильных бактерий имеют весьма высокий температурный оптимум.

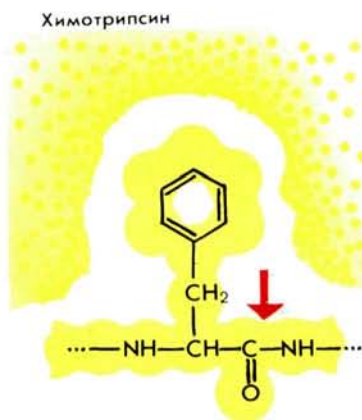
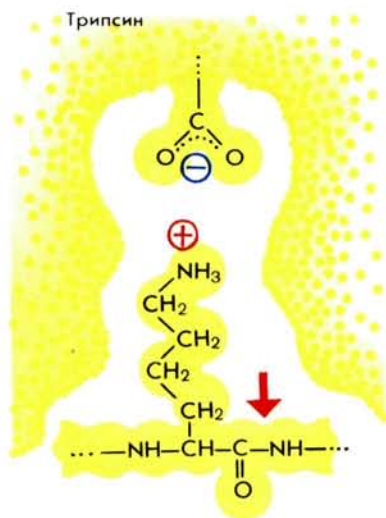


Моно [Monod] Жак Люсьен (1910—1976), французский биохимик и микробиолог. Окончил Парижский университет (1934), работал там же (с 1959 г. — профессор). Совместно с Ф. Жакобом высказал гипотезы о переносе генетической информации и механизме генетической регуляции синтеза белка в бактериальных клетках. Разработал теорию роста и развития бактерий, доказал возможность управления этим ростом. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с Ф. Жакобом и А. М. Львовым).

Таблица 8

Оптимум pH действия некоторых гидролитических ферментов

Фермент	Субстрат	Оптимум pH
Пепсин	Яичный альбумин	1,5
α-Амилаза солода	Крахмал	4,5
Кислая фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	4,5 — 5,0
α-Глюкозидаза	α-Метилглюкозид	5,4
Уреаза	Мочевина	6,4 — 6,9
Трипсин	Белки	7,8
Панкреатическая α-амилаза	Крахмал	6,7 — 7,2
Карбоксипептидаза А	Различные субстраты	7,5
Щелочная фосфатаза плазмы	2-Глицерофосфат	9 — 10
Аргиназа	Аргинин	9,5 — 9,9



Активный центр. Важная особенность ферментативного катализа состоит в том, что фермент образует с субстратом фермент-субстратный комплекс, и химическое превращение субстрата происходит в составе комплекса. В этом комплексе субстрат связывается с определенной зоной фермента, называемой *активным центром*; именно в активном центре происходит превращение субстрата в продукт.

Активные центры ферментов имеют ряд общих черт. Так, обычно активный центр занимает относительно небольшую часть молекулы фермента. Кроме того, активный центр — это трехмерная структура, часто имеющая, как показывают рентгеноструктурные данные, форму щели или впадины в глобуле фермента. Активный центр формируется аминокислотными остатками, находящимися в различных, обычно значительно удаленных друг от друга участках полипептидной цепи. Условно в активном центре можно выделить два участка — связывающий и каталитический. Остатки аминокислот, образующие связывающий участок, обеспечивают удержание субстрата в активном центре. Именно «архитектура» связывающего участка активного центра фермента определяет его комплементарность структуре субстрата, т. е. специфичность фермента. Взаимодействие между субстратом и связывающим участком активного центра осуществляется за счет кооперативного действия сил различной природы. Оно обеспечивается электростатическими и водородными связями, гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. Вклады этих сил могут быть весьма различными у разных ферментов. Примером, показывающим участие электростатических сил в связывании субстрата, может служить взаимодействие субстрата с активным центром трипсина. В то же время гидрофобные взаимодействия играют доминирующую роль при связывании субстрата в случае химотрипсина. Наконец, примером,

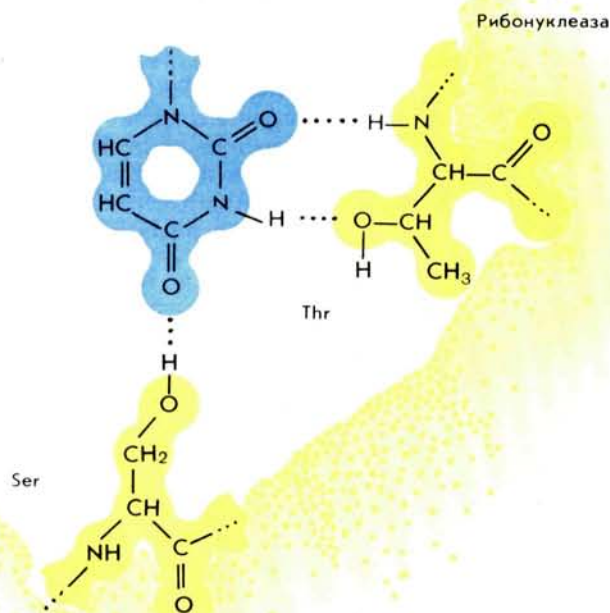


Рис. 93. Образование водородных связей при связывании субстрата с рибонуклеазой.

иллюстрирующим роль водородных связей, является связывание субстрата с панкреатической РНКазой. На рисунке 93 показаны водородные связи, образуемые уридиновым фрагментом РНК с группами связывающего участка фермента.

В каталитический участок фермента входят остатки аминокислот, непосредственно участвующие в катализе. Их называют каталитическими группами. В качестве каталитических обычно выступают ионогенные группы.

Одна из главных задач при установлении механизма действия фермента — идентификация функциональных групп его активного центра, в первую очередь каталитических. Наиболее прямой путь — это использование необратимых ингибиторов, селективно модифицирующих определенные аминокислотные остатки. В одних случаях модификация каталитических групп оказывается возможной вследствие их высокой реакционной способности, в других она достигается в результате использования ингибиторов, связывающихся в активном центре. В соответствии с этим различают две группы необратимых ингибиторов. Представители первой группы не имеют структурного сходства с субстратом, но избирательно модифицируют каталитические группы благодаря высокой реакционной способности последних. В качестве примера можно привести модификацию диизопропилфторфосфатом уникально реакционноспособного остатка серина в каталитическом центре химотрипсина (рис. 89). Ингибиторы другой группы являются структурными аналогами субстратов, содержащими реакционноспособные группировки. Эти ингибиторы сначала нековалентно связываются в зоне активного центра, а затем благодаря наличию реакционноспособной группировки модифицируют локализованные и находящиеся вблизи функциональные группы, образуя с ними ковалентные связи. Рассматриваемый подход известен под названием «аффинного мечения», или биоспецифической модификации (см. с. 172).

Наиболее эффективный метод идентификации функциональных групп активного центра — рентгеноструктурный анализ. На основе информации о пространственной структуре фермент-субстратного комплекса, взаиморасположении каталитических групп фермента и атакующей связи субстрата в ряде случаев удается расшифровать механизм действия фермента.

Причины высокой каталитической активности ферментов

Между ферментативным и химическим катализом принципиальных различий не существует; химические механизмы, лежащие в их основе, сходны. Доминирующей концепцией химического катализа является теория переходного состояния. Эта теория рассматривает только два состояния реагентов — исходное (основное) и переходное — наименее стабильную структуру, образующуюся в ходе реакции. На графике (рис. 94) переходному состоянию соответствует максимум энергии; в таком состоянии химические связи непрерывно разрываются и образуются. Катализатор ускоряет реакцию, снижая величину энергии переходного состояния (энергетический барьер).

Хотя механизмы химического и ферментативного катализа сходны, однако ферменты в условиях нормального давления в вод-

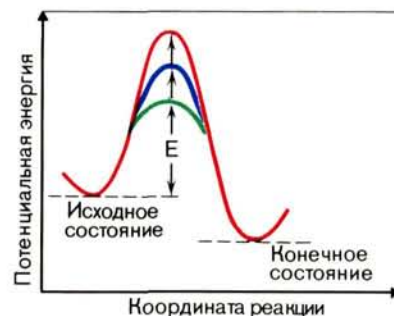


Рис. 94. Снижение энергии активации E при неферментативном и ферментативном катализе:

- некатализируемая реакция;
- неферментативный катализ;
- ферментативный катализ.

ных растворах при 37 °С являются значительно более эффективными, чем обычные химические катализаторы.

За счет чего достигается высокая каталитическая активность ферментов? Можно выделить несколько основных факторов, которые реализуются благодаря образованию фермент-субстратного комплекса: факторы сближения, фиксации и ориентации. В рамках теории переходного состояния эти факторы в конечном счете снижают энергетический барьер реакции. Связывание субстрата в активном центре обеспечивает сближение атакуемой связи с каталитическими группами фермента, одновременно достигается фиксация субстрата и его оптимальная для разрыва и образования химических связей ориентация. Кроме того, это фактор изменения конформаций фермента и субстрата. Д. Кошланд сформулировал концепцию «индуцированного соответствия», согласно которой при связывании специфического субстрата происходит такое изменение конформации фермента, которое перемещает каталитические группы в положение, обеспечивающее эффективное протекание катализа. Индуцируемые субстратом изменения конформации фермента происходят, вероятно, в пределах тех состояний, которые «разрешены» и для свободного фермента. Концепцию индуцированного соответствия можно рассматривать как развитие представлений Э. Фишера о жесткой матрице, действующей по принципу «ключ — замок».

Большое значение для эффективности действия фермента может иметь сопряженный кислотно-основный катализ, а также нуклеофильный катализ с образованием реакционноспособного промежуточного соединения. Немалую роль играет и фактор микросреды. Совокупность факторов, вносящих вклад в повышение каталитической активности ферментов, обеспечивает снижение энергетического барьера реакции. Согласно получившей весьма широкое признание концепции, снижение энергетического барьера достигается благодаря стабилизации переходного состояния или, точнее, благодаря приближению структуры субстрата в фермент-субстратном комплексе к структуре переходного состояния. Приближение к структуре переходного состояния требует в общем случае затраты энергии; согласно рассматриваемой концепции, необходимая энергия обеспечивается за счет части энергии связывания субстрата с ферментом.

Механизм действия ферментов

Раскрытие с помощью метода рентгеноструктурного анализа пространственного строения ряда ферментов явилось надежной основой для построения рациональных схем механизма их действия. В одних случаях эти схемы основываются почти целиком на анализе структуры фермент-субстратных комплексов в кристалле, а в других — используются также результаты исследований по химической модификации ферментов, кинетике катализируемых реакций и другие данные. Установление механизма действия ферментов имеет ключевое значение для раскрытия структурно-функциональных взаимосвязей во множестве биологически активных систем. В данном разделе приведены сведения о механизме действия ряда ферментов; они могут служить иллюстрацией используемых подходов.

Лизоцим. Лизоцим (КФ 3.2.1.17) обнаружен в различных тканях животных и растений, он находится, в частности, в слезной жид-

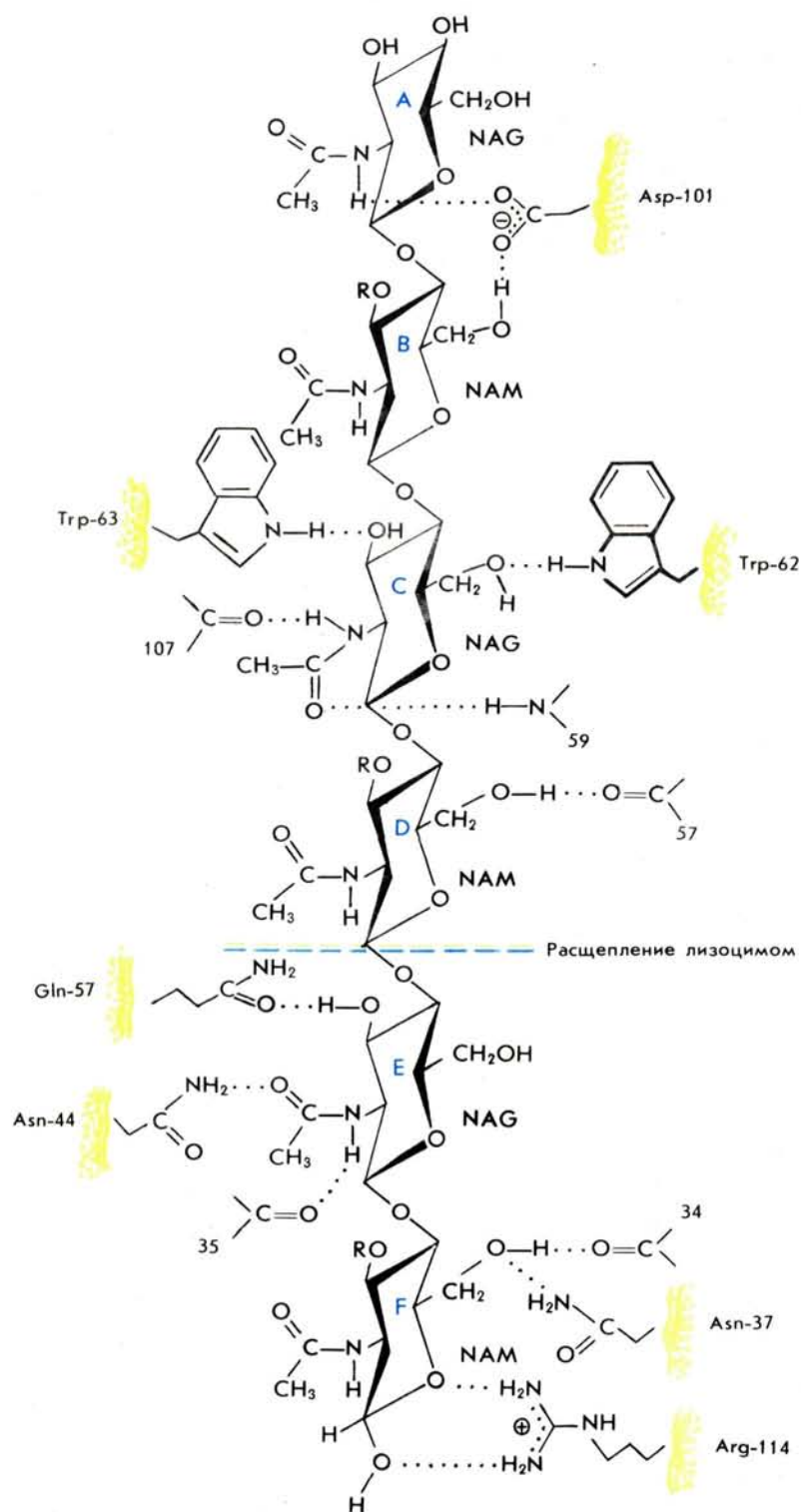


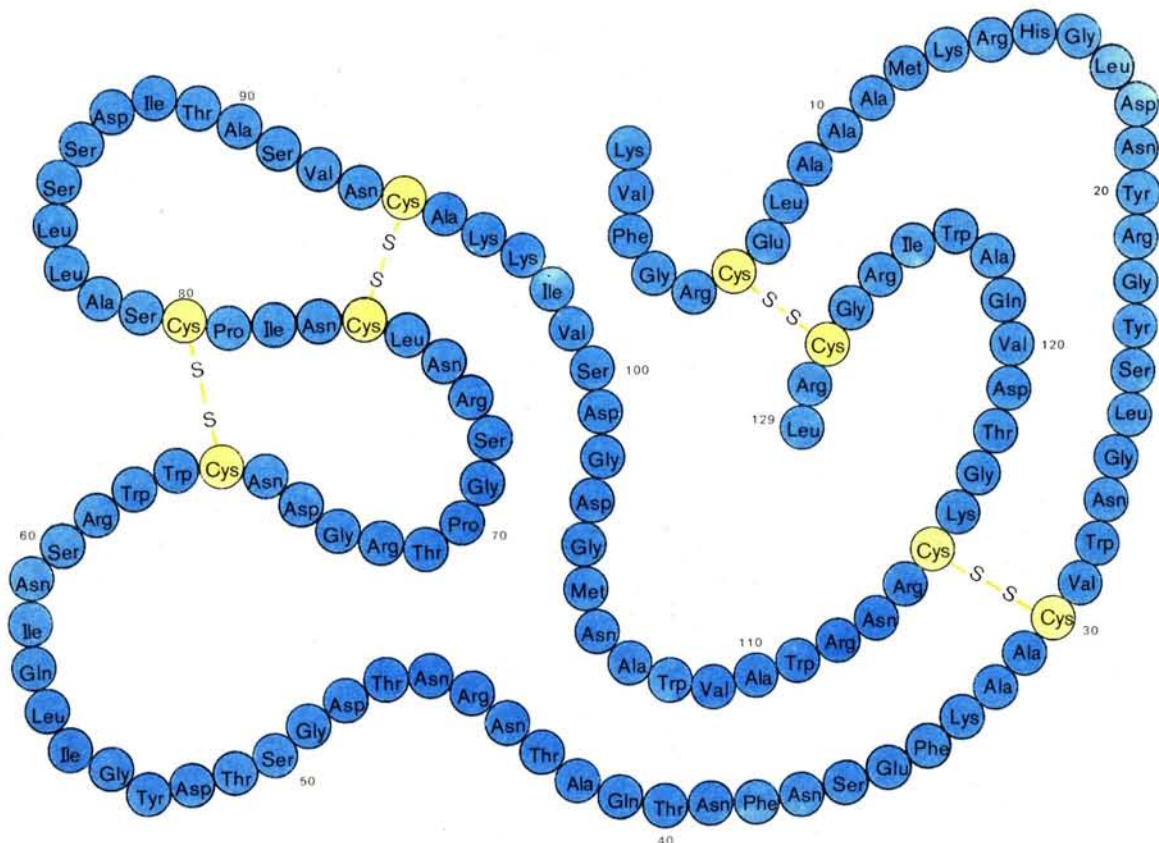
Рис. 95. Фрагмент структуры бактериального полисахарида — субстрата лизоцима. Показаны водородные связи, образующиеся при связывании субстрата в активном центре фермента.

кости и яичном белке. Лизоцим функционирует как антибактериальный агент, катализируя гидролиз полисахарида, входящего в состав клеточных стенок ряда бактерий. Этот полисахарид образован чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM), соединенными β -1,4-гликозидной связью (полисахаридные цепи сшиты короткими пептидными фрагментами) (рис. 95). Бактериальный полисахарид является весьма сложным нерастворимым соединением, в связи с чем в качестве субстратов лизоцима часто используются хорошо гидролизующиеся олигосахариды, образованные остатками NAG.

Лизоцим белка куриных яиц образован одной полипептидной цепью, содержащей 129 аминокислотных остатков; его молекулярная масса составляет 14 600. Первичная структура лизоцима определена Р. Кенфилдом и А. Лиу в 1965 г. (рис. 96). Высокая стабильность фермента обеспечивается наличием четырех дисульфидных мостиков.

Информация об активном центре и типе каталитического процесса была получена Д. Филлипсом и сотр. в 1965 г. на основе рентгеноструктурных исследований лизоцима (и его комплексов с ингибиторами). Молекула лизоцима имеет форму эллипсоида с осями $4,5 \times 3 \times 3$ нм; между двумя половинами молекулы находится «щель», в которой происходит связывание олигосахаридов. Стенки щели образованы в основном боковыми цепями неполярных аминокислот, обеспечивающими связывание неполярных структур субстрата, и включают также боковые цепи полярных аминокислот, которые

Рис. 96. Первичная структура лизоцима.



способны образовывать водородные связи с ациламинными и гидроксильными группами субстрата (рис. 95). Размер щели позволяет разместиться молекуле олигосахарида, содержащей 6 остатков моносахаридов. Это согласуется с результатами кинетических исследований, в соответствии с которыми скорость расщепления олигомеров NAG скачкообразно возрастает при переходе от тетрасахарида к соединениям, содержащим 5 или 6 моносахаридных остатков. Методом рентгеноструктурного анализа установить характер связывания субстрата, например гексасахарида NAG₆, не удается, поскольку он гидролизуется. В то же время комплексы фермента с ингибитором трисахаридом NAG₃ стабильны и хорошо изучены. NAG₃ связывается в щели на поверхности фермента, образуя водородные связи и ван-дер-ваальсовы контакты; при этом он заполняет только половину щели, в которой могут связаться еще три моносахаридных остатка (рис. 97). Невосстанавливающий конец (сахар А) оказывается у начала щели, а восстанавливающий конец (сахар С) — в центральной ее части; остатки сахаров А, В и С имеют конформацию кресла. Построение модели фермент-субстратного комплекса было основано на предположении о том, что при связывании субстрата NAG₆ реализуются те же взаимодействия, что и при связывании NAG₃. На модели фермента внутри щели были размещены еще три остатка сахара (обозначаемые как остатки D, E и F); каждый последующий сахар «присоединялся» таким образом, чтобы его конформация была такой же (насколько это возможно), как у первых трех сахаров. В составе модельного комплекса все остатки сахаров реализуют эффективные нековалентные взаимодействия с боковыми и пептидными группами аминокислотных остатков, образующих щель.

При идентификации каталитических групп естественно было сосредоточить внимание на тех из них, которые в фермент-субстратном комплексе находятся около расщепляемой гликозидной связи и могут служить донорами или акцепторами протонов. Оказалось, что по одну сторону от расщепляемой связи, на расстоянии $\approx 0,3$ нм (от кислорода гликозидной связи), находится карбоксильная группа Glu-35, а по другую (на таком же расстоянии) карбоксильная группа Asp-52 (рис. 97), окружение их сильно различается. Glu-35 окружена гидрофобными остатками; можно предполагать, что в оптимуме рН фермента эта группа находится в неионизированном состоянии. Окружение Asp-52 выражено полярное; ее карбоксильная группа участвует в качестве акцептора водорода в сложной сети водородных связей и функционирует, вероятно, в ионизированном состоянии.

Предложена следующая схема каталитического процесса при гидролизе олигосахарида (рис. 98). Неионизированная карбоксильная группа Glu-35 выступает в качестве донора протона, поставляя его гликозидному атому кислорода между атомом C₍₁₎ сахара D и C₍₄₎ сахара E (стадия общего кислотного катализа); это приводит к разрыву гликозидной связи. В результате остаток сахара D переходит в состояние карбокатиона с положительно заряженным атомом углерода C₍₁₎ и принимает конформацию полукресла. Отрицательный заряд карбоксилатной группы Asp-52 стабилизирует карбокатион. Остаток NAG₂ (сахара E + F) диффундирует из области активного центра. Затем в реакцию вступает молекула воды; ее протон переходит к Glu-35, а OH⁻-группа к атому C₍₁₎ остатка D (стадия общего основного катализа). Остаток NAG₄ (сахара D + C + B + A) уходит из области активного центра, и фермент возвращается в исходное состояние.

Рибонуклеаза. Рибонуклеаза (РНКаза) (КФ 3.1.4.22) поджелудочной железы быка гидролизует межнуклеотидные связи в РНК около пиримидиновых звеньев, которые при этом остаются этери-

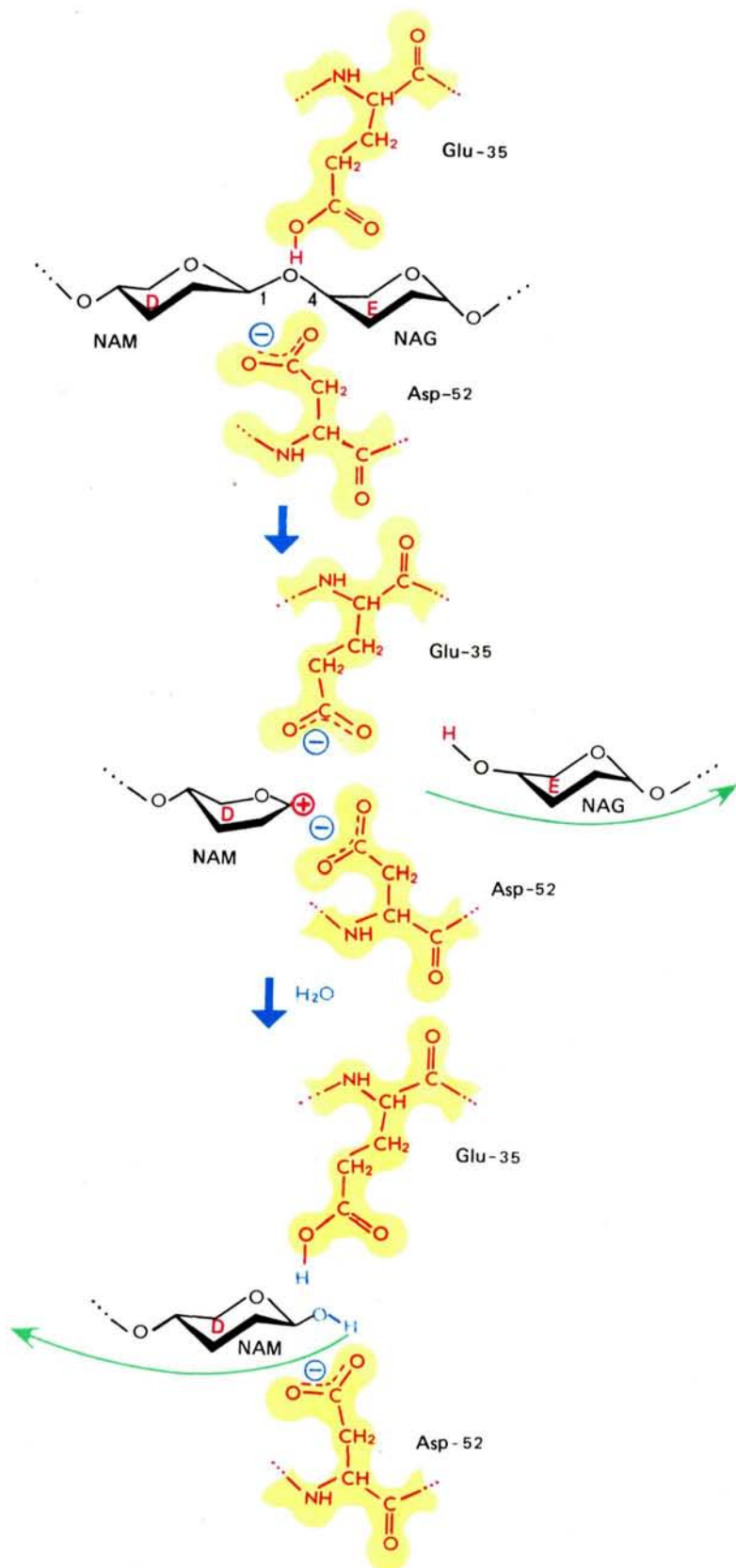
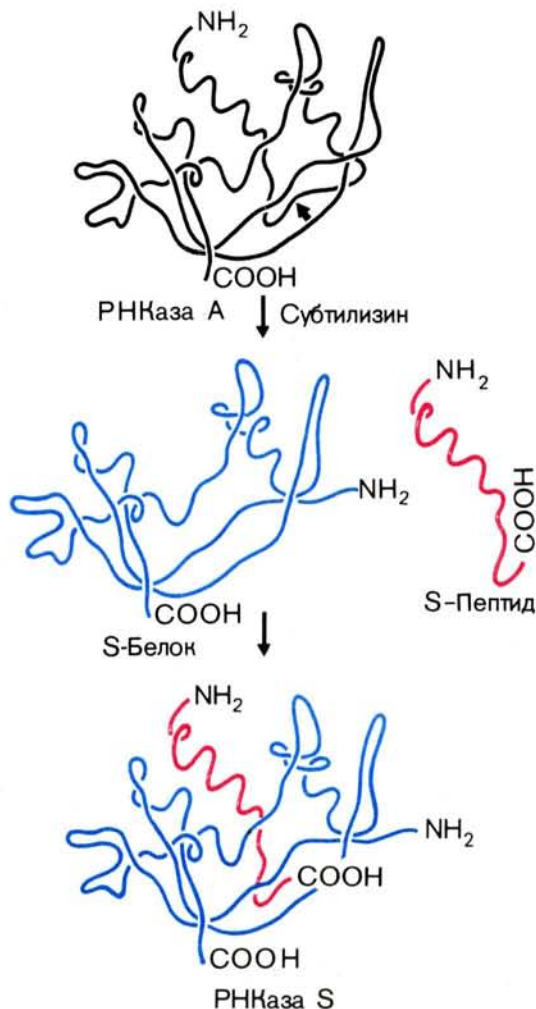


Рис. 98. Схема каталитического процесса при гидролизе олигосахарида лизоцимом.

ставление о том, что пространственное строение белка определяется его первичной структурой.

В 1958 г. Ф. Ричардс показал, что в определенных условиях субтилизин расщепляет в РНКазе пептидную связь Ala-20—Ser-21. Образующиеся фрагменты были названы S-пептидом (остатки 1—20) и S-белком (остатки 21—124); за счет нековалентных взаимодействий фрагменты образуют комплекс, названный РНКазой S. Этот комплекс обладает почти полной каталитической активностью нативного фермента; в изолированном виде S-пептид и S-белок неактивны. Далее было установлено, что синтетический пептид, идентичный по последовательности фрагменту S-пептида, содержащему остатки с 1 по 13, восстанавливает активность S-белка, однако более короткий пептид, содержащий остатки с 1 по 11, такой способностью не обладает. Полученные данные позволили сделать заключение о том, что соответствующие остатки His-12 или Met-13 (или оба этих остатка) входят в активный центр фермента.

При исследовании влияния pH на активность РНКазы была выяснена важная роль функциональных групп белка с рК 5,2 и 6,8; это позволяло предполагать участие в каталитическом акте



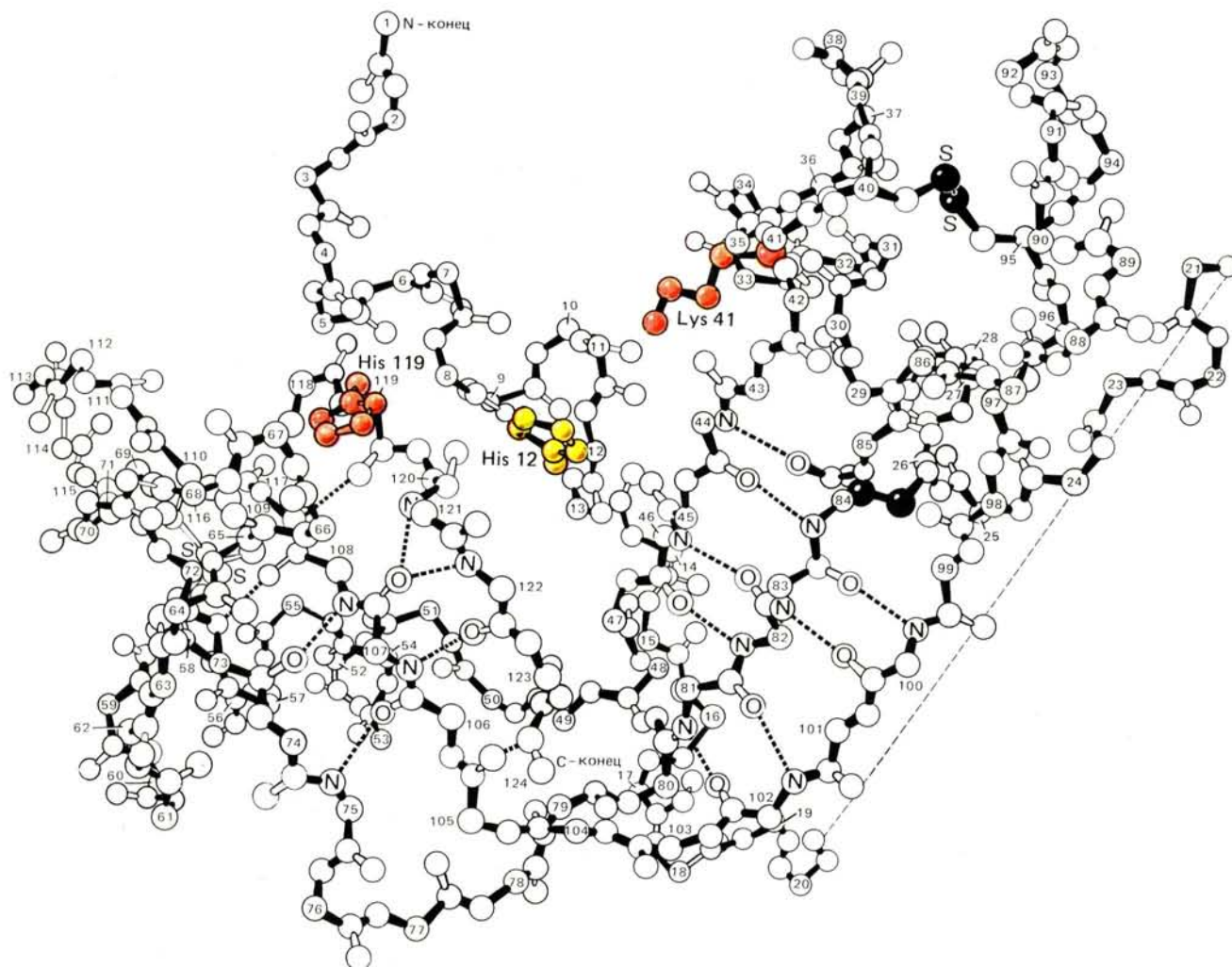
остатков гистидина. При карбоксиметилировании РНКазы иодацетатом при рН 5,5, т. е. в условиях, при которых преимущественно происходит модификация остатков гистидина, наблюдалась полная утрата активности; модифицированный фермент содержит 1 моль карбоксиметильных групп на 1 моль белка. В результате образуются две монокарбоксиметилированные формы фермента. В одной форме карбоксиметилированным является остаток His-12, а в другой — His-119. Преимущественно модифицировался His-119.

Эти данные позволяли предполагать, что остатки His-12 и His-119 находятся в активном центре и что модификация одного из них препятствует модификации другого.

В результате рентгеноструктурных исследований, проведенных Г. Уикофом и Ф. Ричардсом было выяснено пространственное строение РНКазы S и комплекса РНКазы S с ингибиторами. На рисунке 99 приведено строение РНКазы S. Видно, что молекула имеет форму почки, активный центр локализован в углублении, где находятся остатки His-12, His-119 и Lys-41.

Предполагаемая схема каталитического процесса, осуществляемого РНКазой, дана на рисунке 100. Гидролиз происходит в результате сопряженного действия остатков His-12 и His-119, осуществля-

Рис. 99. Строение рибонуклеазы S. Показано взаиморасположение His-12, His-119 и Lys-41 в активном центре.





Антонов Владимир Константинович (р. 1927), советский химик-биоорганик. Окончил Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева (1949), с 1959 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Занимается изучением структуры и функции протеолитических ферментов. Автор книги «Химия протеолиза». Лауреат Государственной премии СССР (1984).

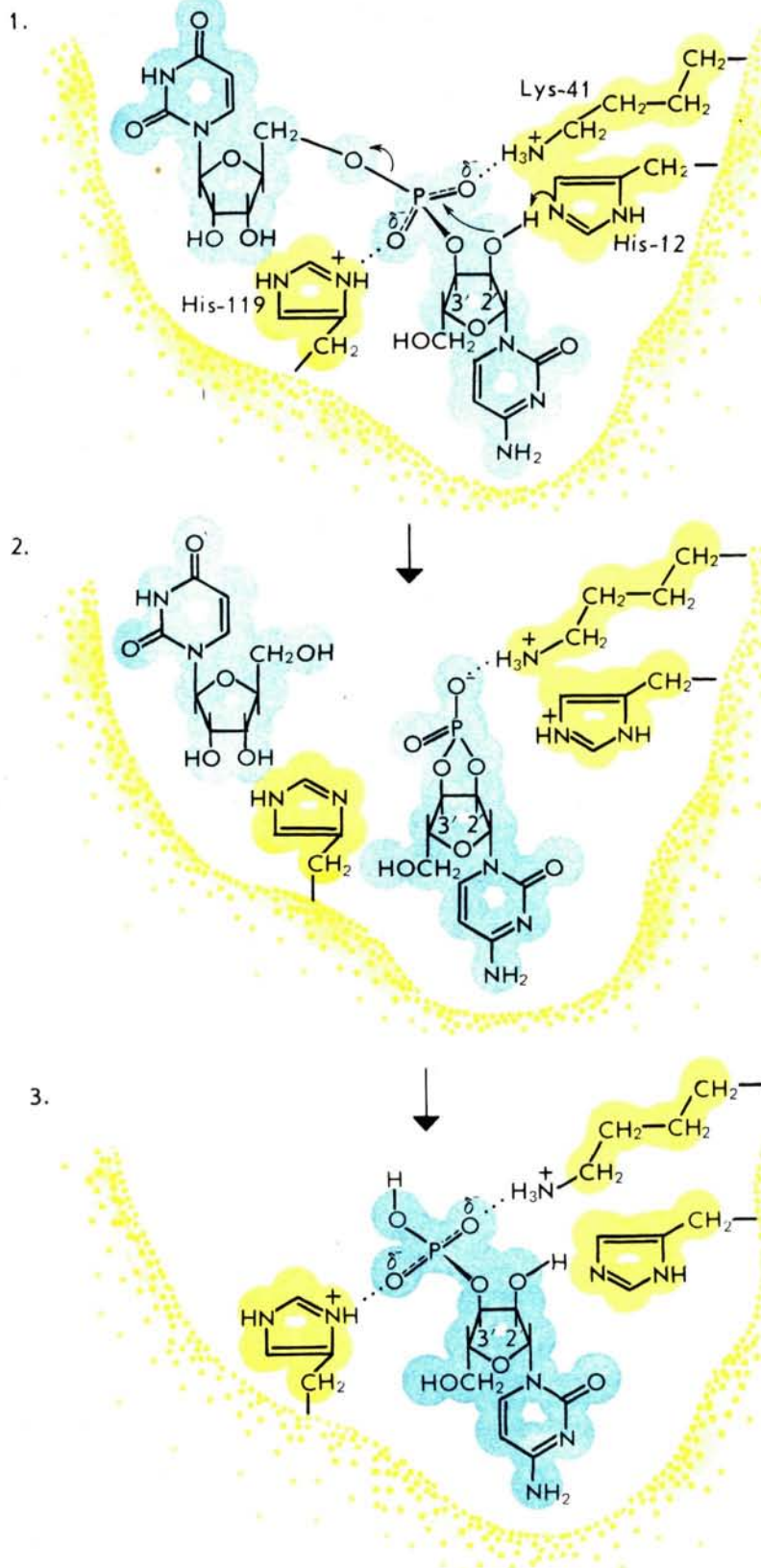


Рис. 100. Схема каталитического процесса, осуществляемого РНКазой.

ющих кислотно-основной катализ. На приведенной схеме указаны стадии каталитического процесса:

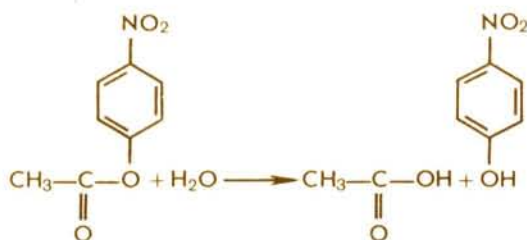
1. Субстрат находится в активном центре; His-12 и His-119, а также Lys-41 расположены около отрицательно заряженного фосфата.

2. В результате действия His-12 как основания, акцептирующего протон от 2'-ОН-группы рибозы, и His-119 как кислоты, отдающей протон атому кислорода фосфата, образуется сначала промежуточный комплекс, а затем 2',3'-циклический фосфат.

3. На место ушедшего продукта поступает вода, отдающая протон His-119, а OH^- — фосфату, одновременно протон от His-12 переходит к кислородному атому рибозы, образуется второй продукт, а фермент возвращается в исходное состояние.

Химотрипсин. Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) секретируется в форме профермента — химотрипсиногена поджелудочной железой позвоночных животных; активация профермента происходит в двенадцатиперстной кишке под действием трипсина. Физиологическая функция химотрипсина — гидролиз белков и полипептидов. Химотрипсин атакует преимущественно пептидные связи, образованные карбоксильными группами остатков тирозина, триптофана, фенилаланина и метионина. Он эффективно гидролизует также сложные эфиры соответствующих аминокислот. Молекулярная масса химотрипсина равна 25 000, молекула его содержит 241 аминокислотный остаток. Химотрипсин образован тремя полипептидными цепями, которые связаны дисульфидными мостиками. Первичная структура фермента установлена Б. Хартли в 1964 г.

Функциональные группы активного центра химотрипсина идентифицированы с помощью необратимых ингибиторов. Остаток Ser-195 был модифицирован диизопропилфторфосфатом и фенилметилсульфофторидом, а остаток His-57 — N-тозил-L-фенилаланил-хлорметилкетонем (см. рис. 89 и с. 171). Двухстадийность процесса химотрипсинового гидролиза была обнаружена при изучении кинетики гидролиза п-нитрофенилацетата.



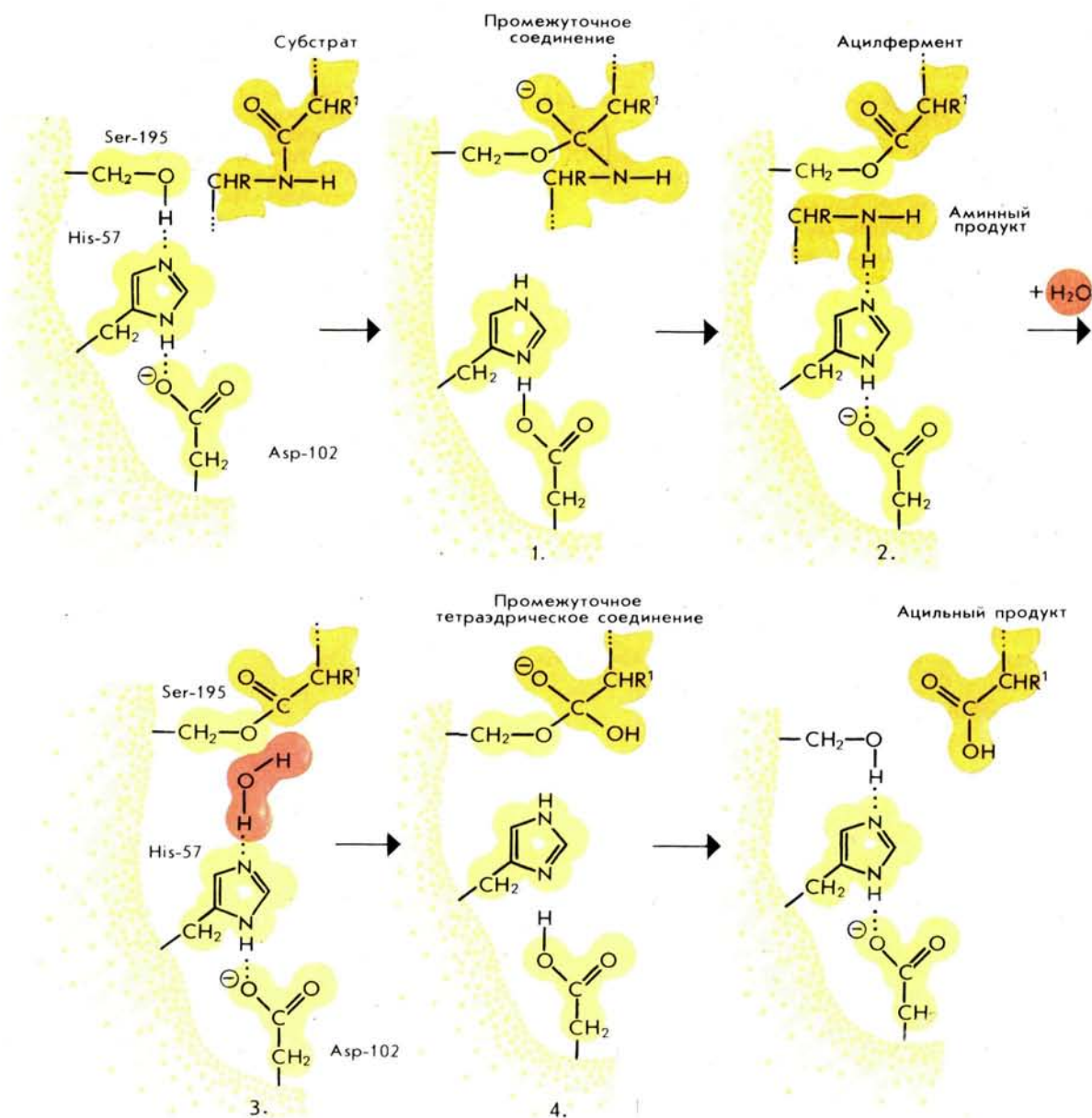
Блоу (Blow) Дэвид Мервин (р. 1931), английский биофизик. Окончил Кембриджский университет, с 1977 г. — профессор Имперского колледжа науки и технологии в Лондоне. Основные работы — по выяснению пространственной структуры белков методом рентгеноструктурного анализа.

Характерной чертой рассматриваемого процесса является образование ковалентного интермедиата — ацилфермента. Ацилируемая каталитическая группа была идентифицирована — остаток Ser-195. Механизм катализа, осуществляемого ферментом, был предложен еще до установления пространственной структуры белка, но позднее был уточнен. В частности, исследования с помощью $^{18}\text{H}_2\text{O}$ позволили доказать образование ацилфермента при гидролизе пептидов (В. К. Антонов).

Трехмерная структура химотрипсина с разрешением 0,2 нм была установлена методом рентгеноструктурного анализа Д. Блоу и сотр.

в 1976 г. Молекула имеет форму эллипсоида с осями $5,4 \times 4,0 \times 4,0$ нм. Результаты кристаллографических исследований подтвердили предположение о том, что остатки Ser-195 и His-57 сближены. На рисунке 101 показан активный центр химотрипсина с фрагментом связанного субстрата. Гидроксильная группа Ser-195 находится на расстоянии 0,3 нм от атома азота имидазольного кольца His-57. Наиболее интересным оказалось то обстоятельство, что атом азота в положении 1 кольца находится на расстоянии $\approx 0,28$ нм от атома кислорода карбоксильной группы боковой цепи Asp-102 и занимает положение, благоприятное для образования водородной связи. Следует отметить, что химические исследования не могли выявить участия Asp-102 в функционировании активного центра, поскольку этот остаток погружен внутрь молекулы. В настоящее время счи-

Рис. 101. Схема каталитического процесса, осуществляемого химотрипсином.

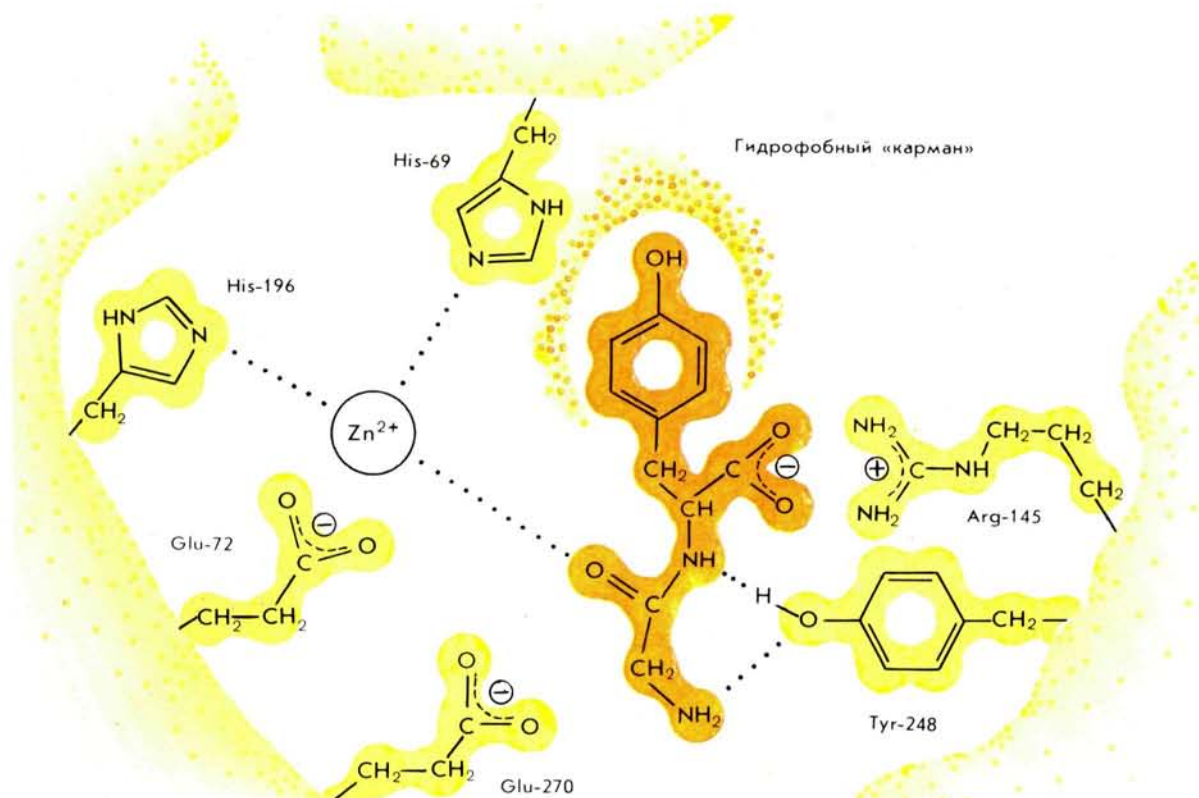


тается, что три остатка Asp-102, His-57 и Ser-195 образуют систему переноса заряда, которая играет решающую роль в процессе катализа. Функционирование системы обеспечивает эффективное участие His-57 в катализе в качестве кислотно-основного катализатора и повышает реакционную способность Ser-195 как нуклеофила. В процессе каталитического акта происходит приближение кислородного атома Ser-195 к карбоксильному углероду атакуемой связи.

Схема каталитического процесса приведена на рисунке 101. Ключевым элементом является перенос протона от Ser-195 к His-57. Одновременно происходит атака атомом кислорода серина карбонильного атома углерода субстрата с образованием сначала промежуточного тетраэдрического соединения (1), а затем ацилфермента (2). На следующей стадии происходит деацилирование. Молекула воды занимает в активном центре место ушедшего аминного продукта (3). Протон от молекулы воды поступает в систему переноса заряда, а ион OH^- одновременно атакует карбонильный атом углерода ацильной группы ацилфермента. Как и на стадии ацилирования, образуется промежуточное тетраэдрическое соединение (4). Затем His-57 поставяет протон атому кислорода Ser-195, в результате чего освобождается ацильный продукт; он диффундирует в раствор, а фермент возвращается в исходное состояние.

Карбоксипептидаза А. Карбоксипептидаза А (КФ 3.4.12.2) секретируется в виде профермента поджелудочной железой позвоночных животных. Образование активного фермента происходит

Рис. 102. Строение комплекса карбоксипептидазы А с дипептидом Gly—Tyr.



в тонком кишечнике при участии химотрипсина. Фермент последовательно отщепляет от пептидной цепи остатки С-концевых аминокислот, т. е. является экзопептидазой.

Карбоксипептидаза А образована одиночной полипептидной цепью, содержащей 307 аминокислотных остатков; молекулярная масса ее равна 34 470. Аминокислотная последовательность белка была установлена в 1969 г. Р. Брэдшоу и сотр.

Выяснение механизма действия фермента оказалось возможным только после проведения рентгеноструктурных исследований. Про-

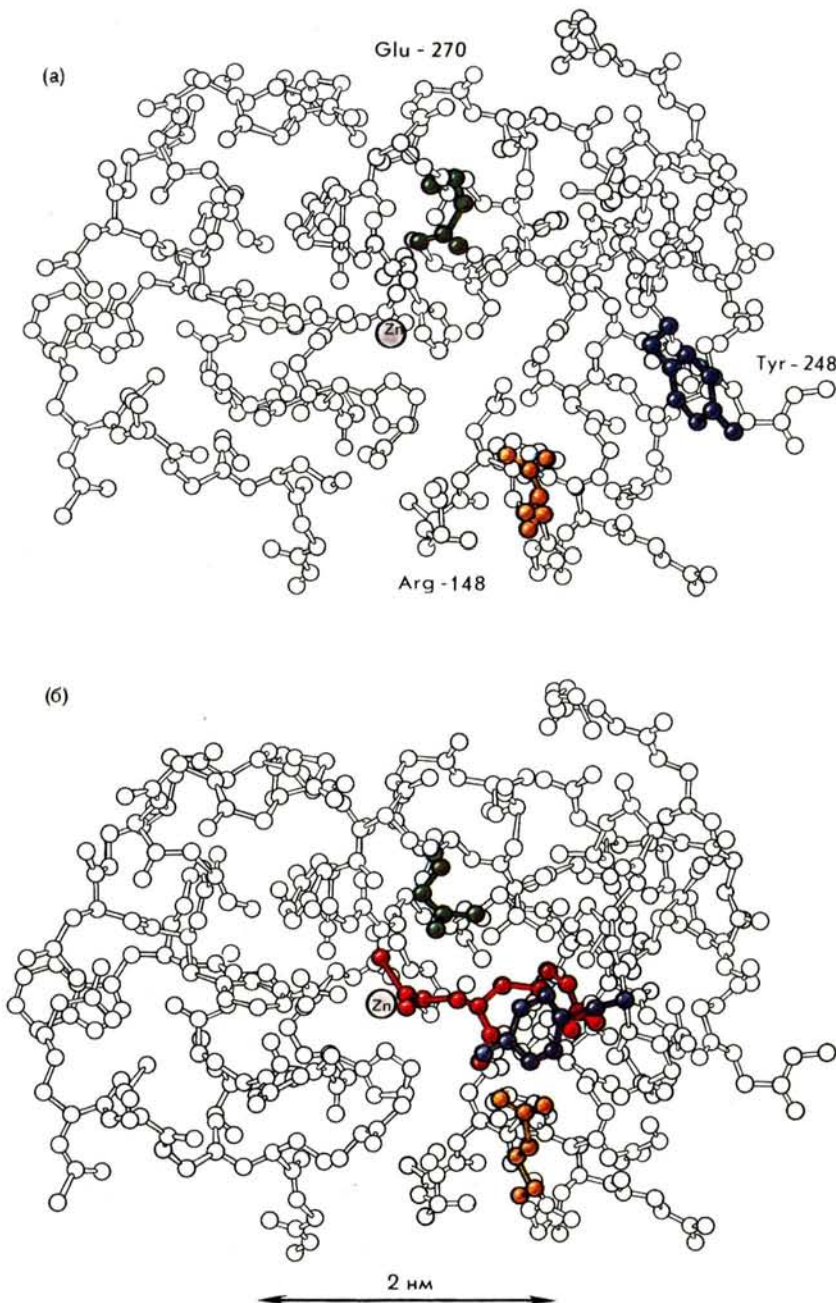
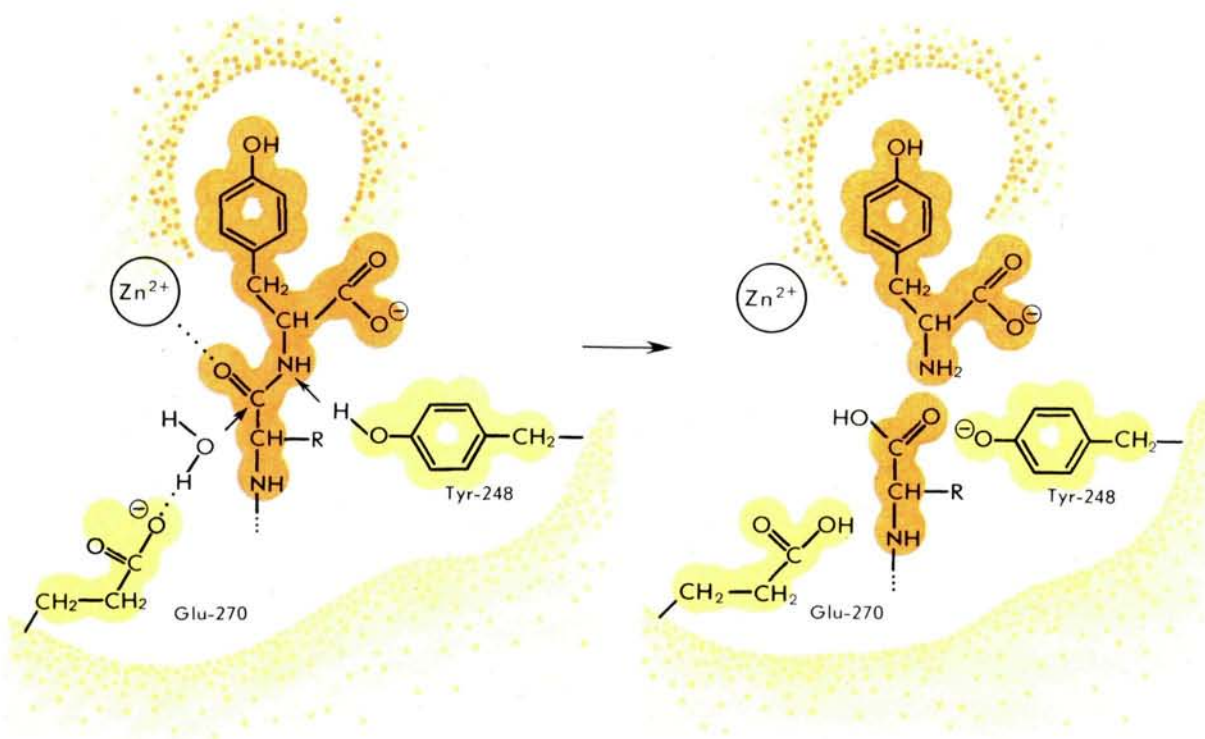


Рис. 103. Изменения в структуре карбоксипептидазы А при связывании с субстратом:

(а) — фермент;

(б) — фермент-субстратный комплекс. (На рисунке представлена только часть молекулы фермента.)

пространственная структура фермента и его комплекса с дипептидом Gly-Тур (модель субстрата) была установлена (с разрешением 0,2 нм) У. Липскомбом и сотр. в 1967 г. Молекула фермента имеет форму эллипсоида с осями $5,0 \times 4,2 \times 3,8$ нм; активный центр находится в углублении, переходящем в глубокий неполярный карман. В зоне активного центра локализован ион цинка (его лигандами являются боковые цепи остатков Glu-72, His-196, His-69 и молекула воды), а также функциональные группы, участвующие в связывании субстрата и катализе,— остатки Arg-145, Glu-270 и Тур-248



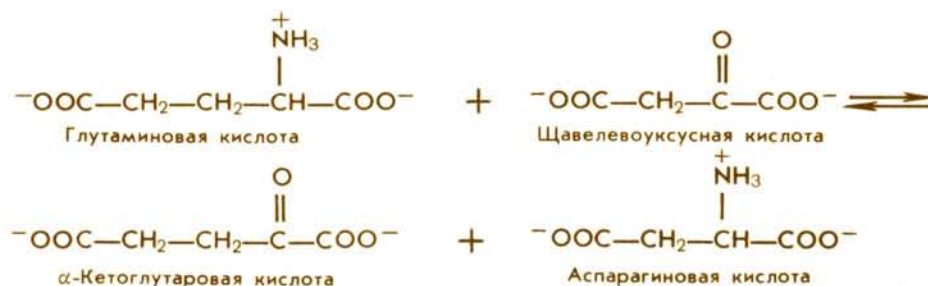
(рис. 102). При сравнительном анализе структур фермента и его комплекса с Gly—Тур была получена важная информация о строении фермент-субстратного комплекса (рис. 103). В частности, установлено, что при образовании комплекса гидроксильная группа Тур-248 перемещается на 1,2 нм по отношению к своему положению в свободном ферменте (т. е. примерно на $1/3$ диаметра молекулы).

Схема каталитического процесса, осуществляемого карбоксипептидазой А, предложена У. Липскомбом на основании данных рентгеноструктурных исследований. Согласно этой схеме (рис. 104), карбоксилатная группа Glu-270 активирует молекулу воды, находящуюся в сфере реакции, оттягивая от нее протон; образующийся ион OH^- осуществляет нуклеофильную атаку на карбонильный углерод расщепляемой связи. Одновременно гидроксильная группа Тур-248, находящаяся около атома азота расщепляемой пептидной связи, отдает ему протон. В результате атакуемая пептидная связь

Рис. 104. Схема каталитического процесса, осуществляемого карбоксипептидазой А.

расщепляется и образующиеся продукты уходят из зоны активного центра. Приведенная схема иллюстрирует общий основной катализ.

Аспартатаминотрансфераза. Аспартатаминотрансфераза (КФ 2.6.1.1) (ААТ) катализирует обратимую реакцию трансминирования:



Ферментативная реакция трансминирования была открыта А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман в 1937 г. при изучении ферментного препарата из мышцы голубя. В последующих исследованиях было показано, что реакции трансминирования широко распространены в живой природе и играют важную роль в сопряжении азотистого и энергетического обмена.

В 1945 г. было установлено, что пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ) является коферментом аминотрансфераз. Молекула ААТ является димером, образованным идентичными субъединицами. В сердечной мышце исследованных позвоночных имеются два изофермента — цитоплазматическая (цААТ) и митохондриальная (мААТ) аминотрансферазы.

Первичная структура цитоплазматической аминотрансферазы из сердечной мышцы свиньи была установлена в 1972 г. Ю. А. Овчинниковым, А. Е. Браунштейном и сотр. Полипептидная цепь белка

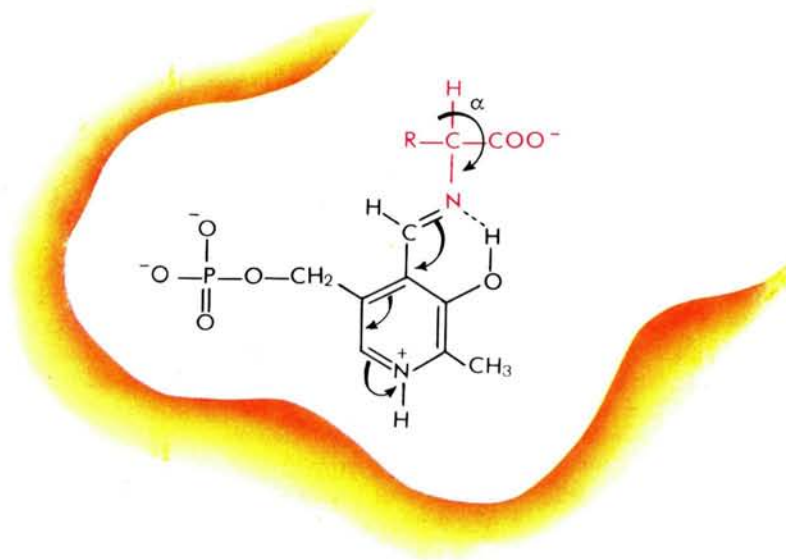


Рис. 105. Смещение электронов к атому азота кофермента по теории А. Е. Браунштейна и М. М. Шемякина.

содержит 412 аминокислотных остатков; молекулярная масса равна 46 000.

Общая теория пиридоксалевого катализа была разработана А. Е. Браунштейном и М. М. Шемякиным в 1952 — 1953 гг., а несколько позднее — Д. Е. Мецлером и Е. Е. Снеллом. Согласно этой теории, каталитическое действие пиридоксальных ферментов

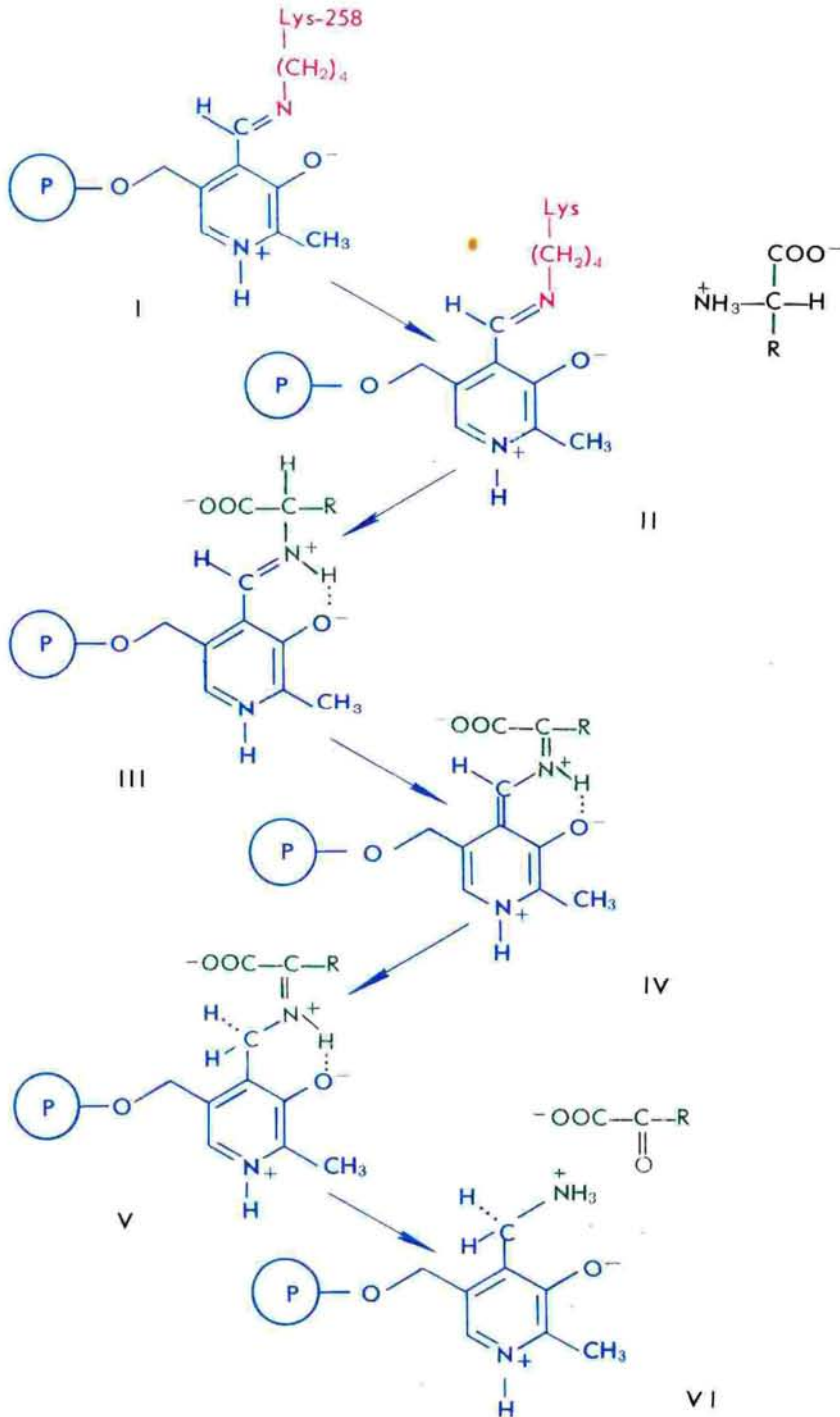


Рис. 106. Стадии ферментативного транс-аминирования.



Браунштейн Александр Евсеевич (1902—1986), советский биохимик, академик АН СССР (1964) и АМН СССР (1945). Окончил Харьковский медицинский институт (1925). Основные труды посвящены химии ферментов и обмену аминокислот. Открыл реакцию переаминирования и обосновал ее роль в азотистом обмене. Предложил (1952, совместно с М. М. Шемякиным) общую теорию действия пиридоксальных ферментов. Лауреат Ленинской (1980) и Государственной (1941) премий СССР. Герой Социалистического Труда (1972).

обусловлено способностью альдегидной группы пиридоксальфосфата образовывать при взаимодействии с аминами, в том числе с аминокислотами, альдимины (шиффовы основания) (рис. 105). В образующейся фосфопиридоксиленаминокислоте имеется система сопряженных двойных связей, по которой происходит смещение электронов от α -углеродного атома аминокислоты к электрофильному атому азота пиридинового кольца кофермента. Понижение электронной плотности у α -углеродного атома облегчает разрыв связей, образованных этим атомом.

Современные представления о механизме ферментативного трансаминирования, разработанные А. Е. Браунштейном и его сотрудниками, являются развитием рассмотренной выше теории (рис. 106). В исходном состоянии альдегидная группа пиридоксальфосфата образует альдиминную связь с ϵ -аминогруппой остатка Lys-258 активного центра (I). При связывании аминокислоты образуется комплекс Михаэлиса (II), а затем альдимин между пиридоксальфосфатом и субстратом (III). В результате последующих

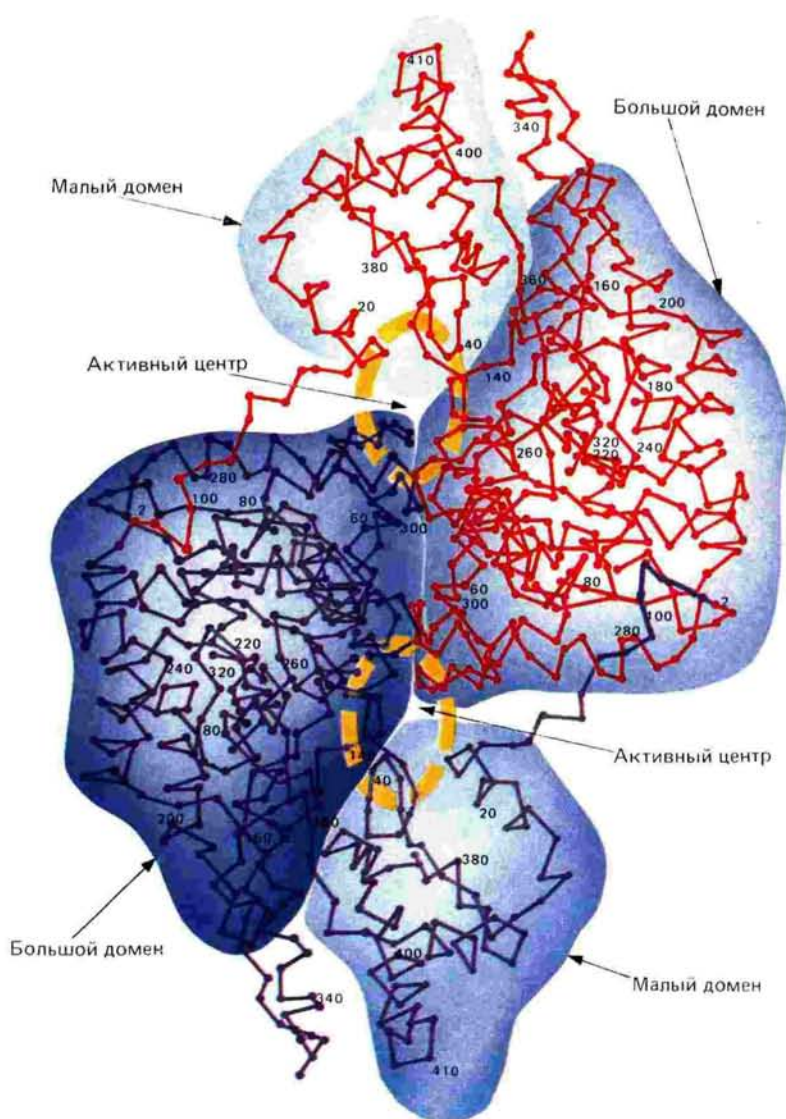


Рис. 107. Пространственное строение аспаратаминотрансферазы.

превращений через промежуточные стадии (IV) и (V) образуется оксокислота (VI). Этим заканчивается первая полуреакция трансаминирования. Повторение тех же стадий в «обратном направлении» с новой оксокислотой составляет вторую полуреакцию, завершающую каталитический цикл трансаминирования.

В результате рентгеноструктурного исследования кристаллов цААТ (из сердечной мышцы кур) установлена пространственная структура фермента с разрешением 0,28 нм (А. Е. Браунштейн, Б. К. Вайнштейн и сотр.). Определен участок связывания пиридоксальфосфата: он расположен в широком углублении на поверхности белка вблизи участка контакта субъединиц (рис. 107).

Миоглобин и гемоглобин. Эти два белка часто называют дыхательными ферментами. Взаимодействие их с субстратом — кислородом выяснено детально, прежде всего на основе рентгеноструктурного анализа высокого разрешения. Трехмерная структура миоглобина была определена Дж. Кендрию в 1961 г., а трехмерная структура гемоглобина — М. Перутцем в 1960 г. Молекула миоглобина име-

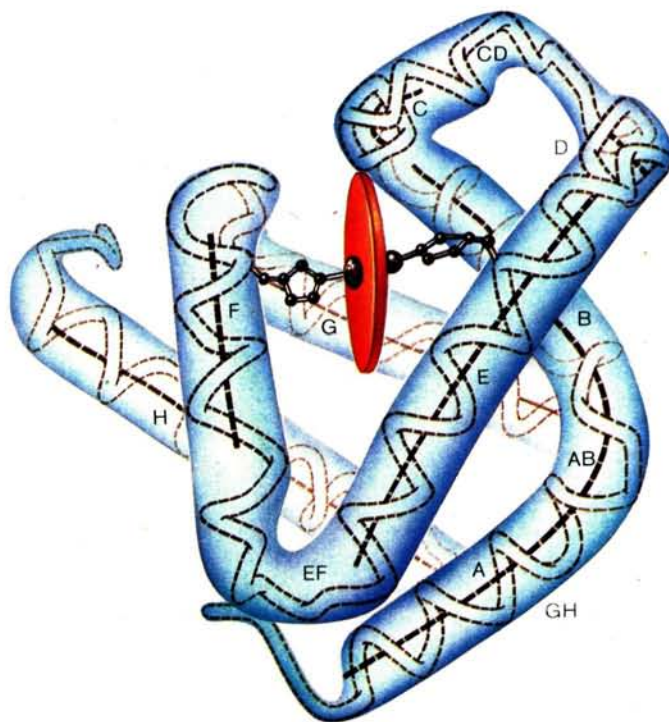


Рис. 108. Модель структуры миоглобина.

ет компактную форму — $4,5 \times 3,5 \times 2,5$ нм (рис. 108), полипептидная цепь образует 8 спирализованных участков, обозначаемых буквами от А до Н. Она специфическим образом уложена вокруг большого плоского железосодержащего кольца гема. Гем — это комплекс порфирина с двухвалентным железом.

Структура протопорфирина IX, входящего в состав гема миоглобина и гемоглобина, представлена на рисунке 109. Полярные цепи пропионовой кислоты гема находятся на поверхности молекулы,

остальная часть гема погружена в глобулу. Связь гема с белком осуществляется за счет координационной связи между атомом железа и атомом азота гистидина, локализованного в спирали F; это так называемый проксимальный гистидин (рис. 110). В гемовом кармане в составе спирали E локализован другой важный остаток гистидина — дистальный гистидин; он находится с противоположной стороны от атома железа на большем расстоянии, чем проксимальный гистидин. Область между железом гема и дистальным гистидином в дезоксимиоглобине свободна, и липофильная молекула O_2 может связываться с железом, занимая шестое координационное положение. Уникальной особенностью миоглобина, а также гемоглобина является их способность обратимо связывать O_2 без окисления гемового Fe^{2+} в Fe^{3+} . Это оказывается возможным, поскольку в гидрофобном гемовом кармане, из которого вытеснена вода, создается среда с низкой диэлектрической проницаемостью.

Рис. 109. Структура протопорфина IX.

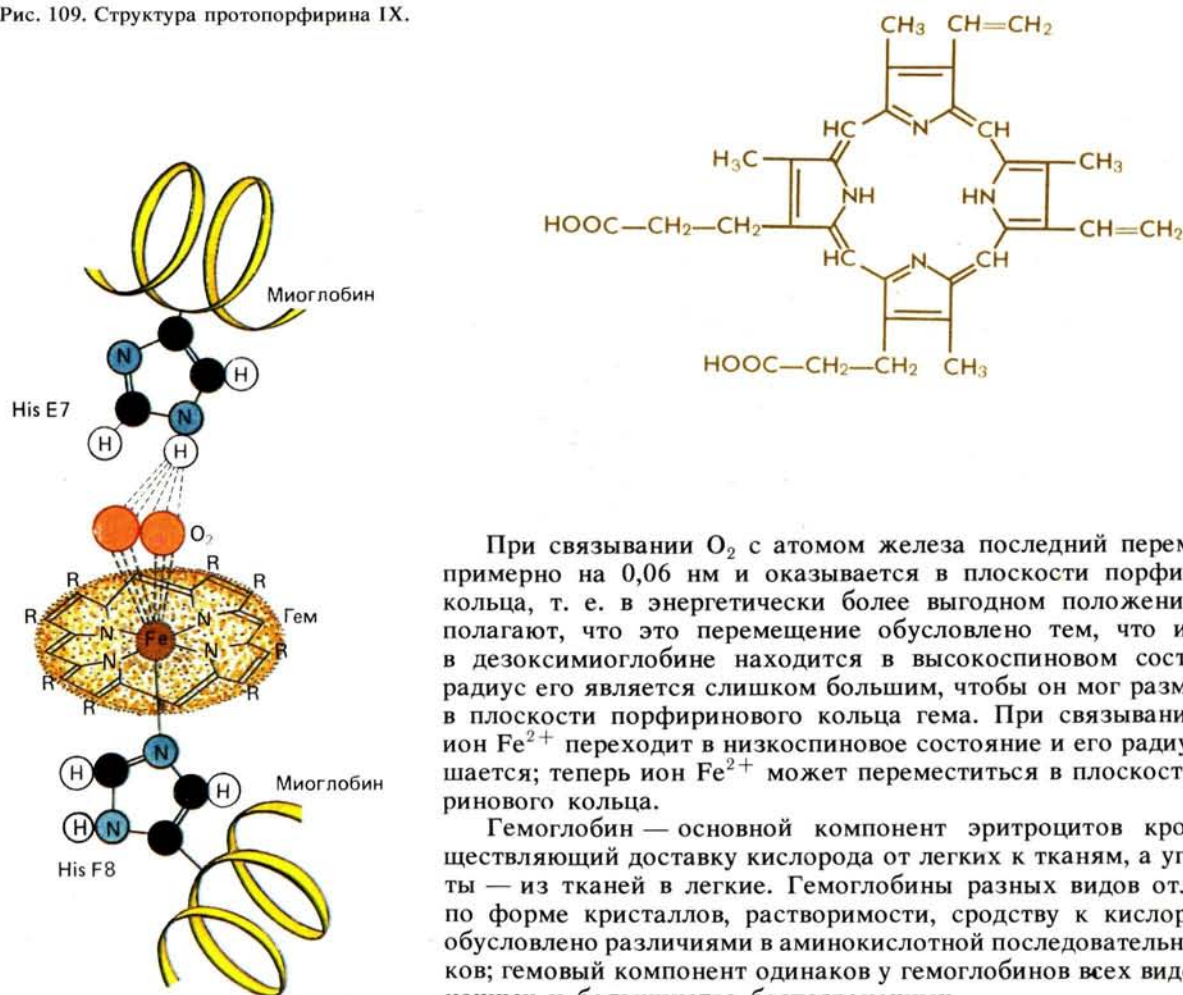


Рис. 110. Зона участка связывания кислорода в миоглобине. Показаны гем, проксимальный гистидин (F8) и дистальный гистидин (E7).

При связывании O_2 с атомом железа последний перемещается примерно на 0,06 нм и оказывается в плоскости порфиринового кольца, т. е. в энергетически более выгодном положении. Предполагают, что это перемещение обусловлено тем, что ион Fe^{2+} в дезоксимиоглобине находится в высокоспиновом состоянии и радиус его является слишком большим, чтобы он мог разместиться в плоскости порфиринового кольца гема. При связывании же O_2 ион Fe^{2+} переходит в низкоспиновое состояние и его радиус уменьшается; теперь ион Fe^{2+} может переместиться в плоскость порфиринового кольца.

Гемоглобин — основной компонент эритроцитов крови, осуществляющий доставку кислорода от легких к тканям, а углекислоты — из тканей в легкие. Гемоглобины разных видов отличаются по форме кристаллов, растворимости, сродству к кислороду. Это обусловлено различиями в аминокислотной последовательности белков; гемовый компонент одинаков у гемоглобинов всех видов позвоночных и большинства беспозвоночных.

Гемоглобин человека представляет собой тетрамер, состоящий из четырех субъединиц: двух α -субъединиц и двух β -субъединиц, содержащих по 141 и 146 аминокислотных остатков соответственно. Между первичными структурами α - и β -субъединиц существует зна-

Защитные белки

Защитные белки — название в известной мере условное. В эту группу включены некоторые наиболее изученные белковые вещества, участвующие в проявлении защитных реакций организма. Основу их составляют белки иммунной системы (иммуноглобулины, антигены тканевой совместимости, интерлейкины, интерфероны и т. п.). В этом же разделе рассматриваются и белки системы свертывания крови.

Белки иммунной системы

Одним из условий существования живых организмов является наличие механизмов, позволяющих противостоять широкому кругу неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе биологического происхождения. К таким факторам следует отнести прежде всего бактерии, вирусы и простейшие, являющиеся возбудителями инфекционных болезней. В процессе жизнедеятельности существует также опасность возникновения и накопления нежелательных соматических мутаций (злокачественное перерождение и т. п.), что может приводить к гибели организма. Несмотря на существенные различия в происхождении этих факторов у них есть одна общая особенность — они генетически чужды организму. Именно эта особенность чужеродных факторов обусловила появление универсального, эволюционно сформировавшегося механизма защиты — иммунитета.

В этой связи следует упомянуть также о проблеме вакцин, т. е. об искусственном внесении чужеродных клеток или веществ (как правило, белковой или углеводной природы) с целью стимуляции защиты против организмов, построенных из аналогичных клеток или веществ. При этом в последние годы появились методы создания чисто искусственных вакцин, получаемых химическим синтезом.

Итак, *иммунитет* — это врожденная, наследуемая способность организма распознавать и обезвреживать чужеродный материал, поступивший извне или образовавшийся в результате патологического процесса.

Иммунная система человека и животных (позвоночных) высокоспециализирована и достаточно сложна. По своей значимости она сравнима с нервной системой. Основными органами иммунной системы человека являются костный мозг, лимфатические узлы, селезенка и тимус (зобная железа), которые связаны в функционально единое целое системами лимфо- и кровообращения. Общий вес клеток иммунной системы человека — около 1 кг (рис. 112).

Исторический очерк. Иммунология возникла как наука о невосприимчивости высших организмов к инфекционным заболеваниям. Почти за 100 лет до ее рождения английский врач Э. Дженнер подметил, что люди, заражавшиеся «коровьей» оспой, невосприимчивы к оспе «человеческой». В 1788 г. им была опубликована работа, доказавшая, что искусственная прививка «коровьей» оспы надежно предохраняет от заболевания «черной заразой». Предложенный Э. Дженнером метод вакцинации против оспы уже в XVIII в. был принят повсеместно. Однако эра современной иммунологии началась с работ Л. Пастера, доказавшего, что инфекционные болезни

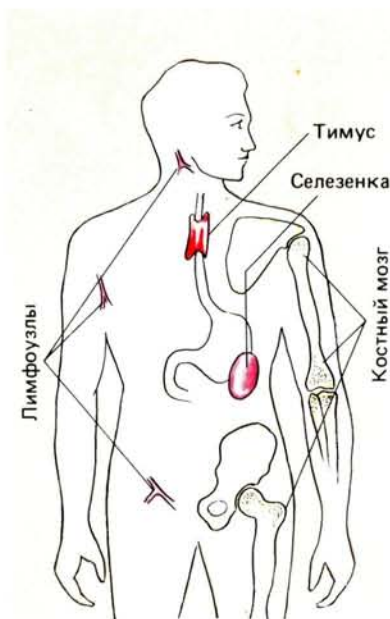


Рис. 112. Основные органы иммунной системы.

вызываются микроорганизмами. В 1881 г. им был предложен общий принцип иммунной защиты — предохранительные прививки путем заблаговременного введения ослабленных возбудителей. Вакцинация ослабленными или убитыми возбудителями для профилактики опаснейших заболеваний (полиомиелита, дифтерита, кори и т. д.) сохранила свое первоначальное значение до настоящего времени. В последние годы все большие усилия направляются на создание искусственных вакцин, получаемых генно-инженерным путем или химическим синтезом и моделирующих биополимеры поверхностной оболочки возбудителя. Их преимущество заключается в полной безопасности для вакцинируемого, а также зачастую в большей доступности. Работы в этом направлении, начатые израильским ученым М. Села, ведутся во всем мире. В СССР исследования, направленные на создание синтетических вакцин, успешно развиваются в лабораториях Р. В. Петрова и В. Т. Иванова.

Творцом клеточной теории иммунитета является И. И. Мечников, который в 1884 г. опубликовал работу о свойствах фагоцитов и роли этих клеток в невосприимчивости организмов к бактериальным инфекциям. Практически одновременно возникла так называемая гуморальная теория иммунитета, независимо развивавшаяся группой европейских ученых. Сторонники этой теории объясняли невосприимчивость тем, что бактерии вызывают образование в крови и других жидкостях организма специальных веществ, приводящих к гибели бактерий при их повторном попадании в организм. В 1901 г. П. Эрлих, проанализировав и обобщив данные, накопленные «гуморальным» направлением, создает теорию образования антител. Многие годы ожесточенной полемики И. И. Мечникова с группой крупнейших микробиологов того времени привели к всесторонней проверке обеих теорий и их полному подтверждению. В 1908 г. Нобелевская премия по медицине присуждается И. И. Мечникову и П. Эрлиху как создателям общей теории иммунитета.

Работами П. Медавара, начатыми в конце второй мировой войны, было доказано, что отторжение гетеротрансплантата при пересадке тканей и органов относится к функциям иммунитета, в результате чего сложилось более широкое понимание роли иммунной системы. В 1950 г. Ф. Бернет формулирует главную функцию иммунитета как распознавание «своего» и «чужого», причем чужими считаются все клетки и молекулы, генетически не идентичные данному организму.

Один из центральных вопросов иммунологии — каким образом организм включает биосинтез антител определенной специфичности, комплементарных введенному антигену, — был решен Ф. Бернетом, разработавшим так называемую теорию клональной селекции. Согласно этой теории, существует множество клонов лимфоцитов, каждый из которых несет на своей поверхности рецептор уникальной специфичности. Попадающий в организм антиген связывается с комплементарным ему рецептором, в результате чего клеточный клон размножается и начинает секретировать антитела той специфичности, которую имел рецептор.

Клетки иммунной системы. Главными клетками иммунной системы являются лимфоциты, число которых в организме человека превышает 10^{12} .

Существует два различных вида лимфоцитов, соответствующих двум основным видам иммунного ответа: Т-лимфоциты, развивающиеся в тимусе и отвечающие за клеточный иммунитет, и В-лимфоциты, развитие которых не зависит от тимуса и которые отвечают за гуморальный (опосредуемый антителами) иммунитет.

Лимфоциты развиваются из стволовых клеток, дающих также начало всем остальным клеткам крови. Стволовые клетки локализованы у взрослых животных в костном мозге, а их последующая



Пастер (Pasteur) Луи (1822—1895), французский микробиолог и химик, почетный член Петербургской АН (1893). Окончил Высшую нормальную школу в Париже (1847); с 1849 г. — профессор Страсбургского, Лилльского, затем Парижского университетов. С 1888 г. — первый директор созданного им Научно-исследовательского микробиологического института. Исследовал этиологию ряда инфекционных заболеваний и методы вакцинации. Выделил возбудителей сибирской язвы, краснухи, бешенства. Осуществил первую антирабическую прививку человеку (1885). Разработал способ обеззараживания пищевых продуктов нагреванием (пастеризация). Показал, что брожение и гниение — процессы, протекающие под влиянием ферментов микроорганизмов (1857).



Мечников Илья Ильич (1845—1916), русский биолог и патолог, почетный член Петербургской АН (1902). Окончил Харьковский университет (1864); работал в Новороссийском университете в Одессе и Петербургском университете, с 1888 г. — в Пастеровском институте в Париже. Провел основополагающие исследования в области микробиологии, иммунологии, эволюционной эмбриологии. Открыл явление фагоцитоза и разработал фагоцитарную теорию иммунитета. Автор классических работ по изучению брюшного тифа, туберкулеза, сифилиса. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1908, совместно с П. Эрлихом).



Бернет [Burnet] Фрэнк Макфарлейн (1899—1986), австралийский иммунолог и вирусолог. Окончил Мельбурнский университет (1923); с 1944 г. — директор Института медицинских исследований, а также профессор университета в Мельбурне. Основные работы — по изучению проблем иммунитета. Один из создателей клонально-селекционной теории иммунитета. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с П. Медваром).

дифференцировка приводит к образованию В- и Т-клеток. Место дифференцировки В-лимфоцитов у млекопитающих не установлено; у птиц таким органом является сумка Фабрициуса (*Bursa Fabricius*), откуда и произошло название всей популяции. Образование Т-клеток из стволовых клеток происходит в тимусе. Затем В- и Т-лимфоциты мигрируют по лимфатическим сосудам в периферические органы иммунной системы — лимфатические узлы, селезенку и т. п., где они проходят заключительные стадии дифференцировки.

Окончательная дифференцировка лимфоидных клеток осуществляется под действием антигенов. *Антиген* — это любая молекула или система молекул (например, клетка), способная индуцировать иммунный ответ. В частности, под воздействием антигена В-клетка превращается в плазматическую клетку, являющуюся фабрикой по производству антител: плазматическая клетка секретирует антитела со скоростью около 2000 молекул в секунду. Плазматическая клетка не способна к дальнейшей дифференцировке и пролиферации и погибает через несколько дней. Продуцируемые ею антитела способны специфически реагировать с отдельными участками структуры антигена, так называемыми антигенными детерминантами или эпитопами, которых, как правило, у антигена множество.

Существуют три функционально различные популяции Т-клеток, образующиеся в результате антиген-независимой дифференцировки предшественников Т-лимфоцитов: а) цитотоксические Т-клетки (*Т-киллеры*), осуществляющие разрушение чужеродных или инфицированных вирусом собственных клеток организма; б) помогающие или индуцирующие Т-клетки (*Т-хелперы*), которые «помогают» специфическим Т- и В-клеткам отвечать на антиген, а также активируют макрофаги; в) подавляющие Т-клетки (*Т-супрессоры*), которые ингибируют ответ специфических Т- и В-лимфоцитов.

Развитие иммунной реакции организма на введение чужеродного антигена включает целый ряд этапов и межклеточных взаимодействий. Первоначальный контакт с антигеном, запускающий иммунный процесс, осуществляют макрофаги; при этом антиген попадает внутрь макрофага и претерпевает процессинг — расщепление гидролитическими ферментами с вычленением сравнительно небольших фрагментов, несущих отдельные антигенные детерминанты. Заключительным этапом процессинга является экспрессия (обратный транспорт) фрагментов на поверхность макрофага, где они оказываются в комплексе с собственными антигенами гистосовместимости II класса (в случае мышей так называемыми Ia-белками, см. с. 220); только в таком, а не в нативном виде антиген может продолжать цепь иммунных реакций, а именно активировать Т-хелперы. В свою очередь, Т-хелперы осуществляют развитие заключительных стадий процесса, способствуя образованию эффекторных клеток — Т-киллеров и плазматических клеток — из соответствующих клеток-предшественников. На всех этапах, требующих межклеточных взаимодействий, важную роль играют растворимые медиаторы иммунного ответа — лимфокины (белки лимфоцитарного происхождения) и монокины (белки, синтезируемые макрофагами): эти гормоноподобные белки, вырабатываемые различными популяциями клеток — участников иммунного ответа, вызывают последовательный рост клона и дифференцировку активированных антигеном лимфоцитов. С их помощью достигается амплификация (усиление) иммунного ответа, они же участвуют в последующей супрессии (остановке) иммунной реакции; последний процесс опосредуется Т-лимфоцитами-супрессорами. Известны и цитотоксические лимфокины — лимфотоксин и фактор некроза опухолей, осуществляющие эффекторную функцию — лизис трансформированных клеток. Эффекторной системой, работающей на заключи-

тельном этапе иммунного ответа, является система комплемента, участвующая в деградации связанного с антителами антигена.

Таким образом, иммунная система представляет собой сложнейшую клеточную систему, в которой оперирует разветвленная сеть регуляторных механизмов, причем регуляция осуществляется как путем прямых межклеточных контактов, так и взаимодействий клетка — регуляторная молекула. Важную роль в развитии представлений об иммунорегуляции сыграли работы Н. Йерне.

Наличие у большинства антигенов множества эпитопов (антигенных детерминант) приводит к активации большого числа клонов В-лимфоцитов, имеющих рецепторы соответствующей специфичности. В результате образующиеся плазматические клетки секретируют сложный набор антител, реагирующих с разными участками поверхности антигена, т. е. наблюдается поликлональный ответ. Получить обычной иммунизацией антитела к заданной детерминанте очень сложно.

В настоящее время эту задачу удастся решить с помощью так называемой гибридомной технологии, разработанной в середине 70-х годов Дж. Кёлером и Ц. Мильштейном. Гибридная технология основана на слиянии соматических клеток и заключается в гибридизации иммунных В-лимфоцитов с опухолевыми клетками (рис. 113).

Клетки лимфоузла (чаще всего селезенки), иммунизированного определенным антигеном животного, сливаются в присутствии полиэтиленгликоля с миеломными клетками. Такая гибридизация приводит к образованию клеток, унаследовавших от одной из родительских клеток (плазматической клетки) способность секретировать антитела, а от другой (миеломной) — способность к бесконечному делению. Ключевым моментом является отбор гибридных клеток, отделение от родительских клеток. Одна из популяций таких клеток — плазматиты — отмирает без каких-либо дополнительных воздействий в процессе культивирования клеток после слияния (как уже говорилось выше, плазматиты — короткоживущая клеточная популяция). Для того чтобы избавиться от родительских опухолевых клеток, используются мутантные миеломные клетки, дефицитные по двум ферментам — гипоксантин-фосфорибозилтрансферазе (ГФТ) и тимидинкиназе (ТК), — ответственным за запасной путь биосинтеза нуклеиновых кислот (использующий гипоксантин/гуанин и тимидин). Если блокировать и основной путь биосинтеза пуринов и пиримидинов с помощью аминоптерина, то такие мутанты оказываются нежизнеспособными и погибают. Гибридные же клетки, имеющие от второй родительской клетки гены ГФТ и ТК, способны к размножению в присутствии аминоптерина; таким образом, культивируя клетки после слияния на селективной среде (содержащей аминоптерин), удается добиться избирательного роста популяции гибридных клеток. Рассеивая гибридные клетки по лункам иммунологического планшета, добиваются того, чтобы в лунке оказался лишь один клеточный клон, отбираются клоны, секретирующие антитела нужной специфичности (для чего проверяется наличие соответствующих антител в культуральной среде), а затем наращиваются гибридные клетки в больших количествах *in vitro* или *in vivo* в виде *асцитов* у животных. Такая технология позволяет нарабатывать значительные количества так называемых моноклональных (продуктов одного клона) гомогенных антител. В большинстве случаев моноклональные антитела получают на мышах, реже на крысах. Получение человеческих моноклональных антител встречает серьезные методические затруднения, прежде всего из-за малодоступности иммунных лимфоцитов человека.

Структура и функция антител. Антитела — класс белков, продуцируемых В-лимфоцитами и осуществляющих первый этап в

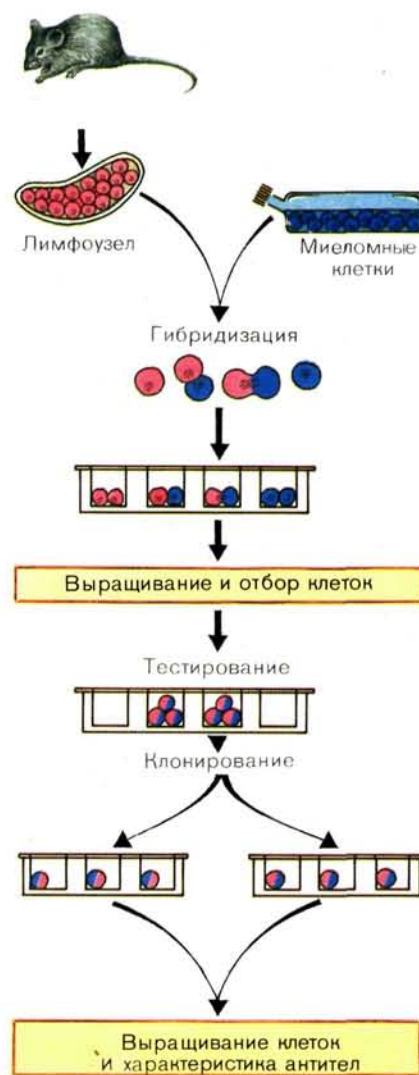
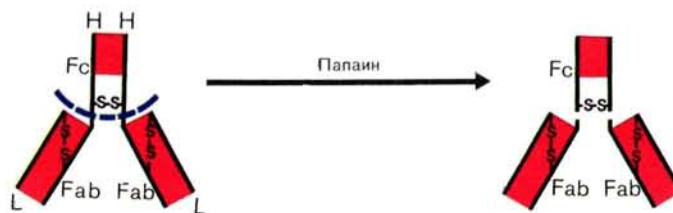


Рис. 113. Гибридная технология.

цепи превращений антигена — его связывание. Уникальным свойством антител является то, что они существуют в виде миллионов различных видов, каждый из которых имеет свой специфический участок связывания антигена. Обобщенно обозначаемые как иммуноглобулины (сокращенно Ig), антитела представляют один из основных классов белков крови, составляя около 20% от общего веса белков плазмы (общее число молекул антител в организме человека равно 10^{20}).

Молекула антитела состоит из четырех полипептидных цепей: двух легких (L) цепей и двух тяжелых (H) цепей. Четыре цепи удерживаются вместе с помощью нековалентных взаимодействий и S—S-связей. В результате ограниченного протеолиза папаином (Р. Портер, 1959) молекула иммуноглобулина расщепляется примерно в середине H-цепей на два идентичных Fab-фрагмента, каждый с одним антигенсвязывающим центром, и один Fc-фрагмент (рис. 114).

Рис. 114. Расщепление молекулы иммуноглобулина папаином.



Эрлих [Ehrlich] Пауль (1854—1915), немецкий бактериолог и химиотерапевт. Образование получил в университете Бреслау, а также Страсбургском, Фрейбургском и Лейпцигском университетах; с 1899 г. работал в Терапевтическом институте (близ Франкфурта-на-Майне). Основные работы посвящены проблемам иммунитета, разработке методов лечения инфекционных болезней, изучению химии лекарственных веществ. Основатель химиотерапии, впервые получил препараты сальварсан (1907) и неосальварсан (1912). Описал различные формы лейкоцитов крови и показал значение костного мозга в кроветворении. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1908, совместно с И. И. Мечниковым).

Таким образом, молекула антитела имеет Y-образную форму с двумя идентичными антигенсвязывающими центрами — по одному на каждом крыле. Благодаря такой структуре антитела могут «сшивать» молекулы антигенов, имеющие две или несколько антигенных детерминант, в большие частицы — агрегаты (рис. 115), которые после достижения определенных размеров могут выпасть в осадок из раствора.

Успехи, достигнутые в изучении структуры иммуноглобулинов, оказались возможными благодаря установлению того факта, что каждый вид антител продуцируется отдельной популяцией клеток (клоном). Присутствующие в крови нормальных индивидов антитела являются продуктами секреции множества клонов и представляют собой сложнейшую смесь близких по структуре, но не идентичных белков. В связи с этим в качестве материала для исследования в настоящее время используются иммуноглобулины пациентов, страдающих множественной миеломой — заболеванием, при котором трансформированные клетки выделяют в кровь огромные количества иммуноглобулинов (так называемые миеломные белки). Эти «патологические» иммуноглобулины по структуре и биологическим свойствам являются «нормальными» иммуноглобулинами, однако секретируются одним клеточным клоном и поэтому гомогенны.

Исследование первичной структуры миеломных белков было проведено в конце 60-х годов в лабораториях Р. Портера в Оксфорде и Дж. Эдельмана в Нью-Йорке. Характерной чертой строения молекул иммуноглобулинов является так называемая доменная структура. И легкие и тяжелые цепи упакованы в компактные домены, состоящие примерно из 110 аминокислотных остатков и содержащие внутримолекулярные дисульфидные связи (рис. 116). Легкие (каждая содержит около 220 аминокислот) и тяжелые (каж-

дая содержит около 440 аминокислот) цепи антител имеют по две резко различающихся области: переменную (V), локализованную в N-концевой части полипептидной цепи, и следующую за ней константную (C). Цепи иммуноглобулинов данного класса различаются только по аминокислотным последовательностям V-областей и имеют практически идентичные C-области. Такая необычная для белков структура связана со свойствами этих систем. В самом деле, функции антител состоят, с одной стороны, во взаимодействии с антигенами, и в этом отношении они должны быть высокоспецифичными, а с другой стороны, самые разные по специфичности антитела должны обладать рядом общих свойств: связывать комплемент, фиксироваться на мембранах, взаимодействовать с некоторыми клетками и т. п. Поэтому переменность структуры V-областей обуславливает специфические свойства молекулы, тогда как структура константной области молекулы обеспечивает реализацию ряда общих качеств.

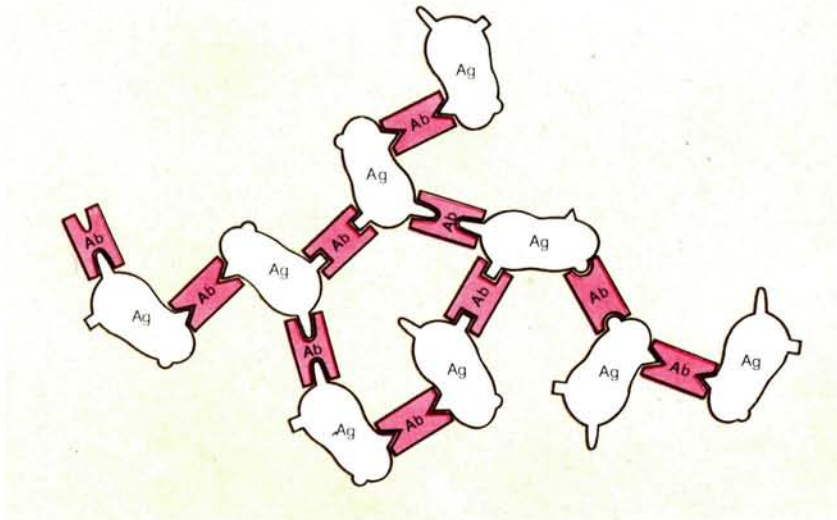


Рис. 115. Образование агрегатов при связывании антителами антигенов. Ag — антиген, Ab — антитело.

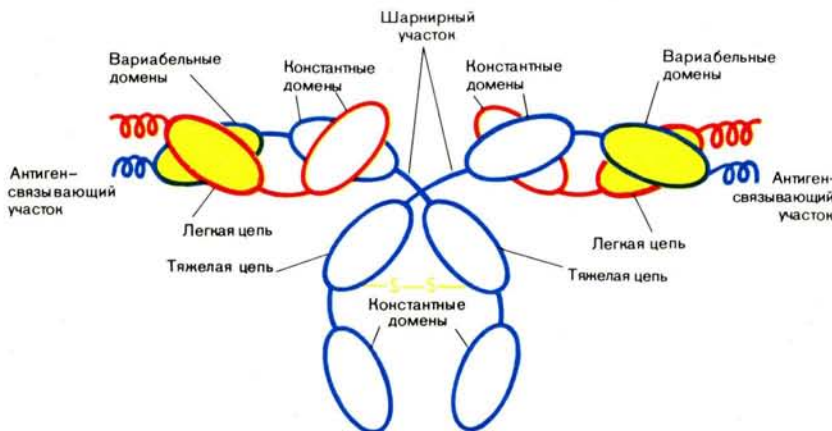


Рис. 116. Доменная структура молекулы иммуноглобулинов.



Йерне (Jerne) Нильс Кай (р. 1911), датский иммунолог. Образование получил в Копенгагенском университете (1951), основатель и руководитель Базельского института иммунологии (1969—1980). Идеи Йерне и его экспериментальные исследования сыграли важную роль в становлении современной молекулярной иммунологии, в частности в формировании представлений об иммунорегуляции. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1984).

Вариабельные участки (V_L) — (V_H) представляют собой единичные домены (рис. 117). Аминокислотные замены, обуславливающие структурные отличия, обычно группируются в нескольких так называемых гипервариабельных участках. В нативной молекуле иммуноглобулина V-области легкой и тяжелой цепи соединены так, что их гипервариабельные участки образуют единый активный центр. В настоящее время установлено, что антигенсвязывающий участок образован 20 — 30 аминокислотными остатками вариабельной части каждой цепи.

C-Область легкой цепи также представлена одним доменом (C_L), тогда как у тяжелых цепей она заметно длиннее и состоит из 3 — 4 линейно расположенных доменов (C_H1 — C_H3), структурно гомологичных C-области легкой цепи. Каждый домен упаковывается в отдельную относительно независимую глобулу, причем основной тип вторичной структуры глобулы — антипараллельная β -складчатая (рис. 118). Между глобулами находятся открытые участки полипептидной цепи, особенно чувствительные к действию протеолитических ферментов. Весьма вероятно, что именно эти участки цепи обеспечивают значительную гибкость всей структуры, позволяющей молекуле антитела приспособиться к конфигурации антигена или взаимодействовать с двумя антигенными детерминантами, расстояние между которыми может варьировать.

У позвоночных существует 5 различных классов антител: IgG (мол. масса 150 000), IgM (950 000), IgA (500 000), IgD (175 000) и IgE (200 000), каждый со своим собственным типом тяжелых цепей — α , β , ϵ , γ и μ соответственно.

Имуноглобулины IgG являются основным классом иммуноглобулинов крови. В отличие от них, IgM-белки представляют собой класс антител, продуцируемых В-клетками первыми в процессе развития иммунного ответа. Непосредственные предшественники В-клеток, так называемые пре-В-клетки, синтезируют только

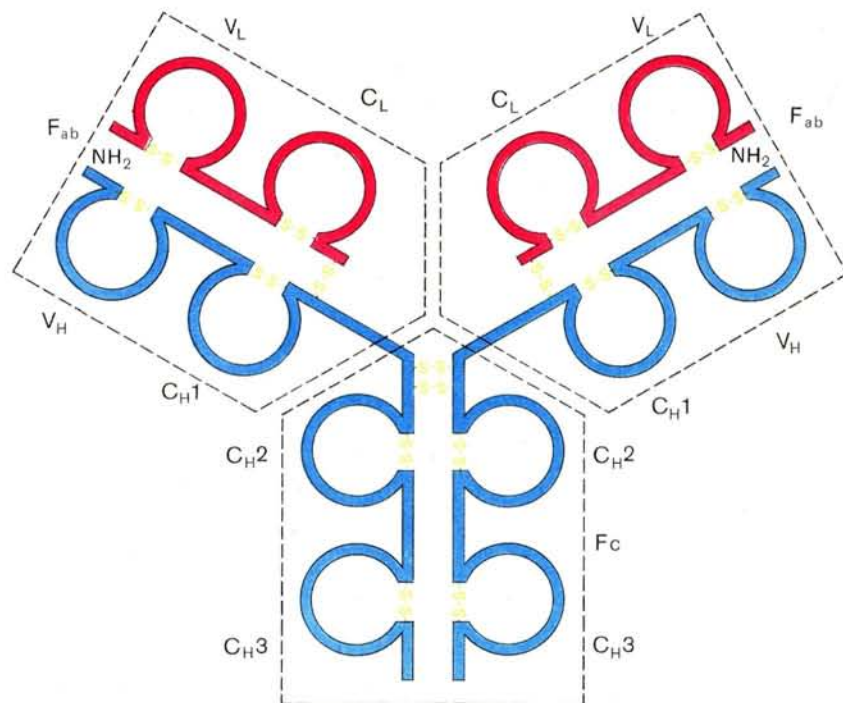
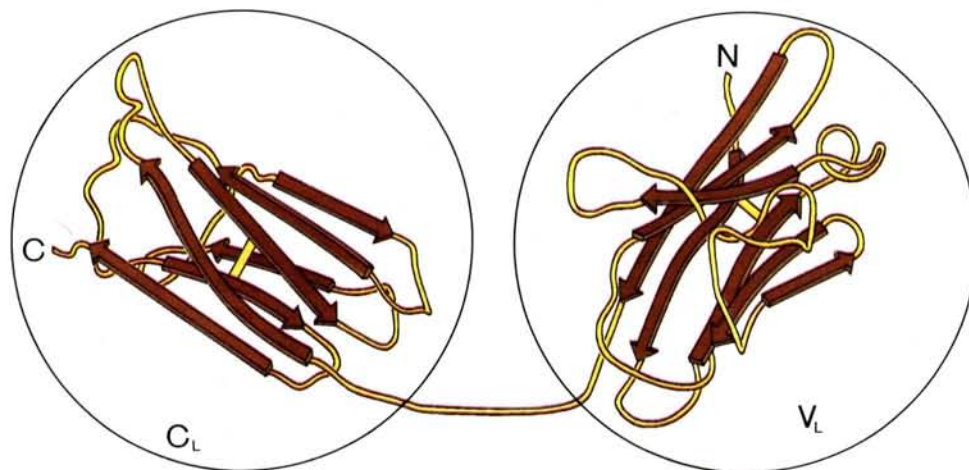


Рис. 117. Строение молекулы иммуноглобулина.

μ -цепи, которые накапливаются внутри клеток. Когда пре-В-клетки начинают синтезировать также и легкие цепи, они соединяются с μ -цепями и образуют молекулы IgM, которые встраиваются в плазматическую мембрану, где выступают в качестве антигенраспознающего рецептора. С этого времени клетки становятся зрелыми В-лимфоцитами и могут отвечать на антигенный стимул. Хотя все классы антител могут существовать в мембрано-связанном виде (в качестве антигенспецифических рецепторов клеточной поверхности) или в форме водорастворимых секретируемых молекул, IgM являются основным классом антител, обнаруженным на поверх-

Рис. 118. Вторичная структура легкой цепи иммуноглобулина.



ности большинства В-клеток. В секретируемой форме IgM-белки представляют собой пентамеры, построенные из 5 мономерных иммуноглобулинов, и имеют 10 антигенсвязывающих центров. Кроме того, каждый пентамер содержит одну копию полипептида, названного J-цепью (20 000), который синтезируется антителообразующей клеткой и ковалентно встраивается между двумя соседними Fc-областями.

Имуноглобулины IgA являются основным классом антител в секретах (молоке, слизи, слезах, секретах дыхательных путей и кишечника). Эти белки существуют либо в виде мономера (как IgG), либо чаще в виде димера, содержащего дополнительно одну J-цепь и еще одну полипептидную цепь, называемую секреторным компонентом (рис. 119). Секреторный компонент синтезируется эпителиальными клетками и первоначально находится на внешней поверхности этих клеток, где он служит в качестве рецептора для связывания IgA из крови. Образующийся комплекс (IgA — секреторный компонент) поглощается клетками путем эндоцитоза, переносится через цитоплазму эпителиальных клеток и выделяется в секреты. Дополнительно к этой транспортной роли секреторный компонент может также предохранять молекулу IgA от деградации протеолитическими ферментами в секретах.

Имуноглобулины IgD и IgE являются минорными компонентами сыворотки крови — их концентрация не превышает 0,3 мг/мл и 0,0001 мг/мл соответственно. Белки типа IgD выполняют функцию

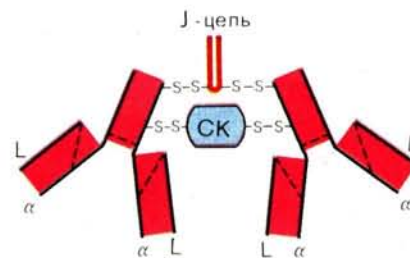


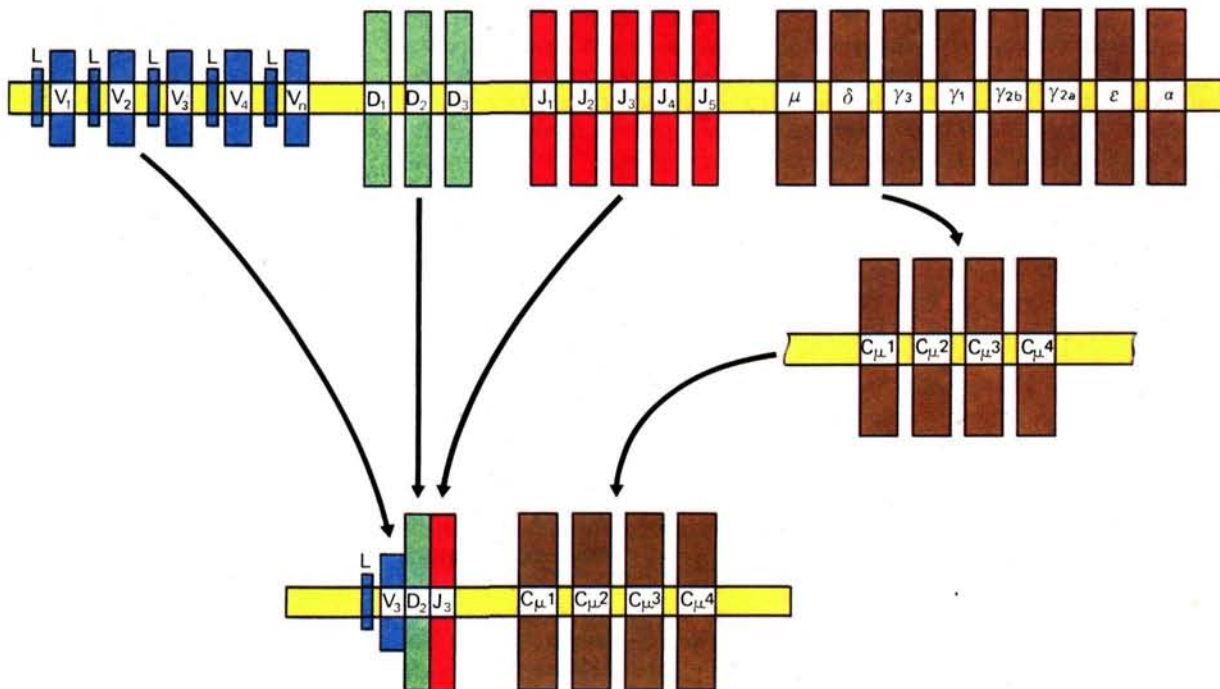
Рис. 119. Схема строения иммуноглобулина А:
СК — секреторный компонент;
L — легкая цепь;
 α — тяжелая цепь IgA.

рецепторов и имеют высокий процент связанных сахаров; их роль окончательно не выяснена. Иммуноглобулины IgE, осуществляющие в норме защиту от паразитарных инфекций, обуславливают многие аллергические реакции. Они связываются с высоким сродством (10^{10}M^{-1}) с поверхностью тучных клеток, и присоединение к ним антигена вызывает дегрануляцию и выброс в кровь биоактивных аминов, прежде всего гистамина и серотонина.

Наряду с пятью классами тяжелых цепей, высшие позвоночные имеют два типа L-цепей, а именно κ (каппа) и λ (лямбда), каждая из которых может быть ассоциирована с любой из H-цепей. Индивидуальная молекула антитела всегда состоит из идентичных L-цепей и идентичных H-цепей, благодаря чему ее антигенсвязывающие центры всегда одинаковы.

Сейчас считается установленным, что организм животного может синтезировать от 10^6 до 10^9 различных молекул антител. Этот набор, по-видимому, достаточен для того, чтобы для любой антигенной детерминанты нашелся соответствующий антигенсвязывающий центр. Поскольку антитела являются белками, а их структура кодируется генами, встает вопрос о том, каким образом такое громадное количество различных антител может кодироваться в геноме. В 1965 г. В. Дрейером и Ж. Беннетом была сформулирована гипотеза, впоследствии блестяще подтвердившаяся, что переменные и константные участки цепей иммуноглобулинов кодируются разными генами. Все гены переменных участков расположены кластером в одной области генома, а гены константных участков — в другой, далеко отстоящей от первой. Выяснилось также, что имеются еще две группы генов J и D (для тяжелых цепей), кодирующие небольшие участки (несколько аминокислот) полипептидной цепи иммуноглобулинов, лежащие между V- и C-областями. В таком виде гены находятся в зародышевой ДНК; в процессе дифференцировки

Рис. 120. Схема сборки структурного гена тяжелой цепи IgM.
L — лидерная последовательность.

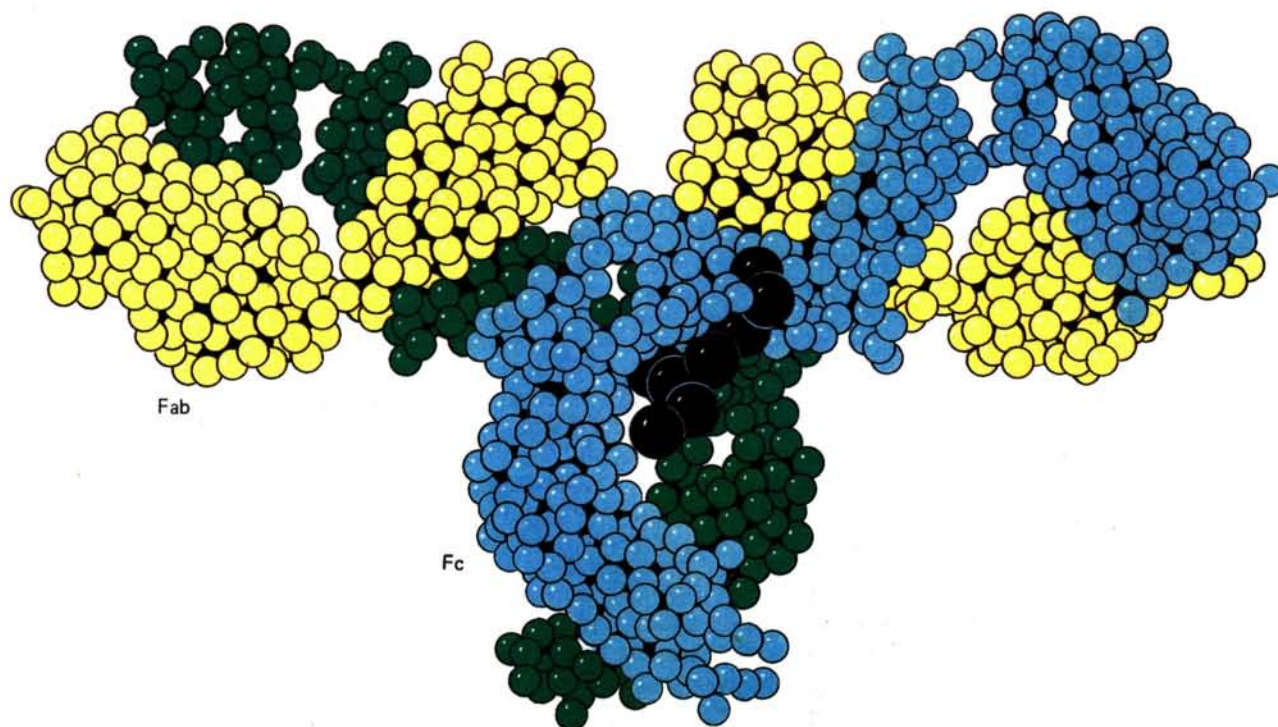


В-лимфоцитов начинается перегруппировка генома. Первоначально, в процессе превращения клетки-предшественника в пре-В-лимфоцит, происходит перемещение определенного V_H -гена к J_H - и D -гену с образованием генного сегмента V_H-D-J_H . Этот сегмент транскрибируется с находящимся теперь по соседству C_H -геном, в результате чего пре-В-лимфоциты синтезируют μ -цепи. В зрелом В-лимфоците может происходить еще одна транспозиция, и V_H-D-J_H присоединяется к какому-либо другому C_H -гену, приводя к экспрессии иммуноглобулина другого класса. В дальнейшем, в процессе транскрипции ДНК, а затем созревания мРНК из гена вырезаются лишние участки, после чего V -, D -, J -, и H -гены оказываются соединенными в непрерывную последовательность, которая и транслируется (рис. 120). Аналогичным образом собирается ген легкой цепи, который кодируется своими V_L - и C_L -генами.

В геноме имеется множество V -генов, некоторое количество J - и D -генов и по одному гену каждого субкласса тяжелых цепей. Как следствие такого не совсем обычного способа кодирования иммуноглобулиновых молекул возникает возможность появления громадного разнообразия антител с различающимся строением и свойствами. Действительно, в результате перестройки генома получают всевозможные комбинации указанных генов, что приводит к созданию молекул, каждая из которых обладает уникальной структурой. Строение (и значит, специфичность) активного центра варьируется в зависимости от строения образующих его V_L - и V_H -областей, а также сочетания их с разными J - и D -участками.

Изучение строения генов константных областей тяжелых цепей иммуноглобулинов показывает, что они состоят из ряда экзонов, каждый из которых кодирует отдельный домен молекулы. Принимая во внимание тот факт, что каждый из V -генов и C_L -генов кодирует один домен, а также структурную гомологию между домена-

Рис. 121. Пространственное строение иммуноглобулина G.





Кёлер (Köhler) Джон (р. 1946), немецкий биохимик. Образование получил во Фрайбурге (ФРГ) и Базеле (Швейцария), с 1985 г.— директор Института иммунологии Общества М. Планка во Фрайбурге. Занимается проблемами экспрессии генов иммуноглобулинов, выполнил основополагающие исследования по получению гибридом для производства моноклональных антител. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1984).



Доссе (Dausset) Жан Батист Габриэль Иохим (р. 1916), французский иммунолог. Окончил Парижский университет (1945), с 1968 г.— профессор этого же университета. Основные труды посвящены иммуногематологии. Впервые описал антиген лейкоцитов (1958) и антигенную систему лейкоцитов (1965). Выявил связь между антигенными свойствами лейкоцитов и тканевой совместимостью. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1980, совместно с Б. Бенасеррафом и Дж. Снеллом).

ми, можно предположить, что все они возникли в процессе эволюции путем серии дупликаций генов, начиная с предкового гена, кодирующего белок размером 110 аминокислот.

На основании рентгеноструктурного анализа выяснено пространственное строение как целой молекулы IgG, так и ее фрагментов (А. Эдмонсон, 1973). Установлено, что все домены иммуноглобулинов имеют очень похожую трехмерную структуру, получившую название *иммуноглобулиновой упаковки* (рис. 121). Каждый домен похож на «сэндвич», образованный двумя слоями белка: один слой содержит три витка полипептидной цепи, а другой — четыре. В каждом слое соседние витки являются антипараллельными и образуют β -структуру (рис. 118). Два слоя располагаются примерно параллельно друг другу и соединяются одной внутрисульфидной S—S-связью.

Структура переменных доменов такова, что гипервариабельные участки L- и H-цепей объединяются вместе и образуют антигенсвязывающий центр. Хотя изменение отдельных остатков в гипервариабельной части и приводит к образованию новых антигенсвязывающих центров, общая структура домена остается неизменной.

Антигены тканевой совместимости

Как уже отмечалось, в основе процессов отторжения пересаженных тканей лежат иммунные реакции. В настоящее время установлено, что причиной отторжения является генетическое несоответствие клеток донора и реципиента. Обнаружены специальные участки генома, контролирующие этот процесс. Общее число их достигает нескольких десятков, но только один из них, называемый главным комплексом гистосовместимости, определяет быстрое отторжение. Продукты главного комплекса гистосовместимости, вызывающие реакцию отторжения и участвующие в иммунологическом узнавании, экспрессированы на поверхности клеток и называются антигенами гистосовместимости. В 1980 г. работа трех ученых, внесших решающий вклад в развитие представлений об антигенных главных комплексах гистосовместимости,— Ж. Доссе (Франция), Дж. Д. Снелл (США) и Б. Бенасерраф (США),— была отмечена Нобелевской премией. Принято различать антигены гистосовместимости I, II и III классов. Наиболее изучены антигены гистосовместимости I класса — основные трансплантационные антигены, по которым Т-киллеры изучают чужеродные клетки. Антигены гистосовместимости I класса есть на всех ядерных клетках организма. Они состоят из двух нековалентно связанных субъединиц: интегрального мембранного гликопротеина с молекулярной массой 45 000 (тяжелой субъединицы), имеющего три надмембранных домена (α_1 — α_3), и β_2 -микроглобулина β_2M — неполиморфного полипептида с молекулярной массой 12 000 (рис. 122). Только тяжелая субъединица кодируется главным комплексом гистосовместимости, в то время как ген β_2 -микроглобулина находится на другой хромосоме (второй у мыши и пятнадцатой у человека). Тяжелая цепь содержит ковалентно связанные олигосахариды и определяет антигенную специфичность молекулы.

Короткий C-концевой район тяжелой цепи ответствен за фиксацию молекулы в мембране и содержит два участка с молекулярной массой примерно по 5000 каждый, сильно различающихся по полярности аминокислот, входящих в их состав. Первый, содержащий

С-концевую аминокислоту, состоит главным образом из полярных аминокислот и экспонирован в цитоплазму клетки. Второй, содержащий большое количество неполярных аминокислот (лейцин, изолейцин, валин), пронизывает гидрофобную область мембраны.

Надмембранная часть молекулы может быть легко переведена в раствор путем ограниченного протеолиза с помощью папаина. Папаиновый фрагмент наиболее детально изучен химически.

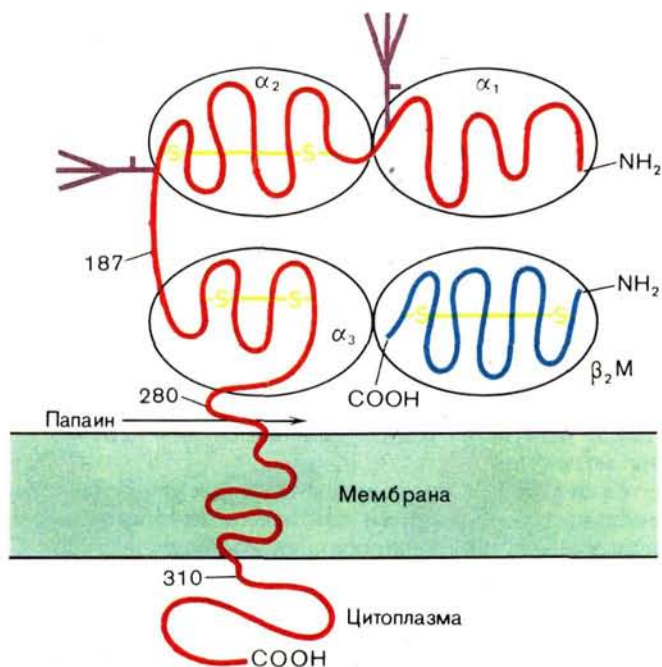


Рис. 122. Структура H—2K,D-антигена.

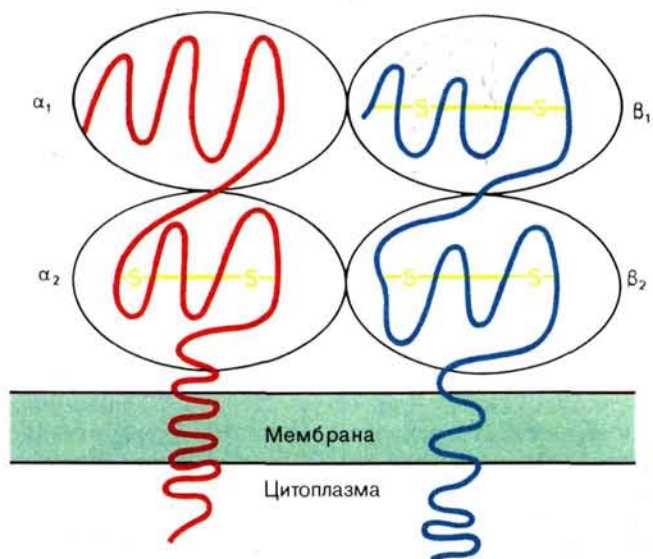


Рис. 123. Структура Ia-антигена.



Эдельман [Edelman] Джералд Морис (р. 1929), американский биохимик. Окончил Пенсильванский университет (1954), в настоящее время — в Рокфеллеровском университете. Основные работы посвящены изучению строения молекул антител. Показал (1959), что молекулы антител состоят из двух типов пептидных цепей (тяжелых и легких). Расшифровал строение молекулы одного из иммуноглобулинов и выдвинул гипотезу о третичной структуре активного центра антител (1962, совместно с Р. Портером). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Р. Портером).

Строение антигенов гистосовместимости I класса было выяснено в 70-х годах работами ученых разных стран, прежде всего лабораторий Дж. Стрёминджера и С. Натансона (США). Для такого рода белков (H — 2K, D, L-антигенов мыши и HLA — A, B, C-антигенов человека) характерна очень высокая степень структурной гомологии (70%); вместе с тем имеются два гипервариабельных участка, локализованных в N-концевом домене. Доказан статистически достоверный уровень гомологии между надмембранными доменами антигенов тканевой совместимости, C_H-доменами иммуноглобулинов и β_2 -микроглобулином; эта гомология может указывать на общее эволюционное происхождение этих белков.

Другим продуктом главного комплекса гистосовместимости являются Ia-белки (антигены II класса), участвующие в регуляции иммунного ответа, т. е. его подавлении или активации. Ia-Белки экспрессируются клетками иммунной системы (лимфоцитами и макрофагами) и неоднородны по своей структуре (в частности Ia-белки различны у Т-хелперов и Т-супрессоров). Молекула Ia-белка состоит из двух полипептидных цепей α и β с молекулярной массой 34 000 и 28 000 соответственно (рис. 123). Обе цепи представляют собой погруженные в мембрану гликопротеины, также имеющие доменную структуру ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$), причем α - и β -субъединицы не имеют структурной гомологии. Кроме того, Ia-белки различных видов животных существенно различаются между собой.

Синтезированные de novo α - и β -цепи антигенов II класса, так же как и тяжелые цепи антигенов I класса, содержат N-концевой гидрофобный сигнальный пептид. Этот пептид инициирует встраивание синтезирующихся молекул в мембраны эндоплазматического ретикулаума, после чего происходит удаление самого пептида и гликозилирование молекулы.

В настоящее время проводится широкое изучение структурно-функциональных особенностей как самих антигенов тканевой совместимости, так и генов и распознающих их рецепторов Т-лимфоцитов.

Система комплемента

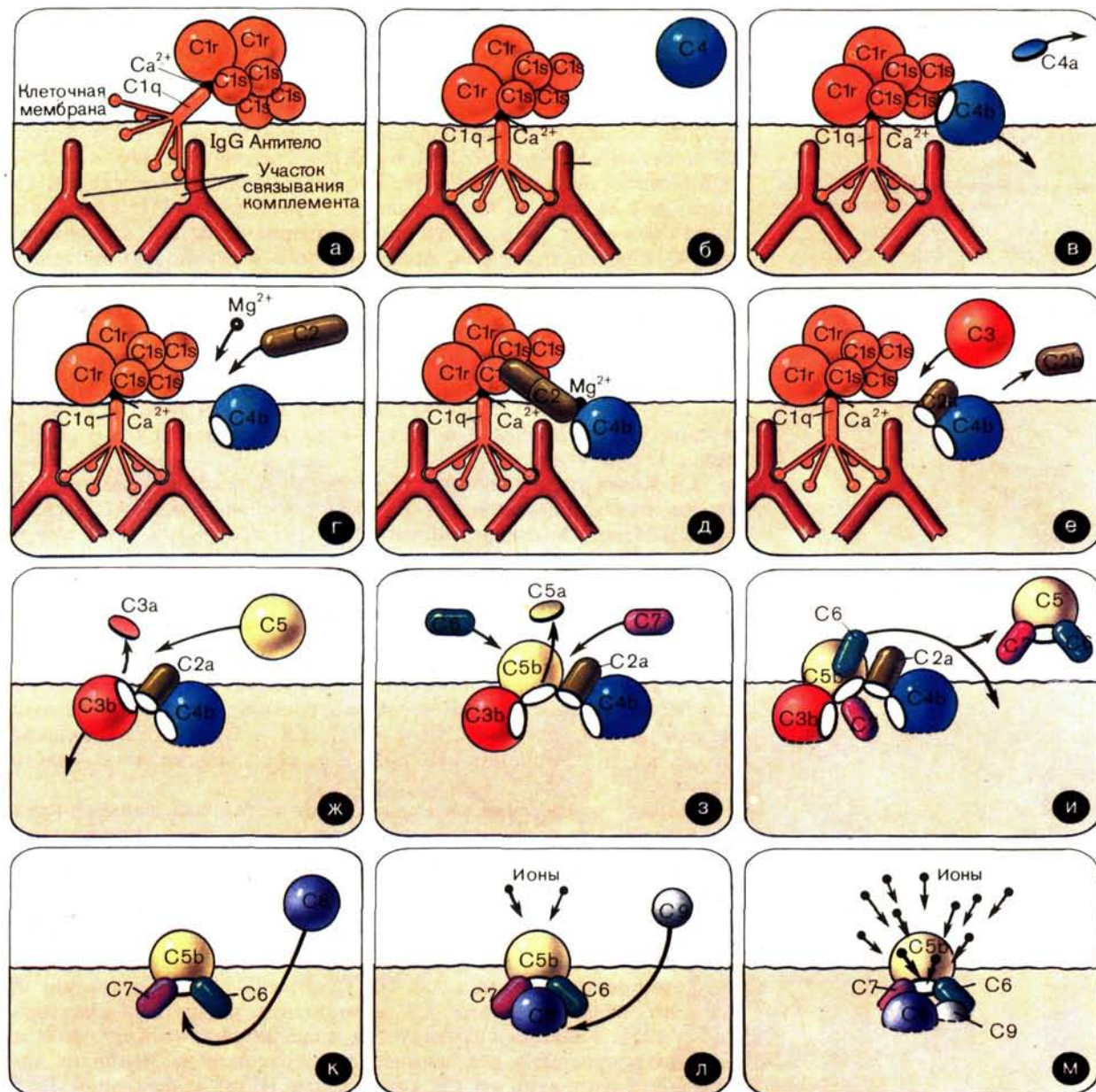
Одним из главных компонентов иммунной системы организма является комплемент. Комплемент был открыт французским ученым Ж. Борде в конце прошлого столетия как результат обнаружения способности нормальной сыворотки крови убивать бактериальные клетки в присутствии соответствующих антител и назван «алексином». Современное название комплементу дал П. Эрлих.

Комплемент представляет собой сложный комплекс белков, состоящий из 20 взаимодействующих компонентов, обозначаемых C1, C2, C3 и т. д. до C9, фактор В, фактор D и ряд регуляторных белков. Все они являются водорастворимыми белками с молекулярными массами от 24 000 до 400 000 (табл. 9), циркулирующими в крови и внеклеточной жидкости. Большинство этих белков являются неактивными вплоть до «запуска» системы в момент образования комплекса антиген — антитело. После активации комплемента его действие носит каскадный характер и представляет собой серию протеолитических реакций. Образно говоря, отношения между антителами и комплементом напоминают собой отношения между ключом зажигания и мотором: взаимодействие антител с антигеном включает мотор.

На рисунке 124 схематически изображена последовательность событий, происходящих на мембране при активации комплемента.

Начальным этапом в цепи процессов активации комплемента является связывание его первого компонента C1 с комплементфиксирующими участками антител (IgG и IgM), образовавшими комплексы антиген — антитело на поверхности клетки (рис. 124, а, б). В состав C1 входят три субъединицы C1q, C1r и C1s, выполняющие различные функции. Связывание компонента C1 происходит посредством белка C1q, который часто называют фактором узнавания. Эта цепь событий характеризует основной, или *классический*, путь активации комплемента. Далее в превращениях участвуют так называемые ранние компоненты комплемента (C4, C2, C3), которые

Рис. 124. Классический путь активации системы комплемента.



Общая характеристика компонентов комплемента человека

Компонент	Молекулярная масса	Число цепей	Константа седиментации
C1	900 000		18 s
C1q	400 000	6×3	11 s
C1r	168 000	2	7 s
C1s	79 000	1	4 s
C4	230 000	3	10 s
C2	117 000	—	6 s
C3	185 000	2	10 s
C5	170 000	2	9 s
C6	125 000	1	6 s
C7	130 000	1	6 s
C8	150 000	3	8 s
C9	79 000	—	4 s

последовательно активируются путем протеолитического расщепления. Поскольку активированный компонент расщепляет несколько молекул следующего компонента, активация ранних компонентов комплемента представляет собой усиливающийся каскад. Связывание с антителом C1q активирует субъединицу C1r в результате отщепления от нее части полипептидной цепи. Активированный C1r расщепляет C1s, превращая его в сериновую протеиназу. Таким образом, срабатывает пусковой механизм системы комплемента. Дальнейшие процессы активации, приводящие к лизису клеток, происходят уже без участия иммуноглобулинов или их комплексов с антигеном. Активированный C1s последовательно расщепляет четвертый и второй компоненты комплемента C4 и C2, которые прикрепляются к находящемуся рядом участку мембраны и образуют активный комплекс — так называемую *C3-конвертазу* (рис. 124, в — е).

C3-Конвертаза активирует третий компонент комплемента (C3) также путем расщепления его на два фрагмента — C3a и C3b (рис. 124, ж). Активированный C3 (C3b) ассоциируется с мембраносвязанной C3-конвертазой, образуя новый ферментный комплекс — *C5-конвертазу*. Последняя активирует пятый компонент комплемента, находящийся в растворе, также путем отщепления полипептидного фрагмента от неактивного C5 (рис. 124, з).

Далее активированный пятый компонент комплемента (C5b) прикрепляется к мембране, и на нем собирается большой мембраноатакующий, литический комплекс, состоящий из поздних компонентов комплемента — C5b, C6, C7, C8 и C9 и осуществляющий лизис клеток мишени; все превращения происходят с участием ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} (рис. 124, и — м).

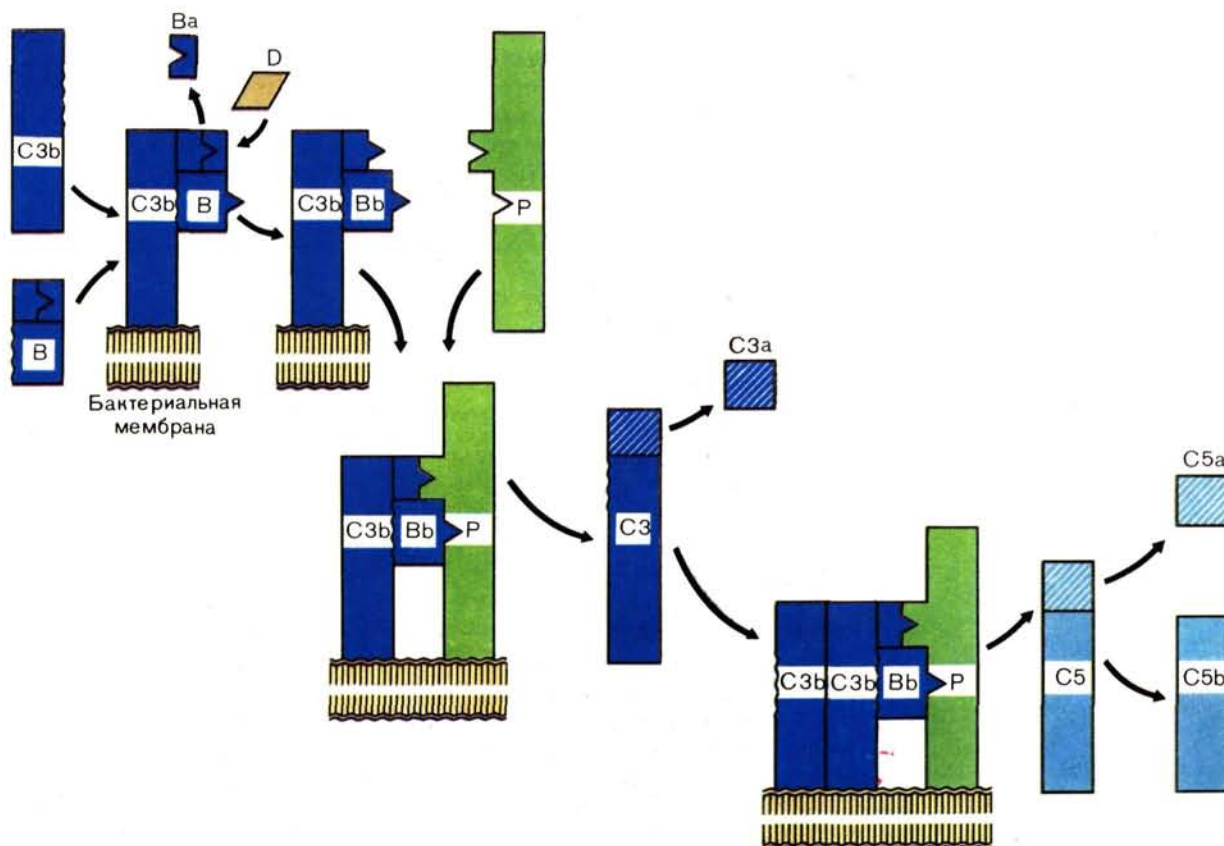
Наряду с классическим существует и так называемый альтернативный путь, или путь активации комплемента, происходящей без участия антител, обнаруженный Л. Пилемером. Этот путь является, по-видимому, основным на ранних этапах борьбы организма с бактериальной инфекцией, когда антитела еще не образовались, представляя собой первую линию защиты. Альтернативный путь также заканчивается образованием C5-конвертазы, однако ее формирование происходит без участия C1, C2 и C4 компонентов за счет взаимодействия C3 компонента с другими факторами (рис. 125). Реакция активируется полисахаридами клеточных стенок микроорганизмов и начинается с создания на мембране комплекса активированного C3 компонента (C3b) с фактором В. По-

следний расщепляется фактором D, что приводит к образованию альтернативной C3-конвертазы C3bBb, которая стабилизируется присоединением пропердина P. Добавление к этому комплексу дополнительных C3b компонентов дает C5-конвертазу альтернативного пути C3b_nBbP. Как и в классическом пути, образовавшаяся C5-конвертаза активирует пятый компонент комплемента, ответственный за сборку мембрано-атакующего комплекса.

Механизм цитолитического действия комплемента окончательно еще не установлен. Однако известно, что образующийся комплекс внедряется в гидрофобную зону мембраны и его компоненты формируют в ней воронку диаметром около 10 нм. Это приводит к нарушению целостности мембраны: выходу из клетки ионов, низкомолекулярных компонентов цитоплазмы, белков, поступлению в клетку воды и т. п., что в конечном счете приводит к ее гибели и разрушению. Процесс настолько эффективен, что достаточно одного комплекса для разрушения клетки.

Необходимым условием для предотвращения разрушительного действия комплемента на собственный организм является наличие эффективных механизмов обратной регуляции. Существует два основных механизма такой регуляции. Первый — за счет действия ряда ингибиторных белков, которые связываются с активированными компонентами комплемента и блокируют их дальнейшее действие. Такие ингибиторы имеются, например, для C1 и C3b. Второй механизм основан на нестабильности некоторых компонентов каскада, в частности C4.

Рис. 125. Альтернативный путь активации системы комплемента.



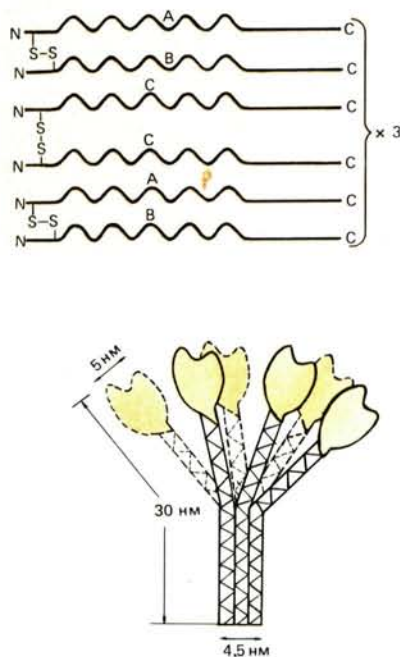


Рис. 126. Схематическое строение молекулы C1q компонента комплемента.

В настоящее время практически все белки системы комплемента выделены в чистом виде и охарактеризованы, установлена полная первичная структура многих из них. Впервые работы по изучению структуры компонентов комплемента были проведены лабораториями Р. Портера (Великобритания) и Г. Фэя (США). В структурном отношении детально изучен фактор C1, функционирующая молекула которого содержит одну C1q, две C1r и две C1s субъединицы, связанные нековалентно. Белок C1q во многих отношениях уникален. Его молекула состоит из трех типов близких по природе полипептидных цепей (A, B и C) с молекулярной массой 23 500 каждая. В структуре каждой цепи можно выделить короткий N-концевой фрагмент, C-концевой глобулярный участок и достаточно протяженный коллагеноподобный район. Молекула C1q содержит в своем составе большое число остатков гидроксизина и гидроксипролина, а также углеводы (глюкозу и галактозу).

A- и B-цепи связаны между собой дисульфидной связью, локализованной в N-концевых фрагментах, и нековалентно взаимодействуют с C-цепью. При этом их вытянутые части образуют единую трехспиральную структуру, подобную той, которая характерна для коллагена, тогда как C-концевые неколлагеновые фрагменты образуют единую глобулярную часть. Образованные таким способом структурные единицы могут легко димеризоваться за счет возникновения дисульфидной связи между N-концевыми фрагментами C-цепей. Нативная молекула C1q, имеющая молекулярную массу около 400 000, состоит из трех таких димеров, связанных нековалентными взаимодействиями между коллагеновыми частями цепей. Внешне такая молекула напоминает букет тюльпанов (рис. 126).

Необычная структура C1q-компонента комплемента объясняется характером выполняемых им функций. Глобулярные области ответственны за связывание с Fc-фрагментами иммуноглобулинов, причем для активации каскада необходимо, чтобы произошло связывание с участием как минимум двух «головок». Структурное разнообразие и полифункциональность характерны и для других компонентов комплемента.

Естественно, что активация комплемента может представлять известную угрозу и для организма хозяина. Однако в норме анти-тело фиксирует комплемент только на чужеродных клетках.

Медиаторы иммунного ответа

Интерфероны. В середине 30-х годов было установлено, что заражение животного каким-либо вирусом защищает его от последующего заражения другим вирусом; это явление получило название вирусной интерференции. Однако потребовалась почти четверть века, прежде чем был выделен в индивидуальном состоянии агент, ответственный за это явление. В 1957 г. английские ученые А. Айзекс и Д. Линденман впервые обнаружили белок, продуцируемый зараженными вирусом клетками, и назвали этот белок *интерфероном*.

Интерфероны — противовирусные агенты универсального действия. Они активны против любых вирусов, но, как правило, обладают видовой специфичностью — каждому виду животных свойствен свой интерферон. Как сейчас установлено, интерфероны — это семейство белков, каждый со специфическим спектром дейст-

вия. Существуют лейкоцитарные, или α -интерфероны, фибробластные, или β -интерфероны, и, наконец, иммунные, или γ -интерфероны.

Структура интерферонов была установлена в конце 70-х — начале 80-х годов. Из природных источников эти белки выделяются в весьма небольших количествах, что затрудняло определение их аминокислотных последовательностей традиционными методами белковой химии. Оказалось, что интерфероны представляют собой небольшие белки с молекулярной массой около 17 500. Существенного прогресса удалось добиться на основе анализа соответствующих генов и сравнения полученных результатов с данными по частичной структуре белков. Определение структуры гена белка, для которого не было данных об аминокислотной последовательности, потребовало разработки специального подхода. Эта задача была успешно решена японским ученым Т. Танигучи на примере β -интерферона. Позднее в лаборатории Ч. Вайсмана (Швейцария) была выяснена структура гена α -интерферона, а структура самого белка впервые определена Дж. Шайвели (США). На рисунке 127 приведена последовательность гена α -интерферона человека и выведенная из нее структура белка, содержащего 166 аминокислотных остатков.

Следует отметить, что у каждого вида животных имеется несколько α -интерферонов (в частности, у человека найдено 14 различных генов α -интерферонов), один или несколько β -интерферонов и всегда один γ -интерферон. Большинство интерферонов α -типа имеют негликозилированные пептидные цепи, тогда как β - и γ -интерфероны являются гликопротеинами. Как следует из нуклеотид-

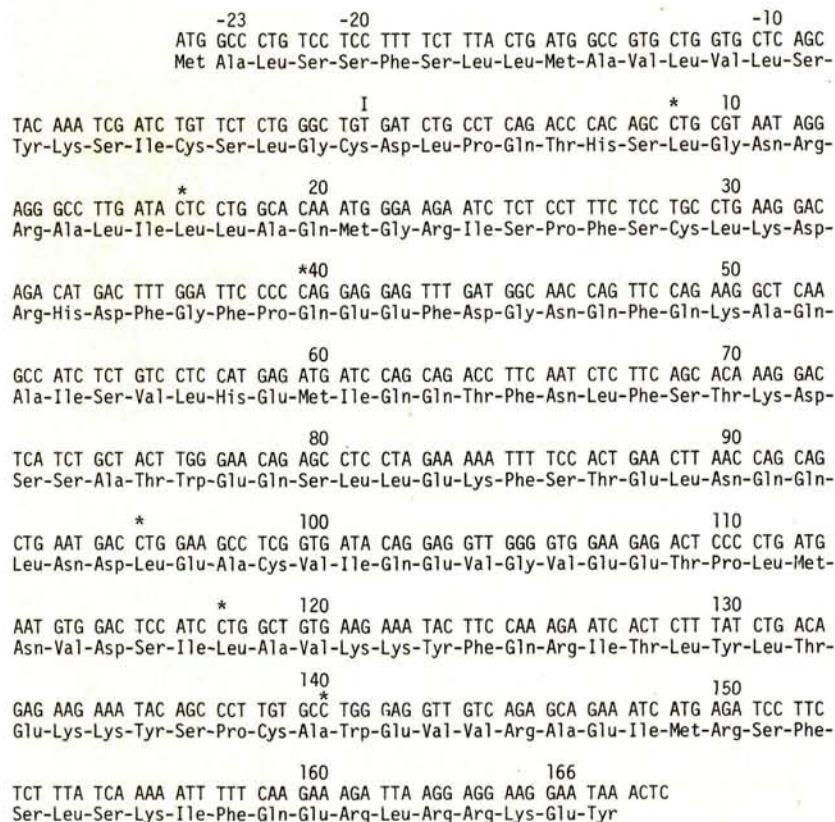


Рис. 127. Аминокислотная последовательность α -интерферона человека и нуклеотидная последовательность соответствующего гена.

ной последовательности, на начальном этапе синтезируется предшественник интерферона, содержащий сигнальный пептид из 23 аминокислотных остатков; последний отщепляется в результате процессинга при секреции белка. β - и γ -Интерфероны также синтезируются в виде предшественников (у человека β -интерферон содержит 166 аминокислотных остатков, а γ -интерферон — 143 остатка).

α - и β -Интерфероны представляют собой типичные глобулярные белки (содержание α -спиральных структур составляет 40—75%). В α -интерферонах обнаружены две дисульфидные связи.

Механизм биологического действия интерферона в общих чертах выяснен. Интерфероны синтезируются и секретируются одними клетками и проявляют свой эффект, воздействуя на другие клетки, в этом отношении они подобны гормонам. Общая схема биологического действия интерферона представлена на рисунке 128.

Связываясь с клеточными рецепторами, интерфероны индуцируют синтез двух ферментов — 2',5'-олигоаденилатсинтетазы и протеинкиназы, вероятно, за счет инициации транскрипции соответствующих генов. Оба образующихся фермента проявляют свою активность в присутствии двухцепочечных РНК, а именно такие РНК являются продуктами репликации многих вирусов или содержатся в их вирионах. Первый фермент синтезирует 2',5'-олигоаденилаты (из АТФ), которые активируют клеточную рибонуклеазу I; второй фермент фосфорилирует фактор инициации трансляции IF2. Конечным результатом этих процессов является ингибирование биосинтеза белка и размножения вируса в инфицированной клетке, а затем ее лизис. Доказано, что существуют и альтернативные механизмы действия интерферонов (инактивация тРНК, вмешательство в процессы метилирования и т. п.).

Интерфероны — мощные противовирусные агенты. Они во все возрастающем масштабе используются в медицинской практике для лечения вирусных заболеваний, таких, как гепатит, энцефалит, бешенство, герпес и т. п. Имеются достаточно обоснованные данные об эффективности ряда интерферонов против некоторых форм рака. Интерфероны действуют в весьма небольших дозах при местном или внутримышечном применении; при этом в ряде случаев у пациентов отмечается некоторое повышение температуры. В мировой практике в настоящее время накапливается все больший опыт использования интерферонов при самых различных заболеваниях, в том числе при эпидемиях гриппа, аденовирусных инфекциях и т. п. Примечательно, что описаны случаи эффективного использования интерферонов для борьбы с вирусами не только сельскохозяйственных животных, но и многих культурных растений.

Широкому применению интерферонов в медицинской практике долгое время препятствовало отсутствие экономичных методов их получения. Первоначально наибольшее распространение получил метод производства лейкоцитарного интерферона на основе донорской крови (К. Кантелл, Финляндия, 1977). При этом лейкоциты подвергаются инкубации с каким-либо вирусом (например, вирус Сендай или вирус болезни Ньюкасла), в качестве компонента культуральной среды используется сыворотка крови человека или быка (иногда казеин молока). Последующая очистка с помощью хроматографических приемов дает достаточно концентрированный препарат интерферона.

Радикальным решением вопроса оказалось использование методов генетической инженерии. В частности, гены интерферона удалось экспрессировать в различных клетках, в том числе бактериальных, дрожжевых и клетках млекопитающих (см. с. 378).

Лимфокины и монокины. В процессе развития защитной реакции организма активированные лимфоциты секретируют набор бел-

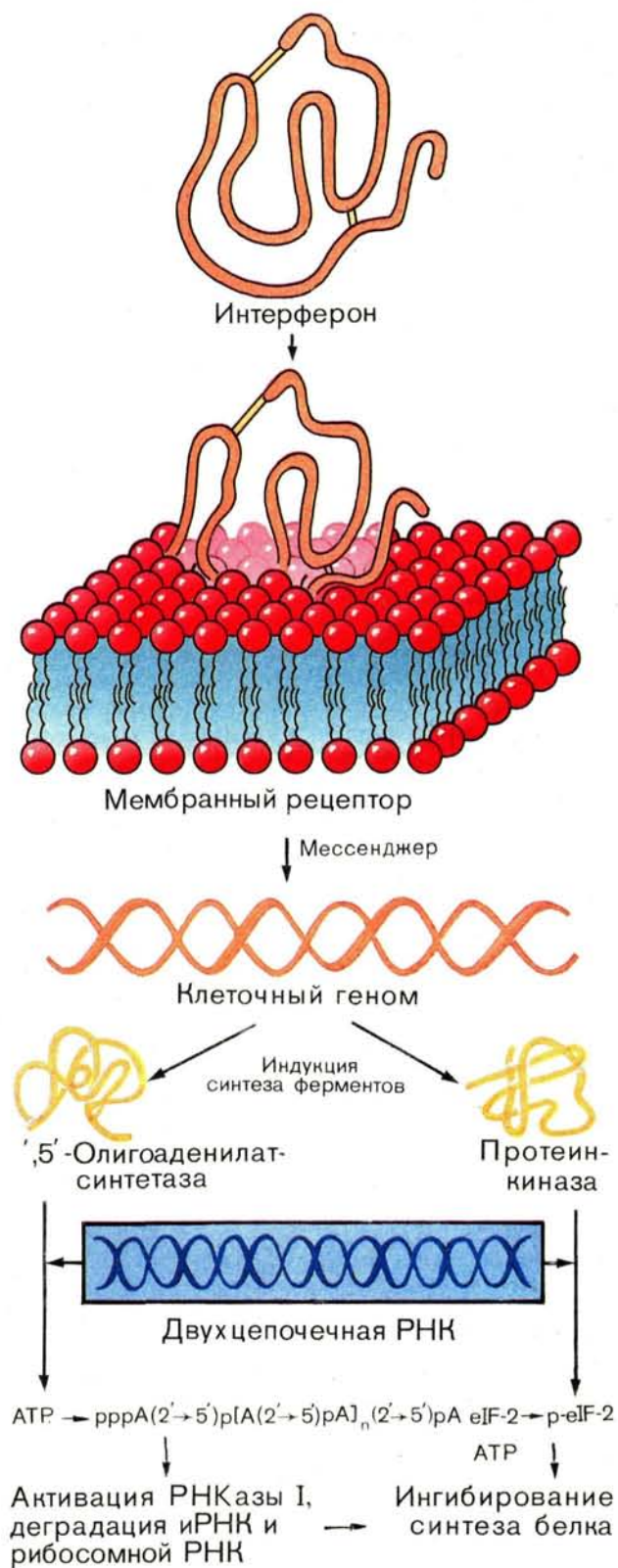


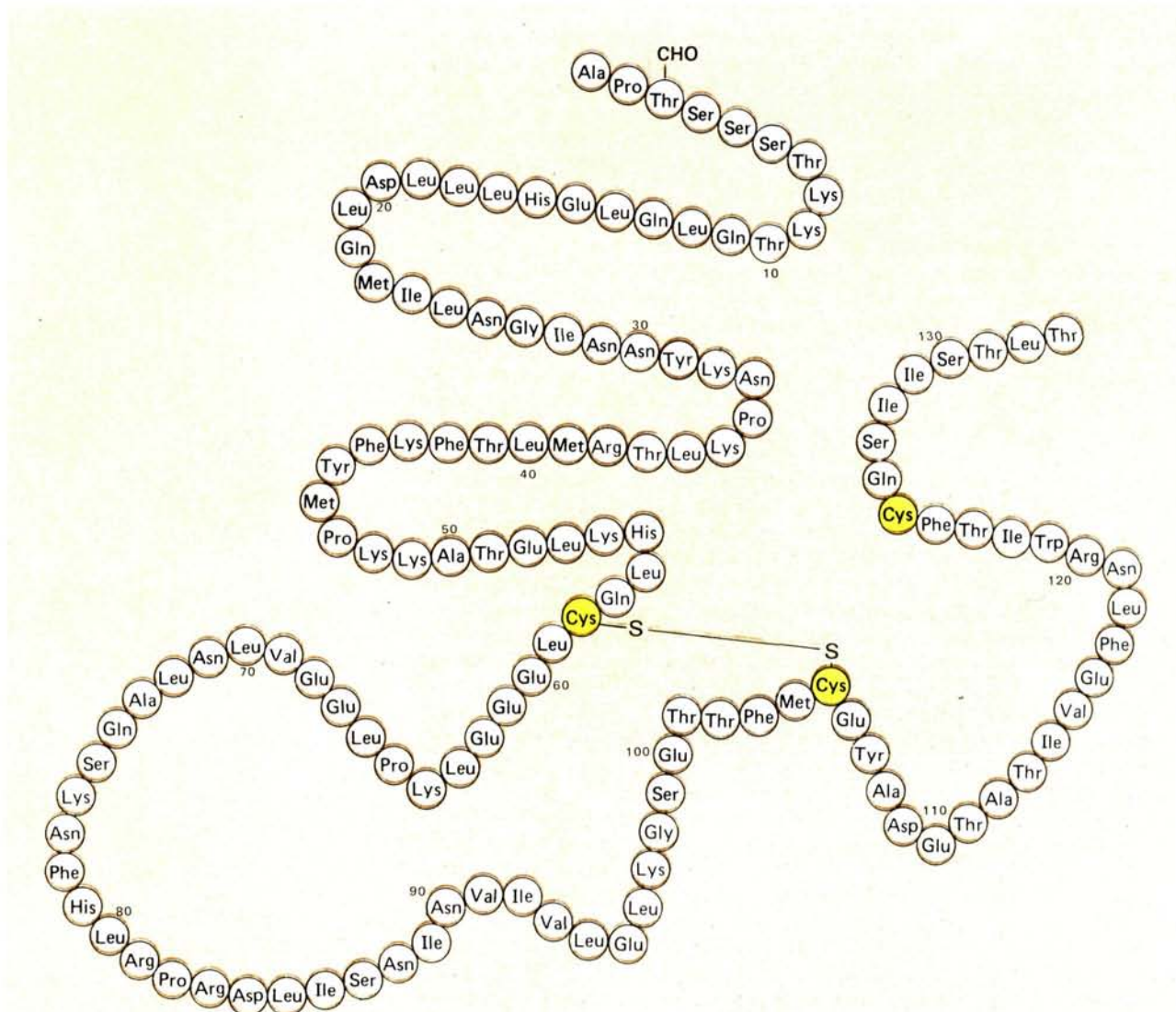
Рис. 128. Механизм действия интерферона.

ков, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток иммунной системы; для таких белков часто используется термин *интерлейкин*.

Открытый в 1976 г. в лаборатории Р. Галло (США) интерлейкин 2 (IL2, ранее называвшийся клеточным ростовым фактором) вызывает пролиферацию активированных Т-лимфоцитов и занимает центральное место в каскаде интерлейкинов (или лимфокинов); он продуцируется зрелыми Т-лимфоцитами (Т-хелперами) в результате их стимуляции антигенами.

В индивидуальном состоянии интерлейкин 2 человека удалось получить на основе использования метода хроматографии высокого давления на обращенной фазе и применения моноклональных антител. Он представляет собой сравнительно небольшой гидрофобный белок, содержащий 133 аминокислотных остатка (рис. 129). Аминокислотная последовательность интерлейкина 2 человека определена по структуре соответствующего гена (Т. Танигучи, 1983)

Рис. 129. Аминокислотная последовательность интерлейкина 2 человека.



и затем подтверждена анализом самого белка. К одному из аминокислотных остатков (Thr-3) интерлейкина 2 присоединена углеводная цепь (за счет O-гликозидной связи), в состав которой входят остатки N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты (NeuNAc), галактозы (Gal) и N-ацетилгалактозамина (GalNAc). Характерно, что наличие углеводов не влияет на биологическое действие интерлейкина 2: рекомбинантный IL 2 имеет ту же удельную активность, что и природный.

Попытки выделить небольшой пептид, моделирующий активный центр молекулы, не увенчались успехом. Использование метода направленного точечного мутагенеза и моноклональных антител к определенным участкам молекулы IL 2 показало, что активный центр формируется аминокислотными остатками, находящимися на N- и C-концах молекулы, сближенных в пространственной структуре молекулы за счет дисульфидной связи.

По характеру биологического действия интерлейкин 2 напоминает гормоны: он продуцируется клетками в весьма малых количествах, активен в концентрациях порядка нескольких пикомолей (на 1 мл), действует на клетку-мишень через соответствующий рецептор на ее поверхности ($K_d = 3 - 5 \times 10^{-12} \text{M}$). «Период полужизни» интерлейкина 2 в кровотоке измеряется минутами.

Интерлейкин 2, получаемый в настоящее время в промышленном масштабе на основе методов генетической инженерии (СССР, США), используется при лечении вирусных заболеваний, иммунодефицитов, некоторых форм рака.

Интерлейкин 1 (IL 1, или лимфоцитактивирующий фактор), впервые описанный И. Джери и Б. Ваксманом (США), продуцируется активированными макрофагами, а также полиморфноядерными лейкоцитами, эпителиальными клетками кожи и другими клетками. Он инициирует пролиферацию фибробластов, синтез простагландинов; основной же мишенью являются активированные Т-хелперы, которые в присутствии IL 1 секретируют IL 2.

Интерлейкины 1 человека представляют собой белки, состоящие из 159 (IL 1 α) и 153 (IL 1 β) аминокислотных остатков. В ходе биосинтеза они получаются из высокомолекулярных белков-предшественников (271 и 269 аминокислотных остатков соответственно).

В отличие от интерлейкинов 2 и 1, открытый Д. Иле с соавторами (США) интерлейкин 3 (из мыши, IL 3) действует не на зрелые клетки иммунной системы, а на клетки-предшественники: он вызывает рост колоний стволовых клеток и предшественников β -клеток. Источником интерлейкина 3 являются активированные Т-хелперы. По характеру своей активности IL 3 принадлежит к факторам, стимулирующим рост колоний различных клеток (CSF); он действует в концентрациях $10^{-11} - 10^{-12} \text{M}$. Интерлейкин 3 является гликопротеином, в состав которого входят 134 аминокислотных остатка.

К группе белков, продуцируемых активированными клетками иммунной системы и родственными интерлейкинам, следует отнести *лимфотоксин* и *фактор некроза опухолей*.

Лимфотоксин (LT) был впервые описан в конце 60-х годов как продукт активированных лимфоцитов, обладающий цитостатической активностью. Действие лимфотоксина на опухолевые клетки заметно усиливается в присутствии γ -интерферона. Лимфотоксин человека является гликопротеином (171 аминокислотный остаток); углеводная цепь связана N-гликозидной связью с Asn-62 (рис. 130).

Фактор некроза опухолей (TNF). TNF вызывает лизис некоторых типов опухолевых клеток. Он вырабатывается активированными макрофагами. Строение TNF человека, проявляющего заметную гомологию с лимфотоксинами, установлено на основе ана-

посторонних веществ, например экстрактов некоторых тканей. На этом основании принято различать *внутренний* (собственный) и *внешний пути* свертывания крови. При обычном свертывании крови внутренний и внешний пути действуют взаимосвязанно.

Э. Дэви установил первичную структуру ряда факторов свертывания крови и внес значительный вклад в расшифровку молекулярных механизмов процесса свертывания крови.

С биохимической точки зрения свертывание крови и образование сгустка представляют собой каскад ферментативных реакций, осуществляемых группой специальных белков (белковых факторов). В цепи последовательных превращений каждый образовавшийся фактор вызывает активацию следующего по принципу профермент → фермент, так что небольшие количества того или иного фактора на начальных этапах процесса вызывают лавинообразное усиление на последующих стадиях и, как результат, быструю ответную реакцию на травму. Внутренний и внешний пути свертывания различаются лишь начальными стадиями, а затем они сливаются в единый, *общий путь свертывания* (рис. 131) (Р. Макферлан, 1965—1966). Внутренний путь свертывания крови реализуется при адсорбции фермента калликреина и высокомолекулярного кининогена на поврежденной поверхности эндотелия сосудов или на какой-либо инородной поверхности (стекло, керамика и др.). При запуске *внутреннего пути* фактор XII (известный также под названием фактора Хагемана) расщепляется калликреином. Это расщепление осуществляется двумя путями — с образованием фак-

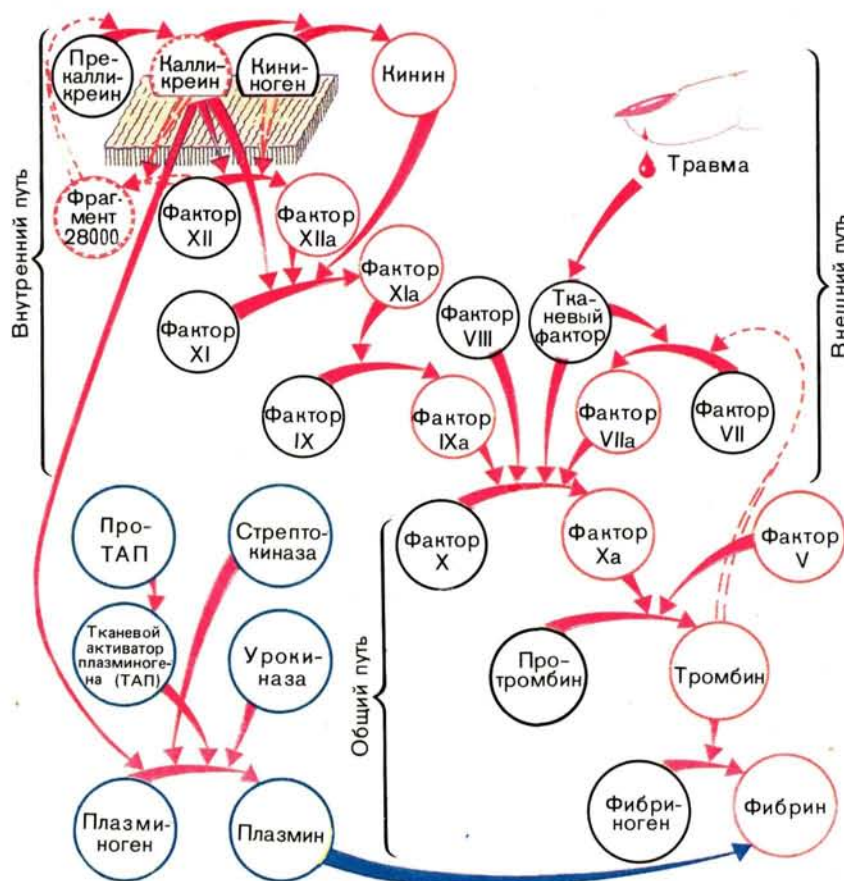


Рис. 131. Белки каскада свертывания крови и фибринолиза.



Дэви (Davie) Эрл В. (р. 1927), американский биохимик. Образование получил в Вашингтонском университете (1954), в настоящее время работает в университете Вашингтона в Сиэтле. Основные работы в области химии белка, энзимологии и рекомбинантных ДНК. Изучал молекулярные механизмы свертывания крови. Выделил и охарактеризовал ряд генов белков, участвующих в процессах свертывания и фибринолиза крови.

тора XIIa, т. е. активированного фактора XII, или с образованием фрагмента, имеющего молекулярную массу 28 000, который, в свою очередь, активирует превращение прекалликреина в калликреин.

Активированный фактор XIIa вместе с калликреином и кинином (последний образуется из высокомолекулярного кининогена при действии калликреина) превращает затем фактор XI (предшественник плазменного тромбопластина) в активную форму XIa (плазменный тромбопластин), последний активирует фактор IX (Кристмас-фактор). Кристмас-фактор получил свое название по имени Стерена Кристмаса — мальчика с нарушениями в системе свертывания крови; из его крови впервые был выделен этот новый белок. Наконец, активированный фактор IXa вместе с еще одним белком — фактором VIII вызывают активацию фактора X (Стюарт-фактор) с образованием фактора Xa и включают, таким образом, общий путь свертывания.

Фактор VIII, называемый *антигемофильным фактором*, является белком-модификатором. Отсутствие его в крови (например, в силу генетического дефекта) вызывает тяжелейшее заболевание — *гемофилию*. При гемофилии нарушение свертывающей способности крови может передаваться по наследству. В частности, широко известен такой исторический факт: английская королева Виктория,

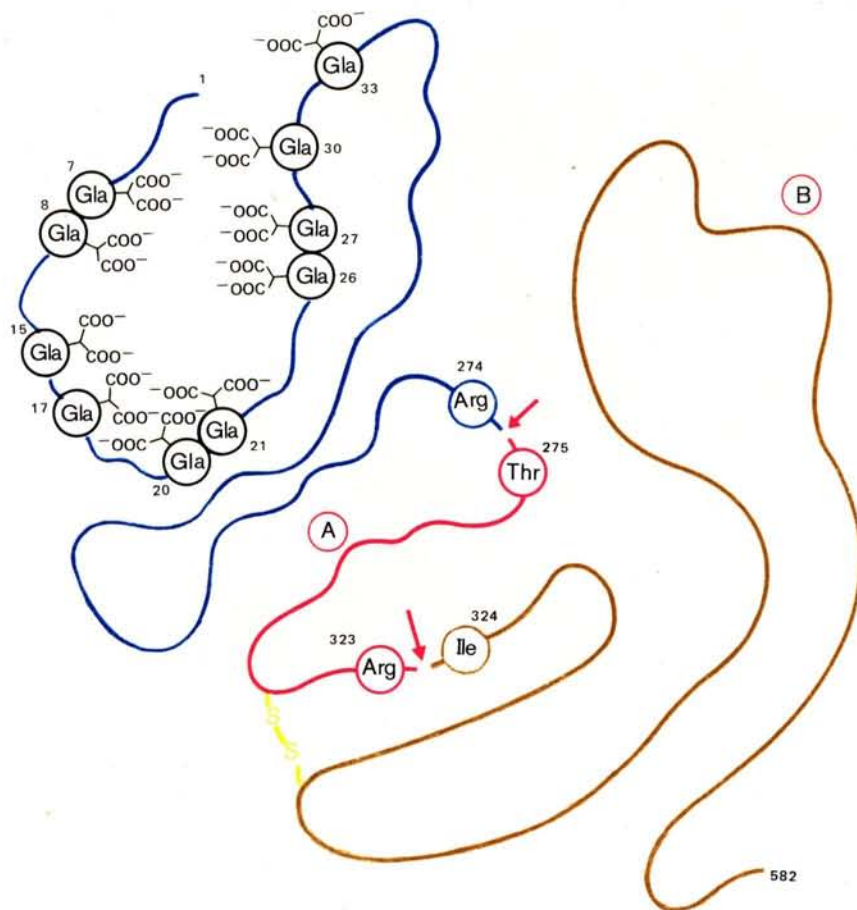


Рис. 132. Схема превращения протромбина в тромбин.

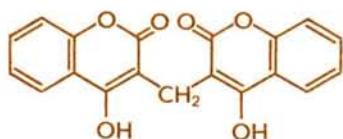
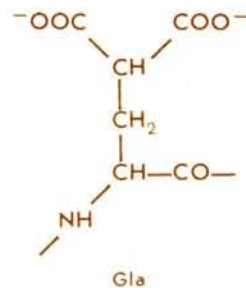
(бывшая носителем гена гемофилии), явилась, сама того не подозревая, причиной распространения этого наследственного заболевания в монархических династиях Пруссии, Испании и России.

Свертывание крови по *внешнему пути* осуществляется весьма быстро (~ 12 с). При повреждении кровеносного сосуда и окружающей ткани в кровь высвобождается *тканевый фактор* липопротеиновой природы, действующий как белок-модификатор. Он вызывает активацию фактора VII (проконвертина) и образование соответствующей протеиназы VIIa (впоследствии этот процесс резко усиливается тромбином по механизму обратной связи), а совместное действие тканевого фактора и фактора VIIa приводит к инициации основного звена процесса свертывания крови: $X \rightarrow Xa \rightarrow \dots$ и т. д.

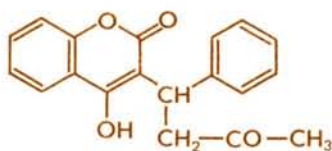
На заключительных этапах каскада весьма существенным является превращение протромбина (фактора II) в тромбин. Оно происходит под действием протеиназы Xa, но скорость этой реакции увеличивается в десятки тысяч раз благодаря участию еще одного сывороточного белка — акселерина (фактора V).

Протромбин — белок, состоящий из 582 аминокислотных остатков; его протеолитическое расщепление по связям Arg—Thr (274 — 275) и Arg—Ile (323 — 324) приводит к удалению большого N-концевого фрагмента и образованию тромбина, состоящего из соединенных дисульфидной связью цепей A и B (рис. 132).

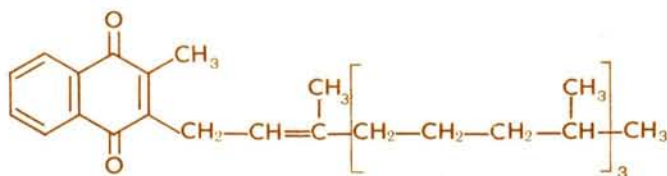
Важной особенностью протромбина является наличие в N-концевом участке его пептидной цепи большого числа (10) остатков γ -карбоксиглутаминовой кислоты (Gla). Именно эти остатки ответственны за связывание ионов Ca^{2+} , являющихся важнейшими кофакторами (известными как фактор IV) на различных стадиях свертывания крови. γ -Карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты осуществляется специальной витамин K-зависимой ферментной системой. Отсюда становится понятным, почему витамин K (см. с. 688) необходим для нормального протекания процессов свертывания, а его антагонисты — дикумарол, варфарин и др. часто используются в медицине в качестве антикоагулянтов для предотвращения тромбозов у больных с повышенной свертываемостью крови:



Дикумарол



Варфарин

Витамин K₁

Превращение протромбина в тромбин происходит на фосфолипидных мембранах тромбоцитов, скапливающихся в месте повреждения ткани стенки сосуда. Каталитический комплекс (рис. 133) состоит из ионов Ca^{2+} , связанных с протромбином, факторов Ха и V, а также кислых фосфолипидов; благодаря близости и оптимальной ориентации всех компонентов на мембране процесс ускоряется в $10^4 - 10^5$ раз! При активации протромбина отщепляется N-концевой фрагмент, содержащий Ca^{2+} -связываю-

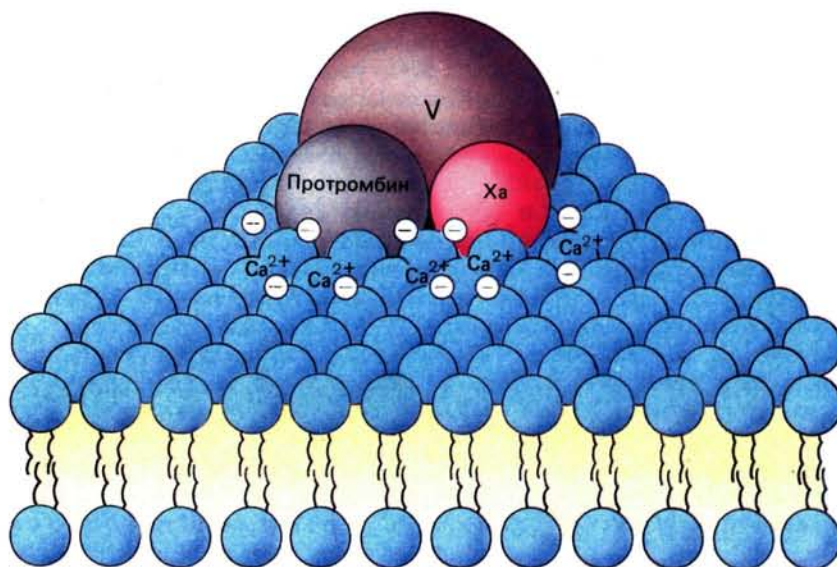


Рис. 133. Мембранный каталитический комплекс активации протромбина.

щие участки. Аналогичный механизм лежит также в основе активации факторов VII, IX, XI, XII.

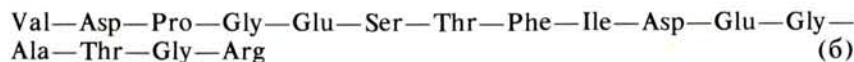
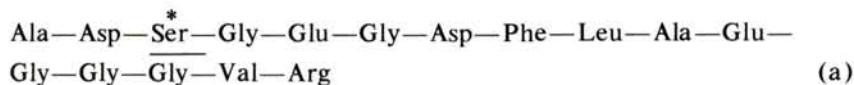
Тромбин — высокоспецифичная протеиназа, во многом аналогичная трипсину. В молекуле фибриногена он расщепляет пептидные связи между остатками Arg и Gly. Аминокислотная последовательность В-цепи тромбина гомологична структуре трипсина, химотрипсина и эластазы, в его активном центре находится фрагмент с характерной для активных центров сериновых протеиназ структурой Gly—Asp—Ser—Gly—Gly—Pro.

Главное звено в свертывании крови — превращение растворимого белка фибриногена (фактор I) под действием тромбина в фибрин-мономер, а затем путем полимеризации последнего — в нерастворимый фибрин-полимер. Фибриноген — высокомолекулярный белок, состоящий из трех пар неидентичных субъединиц — αA , βB и γ , т. е. его структура $(\alpha\text{A}, \beta\text{B}, \gamma)_2$. Совокупность физико-химических данных позволила С. Халлу и Х. Слэйтеру предложить модель пространственной организации фибриногена (рис. 134).

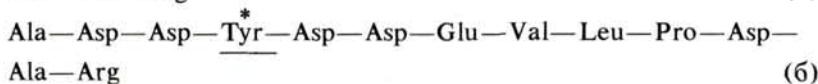
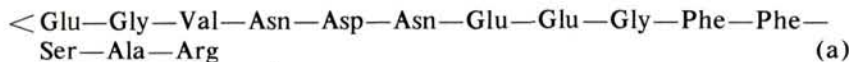
Фибриноген имеет вытянутую форму и напоминает двойную гантель. Длина молекулы фибриногена 46,0 нм; «узлы» в его структуре

стабилизированы дисульфидными связями, но вместе с тем обеспечивают подвижность по принципу своеобразного «шарнира».

В результате протеолитического действия тромбина от фибриногена отщепляются 4 пептида, названные *фибринопептидами*: два А-пептида от двух α А-цепей и два В-пептида от двух β В-цепей. Ниже показаны аминокислотные последовательности фибринопептидов А и В человека (а) и кролика (б):



А



В

Таким образом, фибрин-мономер имеет субъединичную структуру $(\alpha\beta\gamma)_2$; молекула фибрин-мономера спонтанно агрегирует, образуя *фибрин*, имеющий форму длинных нерастворимых нитей (фибрилл). Отщепление фибринопептидов, обладающих большим числом остатков полярных аминокислот, а также заряженными группировками О-фосфосерина Ser^{*} и О-сульфотирозина Tyr^{*}, резко изменяет свойства цепей и способствует агрегации мономеров в фибрин-полимер. Методами электронной спектроскопии и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей установлено, что фиб-

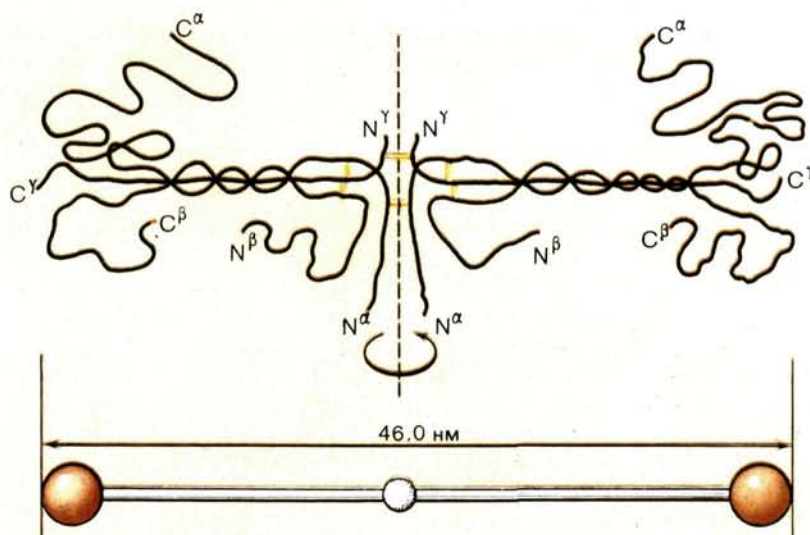
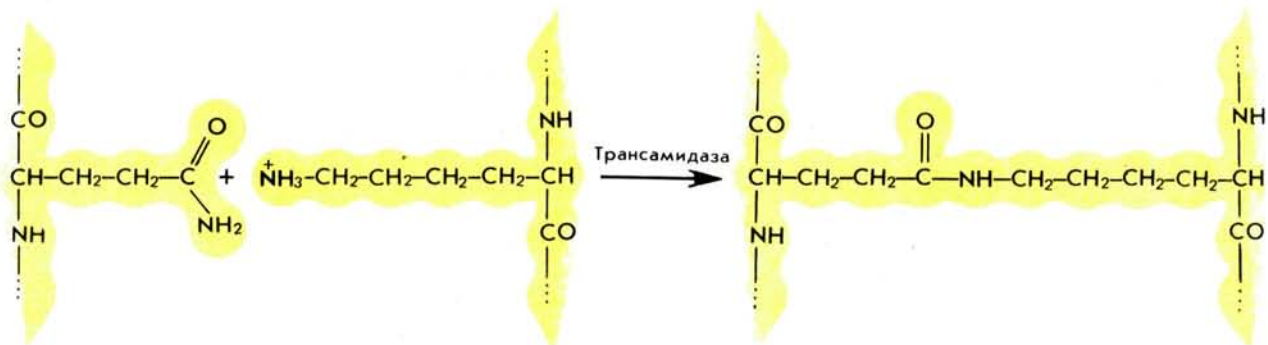


Рис. 134. Модель пространственной структуры фибриногена.

рин имеет периодическую структуру; протяженность повторяющегося участка составляет 23,0 нм (рис. 135).

Сгусток крови, образовавшийся при спонтанной полимеризации мономеров фибрина, вначале является рыхлым и нестойким. Затем он стабилизируется за счет поперечных ковалентных «сшивок» между антипараллельными γ -цепями, в частности путем реакции трансамидирования с участием остатков Gln и Lys:



Если в результате генетических нарушений в крови отсутствует «сшивающий» фермент, то у больных наблюдается повышенная склонность к кровотечениям. Этот фермент (фактор XIII) получил название «трансамидаза» (трансглутаминаза); он активируется тромбином. В процессе участвует еще один белок — фибронектин (гликопротеин, состоящий из двух связанных S—S-связью субъединиц), который «сшивается» с фибрином и способствует процессу свертывания.

Таким образом, в процессе свертывания крови и образования тромба участвует около 20 специфических белков; их характеристики приведены в таблице 10.

Естественно, что для поддержания гомеостаза кроме системы свертывания крови функционирует и противосвертывающая система, или система *фибринолиза* (рис. 131). Она включается в тех случаях, когда свертывание крови нежелательно, а также для

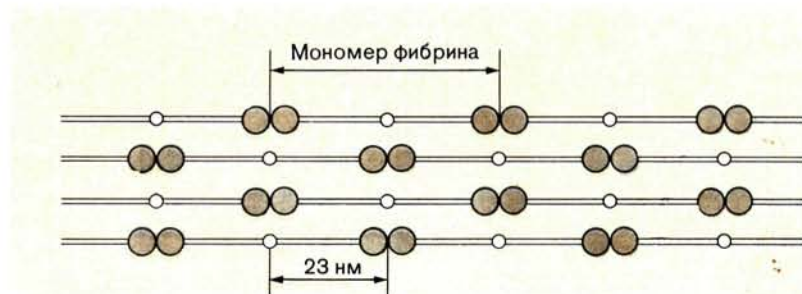


Рис. 135. Структура фибрина.

разрушения свежесформированных тромбов. Наиболее важным из белков этой системы является *плазмин* (фибринолизин) — специфическая протеиназа, разрушающая фибрин. Плазмин образуется в результате активирования *плазминогена* урокиназой. Активация плазминогена может осуществляться также калликреином, специфическим *тканевым активатором плазминогена*, и, кроме того, в результате образования комплекса с бактериальным белком *стрептокиназой*.

Препятствовать тромбообразованию могут также и *белковые ингибиторы протеиназ* — факторов свертывания крови. Среди них наиболее изучен *антитромбин III*; он ингибирует все протеиназы каскада, за исключением VIIa. Действие антитромбина III усиливается полисахаридом *гепарином*.

В заключение следует отметить, что функционирование всех факторов свертывания крови и белков системы фибринолиза осуществляется на основе некоторых общих принципов активации проферментов, или зимогенов (превращение неактивного предшественника в активный фермент). Сравнение структур ряда факторов свертывания крови показывает, что протеолитическим действием во всех случаях обладают С-концевые фрагменты, содержащие около 250 аминокислотных остатков, которые обнаруживают выраженную структурную гомологию как между собой, так и с другими

Т а б л и ц а 10

Белки свертывания крови

Название	Концентрация в плазме (мг/100 мл)	Мол. масса	Субъединичный состав
Фибриноген (фактор I)	200 – 450	340 000	($\alpha A \beta V \gamma$) ₂ , αA – 63 500 βB – 56 000 γ – 47 000
Протромбин (фактор II)	5 – 10	72 000	1
Тканевый фактор (фактор III)	–	–	–
Ca ²⁺ -ионы (фактор IV)	–	–	–
Плазменный проакселерин (фактор V)	0,01	300 000	1
Сывороточный проакселерин (фактор VI)	–	–	–
Проаквертин (фактор VII)	0,1	56 000	1
Антигемофильный фактор (фактор VIII)	0,1	1 100 000	5 × 200 000
Кристалмас-фактор (фактор IX)	0,1	57 000	1
Стюарт-фактор (фактор X)	0,2	60 000	2 16 000 39 000
Плазменный тромбопластин (фактор XI)	0,6	160 000	2 × 80 000
Фактор Хагемана (фактор XII)	1,5 – 4,5	80 000	1
Фибрин-трансамидаза (фактор XIII)	1 – 4	340 000	2 × 75 000 2 × 88 000
Прекалликреин	5,0	90 000	1
Кининоген	6,0	120 000	–
Плазминоген	10 – 15	87 000	–
Фибронектин	25 – 40	440 000	2
Антитромбин III	25	65 000	



Бернар [Bernard] Клод (1813—1878), французский физиолог, один из основателей современной физиологии, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1860). Окончил Парижский университет (1839); работал в Коллеж де Франс, руководил кафедрой в Парижском университете. Основные работы посвящены изучению физиологии нервной системы, пищеварения и кровообращения. Провел классические исследования функции поджелудочной железы и ее роли в пищеварении. Открыл образование гликогена в печени.



Старлинг [Starling] Эрнест Генри (1866—1927), английский физиолог. Окончил Лондонский университет (1886), в 1899—1923 гг. — профессор этого университета. Основные работы посвящены физиологии пищеварения и кровообращения. Открыл секретин — вещество, вызывающее выделение сока поджелудочной железы. Ввел понятие «гормон».

сериновыми протеиназами (30% инвариантных остатков). N-Концевые домены (также гомологичные у ряда факторов) практически во всех случаях содержат остатки γ -карбоксихлутаминовой кислоты. Они участвуют в закреплении активируемого фактора на поверхности мембран и способствуют значительному ускорению протеолитической активации.

Белки — гормоны

Исторический очерк. Понятие об органе или железе внутренней секреции возникло еще в XIX в. В 1849 г. немецкий физиолог А. Бертольд пересадил семенники кастрированным петухам и обнаружил, что после пересадки у них восстанавливаются утерянные вторичные половые признаки, характерные для самцов. А. Бертольд предположил, что семенники выделяют вещество, необходимое для развития вторичных половых признаков. Понятие «внутренняя секреция» было введено в научную литературу в 1855 г. французским физиологом К. Бернаром. Он назвал железами внутренней секреции органы, выделяющие продукты своего обмена в кровь, и отличал их от желез внешней секреции, выделяющих продукты своего обмена через выводные протоки в полости организма, соединяющиеся с внешней средой. Важным этапом в развитии эндокринологии было открытие, сделанное в 1889 г. немецкими физиологами Й. фон Мeringом и О. Минковским. Они обнаружили, что удаление поджелудочной железы у собаки приводит к диабету — болезни, известной человеку еще с глубокой древности. Развитие диабета предотвращает пересадка собакам с удаленной железой кусочков поджелудочной железы.

В 1902 г. английские физиологи Э. Старлинг и У. Бейлисс установили, что слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки при действии на нее соляной кислоты выделяет в кровь вещество, которое стимулирует секрецию сока поджелудочной железой. Э. Старлинг и В. Бейлисс назвали его секретин и позднее доказали, что секретин — лишь первый представитель большой группы еще не открытых биологически активных веществ. В 1905 г. Э. Старлинг предложил называть вещества, относящиеся к этой группе, термином «гормоны» (от греч. *ορμη* — привожу в движение, побуждаю). В последующие десятилетия были выделены и химически охарактеризованы десятки гормонов. В последние годы наука вплотную подошла к пониманию механизма действия их на молекулярном уровне.

Существует несколько признаков, позволяющих выделить гормоны в отдельную группу биологически активных соединений. Согласно классической точке зрения, гормоны — это биологически активные регуляторы эндогенного происхождения, т. е. синтезируемые в организме, а не вносимые в него извне. Гормоны разносятся по организму кровью и действуют на клетки-мишени, удаленные от эндокринных органов.

К белковым гормонам относятся такие важнейшие соединения, как инсулин, гормон роста (соматотропин), некоторые гормоны гипофиза — центральной железы внутренней секреции: тиротропин, гонадотропин, лютропин, липотропин. Еще один белковый гормон — паратгормон — синтезируется в парацитовидных железах.

Взаимодействие гормонов с рецепторами. Для реализации биологического действия гормона необходимо узнавание его клеткой-мишенью, т. е. наличие у нее структур, специфически связывающих данный гормон. Компонент клетки, узнающий гормон и передающий информацию о взаимодействии с ним, называют *рецептором*. Рецепторы должны обладать большим сродством к гормону (константы ассоциации для большинства гормон-рецепторных взаимодействий составляют величины порядка $10^8 - 10^{10} \text{M}^{-1}$), а само взаимодействие должно осуществляться быстро и высокоспецифично. Кроме того, поскольку белковые гормоны не способны свободно пересекать клеточную мембрану, их рецепторы должны быть компонентами плазматической мембраны клеток, локализованными на ее внешней поверхности. Наконец, при связывании гормона рецептор должен обеспечить передачу гормонального сигнала клетке.

Представление о химической природе рецептора на первых этапах получается на основании косвенных данных. Так, анализ влияния структурной модификации гормона на его биологическую активность позволяет делать определенные выводы о свойствах участка связывания в молекуле рецептора. В последнее время широкое распространение получил радиолигандный метод изучения взаимодействия гормон — рецептор, основанный на использовании меченных радиоактивными изотопами гормонов и их структурных аналогов. Метод дает возможность определять такие параметры, как сродство к гормону, количество и локализацию рецепторов в клетке, взаимосвязь между процессами связывания гормона с рецептором и индукцией им биологического ответа клетки. Биологически активные соединения, взаимодействующие с рецепторами, обычно подразделяются на *агонисты* — вещества, связывающиеся с рецепторами и индуцирующие биологический ответ, и *антагонисты* — вещества, связывающиеся с рецепторами, но не вызывающие биологического ответа, а, напротив, препятствующие связыванию и действию агонистов.

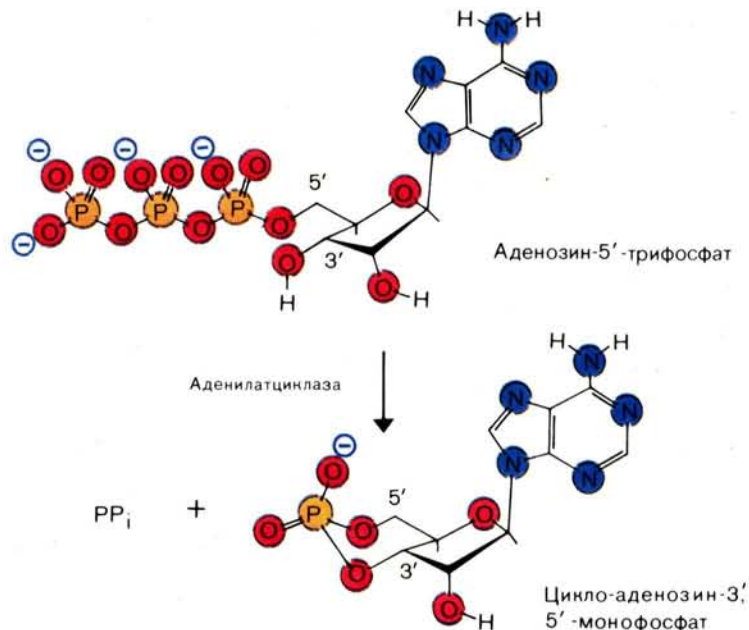
Использование радиолигандного метода позволило приступить к выделению и очистке рецепторов гормонов из мембран. В настоящее время многие рецепторы получены в достаточно гомогенной форме, определены их коэффициент седиментации, молекулярная масса, радиус Стокса, степень гидрофобности и т. д. Рецепторы нескольких гормонов выделены в высокоочищенном виде. Удалось показать, что в большинстве случаев гормональные рецепторы — это гликопротеины.

Структура и свойства аденилатциклазной системы. Взаимодействие гормона с рецептором запускает цепь биохимических реакций, приводящих к характерному ответу клетки. В настоящее время установлено, что в большинстве случаев первым событием, происходящим в клетке после взаимодействия гормонов с их рецепторами, является активация или ингибирование мембранного фермента *аденилатциклазы*, катализирующего реакцию (см. с. 240).

Открытие аденилатциклазы и установление ее роли в механизме действия гормонов связано с именем американского биохимика Э. Сазерленда. В конце 50-х — начале 60-х годов Э. Сазерленд исследовал механизм активации адреналином и глюкагоном гликогенолиза (расщепления гликогена) в клетках печени. Он обнаружил, что эти гормоны непосредственно не влияют на комплекс растворимых ферментов печени, участвующих в гликогенолизе, но после



Сазерленд [Sutherland] Эрл Уилбур (1915—1974), американский биохимик. Окончил медицинскую школу университета им. Дж. Вашингтона в Сент-Луисе (1942), с 1963 г. — профессор медицинской школы Вандербиловского университета в Нашвилле. Основные работы — по изучению углеводного обмена, механизма действия гормонов и лекарственных веществ. Установил, что ключевую роль в передаче гормонального сигнала осуществляет циклическая аденозинмонофосфорная кислота. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1971).



инкубации мембран клеток печени с глюкагоном или адреналином в присутствии АТФ в среде появляется термостабильный низкомолекулярный фактор, активирующий ферментативный комплекс. Э. Сазерленд идентифицировал его как циклический аденозин-3',5'-монофосфат (сАМР). Затем было выяснено, что в мембранном препарате содержится фермент, синтезирующий сАМР из АТФ и названный Э. Сазерлендом «аденилатциклазой». Как оказалось, фермент присутствует практически во всех клетках животных и имеет универсальное значение.

По современным представлениям, стимулируемая гормонами аденилатциклаза — это мембранная система, состоящая по меньшей мере из 3 индивидуальных компонентов: рецептора, каталитического компонента и регуляторных компонентов одного или нескольких типов, связывающих гуаниновые нуклеотиды. При взаимодействии гормона с рецептором развивается сложная цепь событий, приводящая к увеличению или снижению активности аденилатциклазы в результате сопряжения между компонентами аденилатциклазной системы.

Схематически механизм действия аденилатциклазной системы представлен на рисунке 136. Процесс начинается с взаимодействия гормона с его рецептором, расположенным на внешней стороне клеточной мембраны. При этом индуцируются такие изменения в белке-рецепторе, что он приобретает способность взаимодействовать со следующим компонентом системы — N-белком (N).

В клетках животных обнаружено по крайней мере 2 типа N-белков, осуществляющих сопряжение между рецепторами и аденилатциклазой. Один из них, стимулирующий N-белок (N_s), активирует аденилатциклазу. Другой — ингибирующий N-белок (N_i) — снижает ее активность. Оба N-белка состоят из 3 субъединиц. α-Субъединица N_s имеет молекулярную массу 42 000 — 45 000, β-субъединица — 35 000, а γ-субъединица — около 5000. α-Субъединица N_i имеет молекулярную массу 41 000, а β- и γ-субъединицы N_i очень мало отличаются от соответствующих субъединиц N_s или идентичны им.

N_s -Белок взаимодействует с рецепторами, активирующими аденилатциклазу, N_i -белок — с рецепторами, ее ингибирующими. При образовании тройного комплекса гормон — рецептор — N -белок α -субъединица N -белка обменивает связанный с N -белком GDP на GTP. При связывании GTP с α -субъединицей N_s белок приобретает способность взаимодействовать с каталитическим компонентом аденилатциклазы, мембранным ферментом с молекулярной

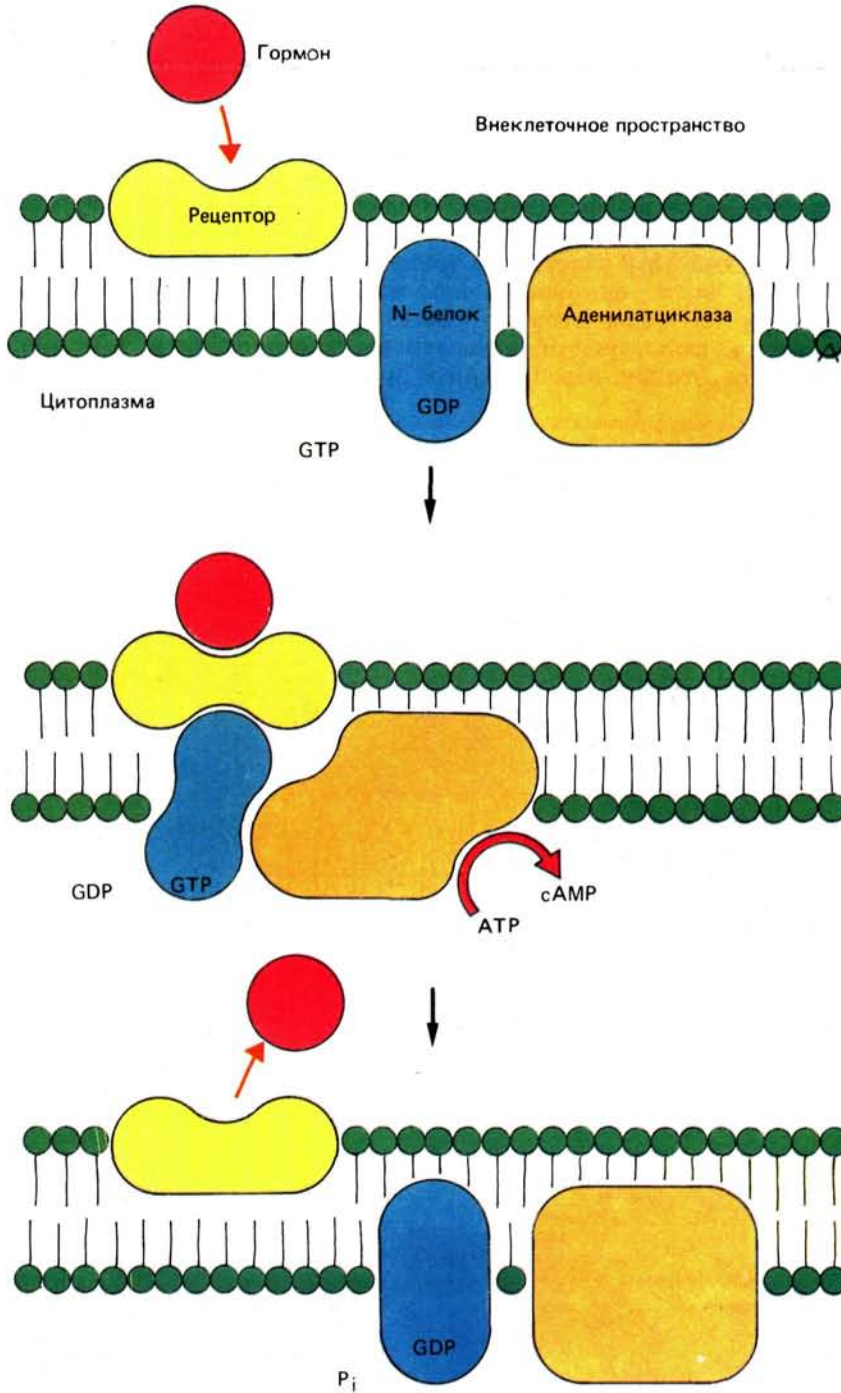


Рис. 136. Механизм действия аденилатциклазы.

массой около 160 000 и активировать ее, при этом возрастает скорость синтеза сАМР. N-Белки обладают ГТФ-азной активностью, гидролиз связанного с α -субъединицей GTP до GDP переводит последнюю в неактивное состояние, и она теряет связь с аденилатциклазой. Система возвращается в исходное состояние, и для ее нового «запуска» необходимо взаимодействие гормона с рецептором. Ингибирование аденилатциклазы происходит при взаимодействии GTP с N_i , индуцированным соответствующим гормоном и рецептором.

Таким образом, взаимодействие гормона с его рецептором индуцирует процесс сопряжения в аденилатциклазной системе, в результате которого активность аденилатциклазы возрастает или снижается, а в клетках изменяется содержание сАМР. Циклический аденозинмонофосфат выполняет роль универсального внутриклеточного «посредника» («второго мессенджера», по Сазерленду), вызывая в клетке цикл превращений, индуцируемых гормоном. В частности, циклический АМР активирует сАМР-зависимые протеинкиназы. Эти ферменты переносят терминальный остаток фосфата АТФ на остатки серина и треонина субстратных белков. Протеинкиназы фосфорилируют многие белки, в частности гистоны, белки рибосом, ферменты, транспортные мембранные белки и т. п. Циклический АМР участвует в реализации биологического действия большого числа гормонов. К ним наряду с упоминавшимися уже адреналином и глюкагоном относятся: паратгормон, тиротропин, лютропин, фоллитропин, кальцитонин, кортикотропин, β -меланотропин, серотонин, вазопрессин и др.

Гормоны могут оказывать свое действие на клетку не только через систему сАМР. В ряде случаев (тиреoliberин, вазопрессин и др.) механизм их действия связан с образованием двух других внутриклеточных «посредников»: инозит-1, 4, 5-трифосфата (IP_3) и диацилглицерина (ДГ). При активации гормонами (рис. 137)

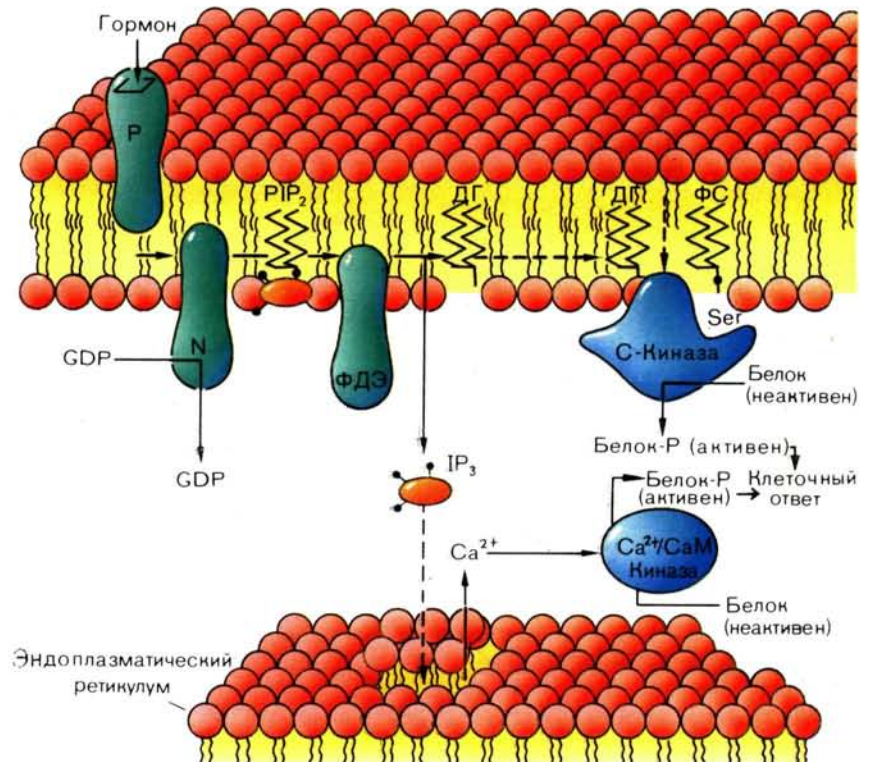
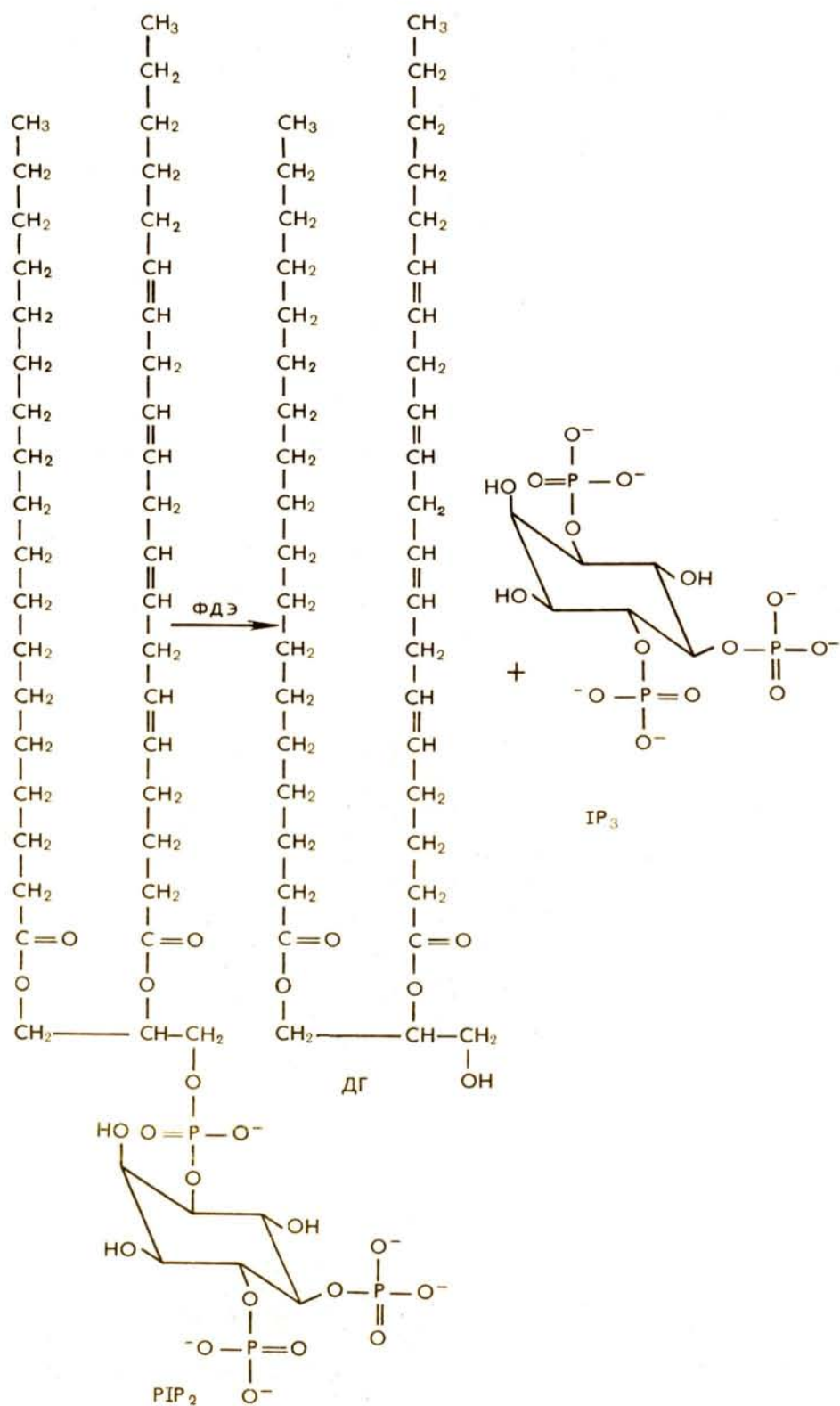


Рис. 137. Инозитный механизм передачи гормонального сигнала.



Действие Ca^{2+} не ограничивается его влиянием на активность протеинкиназы. Концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме нестимулированной клетки очень низка и в различных клетках составляет 10^{-8} — 10^{-7} М. При взаимодействии гормонов с рецепторами внутриклеточная концентрация Ca^{2+} возрастает в десятки раз, и в результате активируются или ингибируются определенные биохимические процессы в клетке.

В большинстве случаев Ca^{2+} как своеобразный «мессенджер» влияет на клеточные процессы не непосредственно, а в основном через активацию им внутриклеточного рецептора — белка кальмодулина. Этот белок был впервые обнаружен в тканях мозга американским исследователем В. Ченгом по его способности активировать фосфодиэстеразу сАМР. Позднее кальмодулин был найден практически во всех растительных и животных тканях. Кальмодулин из мозга млекопитающих — это белок с молекулярной массой 16 790, его первичная структура была установлена в 1980 г. (рис. 138). Кальмодулин — очень кислый белок (рН 3,9 — 4,3) благодаря тому, что около 30% входящих в его состав остатков приходится на долю аспарагиновой и глутаминовой кислот. Этим и объясняется его высокое сродство к Ca^{2+} . В молекуле кальмодулина 4 связывающих Ca^{2+} центра с высокомолекулярной последовательностью. При связывании Ca^{2+} кальмодулин претерпевает конформационное превращение: α -спирализация молекулы сильно возрастает. В таком измененном состоянии сродство кальмодулина к его мишеням — многочисленным ферментам и другим биологически высокоактивным белкам клетки увеличивается и он оказывается способным влиять на их активность.

Механизм действия многих гормонов пока не установлен с полной достоверностью. Так, например, предполагается, что инсулин действует при посредстве специфического пептида. Имеются данные, что для некоторых гормонов вторичным «мессенджером» служит циклический гуанозин-3',5'-монофосфат.



Блобел (Blobel) Гюнтер (р. 1936), американский биохимик. Окончил Тюбингенский университет (1960), с 1976 г. — профессор Рокфеллеровского университета. Известен работами по изучению механизмов биосинтеза белков. Совместно с Д. Сабатини высказал гипотезу о наличии сигнальной последовательности во вновь синтезируемых белках («сигнальная гипотеза»).

Биосинтез гормонов

Гормональные пептиды и белки после биосинтеза в клетках эндокринных желез должны проникнуть через клеточную мембрану, чтобы выйти в русло крови и достигнуть соответствующей мишени. Однако клеточные мембраны являются непреодолимым барьером для свободной диффузии белков. Каким же образом клетка выводит в кровь белковые молекулы, предназначенные «на экспорт»?

В конце 60-х годов было установлено, что на рибосомах, прикрепленных к эндоплазматическому ретикулуму, происходит синтез белков, выводимых клеткой во внешнюю среду. Американские ученые Г. Блобел и Д. Сабатини в 1975 г. выдвинули гипотезу, объясняющую, каким образом происходит перенос через мембрану белков, синтезируемых на таких рибосомах (рис. 139). Синтез секретируемого белка начинается с особой последовательности аминокислот, названной Г. Блобелом «сигнальным пептидом». Эта последовательность необходима для фиксации рибосомы на мембране, откуда следует, что сигнальный пептид должен иметь гидрофобный характер. Взаимодействие сигнального пептида с мембранами вызывает агрегацию определенных рецепторных белков, связывающих большую субъединицу рибосомы и формирующих



Сабатини (Sabatini) Дэвид Д. (р. 1931), американский биохимик. Образование получил в университете в Росарио (Аргентина), с 1972 г. — профессор Нью-Йоркского университета. Основные работы — по изучению биохимии и структурной организации внутриклеточных органелл. Совместно с Г. Блобелом высказал гипотезу о наличии сигнальной последовательности во вновь синтезируемых белках. Идентифицировал белки, участвующие в связывании рибосом на мембране эндоплазматического ретикулума.

Анализ сигнальных последовательностей этих и некоторых других секретируемых белков показал, что для них, как и предполагал Г. Блобел, характерно довольно высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков.

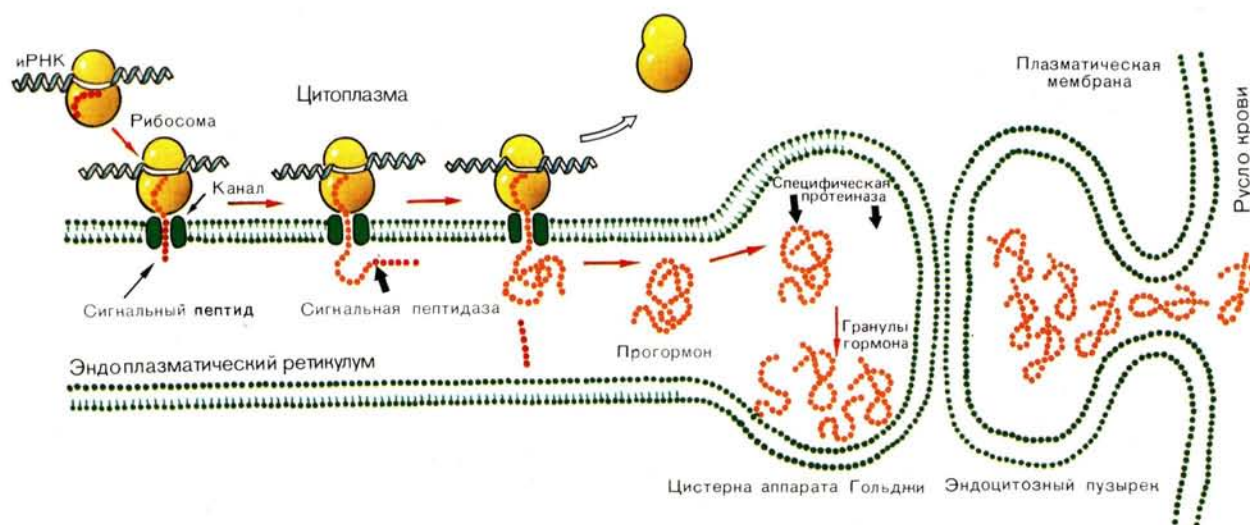


Рис. 139. Схема биосинтеза белковых гормонов.

Многие гормоны синтезируются в виде предшественников — прогормонов. В виде прогормонов образуются инсулин, паратгормон, липотропин и другие белки. Функциональная роль дополнительной последовательности аминокислот у предшественников гормонов, по-видимому, в каждом случае своя. Например, наличие С-пептида в проинсулине необходимо для правильной укладки в пространстве молекулы в процессе ее биосинтеза, для замыкания соответствующих дисульфидных связей между будущими цепями А и В инсулина. Значительные размеры С-пептида связаны с тем, что он должен увеличивать растворимость синтезированной молекулы инсулина. После того как вновь синтезированная молекула проинсулина из-за высокой растворимости диффундирует в цистерны аппарата Гольджи, там происходит отщепление С-пептида ферментом трипсинового типа и образуется уже окончательная форма молекулы — биологически активный инсулин.

Представители белковых гормонов

Инсулин. Еще в конце XIX в. опыты по удалению поджелудочной железы и ее обратной пересадке показали, что поджелудочная железа является источником фактора, снижающего уровень глюкозы в крови. Природа этого гипогликемического фактора в течение десятилетий оставалась неизвестной, и лишь в 1922 г. канадские ученые Ф. Бантинг и Ч. Бест выделили его в чистом виде, а в 1926 г. Дж. Абель получил кристаллический инсулин.

Интерес к инсулину объясняется его важной ролью в организме. При нарушениях, связанных с отсутствием или недостатком инсулина, развивается заболевание, получившее название «сахарный диабет». При этом заболевании содержание глюкозы

Один из них основан на превращении инсулина свиньи в инсулин человека (эти гормоны отличаются только одним С-концевым аминокислотным остатком) с помощью «полусинтетического» метода (см. с. 151). Именно так производят инсулин на предприятиях фирмы «Novo» (Дания).

Второй способ получения инсулина связан с использованием методов геной инженерии (см. с. 381).

Способность инсулина к кристаллизации позволила детально изучить пространственную структуру его молекулы методом рентгеноструктурного анализа. Группа ученых из Оксфорда (Великобритания), возглавляемая Д. Ходжкин, получила в 1969 г. детальную карту гексамера инсулина, содержащего 2 атома цинка. Все 6 молекул инсулина в гексамере имеют почти одинаковую конформацию (рис. 142).

Рецептор инсулина — первый мембранный рецептор, который удалось солиubilизировать из мембран без потери им способности связывать гормон. Это было сделано в 1972 г. американским исследователем П. Куатрекасасом. В настоящее время рецептор инсулина выделен из самых различных тканей млекопитающих. Рецептор из мембран печени состоит из двух типов полипептидных цепей — α -цепи с молекулярной массой 135 000 и β -цепи (95 000). Формула рецептора инсулина — $(\alpha\beta)_2$, все его цепи связаны дисульфидными мостиками.

Соматотропин. Соматотропин (СТГ, гормон роста) — белковый гормон, вырабатываемый передней долей гипофиза, секреция которого регулируется факторами гипоталамуса. Соматостатин инги-



Бантинг (Banting) Фредерик Грант (1891—1941), канадский физиолог. Окончил Торонтский университет (1910), с 1923 г. — профессор отдела медицинских исследований в Институте им. Ф. Бантинга и Ч. Беста Торонтского университета. Основные работы — по изучению обмена веществ и внутренней секреции, физиологии пищеварения. Совместно с Ч. Бестом выделил из поджелудочной железы инсулин (1922) и разработал метод лечения сахарного диабета этим гормоном. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1923, совместно с Дж. Маклеодом).

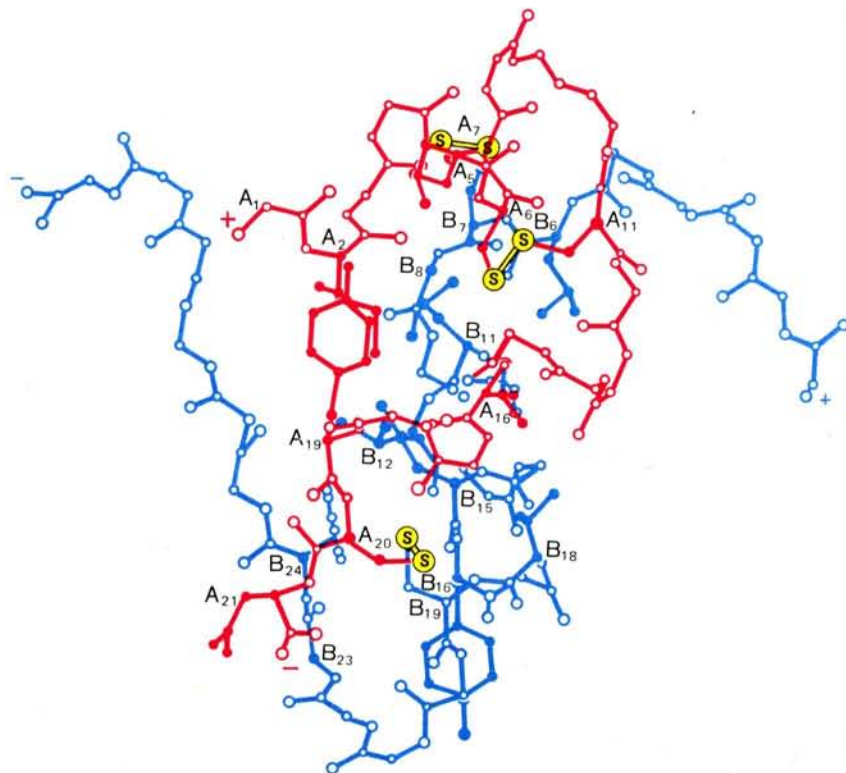


Рис. 141. Ход цепей А и В в молекуле инсулина.

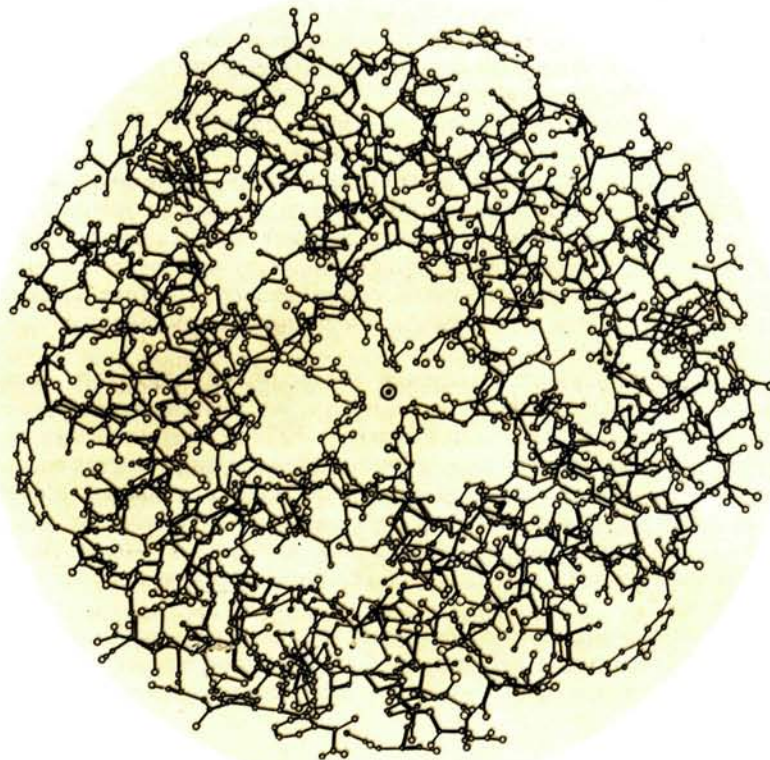


Рис. 142. Структура гексамера 2-цинк-инсулина, определенная на основании рентгеноструктурного анализа кристаллов инсулина свиньи.

Рис. 143. Аминокислотная последовательность соматотропинов человека (сверху) и быка.

Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Asp-Asn-Ala-Met-Leu-Arg-Ala-His-Arg-Leu-His-Gln-Leu-Ala-Phe
 Ala-Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu-Ser-Gly-Leu-Phe-Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg-Ala-Gln-His-Leu-His-Gln-Leu-Ala-Ala
 25
 Asp-Thr-Tyr-Gln-Glu-Phe-Glu-Glu-Ala-Tyr-Ile-Pro-Lys-Gln-Gln-Lys-Tyr-Ser-Phe-Leu-Gln-Asn-Pro-Gln-Thr
 Asp-Thr-Phe-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Thr-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-Arg-Tyr-Ser — Ile-Gln-Asn-Thr-Gln-Val
 50
 Ser-Leu-Cys-Phe-Ser-Glu-Ser-Ile-Pro-Thr-Pro-Ser-Asn-Arg-Glu-Glu-Thr-Gln-Gln-Lys-Ser-Asn-Leu-Gln-Leu
 Ala-Phe-Cys-Phe-Ser-Glu-Thr-Ile-Pro-Ala-Pro(Thr)Gly-Lys-Asn-Glu-Ala-Gln-Gln-Lys-Ser-Asp-Leu-Glu-Leu
 75
 Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Glu-Pro-Val-Gln-Phe-Leu-Arg-Ser-Val-Phe-Ala-Asn-Ser
 Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Gly-Pro-Leu-Gln-Phe-Leu-Ser-Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser
 100
 Leu-Val-Tyr-Gly-Ala-Ser-Asn-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Gln-Thr-Leu-Met
 Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg — Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Leu-Ala-Leu-Met
 125
 Gly-Arg-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg-Thr-Gly-Gln-Ile-Phe-Lys-Gln-Thr-Tyr-Ser-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Ser
 Arg-Glu(Val)Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Met
 (Leu)
 150
 His-Asn-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-Gly-Leu-Leu-Tyr-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Met-Asp-Lys-Val-Glu-Thr
 Arg-Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Thr-Gly-Leu-Leu-Ser-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Leu-His-Lys-Thr-Glu-Thr
 175
 Phe-Leu-Arg-Ile-Val-Gln-Cys-Arg — Ser-Val-Glu-Gly-Ser-Cys-Gly-Phe
 Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe
 191

бирует секрецию СТГ, а стимулирует ее пока не идентифицированный рилизинг-фактор гипоталамуса.

Соматотропин относится к группе анаболических гормонов. При введении его в организм животного с гипофизарной недостаточностью наблюдается усиление роста скелетных костей и других тканей, усиливается синтез белка и секреция молока. Проявление физиологического эффекта соматотропина связано с появлением в крови особых белков, которые называются соматомединами — веществами, опосредующими действие СТГ. Основным местом синтеза соматомединов, как выяснилось в последнее время, является печень. Поэтому печень можно отнести к периферической эндокринной железе, секретирующей вторичные гормоны (в частности, соматомедины) в ответ на действие продукта центральной железы — гипофиза.

Гормоны роста разных видов животных представляют собой одноцепочечные полипептиды, содержащие около 200 аминокислотных остатков. Видовая специфичность первичной структуры резко выражена — например, соматотропины человека и быка содержат 191 аминокислотный остаток, но различны в них всего 63 остатка (рис. 143).

Первичные структуры соматотропинов и пролактина (см. ниже) были расшифрованы в 1970 — 1972 гг. американским химиком Чо Хао Ли. В 1970 г. осуществлен полный химический синтез соматотропина (Д. Ямаширо и Ч. Ли). В настоящее время во многих странах, в том числе в СССР, гормоны роста человека и животных получают на основе методов генетической инженерии и применяются, в частности, в медицине для лечения карликовости, заживления ран и переломов костей, а в сельском хозяйстве — для увеличения продуктивности скота.

Пролактин. В аденогипофизе образуется еще один белковый гормон, близкий по химическим и биологическим свойствам соматотропину, — пролактин, или лактогенный гормон. Он значительно эффективнее стимулирует лактацию, чем соматотропин, и помимо этого обладает широким спектром биологического действия. Пролактин влияет на рост органов и тканей животных, регулирует вод-



Куатрекасас [Cuatrecasas] Педро (р. 1936), американский биохимик испанского происхождения. Окончил Вашингтонский университет в Сент-Луисе (1958), с 1972 г. — профессор фармакологии и экспериментальной терапии. Основные научные интересы связаны с проблемами молекулярной нейробиологии и мембранной рецепции. Выделил (1972) из мембран рецептор инсулина.





Ли [Li] Чо Хао (р. 1913), американский химик и биохимик. Окончил Нанкинский университет в Китае (1933), с 1950 г. — профессор биохимии и экспериментальной эндокринологии Калифорнийского университета в Беркли (США). Внес значительный вклад в изучение гормонов гипофиза. Выделил, установил строение и осуществил химический синтез таких гормонов, как АКТГ, липотропный гормон, гормон роста.

ный и солевой баланс, стимулирует развитие вторичных половых признаков.

Секретция пролактина находится под контролем гипоталамических факторов, в частности, пока не охарактеризованного химически пролактин-релизингибирующего фактора. Секретцию пролактина стимулируют тиролиберин и другие факторы. Молекула пролактина (овцы) состоит из 198 аминокислот и содержит 3 дисульфидных мостика.

Гликопротеиновые гормоны аденогипофиза. Наиболее изучены три гормона аденогипофиза, обладающие субъединичным строением и, кроме белковой части, имеющие в своем составе углеводы: тиротропный гормон (тиротропин, ТСГ), лютеинизирующий гормон (лютропин, ЛГ) и фолликулостимулирующий гормон (фоллитропин, ФСГ). Эти гормоны проявляют разную биологическую активность, но имеют сходную структуру. Фоллитропин стимулирует созревание фолликулов у самок и сперматогенез у самцов. Лютропин вызывает у самок разрыв фолликулов с образованием желтого тела и стимулирует секрецию женских половых гормонов — эстрогена и прогестерона, а у самцов — секрецию тестостерона. Основная мишень действия тиротропина — щитовидная железа, он усиливает потребление железой йода из крови, биосинтез гормонов щитовидной железы (тироксина и три-йодтиронина) и секрецию этих гормонов в кровь.

Молекулы гликопротеиновых гормонов состоят из двух субъединиц, обозначаемых α и β , причем α -субъединицы всех гормонов одного вида животных идентичны, а β -субъединицы отличаются друг от друга. Пептидная цепь α -субъединицы у разных видов содержит 89 — 96 аминокислотных остатков, а β -субъединицы — 115 — 119 аминокислотных остатков. Обе цепи содержат углеводы.

Структуры гликопротеиновых гормонов аденогипофиза были установлены американскими исследователями Дж. Пирсом (1970) и Чо Хао Ли (1972 — 1974).

Паратгормон. Концентрация ионов кальция в крови меняется в очень узких пределах. Такое постоянство обеспечивается двумя гормонами. Один из них — паратгормон (ПТГ) — увеличивает уровень Ca^{2+} в крови, а другой — кальцитонин — уменьшает его. Одновременно оба этих гормона влияют на уровень фосфата в крови, потому что основным депо кальция в организме является скелет, где Ca^{2+} запасается в форме фосфата.

Паратгормон синтезируется и секретируется небольшими эндокринными железами — паращитовидными железами. Паратгормон быка представляет собой небольшой одноцепочечный белок, содержащий 84 аминокислотных остатка:

```

1                               10                               20
Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Ser-Ser-Met-Glu-Arg-
                               30                               40
Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-Gly-Ala-Ser-
                               50                               60
Ile-Ala-Tyr-Arg-Asp-Gly-Ser-Ser-Gln-Arg-Pro-Arg-Lys-Lys-Glu-Asp-Asn-Val-Leu-Val-
                               70                               80
Glu-Ser-His-Gln-Lys-Ser-Leu-Gly-Glu-Ala-Asp-Lys-Ala-Asp-Val-Asp-Val-Leu-Ile-Lys-
                               84
Ala-Lys-Pro-Gln

```

Он синтезируется в форме прогормона. Про-ПТГ имеет 6 дополнительных аминокислотных остатков в N-концевой части молекулы. Биологическая активность ПТГ определяется в основном N-конце-

вой частью его полипептидной цепи. Синтетический фрагмент ПТГ (1 — 34) обладает значительной биологической активностью, но укорочение его с N-конца всего на 1 аминокислотный остаток приводит к полной потере биологической активности.

Действие ПТГ на ткани связано с активацией им аденилат циклазы. Увеличение уровня сАМР в клетках усиливает активность системы транспорта Ca^{2+} .

Белки мышц и соединительных тканей

В этом разделе рассматриваются белковые системы, участвующие в организме в выполнении механической работы, а следовательно, в движении. Движение — важнейший признак живого, и принципы работы двигательных систем клетки и организма во многом уникальны. Перемещение хромосом в процессе деления клеток, проникновение вируса в бактерию, транспорт веществ через мембрану, наконец, движение микроорганизмов и работа мышц — это лишь немногие примеры трансформации химической энергии в энергию движения, заслуживающие подражания при создании машин и механизмов будущего.



Эдсалл (Edsall) Джон Тилестон (р. 1902), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1923), с 1928 г. работает в этом же университете. Известен фундаментальными работами по исследованию структуры мышц, открыл миозин.

Структура мышц

Мышцы представляют собой специализированную волокнистую ткань, основу которой образуют сильно вытянутые многоядерные клетки. Внутри такой клетки многочисленные волокна *миофибрилл* окружены плотной сетью мембранных структур — *саркоплазматическим ретикулумом* и омываются клеточной жидкостью — *саркоплазмой*. В то время как саркоплазма содержит главным образом растворимые ферменты и другие вещества, обеспечивающие функционирование мышц (фосфоорилаза, альдолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гликоген, креатинфосфат, АТФ, Ca^{2+} и др.), миофибриллы построены из нерастворимых *толстых и тонких белковых нитей*, непосредственно участвующих в мышечном сокращении. Толстые нити состоят из белка миозина, а главным компонентом тонких нитей является белок актин; комплекс миозина и актина называют *актомиозином*.

Исторический очерк. Фундаментальные работы по исследованию структуры мышц были выполнены в 30-е годы XX в. Дж. Эдсаллом, который открыл главный белок мышцы — миозин. В 1939 г. В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова установили, что миозин обладает ферментативной активностью и способен гидролизовать АТФ. Следующий важный шаг был сделан в Венгрии А. Сент-Дьёрдьи, который в 1942 г. обнаружил другой главный компонент мышцы — актин и показал, что актомиозиновый комплекс сокращается при действии АТФ. Детальный структурный анализ мышечного волокна был проведен в 50 — 60-х годах Х. Хаксли, предложившим теорию «скользящих нитей», являющуюся основой современных представлений о механизме мышечного сокращения.



Энгельгардт Владимир Александрович (1894—1984), советский биохимик, академик АН СССР (1953) и АМН СССР (1944). Окончил Московский университет (1919), организатор и директор Института молекулярной биологии АН СССР (1959—1984). Основные работы посвящены изучению закономерностей превращения фосфорных соединений в процессах клеточного обмена. Установил (1939, совместно с М. Н. Любимовой), что миозин обладает свойствами аденозинтрифосфатазы. Открыл дыхательное фосфорилирование на уровне клетки (1931). Герой Социалистического Труда (1969), лауреат Государственных премий СССР (1943, 1979).

При детальном анализе структуры миофибрилл методом фазово-контрастной микроскопии в них выявляется наличие повторяющихся звеньев (рис. 144). Функциональная единица миофибриллы (между Z-линиями) называется *саркомером*. Темные полосы принято называть А-дисками (анизотропными), а светлые — I-дисками (изотропными); центральная часть А-полосы является менее плотной (Н-зона) и рассекается М-линией.

Молекулярная структура миофибрилл характеризуется регулярной упаковкой толстых (диаметр 15 нм) и тонких (диаметр 7 нм) белковых нитей. При сокращении мышцы тонкие и толстые нити скользят друг относительно друга, ширина А-полосы остается постоянной, а зоны Н и I уменьшаются (рис. 145). При максимальном сокращении концы толстых нитей приходят в контакт с Z-ли-

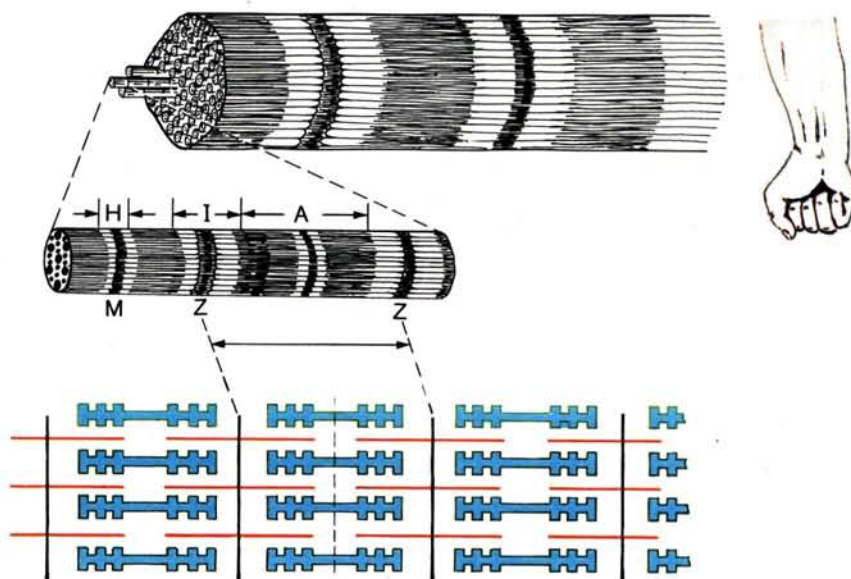


Рис. 144. Структура миофибрилл.

ниями саркомера. При расслаблении мышцы ее структура возвращается в первоначальное состояние. Сокращение инициируется электрическим импульсом, который вызывает деполяризацию плазматической мембраны (сарколеммы) мышечной клетки, это приводит к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Источником энергии при мышечном сокращении является гидролиз АТФ миозином. Синтез АТФ происходит за счет креатинфосфата, а также в результате осуществления гликолиза (гликогенолиза) и окислительных процессов.

Основой толстой нити является молекула миозина. Этот белок имеет молекулярную массу 480 000 и построен из двух тяжелых (по 200 000) и четырех легких (по 20 000) цепей (рис. 146).

При ограниченном протеолизе миозин расщепляется на ряд фрагментов. В частности, при обработке трипсином образуются легкий меромиозин (ЛММ) и тяжелый меромиозин (НММ) (А. Сент-Дьёрдьи, 1953). Тяжелый меромиозин обладает АТФ-

азной активностью и способен связываться с актином. Входящие в его структуру глобулярные «головки» миозина ответственны за ферментативную активность и связывание актина.

Толстая нить образуется путем агрегации молекул миозина, причем палочкообразные участки миозина формируют стержень нити, а «головки» оказываются ориентированными наружу по спирали (рис. 147, 148). Взаиморасположение толстых и тонких нитей изображено на рисунке 148; толстая нить осуществляет контакт с 6 соседними тонкими нитями. Тонкая нить состоит из мономеров актина (так называемого G-актина), упакованных в двунитчатые спиральные структуры (F-актин, рис. 149). В канавках спирали F-актина расположены молекулы тропомиозина, а через каждые 40 нм вдоль нити локализованы молекулы тропонина.

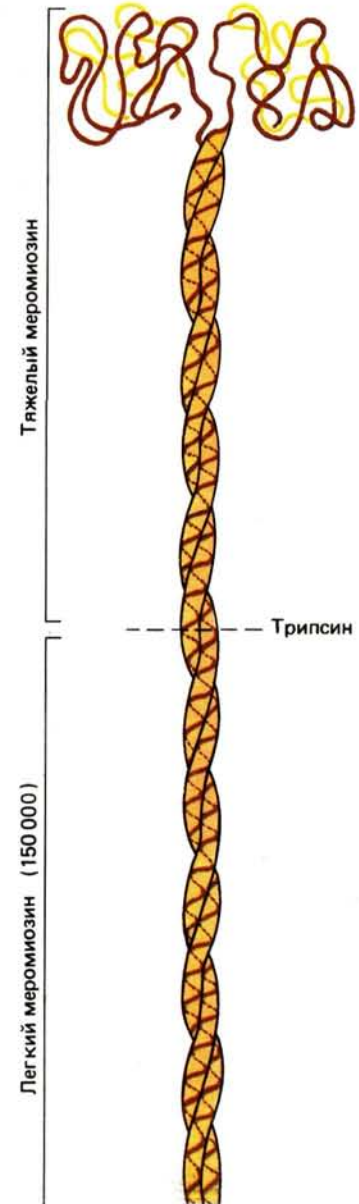
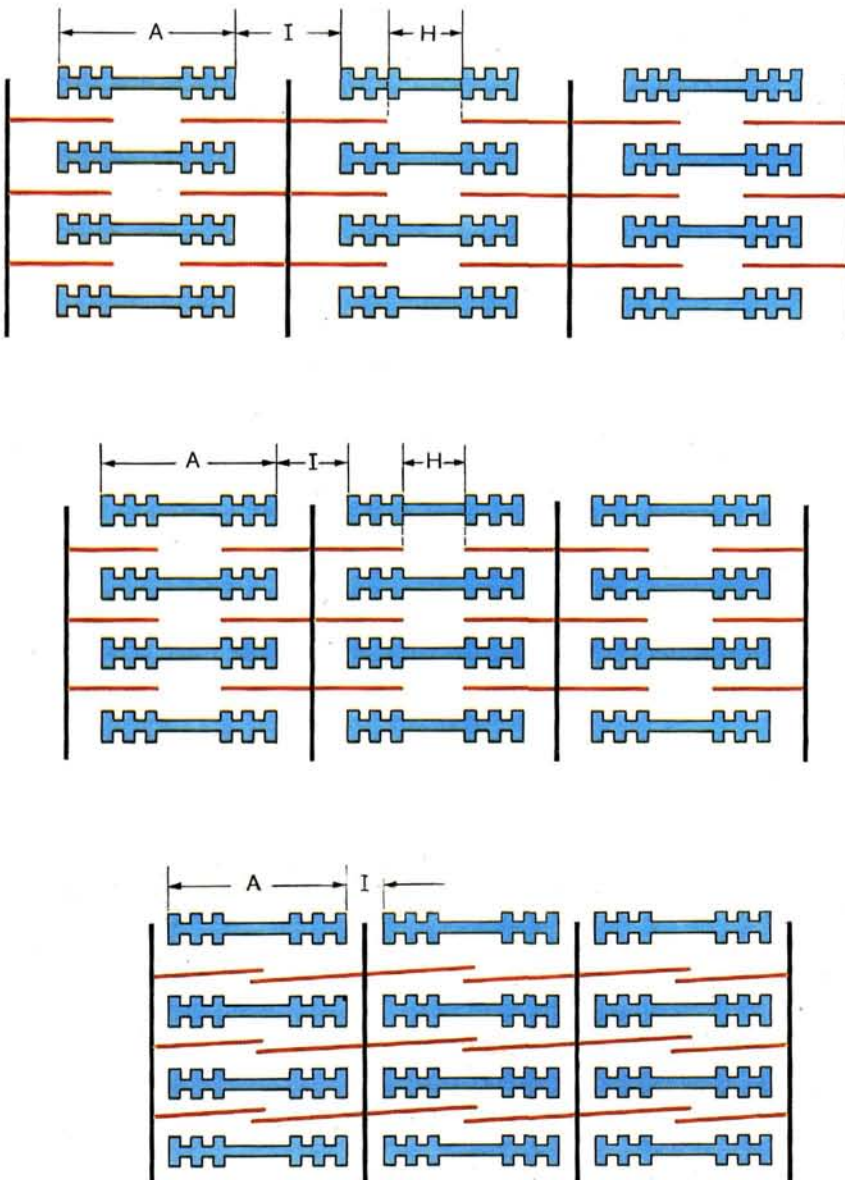


Рис. 146. Строение молекулы миозина.

Рис. 145. Схема скольжения нитей при мышечном сокращении.

и тропомиозин образуют комплекс, функциональная роль которого заключается в регуляции взаимодействия актина с миозином (с участием Ca^{2+}).

В процессе сокращения происходит чередование стадий образования и разрушения «сшивок» между головками молекул миозина и G-актиновыми участками тонких нитей.

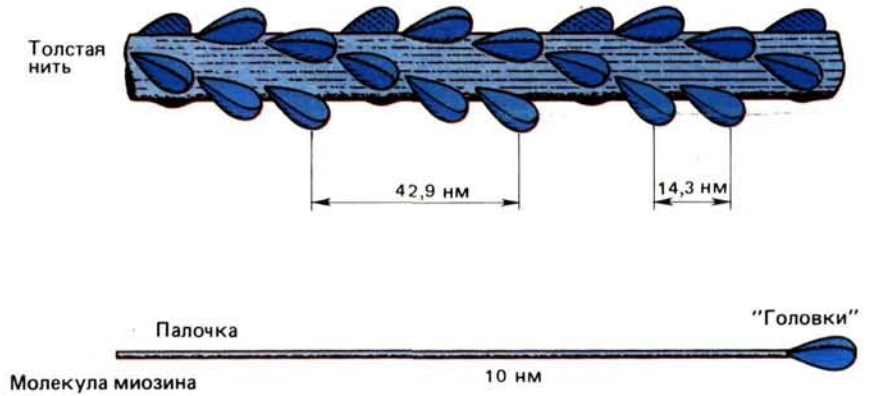


Рис. 147. Структура толстой нити миофибрилл.

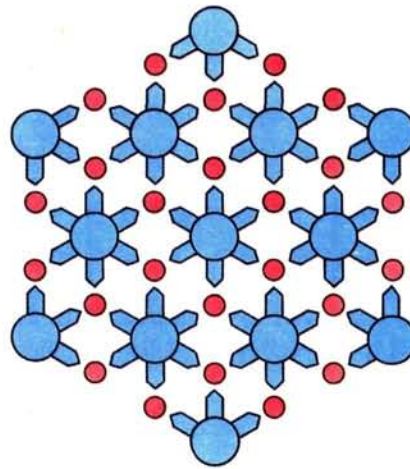


Рис. 148. Взаиморасположение толстых и тонких нитей миофибрилл.

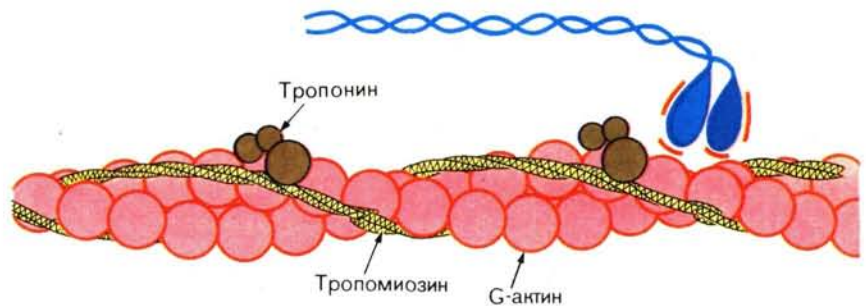


Рис. 149. Строение тонкой нити; образование комплекса с головкой миозина.

В таблице 11 представлена характеристика основных белков миофибрилл (включая минорные компоненты).

Таблица 11

Характеристика основных белков миофибрилл

Название белка	Локализация	Молекулярная масса	Субъединичный состав
Миозин	Толстая нить	480 000	2 × 200 000 4 × 200 000
С-Белок	Толстая нить	140 000	—
Актин	Тонкая нить	46 000	—
Тропомиозин В	Тонкая нить	130 000	2 × 65000
Тропонин	Тонкая нить	80 000	37 000 (Т) 24 000 (I) 18 000 (С)
α -Актинин	Z-Структура	180 000	2 × 90000
β -Актинин	”	”	”
М-Белок	М-Структура	180 000	2 × 90000

Коллаген

Волокна коллагена очень прочны, они входят в состав сухожилий, кожи, хрящей, кровеносных сосудов. Коллаген, составляющий около одной трети всех белков позвоночных, относится к *фибрилярным белкам*, образующим длинные нити — фибриллы. К таким белкам принадлежат также α -кератины волос и шерсти, фиброин шелка; основой их служат сплетенные вместе α -спиральные пептидные цепи. Впервые рентгенограммы фибриллярных белков были изучены в начале 30-х годов У. Астбери.

Коллагеновые нити образуются путем плотной укладки (четырьмя уступами) молекул *тропоколлагена* (рис. 150). Отдельные тро-

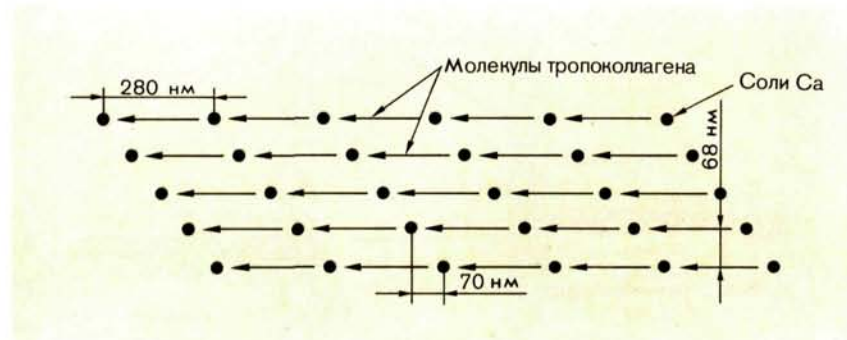
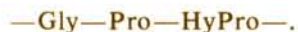


Рис. 150. Структура коллагеновой нити.

поколлагеновые молекулы не связаны между собой, в «разрывах» между ними нередко кристаллизуется фосфат кальция (например, в зубах и костях).

Тропоколлаген — основная структурная единица коллагена, имеет молекулярную массу 285 000 и состоит из трех полипептидных цепей — двух $\alpha 1$ и одной $\alpha 2$. Эти цепи находятся в особой, присущей лишь коллагену конформации и образуют тройную спираль. Аминокислотный состав цепей необычен и характеризуется высоким содержанием остатков глицина и пролина, а также наличием остатков 4-гидроксипролина и 5-гидроксизина. В аминокислотной последовательности цепей практически на каждом третьем месте находится остаток глицина, и наиболее часто повторяющийся фрагмент пептидной цепи имеет структуру



Полная первичная структура цепей определена в 1979 г. К. Кюном.

Биосинтез коллагена, осуществляемый в фибробластах, протекает весьма сложно. Сначала его цепи синтезируются на полисомах в виде предшественников, образуя проколлаген. В частности, предшественники $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -цепей имеют молекулярную массу свыше 120 000 каждый. Пептидные цепи затем гидроксилируются и гликозилируются посттрансляционно, как это схематически показано на рисунке 151.

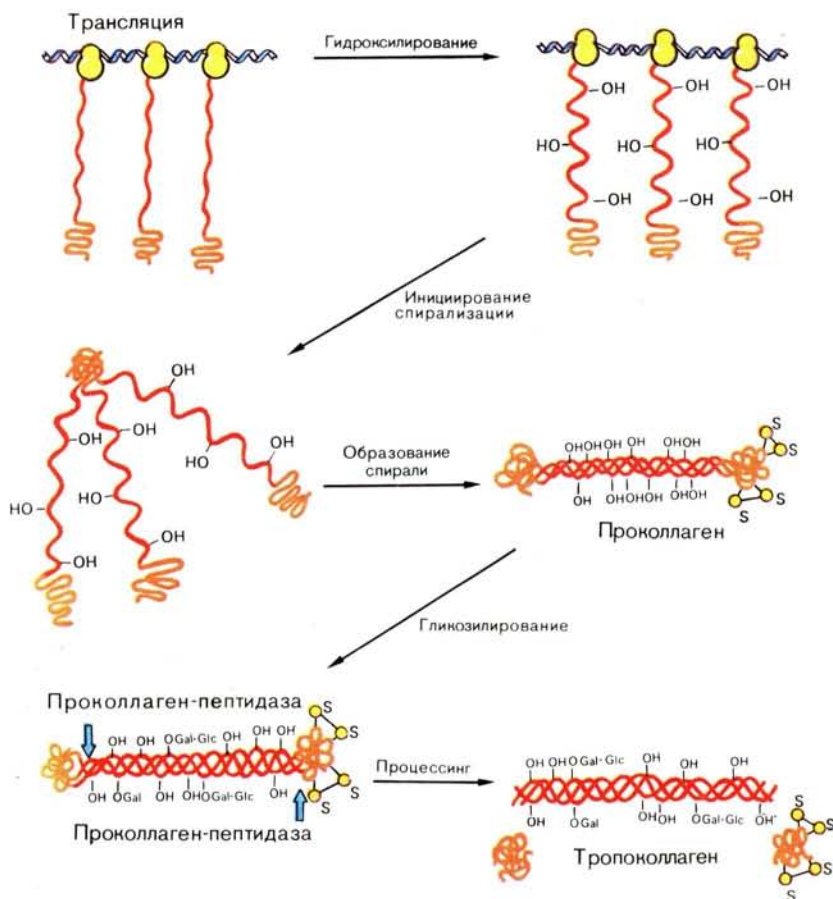


Рис. 151. Схема биосинтеза коллагена.

Гидроксилирование проколлагена осуществляется с участием фермента *проколлаген-гидроксилазы*, использующего в качестве кофактора витамин С (аскорбиновую кислоту) (см. с. 684). Коллаген, который синтезируется при недостатке или отсутствии витамина С, оказывается в существенной степени лишенным гидроксильных групп и соответственно О-гликозильных остатков, что препятствует образованию полноценных волокон и является причиной часто встречающихся поражений кожи, десен, ломкости сосудов и других признаков, характерных для цинги.

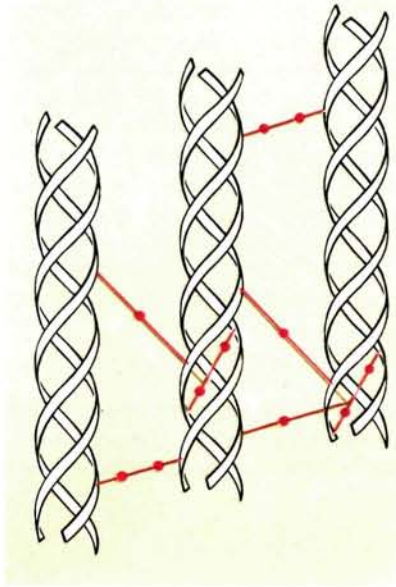
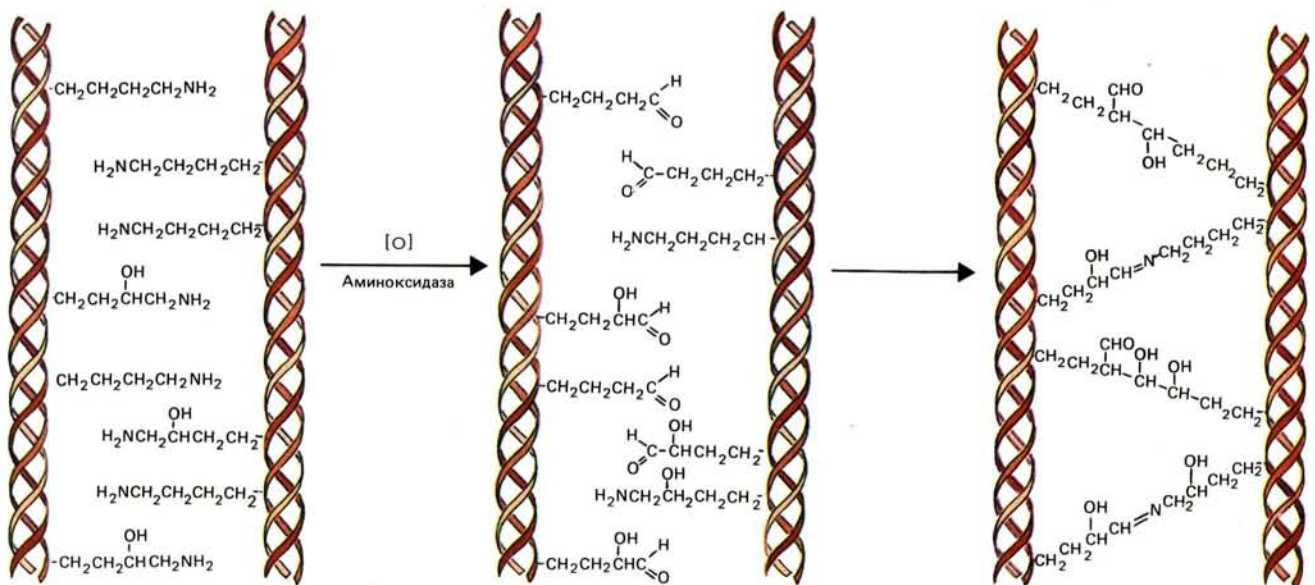


Рис. 152. Межмолекулярные и внутримолекулярные «сшивки» в коллагене.

Рис. 153. Типы ковалентных «сшивок» в коллагене.

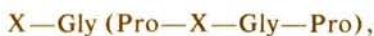


Прочность коллагеновых волокон (нить сечением около 1 мм выдерживает нагрузку более 10 кг) во многом достигается за счет дополнительных ковалентных «сшивок» между молекулами тропоколлагена (рис. 152).

Установлено, что в образовании «сшивок» участвуют главным образом остатки Lys и HyLys: их ферментативное окисление приводит к соответствующим альдегидам, вступающим в альдольную конденсацию или дающим «шиффовы основания» (рис. 153).

Строение образующихся «мостиков» устанавливается после их восстановления боргидридами металлов или гидролитического расщепления. Интересно, что употребление животными особого сорта гороха (*Lathyrus odoratus*) приводит к *латиризму*, т. е. неправильному развитию скелета, обусловленному поражением коллагенсодержащих тканей. Причиной является высокое содержание в горохе β-аминопропионитрила $H_2NCH_2CH_2CN$, являющегося мощным ингибитором Ca^{2+} -активируемой аминоксидазы; в результате не образуются альдегидные группировки и резко уменьшается процент «сшивок». Чистота «сшивок» зависит от функции и возраста ткани: коллагеновое волокно в мягких тканях (язык, хвост и т. п.) «сшито» слабо, а в случае ахиллесова сухожилия — прочно; молодые ткани имеют сравнительно небольшой процент «сшивок» и по этой причине оказываются лучше растворимыми.

Коллаген способен разрушаться под действием специфических ферментов-коллагеназ. В частности, одна из коллагеназ микробного происхождения (*Clostridium histolyticum*) гидролизует в коллагене связь



что приводит к тяжелому поражению соединительных тканей; это наблюдается при газовой гангрене. Существуют и тканевые коллагеназы, которые действуют специфично, вызывая ограниченный протеолиз коллагена.

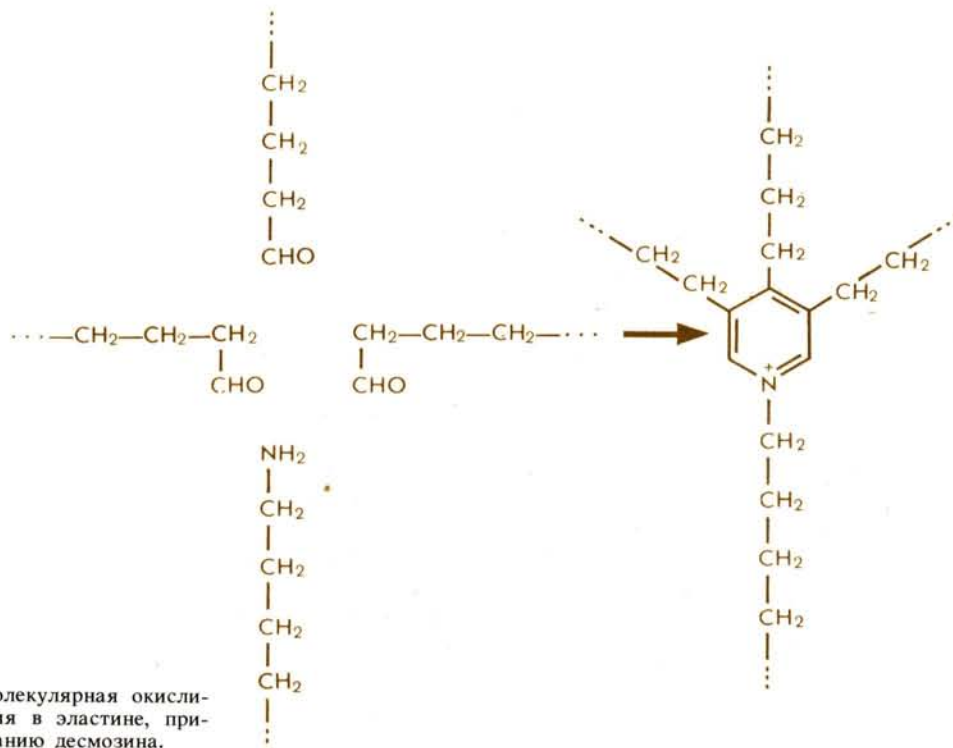


Рис. 154. Внутримолекулярная окислительная конденсация в эластине, приводящая к образованию десмозина.

Близким аналогом коллагена является *эластин* — белок эластичных волокон, содержащийся в стенках кровеносных сосудов, в связках, в тканях шеи у гусей и лебедей. Характерное свойство эластина — способность его растягиваться в несколько раз. В структурном отношении он аналогичен коллагену, однако имеет мало остатков HyPro и совсем не содержит остатков HyLys . Процент «сшивок» в молекуле эластина исключительно высок, встречаются и многокомпонентные «сшивки» в виде узлов, как, например, в случае образования производных десмозина (рис. 154). Эластиновые волокна не расщепляются трипсином, но медленно гидролизуются пепсином при $\text{pH}2$.

Коллаген и эластин практически нерастворимы в воде. При экстракции нерастворимого коллагена водой при $100\text{ }^\circ\text{C}$ получают растворы *желатина*, которые при охлаждении образуют гель.

Биологическая роль пептидов

Нейропептиды и пептидные гормоны

Нейропептиды

Нейропептидами принято называть пептиды, обнаруженные в мозге и способные влиять на функции центральной нервной системы. К этой же группе относятся пептиды гипоталамуса и гипофиза, обладающие широким спектром биологического действия. Несомненно, что число нейропептидов значительно, но лишь немногие из них изучены в достаточной мере. Большинство нейропептидов синтезируется нервными клетками.

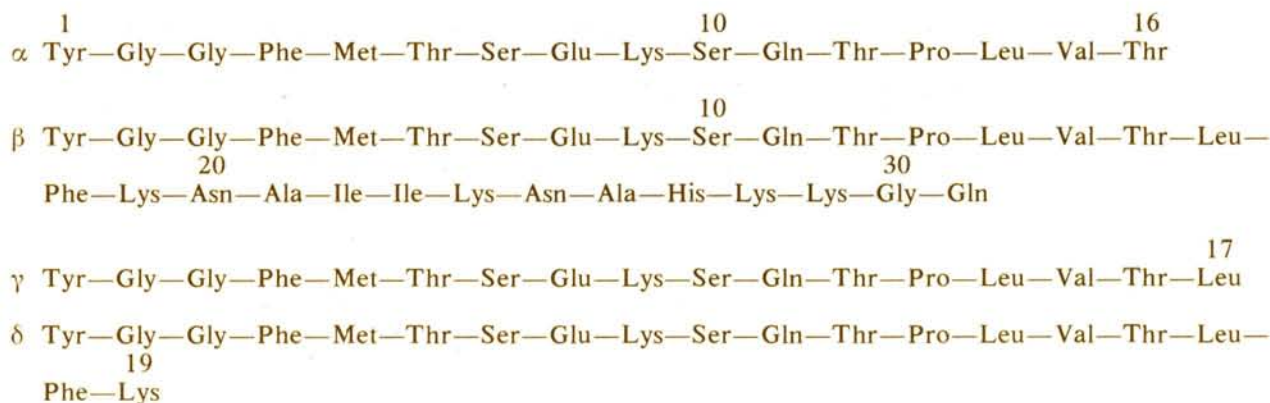
Энкефалины и эндорфины. Энкефалины и эндорфины — представители так называемых опиоидных пептидов, т. е. пептидов, действующих на морфиновые (опиатные) рецепторы головного мозга. Интерес к их изучению связан со способностью этих соединений, аналогично морфину, подавлять боль и вызывать состояние эйфории.

Систематические исследования морфина и его синтетических аналогов привели в 1973 г. к открытию опиатных рецепторов (С. Снайдер, Э. Саймон, Л. Терениус и др.) (позднее были идентифицированы их разные типы — μ , δ , κ). Поиск эндогенных лигандов к рецепторам привел к обнаружению и установлению строения двух энкефалинов, выделенных первоначально из мозга свиньи (Д. Хьюз, 1975), — *Met-энкефалина* и *Leu-энкефалина*.

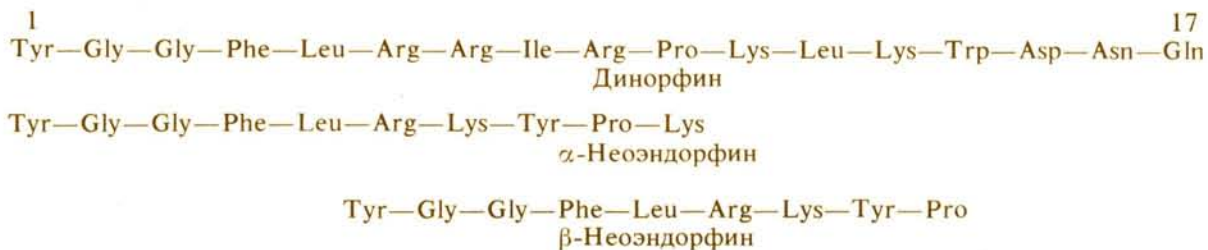
Тыр—Gly—Gly—Phe—Met
Тыр—Gly—Gly—Phe—Leu

Met-энкефалин
Leu-энкефалин

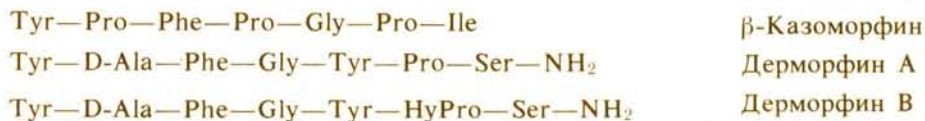
Вскоре были выделены и охарактеризованы другие пептиды этой группы — α -, β -, γ - и δ -эндорфины (эндогенные морфины) (Ч. Ли, Р. Гиллемин, 1975 — 1976):



Несколько позже удалось идентифицировать еще ряд опиоидных пептидов, а именно динорфин (1 — 17) из гипофиза свиньи (А. Гольдштейн, 1979) и α - и β -неоэндорфины (Г. Матсуо, 1980):



Пептиды с ярковыраженной опиоидной активностью выделены и из других источников: β -казоморфин (из гидролизатов казеина) и дерморфины А и В (из кожи южноамериканской лягушки):



Биологическое действие опиоидных пептидов связано с регуляцией болевых ощущений (анальгезия), эмоционального поведения, памяти, обучаемости. Подобно своим растительным аналогам,

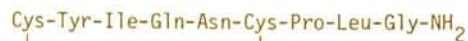
эти пептиды способны вызывать и явления, характерные для наркотиков,— привыкание, физическую зависимость, угнетение дыхания и сердечной деятельности. Не исключено, что механизм действия опиоидов основан на их участии в секреции ряда нейромедиаторов мозга — дофамина, ацетилхолина, норадреналина и т. п. Все биологические эффекты опиоидов подавляются одним антагонистом — налоксоном.

Синтезировано несколько сотен аналогов опиоидных пептидов, в частности энкефалина и динарфина, многие из которых обладают высокой активностью, пролонгированным действием и находят практическое применение. Относительно характера взаимодействия этих соединений с их рецепторами можно лишь утверждать — большинство нейропептидов данной группы имеют весьма подвижные конформации в растворах и их взаимодействие с рецептором лучше объясняется на основе концепции «динамического фармакофора» (взаимного индуцированного соответствия лиганда и рецептора).

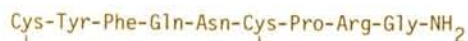
Окситоцин и вазопрессин — первые биологически активные пептиды, выделенные из нервной ткани (Дж. Абель, 1924). Структура этих нейрогормонов была подтверждена химическим синтезом (В. Дю Виньо, 1953) — впервые осуществленным полным синтезом природных пептидов (см. с. 126).



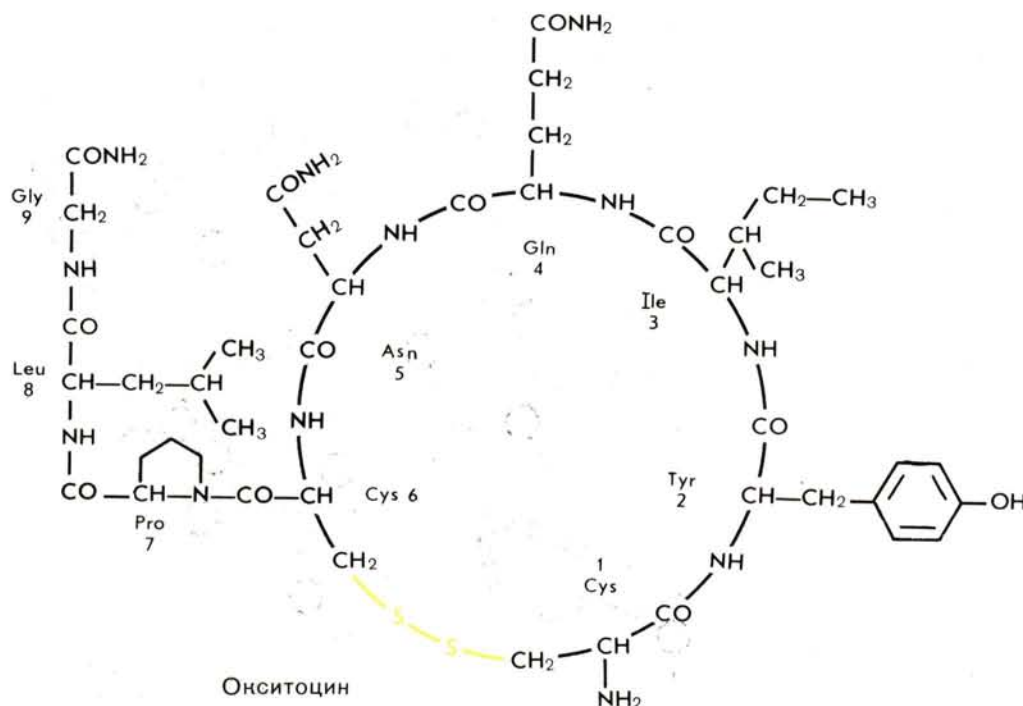
Дю Виньо [Du Vigneaud] Винсент (1901—1978), американский биохимик. Образование получил в Иллинойском университете в Нормале и Рочестерском университете, с 1938 г.— профессор медицинского колледжа Корнеллского университета. Основные работы — по изучению обмена аминокислот, химического строения витаминов и гормонов. Открыл витамин H, назвал его биотином и определил структуру. Выделил, расшифровал структуру и синтезировал гормоны окситоцин и вазопрессин. Лауреат Нобелевской премии по химии (1955).



Окситоцин



Вазопрессин





Швицер [Schwyzer] Роберт (р. 1920), швейцарский химик-биоорганик. Окончил Цюрихский университет; с 1963 г. — профессор Высшей технической школы в Цюрихе, основатель Института молекулярной биологии и биофизики ВТШ. Основные работы посвящены синтезу биологически активных полипептидов, изучению их конформации в растворе, выделению и изучению рецепторов гормонов. Осуществил (1963, совместно с П. Зибером) полный синтез АКГГ.

Конформация окситоцина в растворе установлена на основании данных ЯМР-спектроскопии (Р. Уолтер, Д. Урри) и отличается достаточной жесткостью (прежде всего за счет внутримолекулярной S—S-связи); в такой конформации легко прослеживается элемент β -структуры (рис. 155).

Окситоцин и вазопрессин отличаются весьма широким спектром биологического действия. Они влияют на сокращение гладкой мускулатуры: так, окситоцин вызывает сокращение гладких мышц матки (греческие слова $\delta\epsilon\upsilon\sigma$ + $\tau\omicron\chi\omicron\sigma$ означают «быстрые роды»), а вазопрессин сокращает периферические артериолы и капилляры и тем самым обуславливает повышение давления крови. Кроме того, окситоцин стимулирует лактацию, а вазопрессин оказывает заметное действие на водный обмен (является антидиуретическим гормоном) и способствует также распаду гликогена в печени. Оба гормона, а также их многочисленные аналоги широко используются в медицинской и сельскохозяйственной практике и производятся на основе химического синтеза в промышленных масштабах.

Оба гормона синтезируются в гипоталамусе и с помощью специальных белков-переносчиков (нейрофизинин I и II) поступают в нейрогипофиз.

Секреция вазопрессина и окситоцина происходит в ответ на возбуждение соответствующих нейронов. Поскольку вазопрессин регулирует в основном водный баланс в организме, то стимулами его секреции служат изменение осмотического давления крови, изменение артериального давления, аноксия. Нервные импульсы передают информацию об этих изменениях в головной мозг, и возбуждение соответствующих нейросекреторных клеток приводит к освобождению вазопрессина. Стимулами секреции окситоцина служат, в частности, нервные импульсы, возникающие в результате раздражения сосков при кормлении молоком.

Вазопрессин активирует в тканях — мишенях аденилатциклазу, и его «вторым мессенджером» служит сАМР. Таким посредником у окситоцина, вероятно, является Ca^{2+} . В печени вазопрессин функционирует также через инозиттрифосфатный механизм.

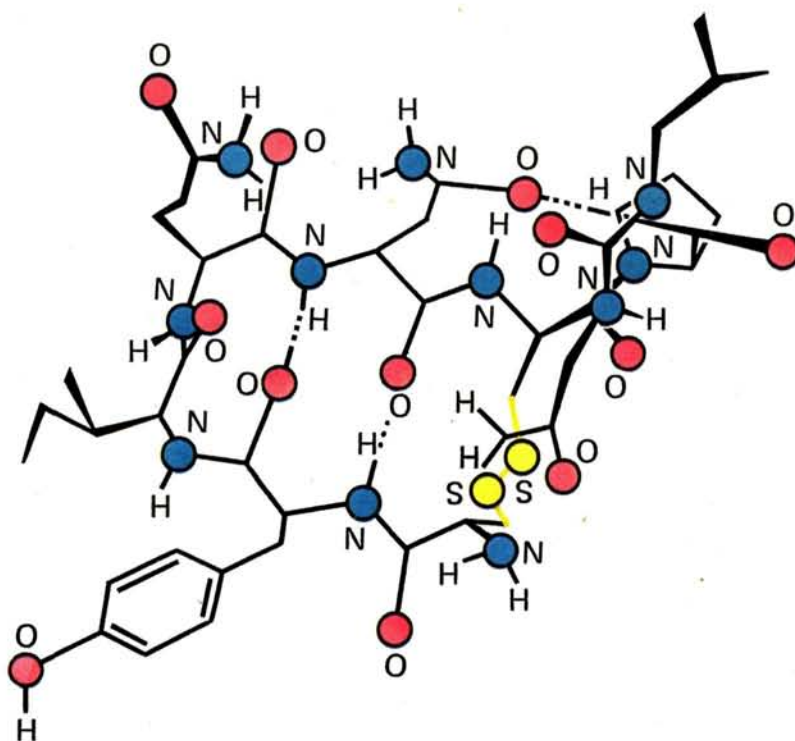


Рис. 155. Конформация молекулы окситоцина в растворе.

Имеются данные об участии вазопрессина в механизмах памяти, в частности вазопрессин стимулирует долговременную память. У животных с генетическими нарушениями в синтезе вазопрессина обнаруживается дефицит обучаемости.

Адренкортикотропный гормон. Адренкортикотропный гормон (АКТГ, кортикотропин) — 39-членный полипептид, вырабатываемый клетками передней доли гипофиза. На рисунке 156 представлены структуры АКТГ ряда животных и человека. Полный синтез 39-членного пептида со структурой, первоначально предложенной для АКТГ свиньи, был осуществлен в 1963 г. Р. Швицером и П. Зибером. Полученное соединение было близко по своим свойствам природному гормону, однако позднее структура последнего была уточнена. Синтез АКТГ человека был проведен независимо группами К. Хофманна и Р. Швицера.

Адренкортикотропный гормон обладает широким спектром биологического действия. Основным из вызываемых им эффектов заключается в стимуляции коры надпочечников, продуцирующей гормоны адаптации — кортикостероиды. Кроме того, АКТГ проявляет липотропную активность, стимулирует синтез жирных кислот в жировых клетках, снижает содержание глюкозы в крови, влияет на белковый обмен, нервную систему и поведение животных.

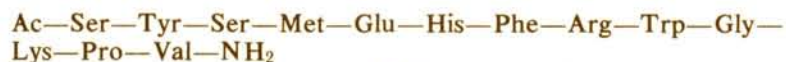
Хотя пространственное строение АКТГ окончательно не установлено, анализ биологического действия большого числа синтетических аналогов и природных вариантов гормона позволяет сделать важные выводы о закономерностях связи его структуры и функции. В частности, установлено, что фрагмент (1 — 24) обладает практически полной активностью АКТГ, он выпускается в промышленных масштабах под названием «Синактен» (фирма СІВА, Швейцария). Участок (25 — 33), где локализованы структурные различия, служит своего рода «антигенной детерминантой» при определении видовой специфичности и несуществен для проявления гормональной активности. Наконец, участки (11 — 20) и (4 — 10) важны для связывания с рецептором и генерации биологического импульса соответственно. Фрагмент АКТГ (4 — 10), получивший название «актона», входит в структуру ряда других гормонов гипофиза. Еще более короткий фрагмент (4 — 7) влияет на формирование рефлексов обучаемости у крыс.

Значительная часть работ по синтезу и исследованию взаимосвязи между структурой и функцией в ряду аналогов и фрагментов АКТГ выполнена венгерскими химиками К. Медзиградским, Л. Кишфалуди, С. Байюшем и сотрудниками.

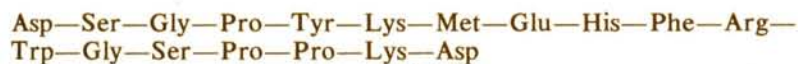
Меланоцитстимулирующие гормоны (МСГ, или меланотропины) выделяются из промежуточной доли гипофиза. Эти соединения способны стимулировать пигментные клетки (меланоциты), что приводит к усилению биосинтеза пигмента меланина и потемнению кожи (в опытах на земноводных).



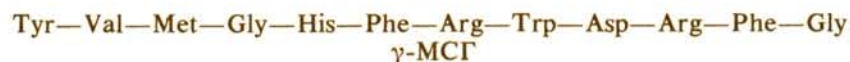
Хофманн [Hofmann] Клаус (р. 1911), американский химик-биоорганик. Окончил Высшую техническую школу в Цюрихе; с 1938 г. работает в США, с 1964 г. — профессор Питтсбургского университета. Основные работы посвящены химии стероидных и пептидных гормонов, терпенов, витаминов, ферментов. Открыл лактобацилловую кислоту, осуществил синтез меланоцитстимулирующего гормона, полный синтез АКТГ, провел первый частичный синтез рибонуклеазы А.



α -МСГ

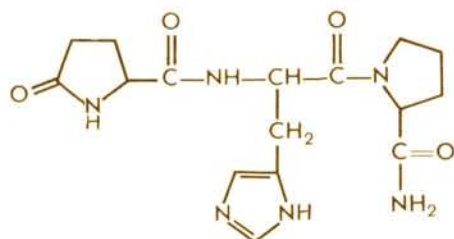


β -МСГ



γ -МСГ

Тиреолиберин (TRF) — один из самых маленьких природных пептидов: в нем всего три аминокислотных остатка. Его строение было установлено Р. Гиллемином с помощью синтетических методов; особенностью структуры является наличие остатка пироглутаминовой кислоты (>Glu).



Тиреолиберин
(>Glu-His-Pro-NH₂-)

Этот гормон стимулирует секрецию тиреотропина и пролактина, вероятно, путем активации аденилатциклазы.

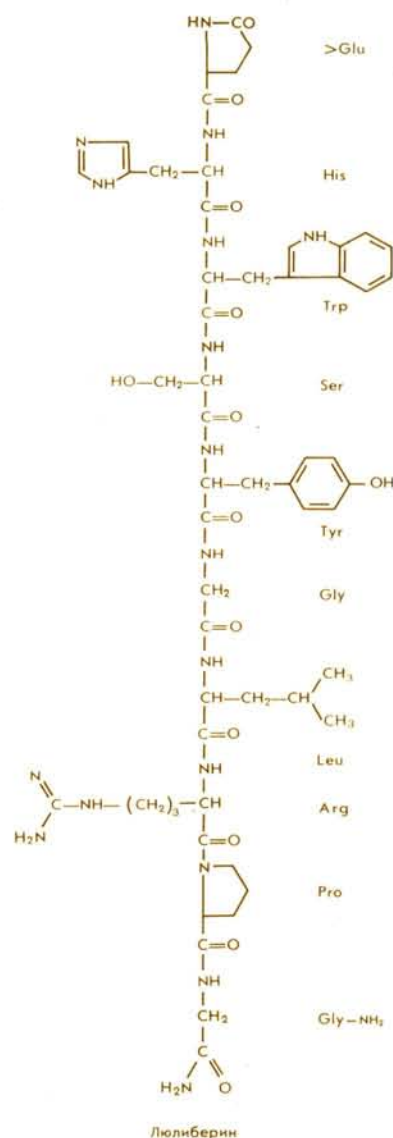
Аналогичной активностью обладает **люлиберин** (гонадолиберин), стимулирующий секрецию аденогипофизом лютеинизирующего гормона, или лютропина. Его структура была установлена в 1971 г. (Э. Шелли) и подтверждена полным синтезом (Р. Гиллемин).

Интересно, что ряд аналогов люлиберина, например [D-Trp⁶]-люлиберин и дез-Gly¹⁰-[D-Trp⁶, Pro⁹-NEt]-люлиберин, обладают в десятки раз более высокой активностью, чем природный гормон. Это связано, вероятно, с повышенной устойчивостью этих соединений к инактивации тканевыми ферментами. Аналоги люлиберина с пролонгированным действием успешно применяются при лечении некоторых форм бесплодия у женщин и в качестве контрацептивных средств. Весьма перспективно использование люлиберина в животноводстве для синхронизации эстрального цикла и других целей.

В 1973 г. Р. Гиллемином была определена структура гипоталамического фактора, ингибирующего синтез гормона роста (соматотропина), — этот фактор был назван соматостатином. Как и окситоцин, соматостатин представляет собой циклический дисульфид, его структура подтверждена полным синтезом (1974). Биологическую активность проявляют как восстановленная, так и окисленная формы гормона, в то же время аналоги соматостатина, неспособные образовывать дисульфидную связь, полностью неактивны.

Соматостатин ингибирует секрецию не только соматотропина, но и тиротропина, инсулина, глюкагона, гастрина и секретина. Соматостатин, влияющий на секрецию гормонов поджелудочной железы, не переносится в этот орган из гипоталамуса, а образуется непосредственно в других органах и тканях организма: в поджелудочной железе, в спинном мозге, в секреторных клетках вдоль всего желудочно-кишечного тракта.

Соматостатин — перспективное средство для лечения акромегалии (гигантизма), связанной с избыточным образованием соматотропина в гипофизе, а также некоторых форм диабета. Широкий



Люлиберин

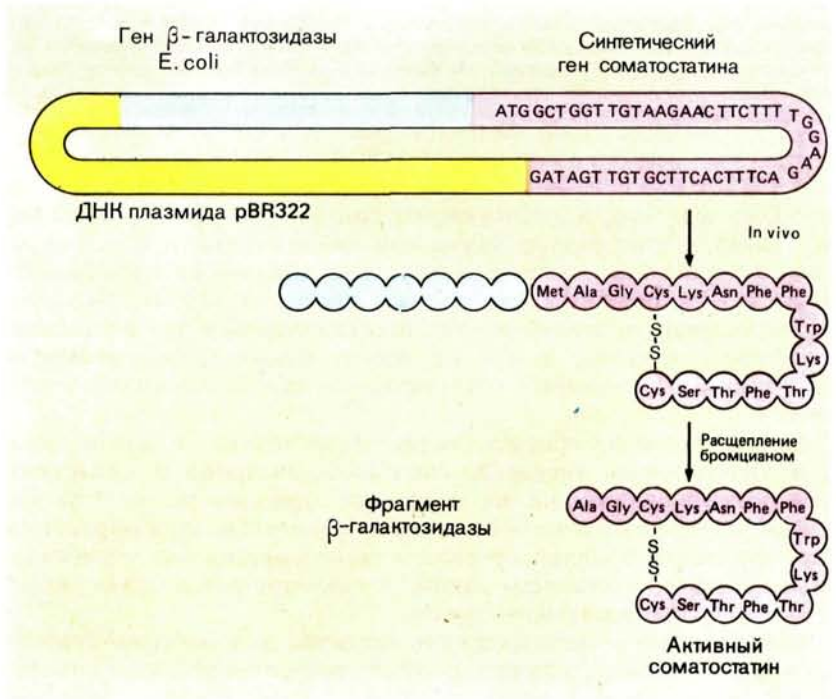
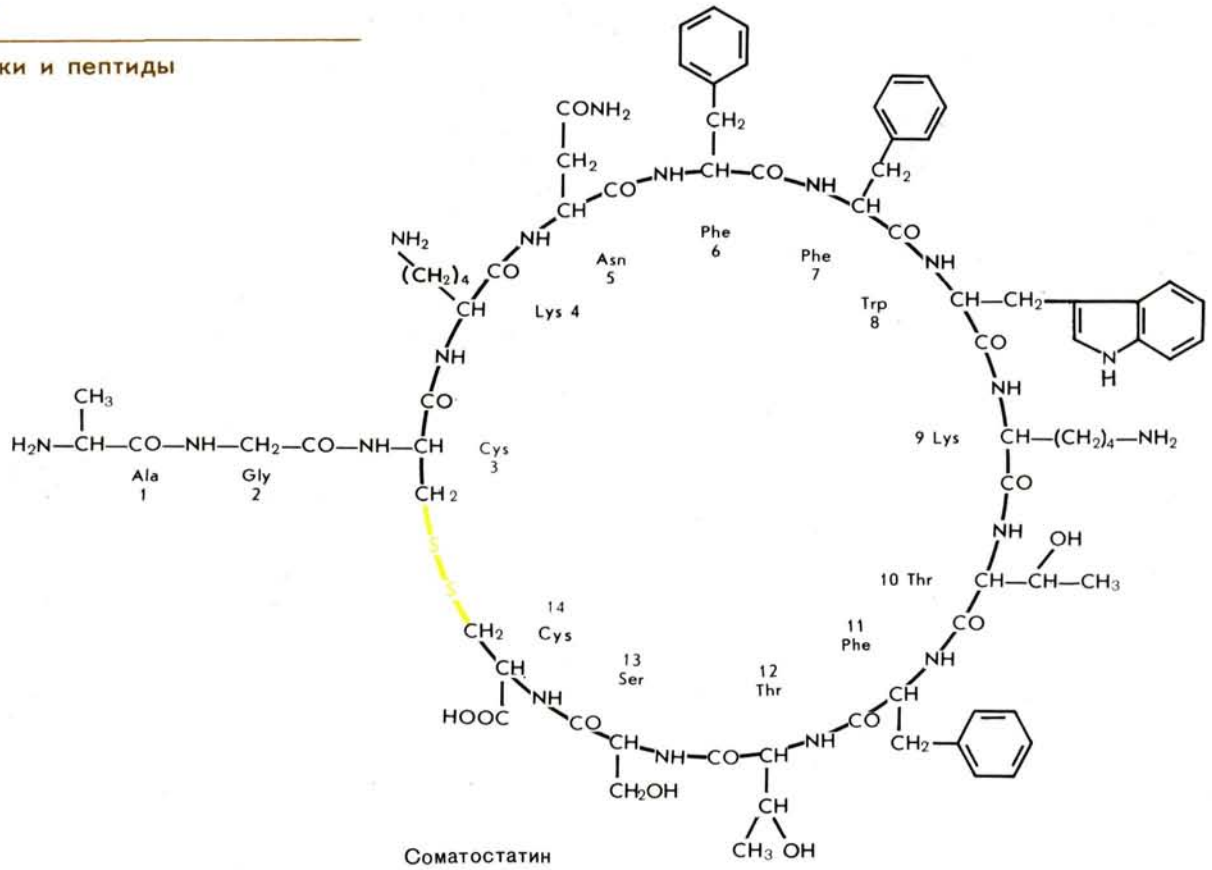


Рис. 157. Синтез соматостатина в бактериальной системе.

спектр и кратковременность действия соматостатина пока препятствуют его использованию в медицине. Усилия ученых-синтетиков направлены на получение аналогов гормона, обладающих большей специфичностью действия.

Соматостатин был первым гормоном животных, биосинтез которого был осуществлен методом геной инженерии. В 1977 г. К. Итакура и Г. У. Бойер с сотр. синтезировали ген соматостатина и встроили его в плазмиду. Клетки *E. coli* были трансформированы с помощью этой мизерной плазмидной ДНК, и в них синтезировался полипептид, включающий последовательность аминокислот, соответствующую соматостатину (рис. 157) (см. с. 437).

В настоящее время известны и другие пептиды класса либеринов и статинов. Помимо их основной, тропной активности, они действуют также на кору больших полушарий, мозжечок, влияют на поведение и двигательную активность и перспективны при лечении нервно-психических расстройств.

Вещество Р. Открыто в 1931 г. в связи с его способностью стимулировать сокращения гладкой мускулатуры, расширение сосудов и слюноотделение. Строение установлено в 1971 г.:

Arg—Pro—Lys—Pro—Gln—Gln—Phe—Phe—Gly—Leu—Met.

Вещество Р содержится в большом количестве в гипоталамусе, субстанции nigra и других отделах мозга; обнаружено также в спинном мозге. Оно регулирует двигательную активность и болевые ощущения, влияет на эмоции и поведение (например, подавляет агрессию). Широкий спектр фармакологической активности вещества Р связывают с его нейромодуляторными и нейромедиаторными функциями. Некоторые вопросы регуляторного действия вещества Р исследованы П. Оме с сотр. Среди синтетических аналогов вещества Р, находящихся практическое применение, наиболее известны препараты с сильным антистрессорным действием.

Пептиды-коннекторы. Одним из первых пептидов этой группы стал скотофобин, выделенный в США Г. Унгаром. В ходе экспериментов было установлено, что если крысу приучить избегать темноты, то в ответ на этот привитый рефлекс в мозге животного синтезируется скотофобин; при введении этого пептида контрольным животным рефлекс полностью воспроизводится. Строение скотофобина установлено в 1972 г. на основании масс-спектрометрического метода и химического синтеза:

Ser—Asp—Asn—Asn—Gln—Gln—Gly—Lys—Ser—Ala—Gln—Gln—Gly—Gly—Tyr—NH₂

Впоследствии были выделены и другие аналогичные пептиды из мозга белых крыс и золотых рыбок (амелитин, хромодиопсины, катабатмофобин и др.). В отношении биологической активности этих соединений, названных пептидами-коннекторами, пока существуют противоречивые данные.

Пептиды, действующие на сон. Большое внимание уделяется изучению нейропептидов, влияющих на сон, так как проблемы понимания природы сна и выяснения механизмов его регуляции постоянно находятся в поле зрения нейрофизиологов и медиков. Первые опыты, указывающие на существование гуморальных факторов сна, относятся к 1910 г. В 1977 г. швейцарские ученые М. Моннье и Г. Шененбергер установили строение пептида, названного ими DSIP (δ -sleep inducing peptide), который был выделен из церебральной венозной крови кроликов, подвергнутых электроча-



Иванов Вадим Тихонович (р. 1937), советский химик-биоорганик, академик АН СССР (1987). Окончил Московский университет (1960), с 1963 г.— в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области химии физиологически активных соединений белково-пептидной природы. Совместно с Ю. А. Овчинниковым установил конформационные особенности и механизм действия ионофоров валиномицина и эзниатинов (1969). Предложил комплексный подход к изучению пространственной структуры пептидов в растворах, определил пространственное строение грамицидина S, брадикинина и др. Лауреат Ленинской (1978) и Государственной (1985) премий СССР.

тых структур, находящихся в равновесии, причем первые, вероятно, ответственны за реализацию биологического действия. Так, циклический аналог нейропептида — цикло(—Gly—DSIP—) обладает значительной гипногенной и антистрессорной активностью.

Липотропины. В 1964—1967 гг. американский биохимик Чо Хао Ли выделил из гипофиза группу гормонов, стимулирующих липолиз в жировой ткани; они были названы α -, β - и γ -липотропинами. Эти гормоны являются белками, а не пептидами, но их рассмотрение в данной главе оправдано в связи с их ролью в биосинтезе нейропептидов. В частности, было установлено, что β -липотропин, содержащий 91 аминокислотный остаток, подвергается в мозге ферментативному расщеплению (процессингу) по пептидной связи между остатками 59 и 60 с образованием α -липотропина и β -эндорфина.

В настоящее время можно считать доказанным, что большая группа нейропептидов мозга синтезируется из более крупного предшественника, в состав которого входит также АКТГ. Из клеток опухоли гипофиза мыши удалось выделить гликозилированный белок с молекулярной массой около 30 000, который, по данным иммунохимического анализа, содержал антигенные детерминанты β -эндорфина, β -липотропина, АКТГ. В 1979 г. группа японских и американских авторов (Ш. Нума и др.) опубликовала полную аминокислотную последовательность биосинтетического предшественника нейропептидов, выведенную на основании анализа нуклеотидной последовательности соответствующего гена. Этот белок-предшественник был назван *препроопиомеланокортином*. Как следует из его структуры (рис. 158), ген кодирует всю последовательность белка, включая сигнальный пептид, γ -, β - и α -МСГ, АКТГ, α - и β -липотропин и β -эндорфин. При процессинге расщепление происходит почти исключительно по остаткам основных аминокислот (Lys, Arg) и осуществляется трипсиноподобными ферментами группы катепсина В или катепсина D.

Пока нет достоверного объяснения, почему природа предпочитает синтезировать несколько различных нейропептидов в виде общего предшественника. В то же время известно, что процессинг этого белка в разных клетках протекает по-разному. Помимо проопиомеланокортина, являющегося предшественником β -эндорфина, АКТГ и меланотропинов, существуют еще 2 независимых белка-предшественника опиоидных пептидов — проэнкефалин для Met- и Leu-энкефалинов и продинорфин — для α -неоэндорфина, динорфина (1 — 17), динорфина (1 — 8) и β -эндорфина.

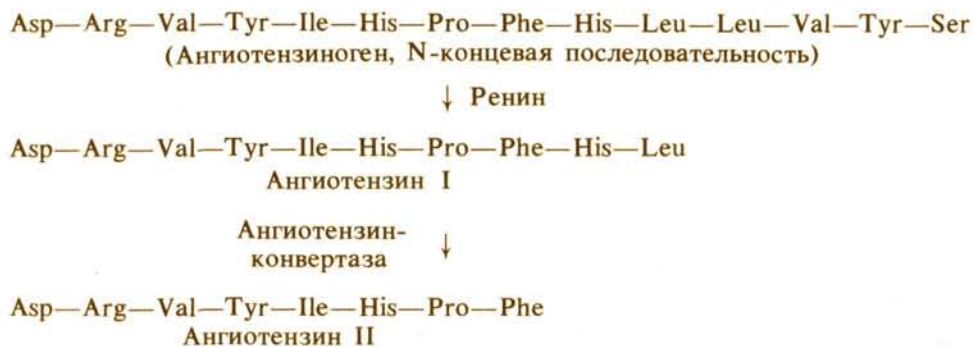
Пептидные гормоны

Наряду с нейропептидами, к числу которых относятся многие гормоны гипофиза и гипоталамуса, в животном организме функционирует большое число пептидных гормонов, выполняющих самые разнообразные биологические функции. Эти соединения, по существу, аналогичны уже рассмотренным белковым гормонам, и их отличает лишь формальная принадлежность к классу пептидов.

Тканевые гормоны образуются из неактивных предшественников в плазме крови и оказывают регулирующее действие на кровяное давление и сокращение гладкой мускулатуры; иногда их называют *кининовыми гормонами*. К ним относятся ангиотензин, каллидин и брадикинин.

А н г и о т е н з и н. В конце XIX в. было установлено, что почки участвуют в регуляции артериального кровяного давления, и вскоре из коры почек было выделено вещество, названное *ренином*, которое при внутривенном введении кроликам вызывало повышение давления крови. Характерно, что клетки почек выделяют в кровь ренин в ответ на понижение кровяного давления, уменьшение эффективного объема крови, снижение концентрации Na^+ в крови и т. п., определение содержания ренина в крови используется в диагностике инфаркта миокарда и других заболеваний.

Механизм действия ренина, представляющего собой термостабильную пептидазу, связан с расщеплением сывороточного α_2 -глобулина, или ангиотензиногена, с образованием декапептида ангиотензина I; последний при участии ангиотензин-конвертирующего фермента отщепляет С-концевой дипептид и превращается в ангиотензин II, обладающий ярковыраженным прессорным действием:



Ангиотензин II действует на гладкие мышцы кровеносных сосудов; кроме того, он стимулирует секрецию клетками коры надпочечников стероидного гормона альдостерона, влияющего на солевой обмен в организме. Синтетические аналоги ангиотензина используются в медицинской практике.

К а л л и д и н и б р а д и к и н и н, в отличие от ангиотензина, снижают кровяное давление. Брадикинин впервые был обнаружен после инкубации плазмы крови со змеиным ядом или трипсином, а каллидин был найден в сыворотке после инкубации ее с калликреином — сериновой протеиназой из мочи. Схема образования каллидина и брадикинина представлена на рисунке 159.

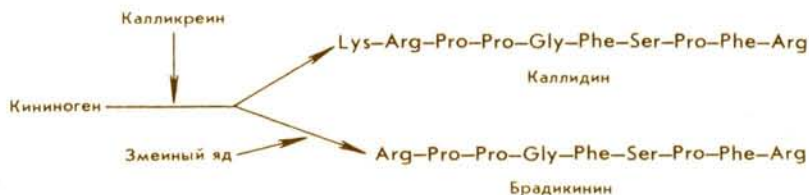
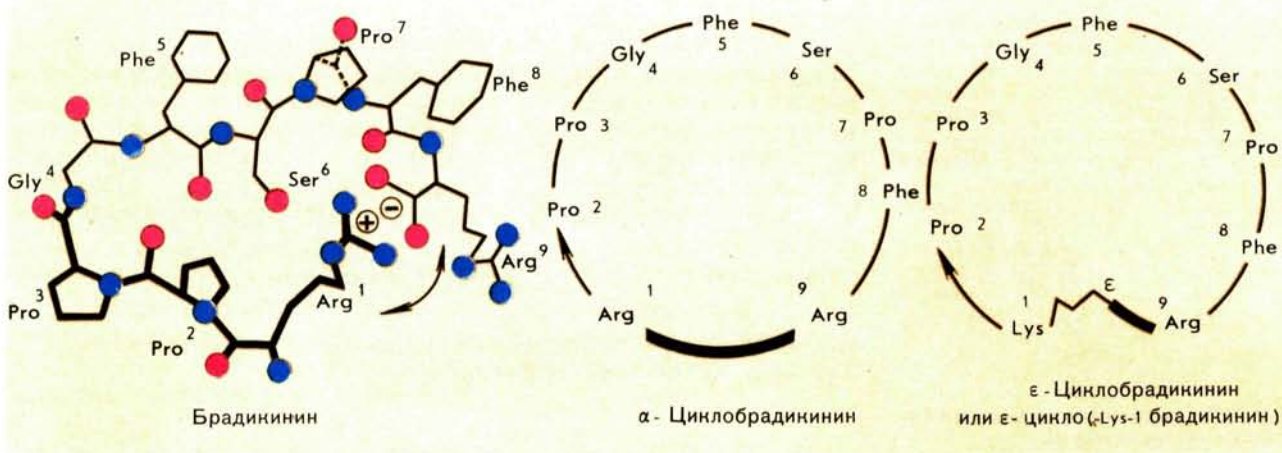


Рис. 159. Схема образования кининов.

Каллидин и брадикинин обладают во многом сходным действием. Они увеличивают проницаемость капилляров, проявляют мощный гипотензивный эффект. В низких концентрациях брадикинин стимулирует сокращение гладкой мускулатуры кишечника, а в более высоких — сокращение мышц матки. При введении в организм брадикинин вызывает сильные болевые ощущения.

Пространственное строение брадикинина исследовалось с помощью комплекса физико-химических и теоретических методов. Согласно этим данным (В. Т. Иванов и Г. И. Чипенс) для брадикинина возможно образование свернутых структур, стабилизированных ионными взаимодействиями С-концевого карбоксила и гуанидиновой группы N-концевого аргинина. Вероятность таких взаимодействий повышается при переходе к органическим растворителям и в комплексе с рецептором. Действительно, циклические аналоги брадикинина обладают высокой биологической активностью.



В 1979 г. все компоненты ренин-ангиотензивной системы были обнаружены и в мозге. Можно считать установленным, что ангиотензин и брадикинин участвуют в функционировании центральной нервной системы. Брадикинин является одним из медиаторов боли, а ангиотензин II вызывает ощущение жажды.

Кальцитонин. Гормон, снижающий концентрацию Ca^{2+} в крови, был открыт в 1964 г. Он синтезируется в парафолликулярных клетках щитовидной железы, вероятно, в форме прогормона. Эти секреторные клетки резко отличаются по своей морфологии от фолликулярных клеток, где синтезируются иодсодержащие гормоны щитовидной железы.

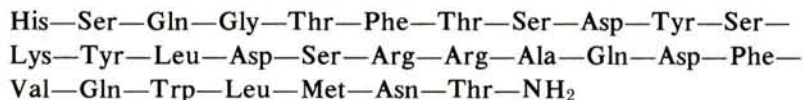
В настоящее время известна первичная структура кальцитонинов нескольких видов животных (рис. 160). Хотя в состав кальцитонина входит всего 32 аминокислотных остатка, расшифровка его первичной структуры была сопряжена с определенными трудностями.

Основная функция кальцитонина состоит в регуляции кальциевого обмена. Он стимулирует аденилатциклазу в костных клетках.

1	Cys			
2	Ser			Gly
3	Asn			
4	Leu			
5	Ser			
6	Thr			
7	Cys			
8	Val	Met	Met	
9	Leu			
10	Ser	Gly	Gly	
11	Ala	Lys	Thr	
12	Tyr	Leu		
13	Trp	Ser	Thr	
14	Arg	Lys	Gln	
15	Asp	Asp	Asp	
16	Leu		Phe	
17	Asn	His		
18	Asn	Lys	Lys	
19	Phe	Tyr	Leu	
20	His		Gln	
21	Arg		Thr	Thr
22	Phe	Tyr		
23	Ser		Pro	Pro
24	Gly		Arg	Gln
25	Met		Thr	Thr
26	Gly		Asn	Ala
27	Phe		Thr	Ile
28	Gly			
29	Pro	Ala	Val	
30	Glu	Gly	Gly	
31	Thr	Val	Ala	
32	Pro			
	1	2	3	4

Рис. 160. Аминокислотная последовательность кальцитонина:
1) свиньи; 2) овцы; 3) лосося; 4) человека.

Глюкагон. В поджелудочной железе, помимо инсулина, вырабатывается другой гормон, влияющий на обмен углеводов — глюкагон. Этот 29-членный пептид вызывает повышение уровня глюкозы в крови за счет стимуляции расщепления гликогена в печени, увеличивает содержание глюкозо-6-фосфата в мышцах и обладает липолитическим действием.

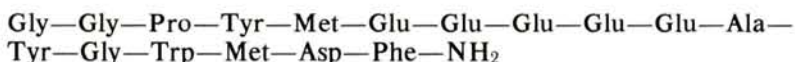


Полный синтез глюкагона осуществлен в 1968 г. (Э. Вюнш и сотр.). По данным рентгеноструктурного анализа (Т. Бландел), молекула глюкагона преимущественно находится в α -спиральной конформации и склонна к образованию олигомеров.

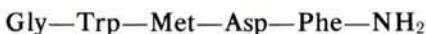
Гормоны желудочно-кишечного тракта. В регуляции процессов пищеварения важную роль играет многочисленная группа пептидных гормонов — гастрин, холецистокинин-панкреозимин, секретин и др.

Гастрин был открыт в 1905 г. в слизистой желудка свиньи. Как установлено в настоящее время, он секретируется клетками многих отделов желудочно-кишечного тракта и его секреция стимулируется приемом пищи. Главное биологическое действие гастрин связано с секрецией желудком соляной кислоты; кроме того, он влияет на сократимость желудка, ингибирует адсорбцию воды и электролитов подвздошной кишкой, стимулирует выделение ферментов.

Структура гастрин I выяснена в 1964 г.:



Гастрин II, в отличие от гастрин I, имеет сульфатированный остаток Tyr¹². С-Концевой пептид гастрин I



обладает практически полным биологическим действием гормона. Этот аналог, а также синтетический пептид



выпускаются на основе химического синтеза в промышленных масштабах и широко применяются в практике.

Первый полный синтез гастрин осуществлен в 1966 г. (Г. Кеннер и сотр.). В плазме крови обнаружен предшественник гастрин, получивший название «большого гастрин» (мол. масса 7 000).

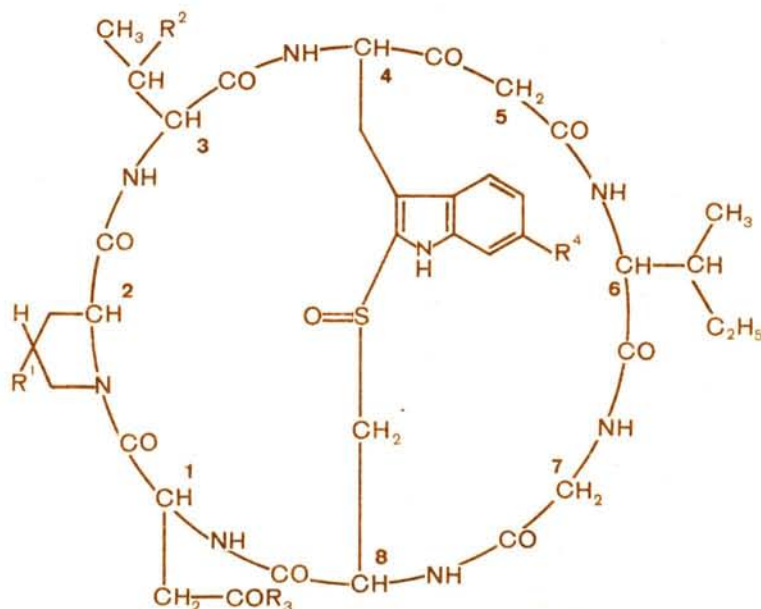
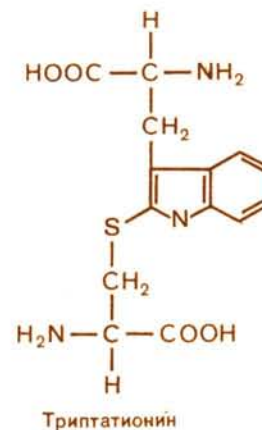
Холецистокинин-панкреозимин (ХЦК-ПЗ) имеет двойное название, поскольку два основных вызываемых им физиологических эффекта — сокращение желчного пузыря и стимуляция секреции пищеварительных ферментов поджелудочной железой — первоначально приписывались двум разным гормонам. Лишь в 1964 г. был выделен 33-членный пептид, обладающий этими двумя видами физиологической активности. Интересно отметить,

Как легко видеть, микотоксины являются циклопептидами необычной структуры. Фаллоидин и α -аманитин представляют собой бициклические системы, в которых «мостик» образован бифункциональной аминокислотой — триплатионином (продукт окислительной конденсации L-Trp и L-Cys).

Кроме того, в состав этих циклопептидов входят L-аллогидроксипролин, L-аланин, D-треонин- γ , δ -дигидрокси-L-лейцин (2-амино-4,5-дигидроксиизогексановая кислота) и другие остатки. Строение фаллоидина было подтверждено его полным синтезом (Т. Виланд, Э. Мунката, 1977). Структурные вариации природных компонентов *Amanita* показаны на примере наиболее токсичных аматоксинов.

Среди грибников случаи смертельного отравления бледной поганкой достаточно часты. Токсины содержатся в грибах в высокой концентрации (аматоксины — 0,4 мг на 1 г массы), и поскольку смертельная доза для человека составляет 5 — 7 мг, то один съеденный гриб может вызвать летальный исход.

Механизм биологического действия аматоксинов связан с ингибированием эукариотической ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Фаллоидин необратимо связывается с примембранным актином, вызывая его полимеризацию, что, в свою очередь, приводит к нарушению морфологии мембран гепатоцитов.



Аматоксин	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
α - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	NH ₂	OH
β - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	OH	OH
γ - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₃	NH ₂	OH
ϵ - Аманитин	OH	CH(OH)CH ₃	OH	OH
Аманин	OH	CH(OH)CH ₂ OH	OH	H
Амануллин	OH	C ₂ H ₅	NH ₂	OH
Проамануллин	H	C ₂ H ₅	NH ₂	OH



Виланд [Wieland] Теодор (р. 1913), немецкий химик. Окончил Мюнхенский университет (1937), в 1968—1981 гг.— профессор Института медицинских исследований Общества М. Планка в Гейдельберге (ФРГ). Известен работами в области химии пептидов. Предложил новые методы пептидного синтеза с использованием смешанных ангидридов и тиоловых эфиров. Установил строение пептидных токсинов из грибов рода *Amanita* — фаллоидина и аманитина, а также соответствующего антитоксина антаманида.

Большая часть последовательности токсина представлена остатками гидрофобных аминокислот, но в С-концевой области расположен кластер положительно заряженных остатков

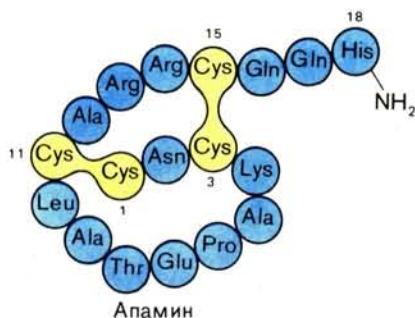
(Lys—Arg—Lys—Arg).

Такое строение обуславливает свойства мелиттина как катионного детергента и его высокую поверхностную активность. Основное биологическое действие мелиттина связано со способностью нарушать структуру мембран. В частности, он вызывает лизис различных клеток и является сильным гемолитиком. Имеются данные о том, что биосинтез мелиттина включает образование соответствующих предшественников (препромелиттина и промелиттина).

Синтез мелиттина и ряда его аналогов был осуществлен Э. Шредером в 1971 г. Характерной особенностью поведения мелиттина в растворе является способность его к агрегации и образованию тетрамеров. Агрегации способствуют высокие концентрации токсина, а также повышение ионной силы и pH раствора. Методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 0,28 нм пространственная структура была установлена для кристаллов тетрамерного мелиттина, полученных из водного раствора.

Большое число работ посвящено изучению взаимодействия мелиттина с природными и искусственными мембранами и выяснению конформации токсина, связанного с липидами. Обнаружено, в частности, что мелиттин индуцирует в бислоях ионную проводимость. Характер зависимости этой проводимости от приложенного к мембране потенциала позволил высказать предположение о том, что 4 молекулы мелиттина образуют в мембране потенциал-зависимый канал (Д. Тостесон, 1981). Не исключено, однако, что индуцированная мелиттином проводимость обусловлена не образованием дискретных каналов, а нарушениями структуры липидного бислоя.

Другой токсичный компонент яда пчел *Apis mellifera* — апамин отличается ярковыраженным действием на центральную нервную систему. Первичная структура апамина установлена в 1967 г. Он содержит 18 аминокислот и является одним из самых небольших известных пептидных нейротоксинов.



В ряде лабораторий осуществлены синтезы апамина и его аналогов. С помощью ЯМР-спектроскопии была выяснена конформация апамина в растворе (В. Ф. Быстров). Характерной чертой строения апамина (рис. 161) является наличие α -спирали (остатки 6 — 16) и β -изгиба (остатки 2 — 5).

Апамин действует на периферическую и центральную нервную систему в концентрации 10^{-5} — 10^{-7} М. Установлено, что мишенью

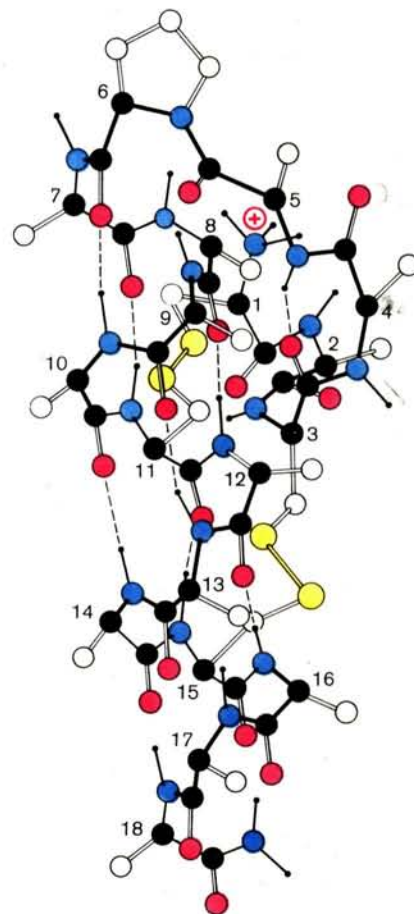


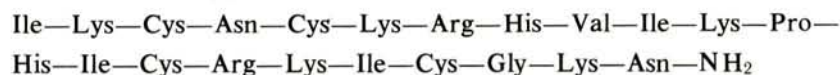
Рис. 161. Конформация молекулы апамина в растворе.



Тостесон [Tosteson] Дэннел С. (р. 1925), американский биофизик. Окончил Гарвардский университет (1949), работает на медицинском факультете того же университета. Основные работы посвящены изучению молекулярных механизмов ионного транспорта через клеточные мембраны.

действия апамина являются Ca^{2+} -зависимые K^{+} -каналы. Апамин специфично и с высоким сродством связывается с соответствующим рецептором ($K_d \approx 2 \cdot 10^{-14} \text{M}$).

MCD-пептид (Must Cell Degranulating peptide) — это соединение, называемое также пептидом 401, содержится в пчелином яде и способно приводить к выделению гистамина из тучных клеток крысы. Структура этого пептида была установлена в конце 60-х годов:



Структурное подобие MCD-пептида и апамина не проявляется в характере биологической активности этих компонентов пчелиного яда: MCD-пептид не действует на центральную нервную систему. Вызываемая им дегрануляция тучных клеток и высвобождение гистамина приводят к воспалительным явлениям.

Нейротоксины из яда змей и скорпионов

Среди пептидных токсинов наиболее хорошо изучены токсические компоненты змеиных ядов, прежде всего нейротоксины постсинаптического действия, блокирующие рецепторы ацетилхолина. Такие нейротоксины присутствуют в яде змей семейства элапидов (кобры, мамбы, крайта), а также многих морских змей.

По своей структуре постсинаптические нейротоксины подразделяются на два класса: «короткие» и «длинные» токсины, состоящие из 60 — 62 или 71 — 74 аминокислотных остатков с 4 или 5 внутримолекулярными дисульфидными связями соответственно

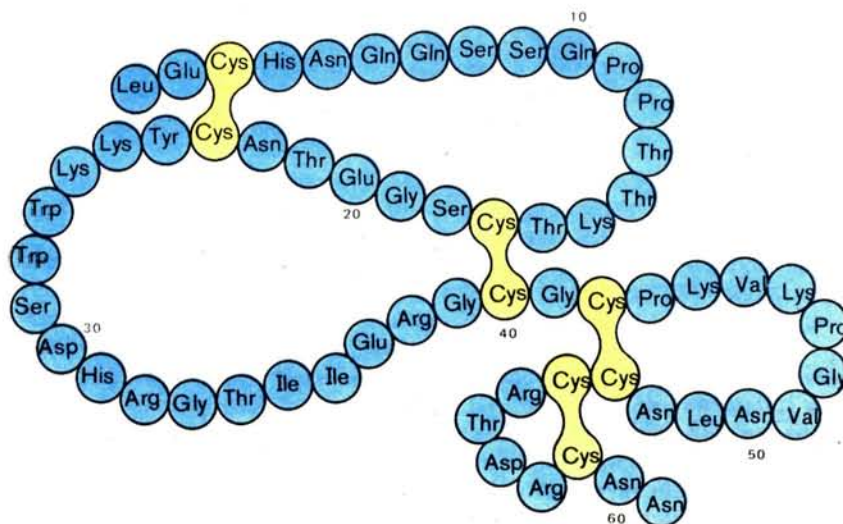


Рис. 162. Структура нейротоксина «короткого» типа из яда кобры *Naja naja oxiana* (Е. В. Гришин, 1974).

Этот токсин, получивший название «кротамин», является единственным нейротоксином яда змей, действующим на натриевые каналы электровозбудимых мембран, подобно растительному нейротоксину вератридину.

В яде скорпионов содержатся нейротоксины, замедляющие скорость инактивации быстрых натриевых каналов. Они представ-

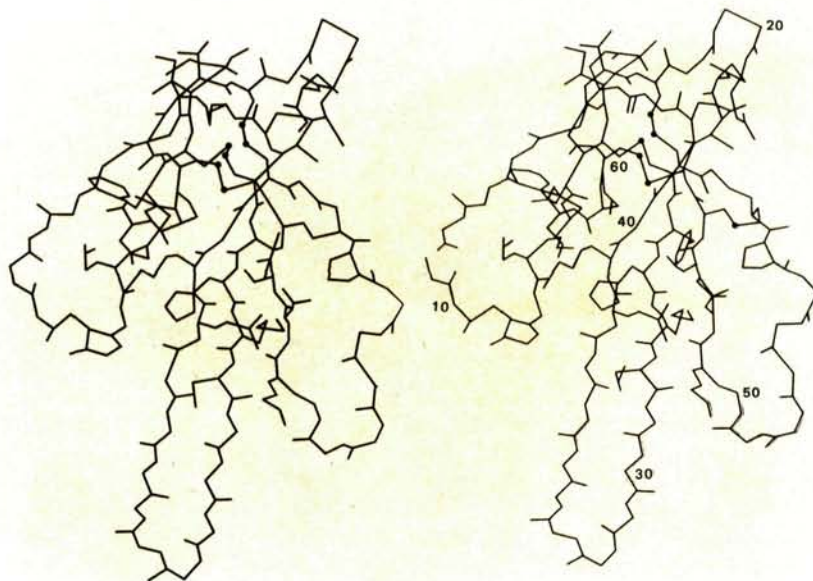


Рис. 164. Стереобразение кристаллической структуры нейротоксина «короткого» типа эрабутоксина b из яда морской змеи *Laticauda semifasciata* (разрешение 0,25 нм).

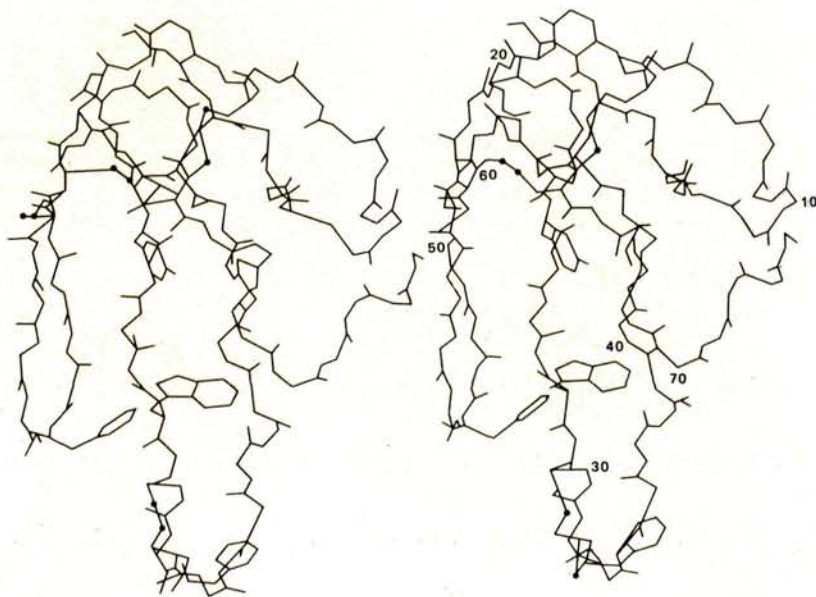


Рис. 165. Стереобразение кристаллической структуры нейротоксина «длинного» типа α -бунгаротоксина из яда крайта *Bungarus multicinctus*.

ляют собой гомологичные полипептиды молекулярной массы 6000 — 8000 с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. По своей структуре они довольно сильно отличаются от нейротоксинов яда змей (рис. 166), менее устойчивы, чем нейротоксины яда кобры, и достаточно легко теряют физиологическую активность в разбавленных водных растворах.

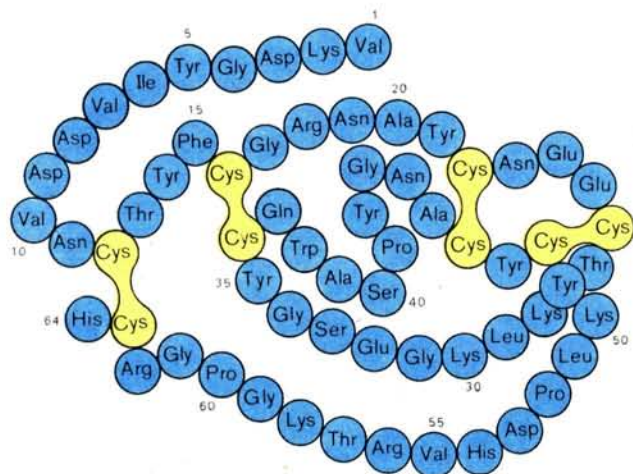
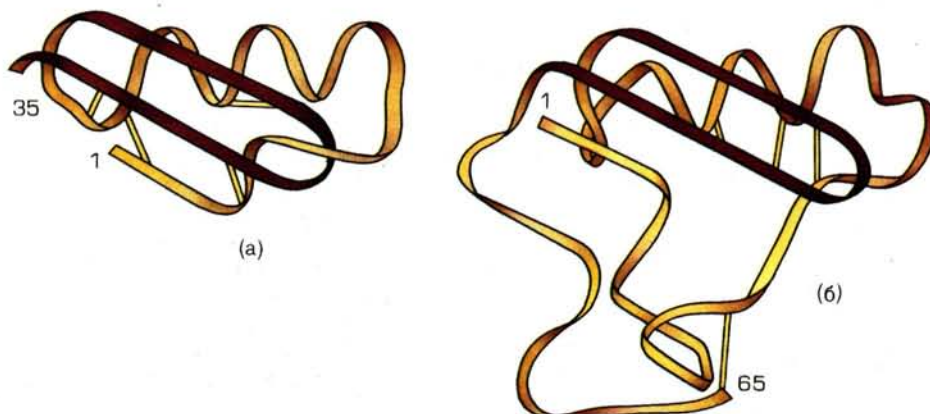


Рис. 166. Структура токсина II из яда скорпиона *Androctonus australis* Hector.

Уникальным свойством яда скорпионов является наличие в его составе токсинов, действующих избирательно только на один из классов животных: млекопитающих, насекомых или ракообразных. Некоторые инсектотоксины скорпионов могут быть построены только из 35 — 36 аминокислотных остатков с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. По своей пространственной структуре они напоминают нейротоксины млекопитающих (рис. 167).

Рис. 167. Пространственные структуры нейротоксинов из яда скорпиона *Centruroides sculpturatus* Ewing: (а) — инсектотоксин, (б) — токсин для млекопитающих.



Стрекательные клетки морских анемонов и актиний содержат токсичные полипептиды молекулярной массы около 5000. Подобно нейротоксинам яда скорпиона, они действуют на быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран, влияя на процесс инактивации. Однако по структурным признакам токсины анемонов достаточно сильно отличаются от скорпионовых токсинов. На рисунке 168 представлена структура типичного представителя этой группы гомологичных полипептидов — токсина II, выделенного из средиземноморской анемоны *Anemonia sulcata*. Токсин II состоит из 47 аминокислотных остатков с тремя внутримолекулярными дисульфидными связями и не имеет видимых структурных аналогий ни с токсинами яда змей, ни с токсинами скорпионов. Для этого нейротоксина следует отметить присутствие большого числа гидрофобных аминокислотных остатков.

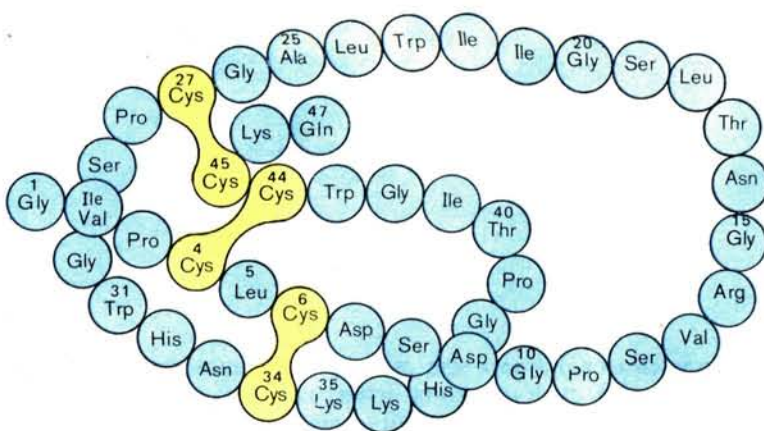
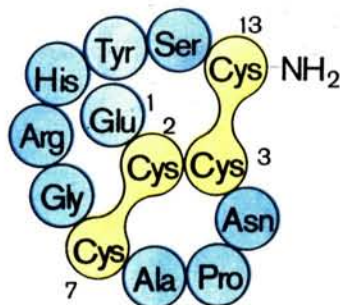


Рис. 168. Структура токсина II из яда средиземноморской анемоны *Anemonia sulcata*.

Наименьшей молекулярной массой обладают нейротоксины из морского моллюска *Conus geographus*. Конотоксины состоят из 13 — 15 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными связями. По механизму действия они подобны постсинаптическим нейротоксинам из ядов змей, но почти на порядок превосходят их по токсичности.



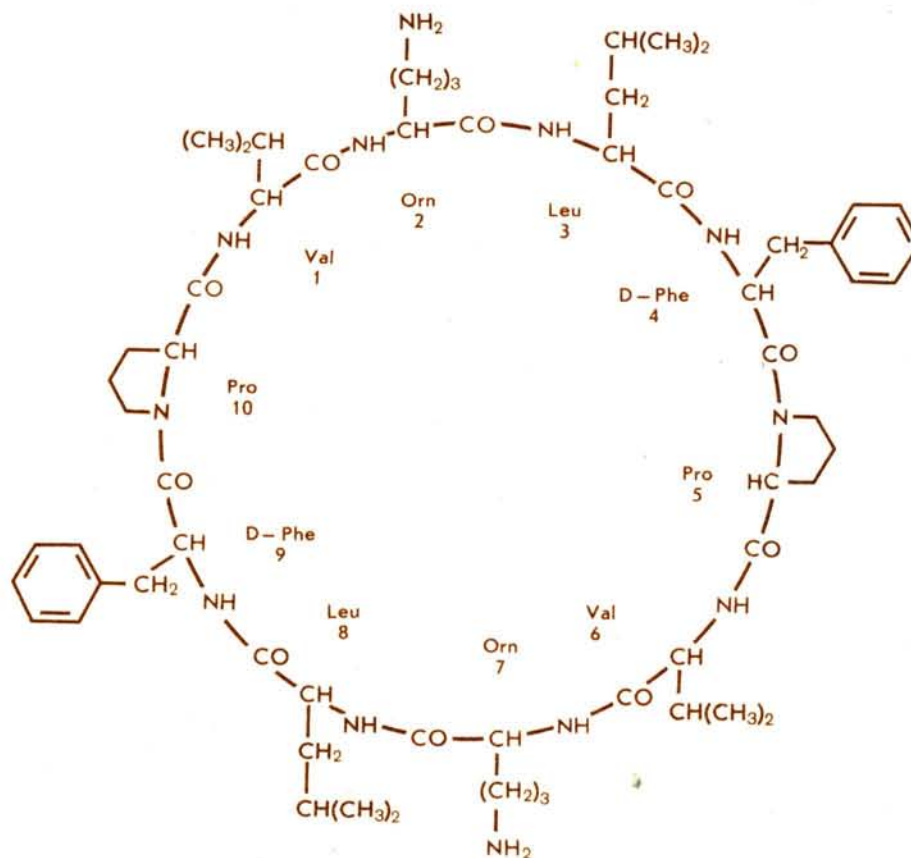
Среди многочисленных антибиотиков пептидной природы заслуживают внимания грамицидин S, тироцидины, полимиксины, бацитрацин, актиномицины и эхиномицины; другие соединения этого типа будут более детально рассмотрены в главе, посвященной биологическим мембранам.

Грамицидин S. Антибиотик впервые выделен из культуральной среды *Vacillus brevis* в 1942 г. Г. Ф. Гаузе и М. Г. Бражниковой («S» означает «советский»), строение его установлено в 1952 г. (Л. Крейг) и доказано в 1956 г. полным химическим синтезом (Р. Швицер).

Пространственное строение грамицидина S выяснено с помощью метода рентгеноструктурного анализа (Д. Ходжкин, 1957) и подтверждено позднее при исследовании конформации антибиотика в растворе (Р. Швицер, Ю. А. Овчинников). Молекула грамицидина S имеет форму β -складчатого листа с четырьмя внутримолекулярными водородными связями, что обеспечивает относительную жесткость циклопептидного скелета и специфическую ориентацию боковых цепей остатков орнитина. Для реализации предпочтительной конформации антибиотика важное значение, несомненно, имеет наличие в нем остатков D-фенилаланина (рис. 169).



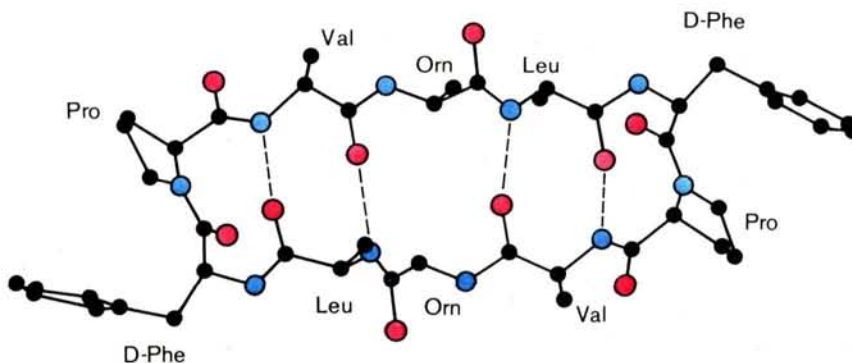
Бражникова Мария Георгиевна (р. 1913), советский химик, работала в Институте по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. Занималась получением и изучением новых антибиотиков. За открытие грамицидина S присуждена Государственная премия СССР (1946).



Грамицидин S

Для грамицидина S характерна разносторонняя биологическая активность. Он подавляет грамположительные и слабее грамотрицательные бактерии и применяется в медицинской практике (в частности, для полоскания горла при ангине). Механизм биологического действия антибиотика, по всей вероятности, связан с его взаимодействием с фосфолипидными мембранами, приводящим к их разрушению. Не исключено его участие в трансмембранном транспорте нуклеотидов.

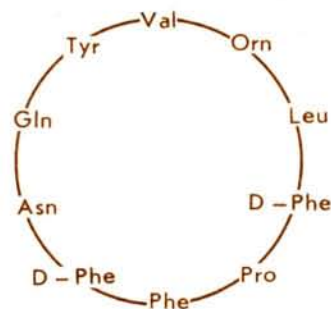
Рис. 169. Структура грамицидина S в кристаллическом комплексе с мочевиной (часть боковых цепей опущена).



Весьма близки грамицидину S по строению и характеру действия антибиотики группы *тироцидина*; показано, что эти соединения образуют комплексы с ДНК, участвуя в регуляции активности генов.



Гаузе Георгий Францевич (1910—1986), советский микробиолог, академик АМН СССР (1971). Окончил Московский университет (1931), с 1960 г.— директор Института по изысканию новых антибиотиков АМН СССР. Основные научные исследования посвящены поиску антибиотиков и изучению механизма их действия. Получил и внедрил в производство грамицидин S (1942, совместно с М. Г. Бражниковой) и ряд других антибиотиков. Лауреат Государственной премии СССР (1946).



Тироцидин

Грамицидин S и родственные антибиотики относятся к той группе пептидно-белковых веществ, биосинтез которых протекает без участия рибосомного аппарата, а осуществляется с помощью ферментных систем. В частности, в построении пептидной цепи грамицидина S принимает участие ферментативный комплекс, названный грамицидин-S-синтетазой: аминокислоты активируются в активных центрах ферментов и последовательно соединяются пептидными связями, как это показано на рисунке 170.

По сходной схеме синтезируются и депептидные антибиотики, в том числе ионофоры энниатиновой группы (см. с. 155). Соответствующие ферментные комплексы были получены и изучены Х. Клейнауфом.

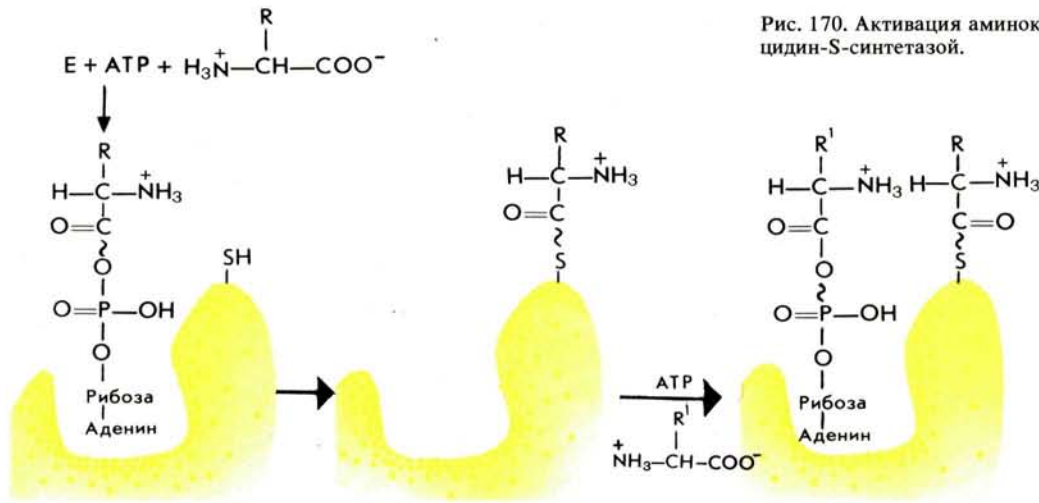
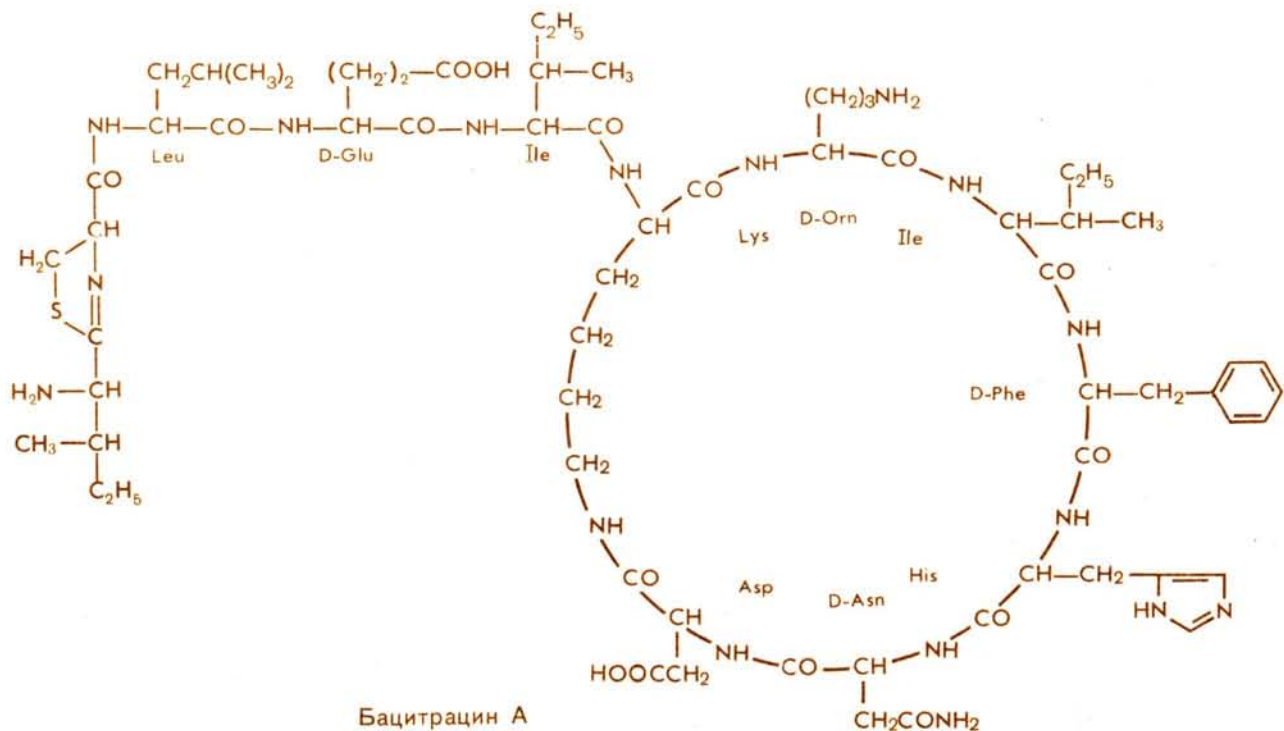


Рис. 170. Активация аминокислот грамицидин-S-синтетазой.

Бацитрацины. *Бацитрацин А* — основной представитель группы антибиотиков, открытых в 1945 г.; однако химическая формула его была установлена сравнительно недавно (1971).



Как и полимиксины (см. с. 288), он представляет собой циклолинейный пептид. Необычным элементом структуры бацитрацинов является тиазолиновое кольцо, образовавшееся, по-видимому, из С-концевого дипептида Ile—Cys.

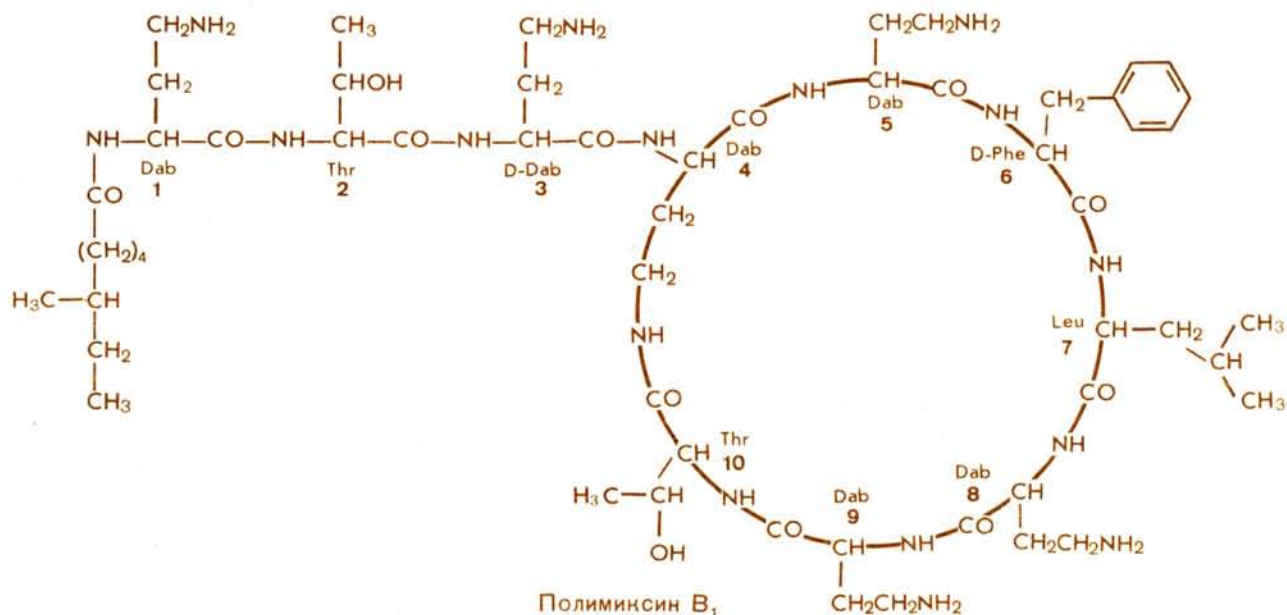
Бацитрацины весьма активны против грамположительных бактерий, напоминая по спектру действия пенициллин. В работах Дж. Стрёминджера (1971) и Д. Сорма (1974) получены данные, свидетельствующие о связывании бацитрацинами S_{55} -изопренилпирофосфата в виде тройного комплекса с ионом двухвалентного металла (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} или Ca^{2+}). При этом блокируется стадия регенерации липидного переносчика, участвующего в биосинтезе клеточной стенки бактерий, что и приводит к гибели микроорганизма.

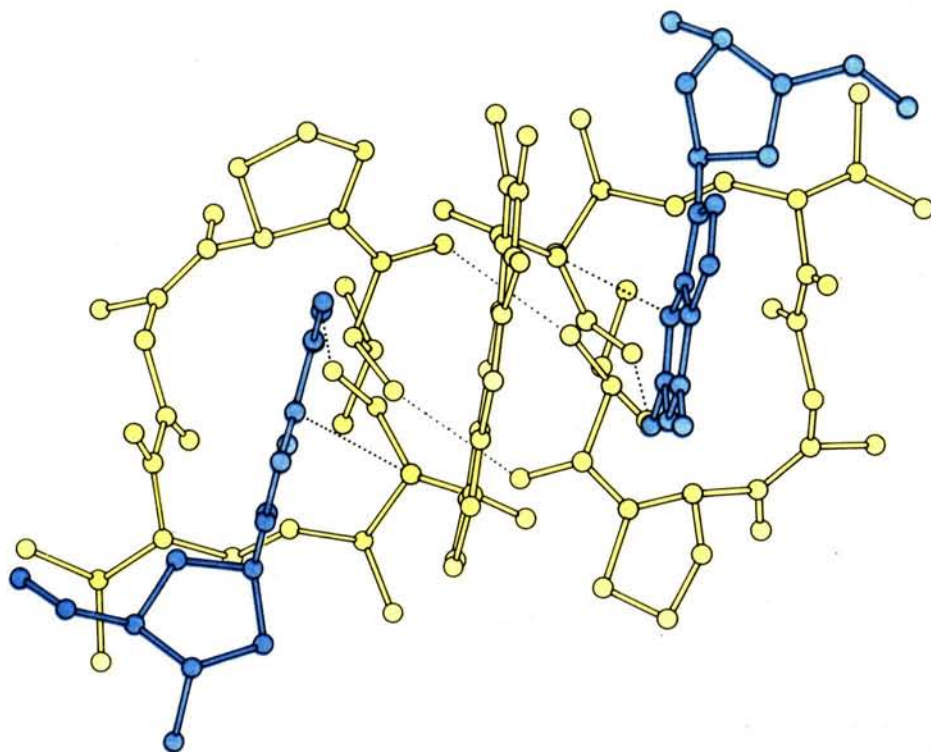
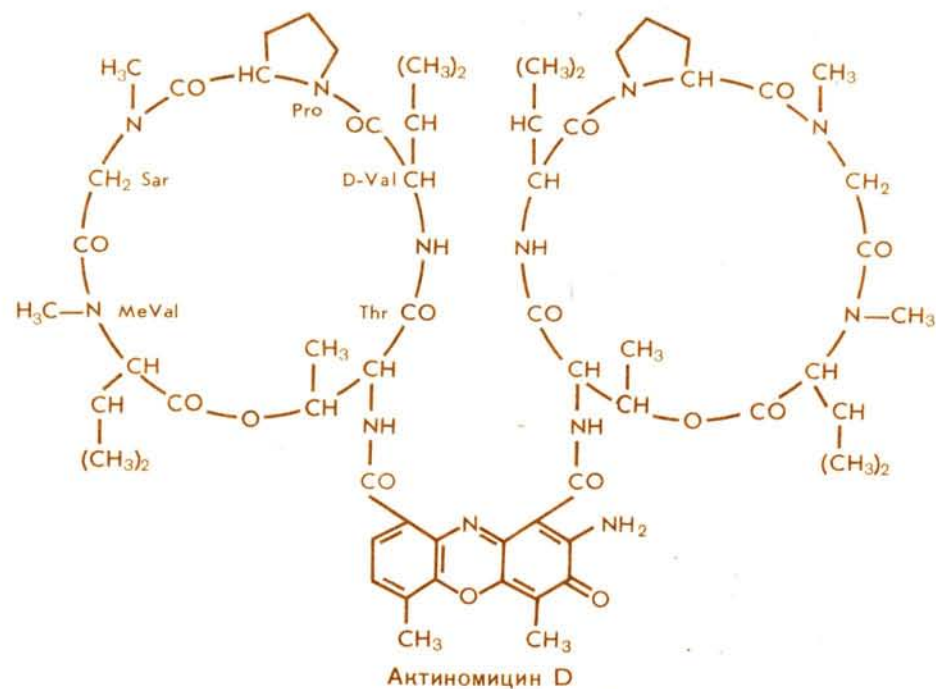
Полимиксины — группа мембрано-активных пептидных антибиотиков, имеющих циклолинейную структуру и сильноосновные свойства за счет наличия 5—6 остатков α,γ -диаминомасляной кислоты (Dab).

В качестве примера приведена формула полимиксина V_1 , установленная в 1964 г. К. Фоглером и сотр.

Полимиксины обладают ярковыраженным бактерицидным действием против большинства грамотрицательных бактерий, превосходя в этом отношении многие другие антибиотики. Мишенью действия полимиксинов является плазматическая мембрана бактерий. Показано, что полимиксины связываются с фосфатными группами кардиолипина, фосфатидилэтаноламина или других кислых липидов, нарушая барьерные функции мембраны.

С другой стороны, полимиксины обладают способностью активировать фосфолипазы внешней мембраны грамотрицательных бактерий, что также может приводить к разрушению мембраны и гибели микроорганизма.





Действие актиномицинов обусловлено способностью их образовывать устойчивые комплексы с ДНК. С помощью рентгеноструктурного анализа было выяснено пространственное строение кристаллического комплекса актиномицина D с дезоксигуанозином (М. Собелл, 1971). В комплексе актиномицин связан таким образом, что две молекулы нуклеозида располагаются с противоположных сторон хромофора, образуя многочисленные гидрофобные контакты и водородные связи.

Эхиномицин — антибиотик хиноксалиновой (хиномициновой) группы, выделен из культуры актиномицетов (*Streptomyces echinatus*); его строение было установлено в 1959 г. В. Прелогом. В основе биологического действия хиномицинов лежит их способность специфически связываться с двунитевой ДНК. Согласно данным ЯМР и теоретического конформационного анализа, эхиномицин имеет в растворе жесткую конформацию (рис. 171). Как легко видеть, оба хиноксалиновых кольца располагаются по одну сторону цикла; при взаимодействии с ДНК происходят изменения пространственного положения хромофоров, аналогичные тем, которые наблюдаются при образовании комплекса ДНК с актиномицином D.

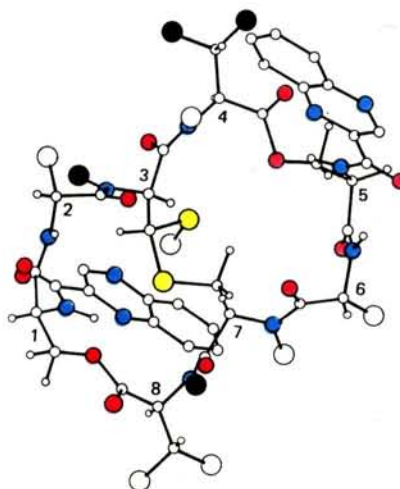
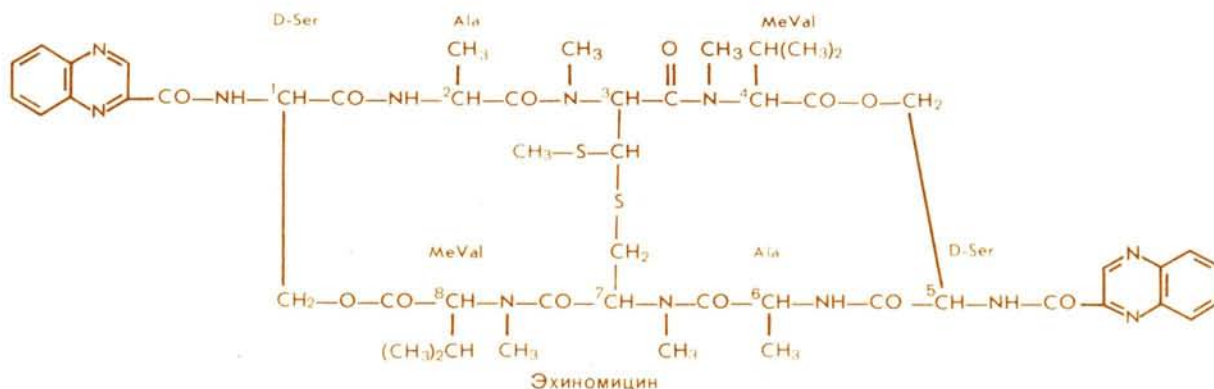


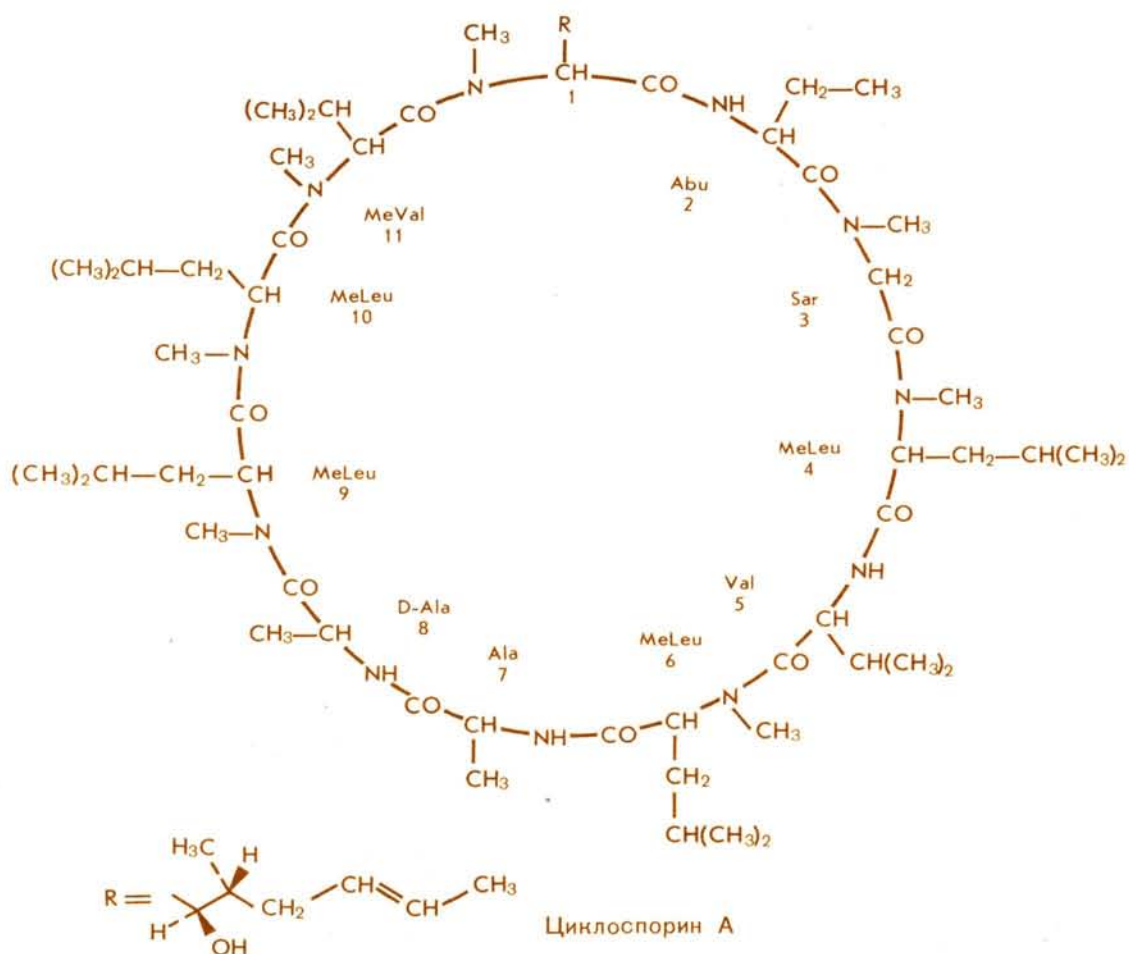
Рис. 171. Предпочтительная конформация эхиномицина в растворе.

Один из основных представителей группы — антибиотик циклоспорин А, продуцируемый микроорганизмом *Trichoderma polysporum*, — обладает выраженными иммунодепрессивными свойствами. Его строение установлено в 1976 г. с помощью химических методов и рентгеноструктурного анализа; в конформационном отношении этот циклоундекапептид аналогичен грамицидину S. Полный синтез циклоспорина А осуществлен в 1981 г. Р. М. Венгером (фирма «Sandoz», Швейцария); антибиотик выпускается фирмой в промышленных масштабах на основе биосинтетического метода.

Циклоспорин А ингибирует отторжение пересаженных органов и тканей и для этих целей широко применяется в клинике. Мишенью его действия является Т-хелперная популяция лимфоцитов.

Важнейшим регулятором иммунной системы является *тафцин*, выделенный в 1970 г. Он представляет собой тетрапептид

Thr—Lys—Pro—Arg,



являющийся фрагментом C_H2-домена иммуноглобулина G. В настоящее время получено много его синтетических аналогов, в том числе ценных в практическом отношении. Тафцин повышает цитотоксическую и цитостатическую активность против чужеродных клеток, обладает противоопухолевым и антибактериальным действием.

Большая группа иммуноактивных пептидов выделена из тимуса; они получили название *тимических гормонов* или *тимических факторов*. Так называемый *тимозин* (А. Гольдштейн, 1975) является смесью большого числа высокомолекулярных пептидов, среди которых идентифицированы тимозин α₁ (28 аминокислотных остатков), тимозин β₄ (43 аминокислотных остатка) и др.; все эти соединения регулируют активность Т-лимфоцитов. Аналогичны по биологической активности и *тимопозтины*. Относительно простой структурой среди тимических гормонов обладает *тимулин* (Г. Бах, 1975):



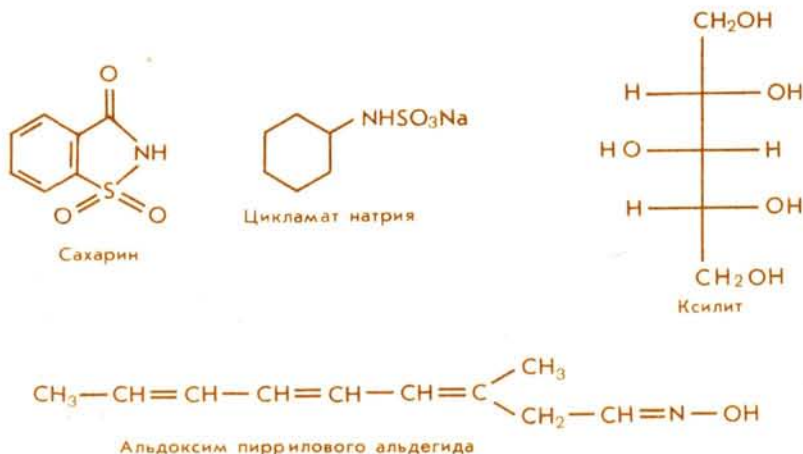
Многие тимические факторы синтезированы и используются в практике.

Особое место занимают в этой группе *гликопептиды* — фрагменты клеточных стенок бактерий (см. с. 508).

Пептиды с вкусовыми качествами

В последние годы соединения пептидно-белковой природы привлекают повышенное внимание в связи с проблемой получения веществ, обладающих ценными вкусовыми качествами. Естественно, что главные среди них — это заменители сахара.

Как известно, сахар производится в мире многими миллионами тонн, прежде всего путем переработки сахарного тростника и сахарной свеклы. В настоящее время биотехнологические методы позволяют получать сахар (сахарозу, глюкозу, фруктозу) на основе ферментативной обработки крахмала и даже целлюлозы. Тем не менее постоянно ведется поиск «сладких» веществ и среди соединений других типов — более дешевых и менее «коварных» в связи с проб-



лемой диабета. Давно применяются сахарин, цикламат натрия, ксилит и т. п. Имеются указания на «сверхсладкие свойства» альдоксима пирилового альдегида (в 2000 раз слаще тростникового сахара). Многие аминокислоты обладают сладким вкусом, причем вкусовые качества во многом определяются их стереохимией. Например, глицин, оба изомера аланина и серина — сладкие; в случае аспарагина, гистидина, лейцина, метионина, валина, триптофана, тирозина и треонина сладкими являются D-изомеры, а L-изомеры безвкусные или горькие. В то же время сладким является L-пролин.

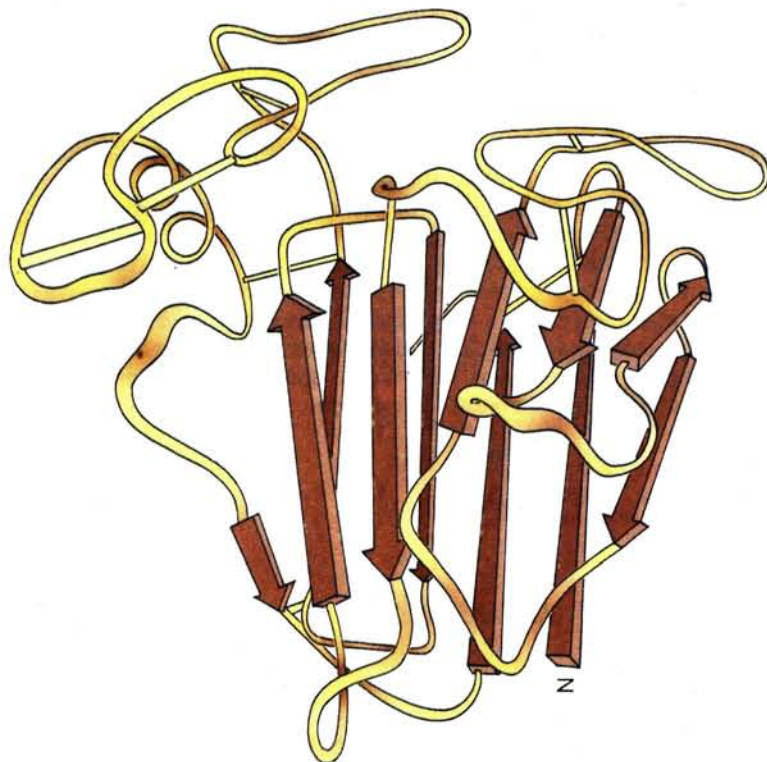


Рис. 172. Схема укладки полипептидных цепей в тауматине I.

Недавно обнаружено, что весьма сладким вкусом обладает дипептид — метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, получивший название *аспартам*

Asp—Phe—OMe.

Аспартам примерно в 200 раз слаще сахарозы, нетоксичен и уже выпускается тысячами тонн и применяется в пищу. Его главное преимущество — простота структуры, низкая калорийность. Получены сотни синтетических аналогов аспартама, выяснено, в частности, что замена L-Asp на D-Asp или L-Glu приводит к безвкусным соединениям.

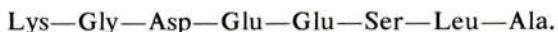
В настоящее время изучается механизм биологического действия аспартама, в том числе на основе исследований физико-химических характеристик его белкового рецептора.

В природе имеются и *горькие пептиды*, например гептапептид, полученный при протеолизе казеина:



не уступающий по своему горькому вкусу хинину.

Можно упомянуть и «вкусный» пептид («delicious peptide»), выделенный в 1980 г. при обработке папаином мяса крупного рогатого скота:



К белкам, обладающим интенсивно сладким вкусом, относятся, в частности, *тауматины* и *монеллин*, выделенные из плодов ряда африканских растений (*Thaumatococcus danieli*, *Dioscoreophyllum cumminsii* и др.) и превосходящие сахар по сладкости в 100 тыс. раз (при одинаковой молярной концентрации).

Тауматины являются основными белками с молекулярной массой около 22 000 (тауматины I и II содержат по 207 аминокислотных остатков). Их молекулы построены из двух доменов, соединенных гибким 28-членным пептидным фрагментом и характеризующихся высоким процентом содержания β -структур и β -изгибов (рис. 172). Молекула монеллина имеет две нековалентно связанные пептидные цепи, включающие в целом 94 аминокислотных остатка; ряд участков тауматинов и монеллина обнаруживают структурную гомологию.

Плодовые растения, содержащие тауматины, не плодоносят вне своего природного ареала, поэтому предпринимаются попытки получать «сладкие белки» для широкого практического использования с помощью методов генной инженерии.

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Строение нуклеиновых кислот

Синтез нуклеиновых кислот

Химическая модификация
нуклеиновых кислот

Нуклеопротеиды

Процессы
с участием нуклеиновых кислот:
репликация, транскрипция
и трансляция

Генная инженерия



Мишер (Miescher) Иоган Фридрих (1844—1895), швейцарский врач. Окончил Базельский университет. В 1869 г. из ядер лейкоцитов выделил вещество, названное им нуклеином, и установил его кислотные свойства; эта дата считается датой открытия нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты — важнейшие биополимеры, осуществляющие хранение и передачу генетической информации в живой клетке.

Существуют два различных типа нуклеиновых кислот — дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК). ДНК представляет собой генетический материал большинства организмов. В прокариотических клетках, кроме основной хромосомной ДНК, часто встречаются внехромосомные ДНК — плазмиды. В эукариотических клетках основная масса ДНК расположена в клеточном ядре, где она связана с белками в хромосомах. Эукариотические клетки содержат ДНК также в различных органеллах (митохондриях, хлоропластах). Что же касается РНК, то в клетках имеются матричные РНК (мРНК), рибосомные РНК (рРНК), транспортные РНК (тРНК) и ряд других; кроме того, РНК входят в состав многих вирусов.

Исторический очерк. К середине прошлого века было установлено, что способность к наследованию признаков определяется материалом клеточного ядра. В 1869 г. Ф. Мишер, исследуя химический состав ядер гнойных клеток, выделил из них вещество кислого характера, названное им нуклеином. Это событие расценивается сейчас как открытие нуклеиновых кислот. Сам термин «нуклеиновые кислоты» был введен в 1889 г., а в 1891 г. немецкий биохимик А. Кёсель описал гидролиз нуклеиновой кислоты, установив, что она состоит из остатков сахара, фосфорной кислоты и четырех гетероциклических оснований, принадлежащих к пуринам и пиримидинам. Он же впервые указал на существование двух типов нуклеиновых кислот.

С начала нашего века началось интенсивное изучение продуктов расщепления нуклеиновых кислот. Э. Фишер внес большой вклад в химию пуринов и пиримидинов, а позднее Ф. Левен, Д. Гулланд и др. определили строение углеводных компонентов и природу нуклеозидных звеньев (названия «нуклеозид» и «нуклеотид» были предложены Ф. Левеном еще в 1908—1909 гг.). Окончательно строение нуклеозидов, нуклеотидов и роль фосфодиэфирной связи были выяснены в 1952 г. в результате работ английской школы под руководством А. Тодда.

Что касается полимерной природы нуклеиновых кислот, то с конца 30-х годов существовало убеждение, что ДНК представляет собой тетра-нуклеотид с четырьмя различными гетероциклическими основаниями; это позволило Ф. Левену сформулировать позднее тетра-нуклеотидную теорию строения ДНК. Теория была опровергнута лишь в 1950 г. благодаря работам Э. Чаргаффа, который при тщательном анализе нашел значительные различия в нуклеотидном составе ДНК из разных источников; он же сформулировал правила о попарной эквивалентности содержания аденина и тимина, гуанина и цитозина в ДНК. Пионерские работы по изучению химического состава ДНК растений были выполнены в этот период А. Н. Белозерским и его сотрудниками.

Накопленные данные позволили сформулировать концепцию: генетическая информация в полимерной цепи ДНК заключена в порядке чередования четырех мономерных звеньев. К этому времени в лаборатории М. Уилкинса (Р. Франклин) были получены первые рентгенограммы ДНК. Венцом исследований по строению нуклеиновых кислот явилась модель двойной спирали ДНК, предложенная в 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком и ознаменовавшая рождение молекулярной биологии.

К началу 40-х годов были получены прямые доказательства участия нуклеиновых кислот в передаче генетической информации. В 1940 г. Дж. Бидл и Э. Тейтем, основываясь на многочисленных экспериментальных данных по изучению мутантных штаммов хлеб-

ной плесени *Neurospora crassa*, сформулировали важный принцип «один ген — один фермент». Несколько позднее О. Эйвери, К. Мак-Леод и М. Мак-Карти однозначно установили, что передача наследственной информации от клетки к клетке осуществляется ДНК.

Идея самовоспроизводства, или репликация, ДНК, следовавшая из модели Уотсона — Крика, была подтверждена открытием фермента ДНК-полимеразы (А. Корнберг, 1957).

Начало работам, приведшим к выяснению биологической роли РНК, было положено Т. Касперсоном и Ж. Браше еще в 30-х годах. Значительно позже (в 50-х годах) было показано, что синтез белка осуществляется рибосомами, но концепция о существовании РНК-посредника (мРНК), переносящего информацию от ДНК к рибосомам, была сформулирована Ф. Жакобом и Ж. Моно только в 1961 г. Главный фермент транскрипции — ДНК-зависимая РНК-полимераза — был открыт в 1960 г. С. Вейссом, Ж. Гурвицем и О. Стивенсом.

Одним из самых важных этапов в изучении функции нуклеиновых кислот явилась расшифровка способа записи информации в ДНК и принцип передачи ее на белковую структуру, т. е. формулирование генетического кода. В 1961 г. Ф. Крик и С. Бреннер показали, что каждой аминокислоте в белке соответствует триплет нуклеотидов. К этому времени были уже обнаружены транспортные РНК (М. Б. Хагланд и К. Огата, 1957) и выяснена их функция, проявляемая во взаимодействии антикодонов и кодонов (П. Замечник, 1957). Сам же генетический код, состоящий из 64 кодонов, был установлен в 1966 г. благодаря работам М. Ниренберга, Г. Кораны и С. Очоа.

С момента открытия генетического кода начинается новый этап в изучении структуры и функции нуклеиновых кислот. Он характеризуется стремительным накоплением огромного количества экспериментальных данных, приведших к новым качественным представлениям.

К 1970 г. исследования так называемой системы рестрикции и модификации, которая существует в прокариотических клетках и предохраняет от попадания внутрь клетки чужеродной генетической информации, привели к выделению первого из ферментов, осуществляющих рестрикцию. Им оказалась эндонуклеаза, расщепляющая ДНК по определенной последовательности оснований. Затем было найдено около 400 подобных ферментов, способных узнавать свыше 90 различных последовательностей в ДНК.

Таким образом, появился метод специфических расщеплений молекул ДНК, который составил основу современной методологии установления структуры нуклеиновых кислот и геной инженерии. Исследования рестрикционных эндонуклеаз были отмечены Нобелевской премией, присужденной Х. Смиуту, В. Арберу и Д. Натансу.

В 1970 г. американские ученые Г. Темин и Д. Балтимор сообщили об открытии в вирионах опухолеродных РНК-содержащих вирусов фермента — обратной транскриптазы, способного синтезировать ДНК, используя РНК в качестве матрицы. Существование такого фермента ранее было предсказано советским генетиком С. М. Гершензоном. Это открытие явилось настоящей революцией в фундаментальных представлениях о путях биосинтеза нуклеиновых кислот и дало возможность получения *in vitro* ДНК, являющихся копиями информационных РНК.

В 1972 г. П. Берг сообщил о соединении *in vitro*, с помощью специально разработанных приемов, ДНК двух различных вирусов: бактериофага λ и SV-40. Таким образом, было положено начало генетической инженерии, которая вскоре стала использовать для получения фрагментов ДНК рестрикционные эндонуклеазы, а для



Кёссель [Kossel] Альбрехт (1853—1927), немецкий биохимик, иностранный почетный член АН СССР (1926). Окончил Страсбургский университет (1877), с 1887 г. — профессор Берлинского, а в 1901—1923 гг. — Гейдельбергского университетов. Основные работы посвящены химии белков и нуклеопротеидов. Впервые описал гистоны и протамины. Автор одной из первых теорий строения белков. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1910).



Чаргафф (Chargaff) Эрвин (р. 1905), американский биохимик. Окончил Венский университет (1928); с 1935 г. — в Колумбийском университете в Нью-Йорке. Основные работы — по изучению химического состава и структуры нуклеиновых кислот, определил количественное соотношение азотистых оснований, входящих в их состав (правило Чаргаффа). Это открытие было использовано Ф. Криком и Дж. Уотсоном при построении модели структуры ДНК.

их соединения открытые и хорошо охарактеризованные к тому времени ферменты — ДНК-лигазы. Были разработаны (Г. Бойер, С. Коэн, Д. Хелинский) системы введения чужеродных ДНК в различные клетки, которые использовали в качестве носителя ДНК внехромосомные элементы, способные существовать и размножаться в этих клетках, зачастую вместе с ним. Встраивание чужой ДНК в носители (векторы) осуществлялось путем разрезания их рестрикционными эндонуклеазами и последующего сшивания лигазами.

Методы генной инженерии в сочетании с доступностью ДНК, являющихся копиями мРНК, открыли три возможности: а) выделение ранее труднодоступных генов эукариот в индивидуальном виде; б) получение их в больших количествах, необходимых для структурного анализа; в) создание системы их экспрессии в чужеродных организмах, например в бактериальных клетках.

Последнее обстоятельство открывало путь к созданию живых организмов с заданными свойствами. Вскоре эта возможность реализовалась в биотехнологии. Были получены микробы, способные продуцировать самые разнообразные белки, обычно синтезируемые эукариотическими, в том числе человеческим, организмами.

Две первые возможности сделали реальным анализ структуры ранее недоступных генов. Недоставало только методов быстрого определения первичной структуры больших ДНК.

В 1975 г. А. Максам и У. Гилберт в США и Ф. Сенгер в Великобритании разработали такие методы, ставшие последним звеном в цепи методов, необходимых для широкомасштабных исследований структуры и функционирования геномов. В разработку этих методов существенный вклад был внесен А. Д. Мирзабековым и Е. Д. Свердловым (СССР).

Строение нуклеиновых кислот

Первичная структура нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты представляют собой биополимеры, построенные из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирной связью. Каждый нуклеотид, в свою очередь, состоит из остатков гетероциклического основания, углевода и фосфорной кислоты.

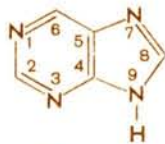
Одним из важнейших компонентов нуклеиновых кислот являются гетероциклические основания. Все они представляют собой производные пиримидина или пурина.

В подавляющем большинстве случаев нуклеиновые кислоты в качестве гетероциклических оснований содержат урацил (только в РНК), тимин (только в ДНК) и цитозин, являющиеся производными пиримидина, а также аденин и гуанин, относящиеся к производным пурина.

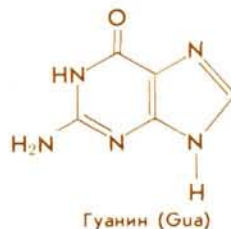
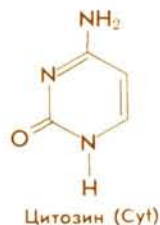
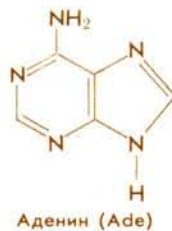
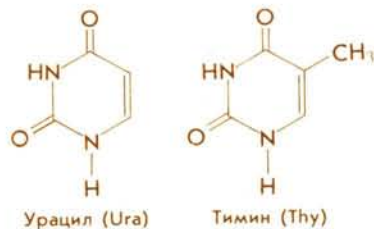
В соответствии с принятой номенклатурой основания могут записываться трехбуквенным кодом, представляющим три первые буквы их латинского названия.



Пиримидин

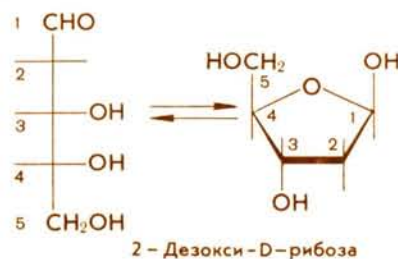
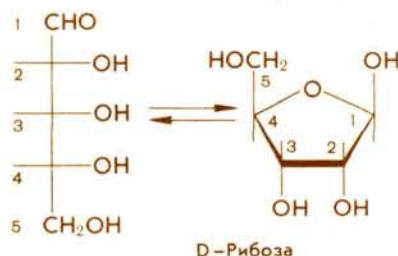


Пурин



Белозерский Андрей Николаевич (1905—1972), советский биохимик, академик АН СССР (1962). Окончил Среднеазиатский университет в Ташкенте (1927), работал в Московском университете и в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, в 1971—1972 гг. — вице-президент АН СССР. Основные работы посвящены химии и биохимии нуклеиновых кислот. Первым установил (1936) наличие в нуклеопротеидах растительной клетки ДНК и нещелочных белков, исследовал их структуру и локализацию. Показал видовую специфичность нуклеиновых кислот, обнаружил связь между составом нуклеиновых кислот и филогенезом организмов. Герой Социалистического Труда (1969).

Нуклеозиды. В составе нуклеиновых кислот гетероциклические основания связаны с D-рибозой в РНК или с 2-дезоксид-рибозой в ДНК, образуя соединения, называемые соответственно рибонуклеозидами или дезоксирибонуклеозидами. Нуклеозиды являются β-N-пентафуранозидами гетероциклических оснований

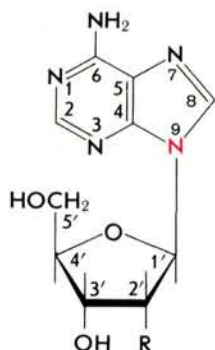


Пиримидиновые основания соединяются с углеводом своими N-1, а пуриновые — N-9 атомами азота. Нуклеозиды, содержащие аденин и гуанин, называются аденозином или дезоксиаденозином и гуанозином или дезоксигуанозином. Нуклеозиды — производные урацила и цитозина называются соответственно уридином или дезоксиуридином и цитидином или дезоксцитидином. Дезоксирибонуклеозид тимина принято называть тимидином, а рибонуклеозид — риботимидином.

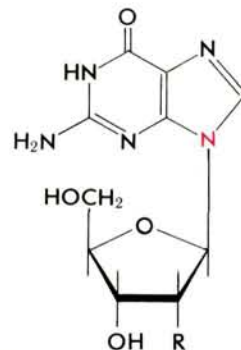


Бидл (Beadle) Джордж Уэлс (р. 1903), американский генетик. Образование получил в университете штата Небраска и Корнеллском университете; в 1937—1968 гг. — профессор Стэнфордского университета, Калифорнийского технологического института, президент Чикагского университета. Основные работы — в области цитологии и генетики. Один из основоположников биохимической генетики, выдвинул (1944, совместно с Э. Тейтеном) концепцию «один ген — один фермент». Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1958, совместно с Э. Тейтеном и Дж. Ледербергом).

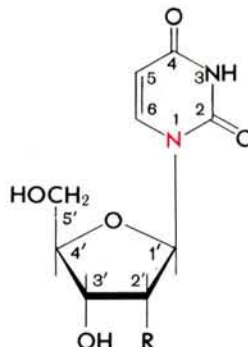
Для сокращения названий нуклеозидов используется трехбуквенный или однобуквенный код. В первом варианте к двум начальным буквам латинского названия нуклеозида добавляется третья так, чтобы отличить название нуклеозида от названия основания (например, Adenine = Ade, Adenozine = Ado). Во втором варианте используются начальные буквы латинских названий. Дезокси-нуклеозиды отличаются от рибонуклеозидов добавлением префикса d; dAdo, dThd или dA, dT и т. д. Для обобщенного обозначения любого нуклеозида применяется символ N, для пиримидинового нуклеозида символ Y, пуринового — символ R



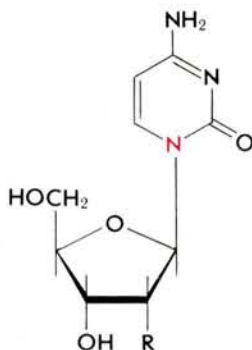
R=OH, аденозин (A, Ado)
R=H, дезоксиаденозин (dA, dAdo)



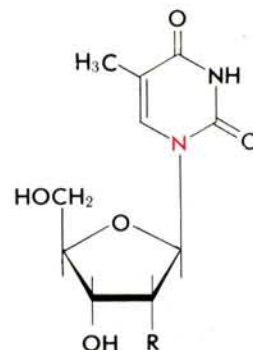
R=OH, гуанозин (G, Guo)
R=H, дезоксигуанозин (dG, dGuo)



R=OH, уридин (U, Urd)
R=H, дезоксиуридин (dU, dUrd)



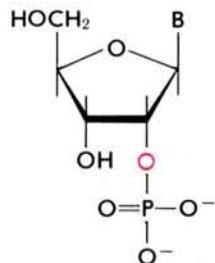
R=OH, цитидин (C, Cyd)
R=H, дезоксицитидин (dC, dCyd)



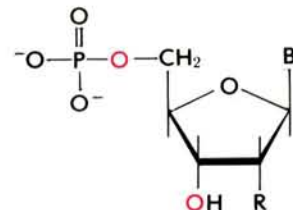
R=OH, риботимидин (T, Thd)
R=H, тимидин (dT, dThd)

Для того чтобы различать номера атомов оснований и атомов сахара, к последним в нуклеозидах добавляется сверху штрих. Например, С-3 углеродный атом рибозы в нуклеозиде называется С-3' атомом, а связанный с ним гидроксил — 3'-гидроксильной группой.

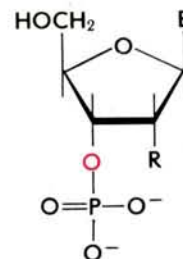
Нуклеотиды. Третий компонент нуклеиновых кислот — ортофосфорная кислота — образует сложноэфирные связи со спиртовыми группами рибозы или дезоксирибозы. Путем расщепления нуклеиновых кислот в контролируемых условиях удается выделить сложные эфиры нуклеозидов и фосфорной кислоты — нуклеотиды. Названия нуклеотидов производятся от названия гетероциклического основания, входящего в их состав, с добавлением слова «кислота»: цитидиловая кислота, адениловая кислота и т. д. В современной номенклатуре указываются также положения фосфатной группы или групп (аденозин-5'-фосфат, аденозин-3'-фосфат, дезоксиаденозин-5'-фосфат); часто используются однобуквенные сокращения: для 5'-фосфатов — рА, рG, рC, рU, рN, рdА, рdG, рdC, рdU, рdN, для 3'-фосфатов — Ар, Gr, Cr, Ur, Nr, dAr, dGr, dCr, dUr, dNr, для 2'-фосфатов — А(2')р, G(2')р, C(2')р, U(2')р, N(2')р



Нуклеозид-2'-фосфат N(2')р



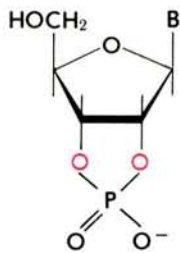
R = OH, нуклеозид-5'-фосфат (рN)
R = H, дезоксинуклеозид-5'-фосфат (рdN)



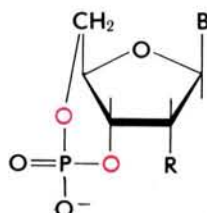
R = OH, нуклеозид-3'-фосфат (рr)
R = H, дезоксинуклеозид-3'-фосфат (рdр)

B — гетероциклическое основание
(от англ. base — основание)

При определенных условиях расщепления рибонуклеиновых кислот образуются циклические фосфаты, представляющие собой диэфиры ортофосфорной кислоты с 2'- и 3'-гидроксильными группами рибозы. Они называются нуклеозид-2', 3'-циклофосфатами и обозначаются N > р (например, аденозин-2', 3'-циклофосфат, или А > р). Циклофосфаты типа (а) N(3', 5') > р не образуются при расщеплении нуклеиновых кислот. Некоторые из них, например аденозин-3', 5'-циклофосфат (см. с. 240), являются продуктами ферментативных реакций, протекающих в клетке, и играют важную биологическую роль.

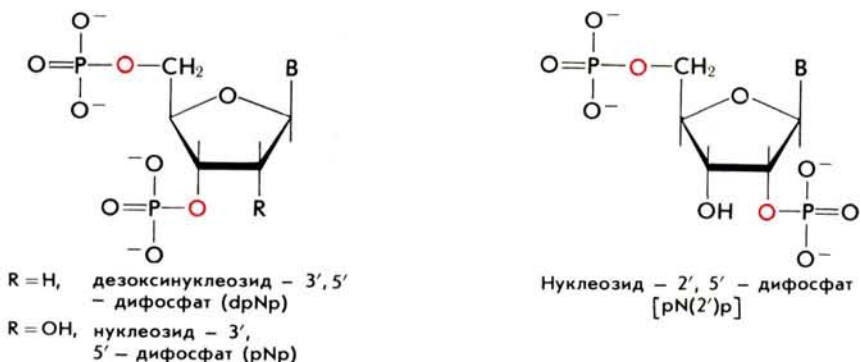


Нуклеозид-2', 3'-циклофосфат (N > р)

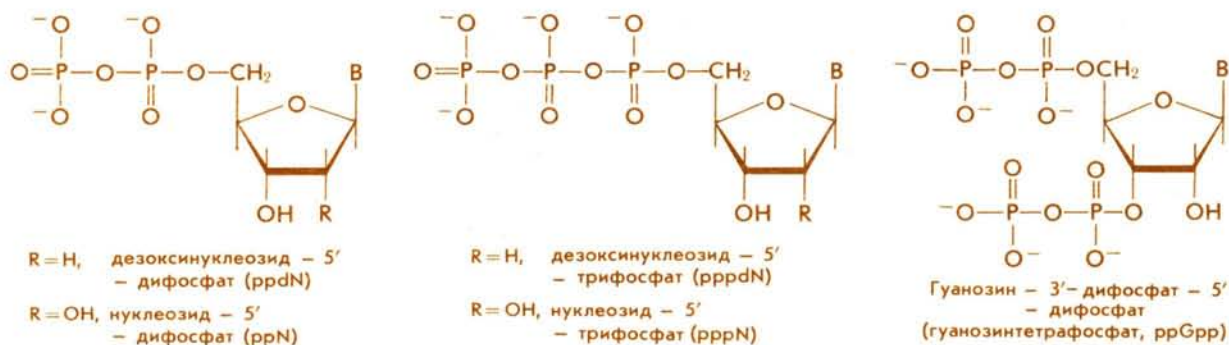


а) R = OH, нуклеозид-3', 5'-циклофосфат N(3', 5') > р
б) R = H, дезоксинуклеозид-3', 5'-циклофосфат N(3', 5') > р

При гидролизе нуклеиновых кислот могут образовываться нуклеотиды, содержащие два остатка фосфорной кислоты, один из которых связан с 5'-гидроксильной, а другой — с 3'- или 2'-гидроксильной группами. Такие производные называют нуклеозид-3', 5'- или нуклеозид-2', 5'-дифосфатами.

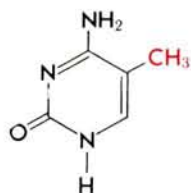
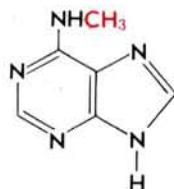


Важную роль в жизнедеятельности клетки играют сложные эфиры полифосфорных кислот и нуклеозидов. Наиболее широко распространены эфиры, образованные ди- или трифосфатными группами и 5'-ОН-группами нуклеозидов (см. с. 348). Они называются нуклеозидди- или нуклеозидтрифосфатами и обозначаются ppN, ppdN, pppN, pppdN. Пирофосфатные группы могут быть соединены с 5'- и 3'-гидроксилами рибозы. Наиболее интересным соединением такого рода является гуанозинтетрафосфат: гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат, ppGpp

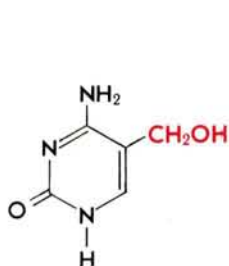
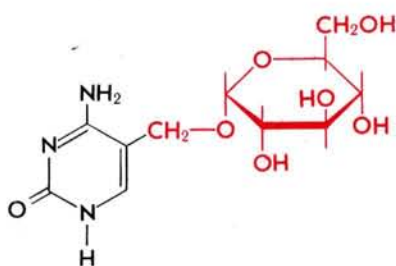
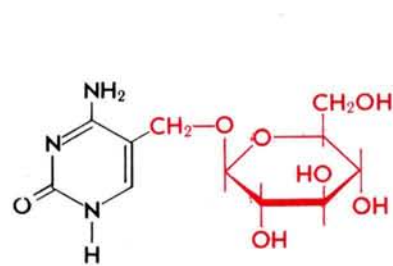


Редкие (минорные) компоненты нуклеиновых кислот. Помимо основных компонентов, в состав нуклеиновых кислот могут входить нуклеозиды с необычными гетероциклическими основаниями или с модифицированным углеводным остатком.

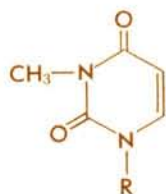
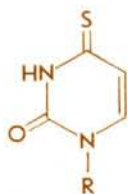
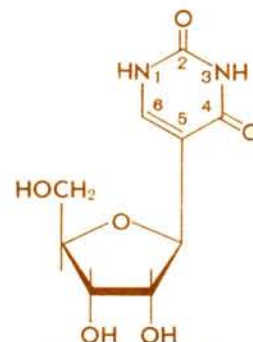
Редкими компонентами ДНК являются метилированные основания: 5-метилцитозин, 6-N-метиладенин и некоторые другие. В ДНК

5-Метилцитозин ($m^5\text{Cyt}$)6-N-Метиладенин ($m^6\text{Ade}$)

некоторых бактериофагов вместо цитозина имеются 5-гидроксиметилцитозин и его гликозилированные производные — α -D-гликопиранозил или β -D-гликопиранозил

5-Гидроксиметилцитозин ($hm^5\text{Cyt}$)5-(α -D-Глюкопиранозилгидроксиметил)цитозин5-(β -D-Глюкопиранозилгидроксиметил)цитозин

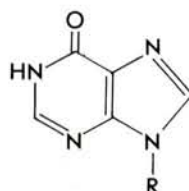
РНК также содержат редкие компоненты. Они в большей степени встречаются в тРНК, в меньшей степени — в рибосомных и ядерных РНК. Наиболее распространены производные обычных оснований (цитозина, урацила, аденина и гуанина) с заместителями в гетероциклическом ядре или в экзоциклических аминогруппах. Известны некоторые производные урацила, такие, как 3-метилуридин, 4-тиоуридин и т. д. Необычная модификация наблюдается в случае псевдоуридина, в котором урацил соединяется с сахаром С-гликозидной, а не N-гликозидной связью за счет атома С-5 гетероциклического ядра

3-Метилуридин ($m^3\text{U}$)4-Тиоуридин ($S^4\text{U}$)Псевдоуридин (ψ)



Тейтем (Tatum) Эдвард Лори (1909—1975), американский генетик и биохимик. Окончил Висконсинский университет в Милуоки (1931), с 1957 г. — профессор Рокфеллеровского института медицинских исследований. Основное направление научных исследований — молекулярная генетика. Сформулировал концепцию «один ген — один фермент», ставшую основой биохимической генетики (1944, совместно с Дж. Бидлом). Открыл явление генетической рекомбинации у бактерий — конъюгацию (1946, совместно с Дж. Ледербергом). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1958, совместно с Дж. Бидлом и Дж. Ледербергом).

Очень часто в тРНК встречается продукт дезаминирования аденозина — инозин. Известны компоненты, являющиеся продуктами метилирования 2'-гидроксила рибозы (2'-О-метилнуклеозиды)



Инозин



2'-О-Метилнуклеозид (Nm)

Олиго- и полинуклеотиды. *Олигонуклеотидами* называют полимеры, в которых несколько нуклеозидов (до 20) соединены друг с другом фосфодиэфирными связями; более длинные цепи называют *полинуклеотидами*.

В обычных нуклеиновых кислотах 5'-гидроксильная группа одного нуклеозида связана с 3'-гидроксильной группой другого посредством остатка фосфорной кислоты, образующей с этими группами сложноэфирные связи. Простейшими олигонуклеотидами являются динуклеозидмонофосфаты [нуклеотидил-(3' → 5')-нуклеозиды]. В молекуле аденилил-(3' → 5')-цитидина (рис. 173) два углеводных остатка неодинаковы с химической точки зрения. Тот, который принадлежит аденозину, имеет свободную 5'-гидроксильную группу, тогда как его 3'-гидроксильная группа участвует в образовании фосфодиэфирной связи. Другой, принадлежащий цитидину, напротив, содержит свободную 3'-гидроксильную группу, а его 5'-гидроксильная группа вовлечена в образование фосфодиэфирной связи.

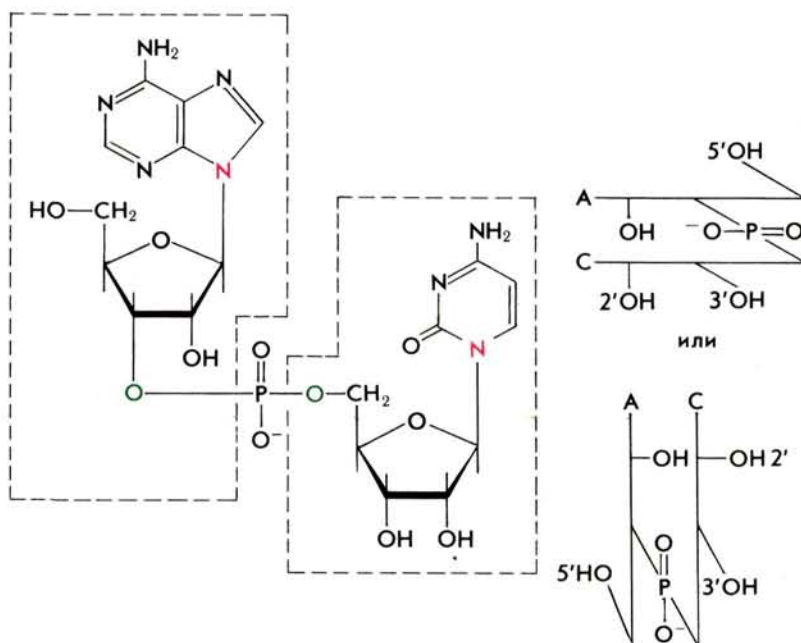
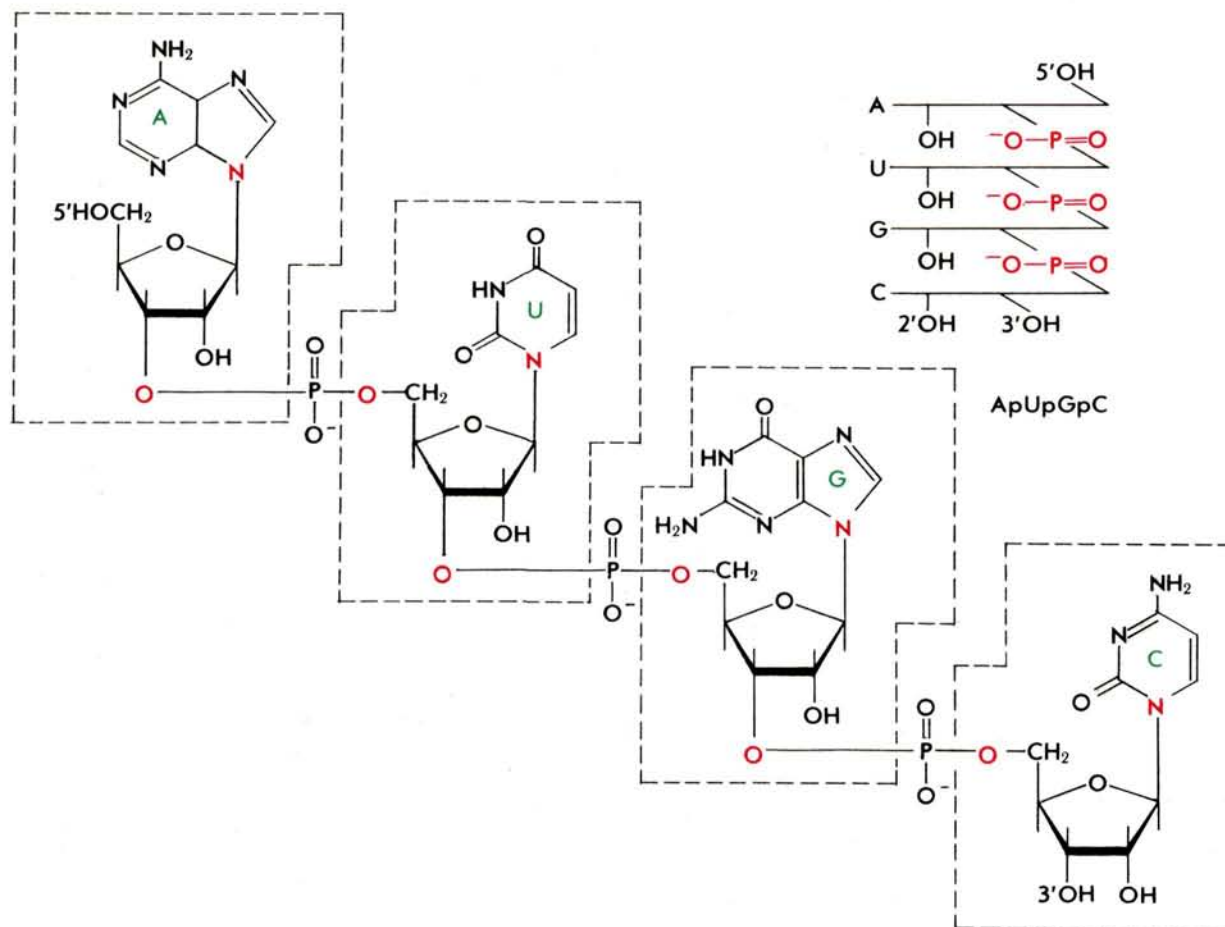


Рис. 173. Аденилил-(3' → 5')-цитидин (ApC).

Нуклеозид со свободной 5'-ОН-группой называется 5'-концевым, нуклеозид со свободной 3'-ОН-группой — 3'-концевым. Это определение относится и к более длинным олигонуклеотидам, например тетра-нуклеотиду, изображенному на рисунке 174. Полное название олигонуклеотида: аденилил-(3' → 5')-уридил-(3' → 5')-гуанилил-(3' → 5')-цитидин. Для простоты написания и произношения нуклеозиды обозначаются однобуквенным кодом и нуклеотидные цепи записываются слева направо, начиная с 5'-концевого нуклеозида в порядке следования мономерных звеньев. Возможны два варианта сокращенного написания: динуклеозидмонофосфат (рис. 173) может быть записан как ApC или A—C, а тетра-нуклеотид (рис. 174) как ApUpGpC или A—U—G—C. В случае дезоксирибоолиго- или полинуклеотидов добавляется символ d: d(A—T—G—C—...).

Для обозначения полинуклеотидов используются способы, которые иллюстрируются примерами: поли (A), поли (A—U); они представляют собой соответственно полимеры: A—A—A—A—... и A—U—A—U—A—U—..., а в случае дезоксирибополинуклеотидов: поли d(A), поли d(A—T). В сокращенной записи фосфорилирование 5'-концевого звена символизирует буква «р» слева от 5'-концевого звена: pApC, pApUpGpC, pA—C, pA—U—G—C. Фосфорилирование 3'-концевого звена обозначается той же буквой, но справа от него: ApCp, ApUpGpCp, A—Cp, A—U—G—Cp.

Рис. 174. Аденилил-(3' → 5')-уридил-(3' → 5')-гуанилил-(3' → 5')-цитидин (ApUpGpC).





Ледерберг (Lederberg) Джошуа (р. 1925), американский генетик. Окончил Колумбийский университет (1944), с 1959 г. — профессор Стэнфордского университета. Заложил основы генетики микроорганизмов. Открыл явление конъюгации у бактерий (1946, совместно с Э. Тейтемом). Выяснял причины возникновения устойчивости бактерий к антибиотикам. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1958, совместно с Дж. Бидлом и Э. Тейтемом).

При описании химических процессов с участием сахара и фосфорной кислоты применяются также условные обозначения полинуклеотидных цепей, как это показано на рисунках 173 и 174: остатки сахара изображаются прямыми линиями, соединенными между собой; 2'-, 3'- и 5'-гидроксилы символизируются отрезками, исходящими из прямой.

Различные олиго- и полинуклеотиды отличаются друг от друга содержанием нуклеотидов каждого типа. Выраженные в процентах относительные количества мономерных звеньев называют нуклеотидным составом, а их последовательность — первичной структурой нуклеиновой кислоты.

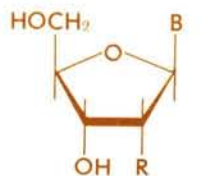
При доказательстве химического строения нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов определяются тип гетероциклического основания, природа углеводного компонента и место присоединения его к основанию, конфигурация гликозидного центра; устанавливаются также число и место присоединения остатков фосфорной кислоты.

Гетероциклические основания в составе нуклеиновых кислот идентифицируются после жесткого кислотного гидролиза сравнением их хроматографических характеристик, электрофоретической подвижности, а также УФ-, ИК- и ЯМР-спектров.

Идентификация углеводных компонентов также проводится после кислотного гидролиза нуклеиновых кислот. При этом из пуриновых или предварительно гидрированных по 5, 6-двойной связи пиримидиновых рибонуклеотидов образуется D-рибоза. Основания дезоксирибонуклеотидов отщепляются в значительно более мягких условиях, чем рибонуклеотиды, но вследствие нестабильности образующаяся дезоксирибоза превращается в левулиновую кислоту. При чрезвычайно мягкой обработке кислотой пуриновых или восстановленных пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов удается выделить дезоксирибозу или ее легко идентифицируемые производные



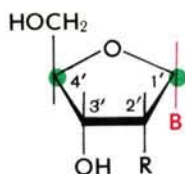
Возможность отщепления гетероциклического основания от углевода в условиях мягкого кислотного гидролиза позволяла предположить, что нуклеозиды представляют собой N-гликозиды, причем в образовании гликозидной связи участвует один из гетероциклических атомов. С помощью спектральных и химических методов анализа было установлено, что основание соединено с углеводом своим N-9 атомом в случае пуринов и N-1 в случае пиримидинов. В состав нуклеотидов входят только два остатка сахара — D-рибоза и 2-дезоксид-рибоза. С помощью периодатного окисления было показано, что оба углевода находятся в форме фуранозы. Наличие в циклической форме углевода асимметрического (C-1') атома углерода обуславливает возможность ее существования в виде двух различных стереоизомеров. В соответствии с принятой номенклатурой стереоизомеры, отличающиеся только конфигурацией гликозидного центра, называются аномерами. Тот из аномеров,



Фуранозная форма

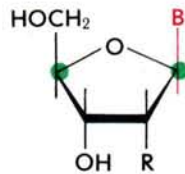
R = H, дезоксирибоза; R = OH, рибоза

который имеет одинаковую конфигурацию у C-1' и у атома, определяющего принадлежность сахара к D- или к L-ряду (см. с. 446), называется α -аномером. Аномер с противоположными конфигурациями у этих атомов называется β -аномером



R=H, α -аномер гликозида
D- дезоксирибозы
R=OH, α -аномер гликозида
D- рибозы

(Конфигурации атомов C-1' и C-4', отмеченных кружками, одинаковы)



R=H, β -аномер гликозида
D- дезоксирибозы
R=OH, β -аномер гликозида
D- рибозы

(Конфигурации атомов C-1' и C-4', отмеченных кружками, противоположны)



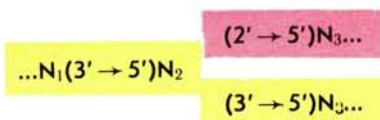
Касперсон (Caspersson) Тобийорт Оскар (р. 1910), шведский биофизик. Окончил Стокгольмский университет (1936), с 1944 г.— руководитель медицинского отдела Нобелевского института медицинских исследований клетки и лаборатории экспериментальных исследований клетки в Стокгольме. Основные работы — в области физики клетки. Исследовал содержание, распределение в клетке и биологическую роль нуклеиновых кислот, в первую очередь РНК.

В нуклеиновых кислотах оба моносахарида имеют β -конфигурацию аномерного центра. Современные доказательства конфигурации аномерного центра базируются на исследовании ЯМР- и ИК-спектров, спектров кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения.

При щелочном и кислотном гидролизе ДНК и РНК ведут себя различно. ДНК устойчива к действию щелочи, тогда как РНК очень быстро гидролизует и дает смесь нуклеозид-3'- и нуклеозид-2'-фосфатов. Эти данные свидетельствуют о том, что в случае РНК наиболее вероятен 5' → 3' тип фосфодиэфирной связи.

Лучшие результаты дают ферментативные методы гидролиза, в том числе использование фосфодиэстеразы змеиного яда, рибонуклеазы и других ферментов. Совокупность химических и ферментативных методов однозначно показывает, что и в ДНК, и в РНК полинуклеотидные цепи построены однотипно за счет 5' → 3'-фосфодиэфирных связей между каждыми двумя соседними нуклеозидными звеньями.

До недавнего времени среди нуклеиновых кислот не обнаруживались разветвленные структуры, что позволяло считать их исключительно линейными полимерами. В последние годы показана возможность существования и разветвленных структур РНК. В частности, гетерогенные ядерные РНК в клетках опухоли HeLa содержат до 10% молекул, в которых ответвление обусловлено присоединением одной цепи РНК к другой посредством 2' → 5'-фосфодиэфирных связей. Таким образом, в точке разветвления существует структура:



Определение первичной структуры

Общие принципы расшифровки первичной структуры нуклеиновых кислот те же, что и в случае других биополимеров. Полинуклеотидная цепь расщепляется с помощью ферментов и химических агентов, обладающих повышенной избирательностью, на фрагменты, которые дешифруются специфическими методами, и затем реконструируется вся цепь.

дезоксирибонуклеиновые кислоты. Были разработаны также методы быстрого определения последовательностей длинных участков ДНК. Успехи в анализе последовательности ДНК привели к тому, что структуры РНК стали определяться путем их «переписывания» в соответствующую дезоксирибонуклеотидную последовательность с помощью обратной транскриптазы.

Принцип блочного метода определения последовательности показан на рисунке 175. Олигонуклеотид неизвестной структуры расщепляется двумя способами: X и Y, различающимися по специфичности. При расщеплении по способу X образуются три олигонуклеотида, а по способу Y — два. Структуры всех полученных фрагментов устанавливаются соответствующим методом. Далее проводится сопоставление структур олигонуклеотидов Y со структурами X с целью нахождения частично совпадающих (перекрывающихся) последовательностей и реконструкции таким образом исходной цепи. Поскольку каждый полученный олигонуклеотид представляет собой блок, из суммы которых строится исходная структура, метод называется методом перекрывающихся блоков.

Ферменты, расщепляющие ДНК. Фрагментация нуклеотидной цепи при анализе последовательности осуществляется с помощью ферментов, называемых нуклеазами. Известно значительное число таких ферментов. Одни из них расщепляют фосфодиэфирные связи внутри полинуклеотидной цепи (эндодезоксирибонуклеазы), другие гидролизуют цепь начиная с 5'- или 3'-конца — они называются 5'-или 3'-экзодезоксирибонуклеазами. Эндонуклеазы различаются по специфичности — расщепляют определенные последовательности или не предъявляют к последовательности никаких требований. Существуют ферменты, гидролизующие только одноцепочечные ДНК или двухцепочечные ДНК, или те и другие. Наиболее важным классом эндодезоксирибонуклеаз являются рестрикционные эндонуклеазы.

Рестрикционные эндонуклеазы. Название рестрикционных эндонуклеаз (или, сокращенно, рестриктаз) образуется из первой буквы названия рода и первых двух букв названия вида микроорганизма, из которого получен фермент. Например, если источником фермента является *Escherichia coli*, фермент называется Eco, *H. influenzae* — Hin. Название штамма следует за этими тремя буквами — Hind. Если в микроорганизме содержится несколько ферментов, то они нумеруются римскими цифрами EcoRI, EcoRII и т. д.

Эти ферменты являются компонентами системы рестрикции — модификации прокариотических клеток, которая предназначена для их защиты от чужеродных ДНК. К рестрикционным эндонуклеазам относятся также и все другие ферменты, специфически расщепляющие ДНК по определенной последовательности, хотя часто их роль в процессах рестрикции — модификации не доказана. В зависимости от характера узнаваемой нуклеотидной последовательности («сайта»), мест расщепления и условий реакции рестриктазы делятся на три класса.

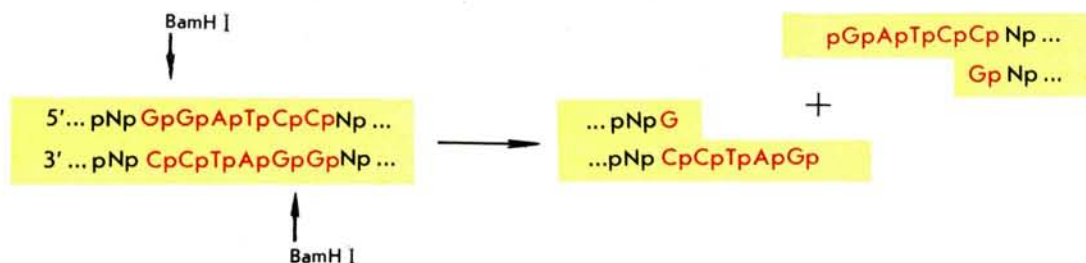
Рестрикционные эндонуклеазы первого класса узнают специфическую последовательность ДНК, но расщепляют нуклеиновую кислоту в различных местах, находящихся на неопределенном расстоянии от участка узнавания. Они содержат в одном ферментном комплексе рестриктирующую и модифицирующую активности и требуют присутствия в среде S-аденозилметионина, АТФ и Mg^{2+} .

Ферменты второго класса расщепляют участок ДНК, имеющий ось симметрии второго порядка. К ним относится также несколько ферментов, узнающих несимметричные последовательности и расщепляющих ДНК на некотором расстоянии от участка узнавания. Общим свойством рестриктаз этого класса является необходимость



Берг (Berg) Пол (р. 1926), американский биохимик. Окончил Пенсильванский университет (1948), с 1959 г. — профессор Стэнфордского университета. Основные работы посвящены генной инженерии, изучению роли тРНК в биосинтезе белка. Впервые получил рекомбинантные молекулы ДНК бактериального вируса лямбда и вируса обезьяны SV-40. Лауреат Нобелевской премии по химии (1980, совместно с У. Гилбертом и Ф. Сенгером).

присутствия в среде только ионов Mg^{2+} . Некоторые рестриктазы расщепляют полинуклеотидную цепь так, что в результате образуются фрагменты, содержащие на 5'-концах выступающие четырехзвенные фрагменты с фосфорилированными 5'-концевыми звеньями. Вследствие симметрии расщепляемой последовательности эти тетра-нуклеотиды комплементарны друг другу. Они называются липкими, так как могут взаимодействовать друг с другом, образуя совершенные двуспиральные участки. Другие рестриктазы этого класса расщепляют полинуклеотидную цепь с образованием фрагментов, не содержащих однонитевых концевых участков, или структур с выступающими 3'-концевыми однонитевыми участками.



Для рестриктаз третьего класса участок узнавания не обязательно должен быть симметричным, а расщепление происходит на расстоянии 24 — 27 нуклеотидов от участка узнавания. Так же как рестриктазы первого класса, они содержат в одном комплексе и рестриктирующую, и метилирующую активности и требуют для рестрикции присутствия АТФ. Пример последовательности, узнаваемой рестриктазой EcoRI, относящейся к третьему классу, приведен ниже:



Известно уже несколько сотен рестриктаз. Часто выделяемые из разных источников ферменты проявляют одинаковую специфичность. Такие ферменты называют изоизомерами.

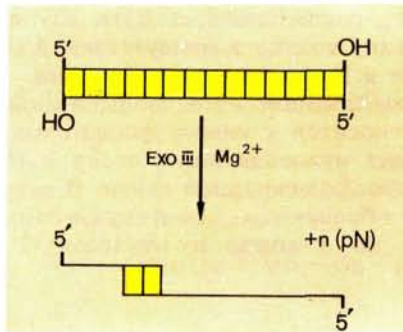
Дезоксирибонуклеазы I и II (ДНазы I и II). Дезоксирибонуклеаза I, или панкреатическую дезоксирибонуклеазу, выделяют из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Она расщепляет одно- и двухцепочечные ДНК, давая сложную смесь как моно-, так и олигонуклеотидов с 5'-концами, содержащими фосфатные группы.

Фермент проявляет активность в присутствии ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} при оптимальном значении pH среды 7,5. ДНазы I неспецифичны к последовательности субстрата, однако наблюдаются незначительные различия в скоростях расщепления фосфодиэфирных связей, образуемых различными нуклеотидами.

Дезоксирибонуклеаза II гидролизует ДНК до смеси моно- и олигонуклеотидов, содержащих 3'-фосфатные группы, оптимум pH фермента лежит в кислой области.

ДНазы I и II используются для расщепления ДНК с целью получения коротких фрагментов.

Эксонуклеаза III из *E. coli*. Фермент катализирует последовательное удаление 3'-концевых звеньев из двухцепочечных ДНК путем отщепления их в виде 5'-мононуклеотидов

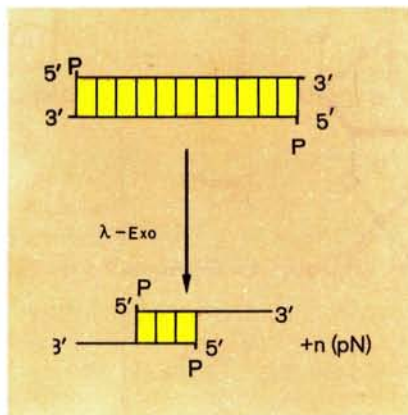


При этом в ДНК остаются одноцепочечные 5'-концевые участки; гидролиз продолжается до тех пор, пока длина двухцепочечного участка в центре гидролизуемой молекулы не уменьшается настолько, что два 5'-концевых фрагмента больше не могут удерживаться вместе. Когда они разделяются, гидролиз останавливается. Эксонуклеаза III используется для укорачивания двухцепочечных фрагментов ДНК.

5'-Эксонуклеаза из *E. coli*, инфицированной бактериофагом λ . Фермент удаляет нуклеозид-5'-фосфаты, последовательно отщепляя их от 5'-конца двухцепочечных ДНК. В ре-



Смит (Smith) Хамилтон (р. 1931), американский микробиолог. Окончил Калифорнийский университет в Беркли (1952), с 1970 г. — профессор университета Дж. Гопкинса в Балтиморе. Основные работы — в области генной инженерии. Впервые выделил рестрикционную эндонуклеазу Hind II (1970), разработал методы определения структуры узнаваемого участка. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1978, совместно с Д. Натансом и В. Арбером).



зультате образуются ДНК с выступающими 3'-концевыми участками.

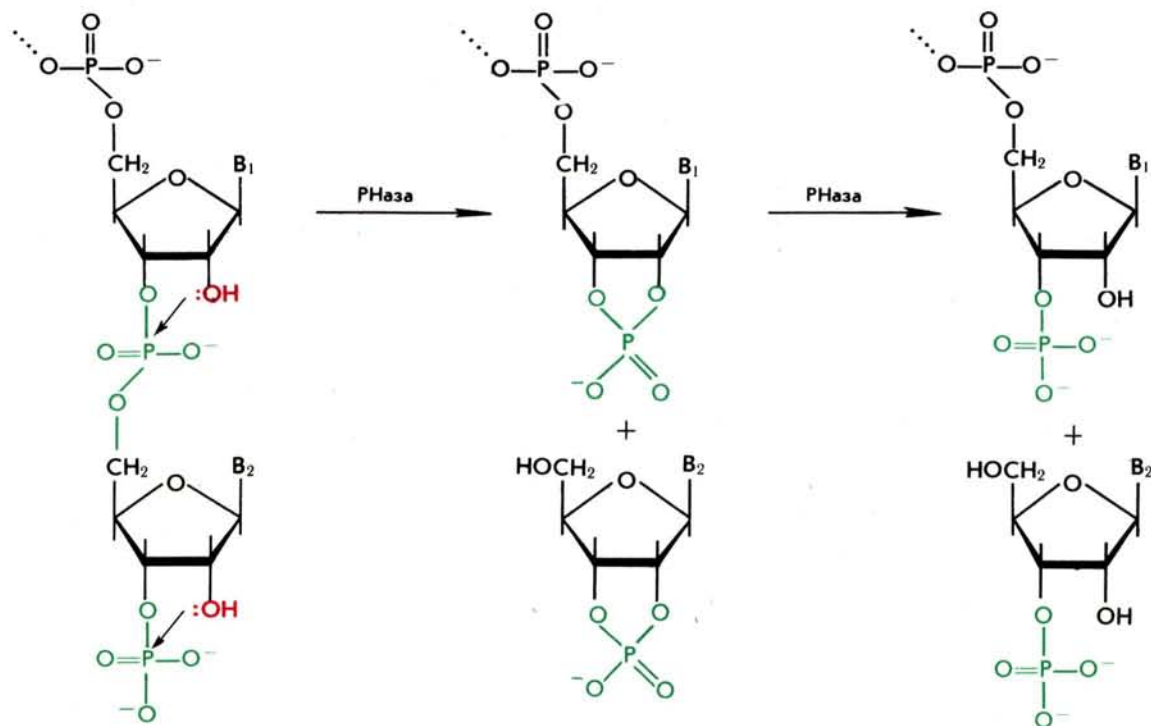
Эксонуклеаза VII из *E. coli* специфична к одноцепочечным ДНК и отщепляет небольшие олигонуклеотиды как с 5'-, так и с 3'-концов ДНК.

Применение находит и эксонуклеаза I из *E. coli*, гидролизующая одноцепочечные ДНК в 40 000 раз быстрее, чем двух-

цепочечные. Гидролизу подвергаются только полимеры со свободной 3'-гидроксильной группой; в результате гидролиза ДНК укорачивается с 3'-конца путем последовательного отщепления нуклеозид-5'-фосфатов. Фермент используется для специфического удаления 3'-концевых одноцепочечных участков ДНК.

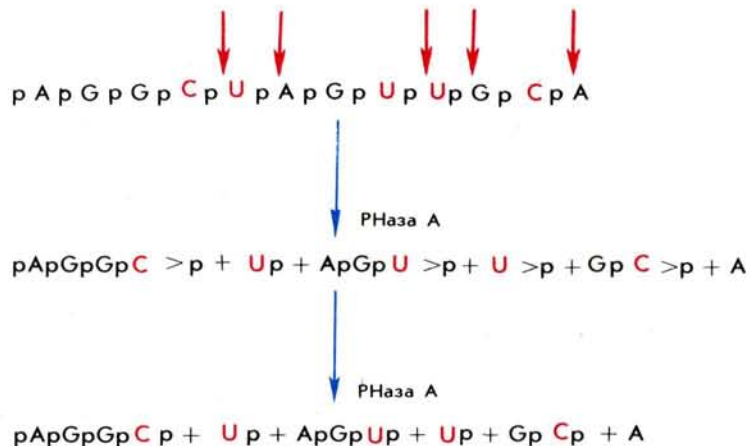
Следует отметить, что в клетках содержится большое количество дезоксирибонуклеаз, расщепляющих ДНК как по экзо-, так и по эндонуклеазному типу только в присутствии АТР. Многие из них принимают участие в процессах рекомбинации.

Ферменты, расщепляющие РНК. Большинство известных рибонуклеаз (РНаз) относится к классу фосфотрансфераз — ферментов, катализирующих нуклеофильную атаку 2'-ОН-группы рибозы на атом фосфора фосфодиэфирной связи. В результате на первом этапе реакции образуются олигонуклеотиды, содержащие 2',3'-циклофосфат на 3'-конце и нуклеозид-2',3'-циклофосфаты



При более высоких концентрациях РНазы циклофосфатные группы раскрываются, образуя 3'-фосфатные группы. Процесс раскрытия циклофосфатов может быть осуществлен кратковременной обработкой кислотой; при этом образуются смеси 2'- и 3'-монофосфатов. Такие рибонуклеазы относятся к эндонуклеазам.

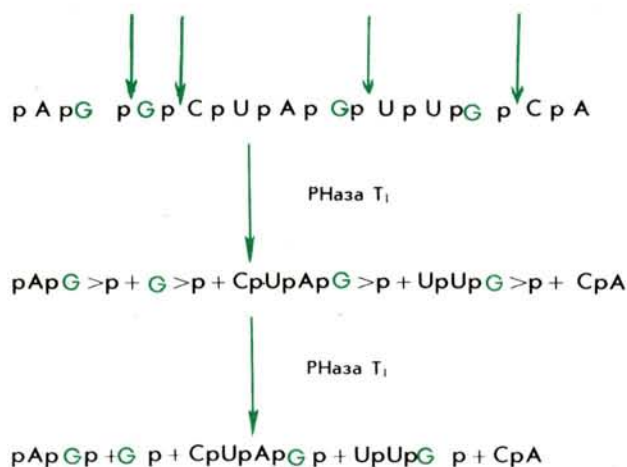
Рибонуклеаза А специфически гидролизует РНК по пиримидиновым основаниям; конечными продуктами (после расщепления циклофосфатов) являются пиримидиновые нуклеозид-3'-фосфаты и олигонуклеотиды, содержащие 5'-ОН- и 3'-фосфатную группы:



Натанс (Nathans) Даниэль (р. 1928), американский вирусолог. Окончил университет штата Делавэр (1950), с 1972 г. — директор отдела микробиологии медицинского факультета университета Дж. Гопкинса в Балтиморе. Основные работы — по изучению структуры и функции генома вируса. Впервые с помощью рестрикционных эндонуклеаз провел картирование ДНК вируса обезьяны SV-40. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1978, совместно с Г. Смитом и В. Арбером).

Скорость расщепления различных фосфодиэфирных связей убывает в ряду $CpA > UpA \gg CpC \gg UpC > CpU > UpU$; предпочтительно гидролизуются однонитевые РНК.

Рибонуклеаза T_1 из *Aspergillus oryzae* осуществляет расщепление РНК по гуаниновым звеньям, образуя гуанозин-3'-фосфаты и олигонуклеотиды, имеющие на 5'-конце гидроксильную группу, а на 3'-концах — гуанозин-3'-фосфат:



Так же как и рибонуклеаза А, РНаса T_1 со значительно большей скоростью расщепляет одноцепочечные полинуклеотиды; скорость гидролиза убывает в ряду $GpC > GpA > GpG > GpU$.



Арбер (Arber) Вернер (р. 1929), швейцарский генетик. Образование получил в Цюрихе, профессор университета и Биоцентра в Базеле. Основные работы посвящены изучению структуры и функционирования вирусного генома. Открыл (1962) ферменты рестрикции и модификации. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1978, совместно с Д. Натансом и Г. Смитом).

Рибонуклеаза T_2 из *A. oryzae* при длительном гидролизе РНК расщепляет ее полностью до нуклеозид-3'-фосфатов. При частичном расщеплении РНК образуются преимущественно фрагменты, содержащие на 3'-концах аденозин-3'-фосфат.

Рибонуклеаза U_2 из *Ustilago sphaerogena* преимущественно расщепляет фосфодиэфирные связи, в которых донором 3'-ОН-группы являются пуриновые нуклеотиды, т. е. связи RpN ; скорость расщепления возрастает в ряду $U < C < G < A$.

Среди других ферментов, расщепляющих РНК, следует упомянуть рибонуклеазу III из *E. coli*, проявляющую абсолютную специфичность к двухцепочечным полирибонуклеотидам. Фермент дает олигонуклеотиды, оканчивающиеся 3'-фосфатом.

Ферменты, расщепляющие ДНК и РНК. Известно значительное число ферментов, неспецифичных к типу углеводного остатка в нуклеиновых кислотах. Так, фосфодиэстеразы, выделяемые из яда змей, гидролизуют олиго- и полинуклеотиды начиная с 3'-конца, путем последовательного отщепления нуклеозид-5'-фосфатов. Эти ферменты способны катализировать гидролиз одноцепочечных и со значительно меньшей скоростью двуспиральных полинуклеотидов. Напротив, фосфодиэстеразы из селезенки гидролизуют нуклеиновые кислоты начиная с 5'-конца, последовательно удаляя концевые звенья в виде нуклеозид-3'-фосфатов. Оба фермента гидролизуют рибо-, дезоксирибо-, олиго- и полинуклеотиды и используются для получения мононуклеотидов.

Большая группа ферментов, неспецифичных к типу углеводного остатка, весьма чувствительна к вторичной структуре и расщепляет только одноцепочечные полинуклеотиды. Наиболее широко используемыми ферментами такого типа являются нуклеаза S_1 из *A. oryzae*, нуклеаза из *Mung bean* и нуклеаза из *N. crassa*. Первые две из них расщепляют одноцепочечные ДНК и РНК в слабощелочной среде в присутствии ионов цинка до олиго- и мононуклеотидов с фосфатной группой на 5'-конце; третья расщепляет полинуклеотиды в нейтральной и слабоосновной средах, давая 5'-фосфорилированные короткие олигонуклеотиды.

Эти нуклеазы широко используются для исследования вторичной структуры одноцепочечных участков. В генной инженерии они применяются для удаления односторонних концевых участков ДНК.

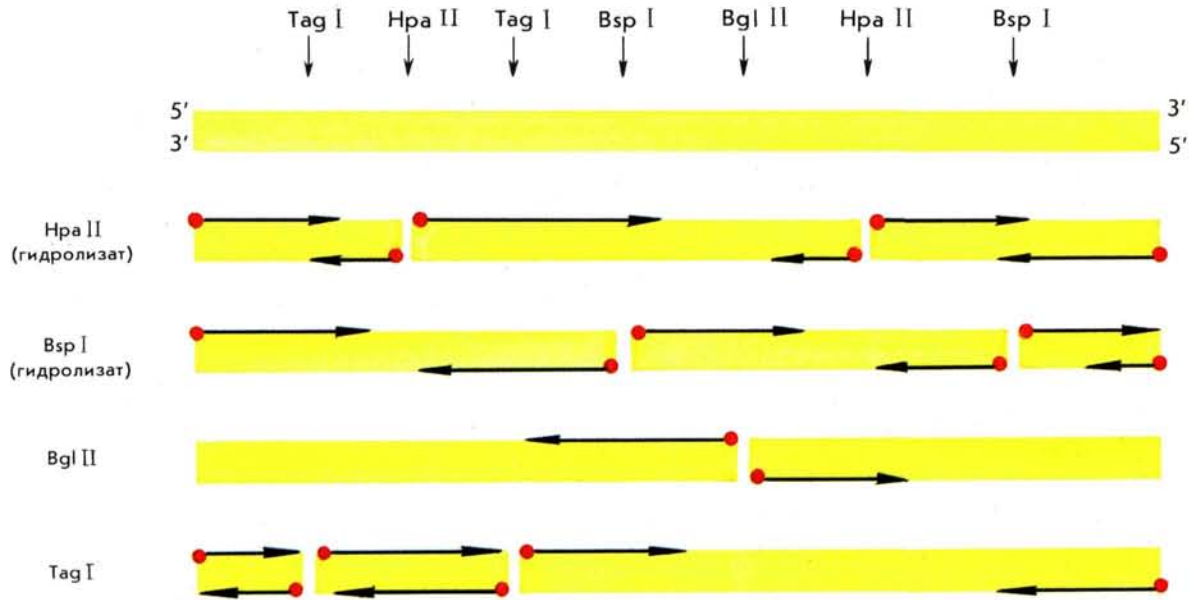
Существует большое число ферментов, способных отщеплять фосфатные группы от моно-, олиго- и полинуклеотидов. Некоторые из них обладают специфичностью в том отношении, что удаляют только 5'- или только 3'-фосфатные группы. Из неспецифичных фосфомоноэстераз, отщепляющих фосфаты вне зависимости от их положения как от моно-, так и от полинуклеотидов, широко используются две фосфомоноэстеразы. Одна из них, так называемая бактериальная щелочная фосфатаза, выделяется из *E. coli*, другая — из тонкого кишечника телят.

В блочном методе определения последовательности нуклеиновых кислот весьма существенна методология структурного анализа. В одном из возможных вариантов используется полное расщепление полинуклеотидной цепи двумя (или более) ферментами с различной специфичностью. В случае РНК это может быть осуществлено различными рибонуклеазами, например гидролиз последовательно рибонуклеазой T_1 , а затем — панкреатической рибонуклеазой. Структуры полученных олигонуклеотидов сравниваются для поиска перекрывающихся последовательностей. Если это оказывается недостаточным, используется третья РН-аза.

Для двухцепочечных ДНК перекрывающиеся блоки получают путем расщепления двумя или более различными рестрикционными эндонуклеазами. При этом часть исследуемой ДНК гидролизует одним ферментом и устанавливается структура полученных фраг-

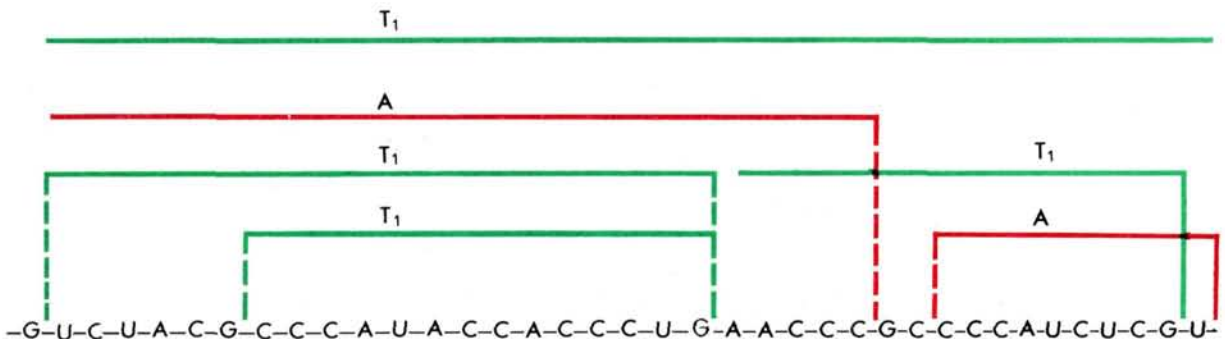
ментов, а затем те же операции повторяются на другой порции ДНК с другим ферментом. Поскольку требование перекрывания приходится сочетать с необходимостью получения сравнительно небольших фрагментов, иногда применяется расщепление несколькими рестрикционными эндонуклеазами одновременно. При этом обязательно устанавливать полную последовательность фрагментов — важно лишь найти «перекрытия». Процесс поиска перекрывающихся блоков изображается специальными схемами, как показано на рисунке 176.

Рис. 176. Схема применения метода перекрывающихся блоков для определения последовательности ДНК с использованием рестриктаз.



Фрагменты ДНК условно обозначены прямоугольниками, верхняя сторона которых представляет собой одну комплементарную цепь, а нижняя сторона — другую. Слева указаны эндонуклеазы, использованные для получения перекрывающихся блоков. Вверху дана рестрикционная карта определяемого фрагмента. Стрелками в прямоугольниках указывается длина расшифрованного участка и направление, в котором определялась последовательность (в данном случае она определялась в направлении от 5'-к 3'-концу).

Рис. 177. Перекрывающиеся блоки, получаемые методом неполных расщеплений РНК РН-азами А и T₁.



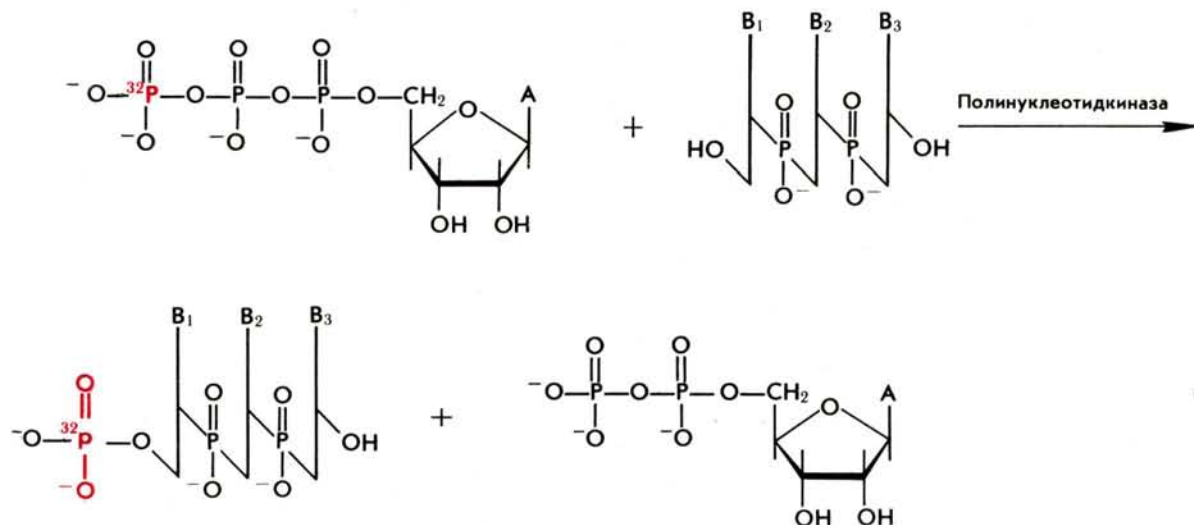
Как видно на схеме, установленные последовательности полностью перекрываются; более того, они определены фактически дважды — для верхней цепи и независимо для нижней: это служит гарантией правильности определения полной структуры и позволяет избежать ошибок.

Другой способ получения перекрывающихся блоков предполагает неполное расщепление исследуемого фрагмента (в частности, при помощи РНаз). Пример определения последовательности рибонуклеотида таким методом изображен на рисунке 177.

Неполные расщепления используются и в случае установления последовательности ДНК. Для этой цели может быть применена обработка как рестрикционными эндонуклеазами, так и неспецифичными эндонуклеазами (например, ДНазой I в присутствии ионов Mn^{2+}).

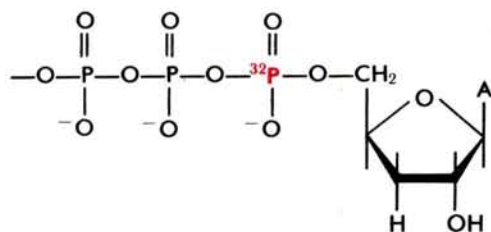
Определение строения олигонуклеотидов. Во всех современных способах определения первичной структуры нуклеиновых кислот первостепенную роль играют методы введения радиоактивных меток в 5'- и 3'-концевые звенья. Чаще всего роль концевой метки играет фосфатная группа, содержащая ^{32}P , но иногда в качестве метки используют также тритий (3H) или иод (^{125}I).

Для введения меченых фосфатных групп в 5'-концевые звенья олиго- и полинуклеотидов используется фермент полинуклеотидкиназа (см. с. 353); радиоактивным реагентом служит АТФ, содержащий меченый фосфор в γ -положении ($^{32}pppA$)

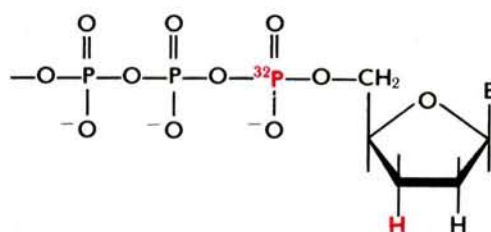


Методы включения метки в 3'-концевые группы более разнообразны. Так, в двухцепочечные ДНК метка вводится в составе $[\alpha\text{-}^{32}P]$ -дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с помощью ДНК-полимеразы I E. coli или фага T4 (см. с. 348). Двух- и одноцепочечные ДНК могут быть помечены по 3'-концевому звену с использованием концевой нуклеотидилтрансферазы. В одном из вариантов этого метода к 3'-ОН-группе олигодезоксирибонуклеотида присоединяются $[\alpha\text{-}^{32}P]$ -меченые рибонуклеозидтрифосфаты. После ферментативной реакции продукт подвергается щелочному гидролизу, в результате чего на 3'-конце образуется только одно рибонуклеотидное звено. Во втором способе используются аналоги природных нук-

леозидтрифосфатов, не содержащие 3'-ОН-группы. Такие аналоги могут быть введены в 3'-концевое звено олигонуклеотида, но не способны присоединять к себе последующие звенья, поэтому их называют терминирующими. Обычно для этих целей применяются кордицепинтрифосфат или 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты, содержащие $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -меченую фосфатную группу:



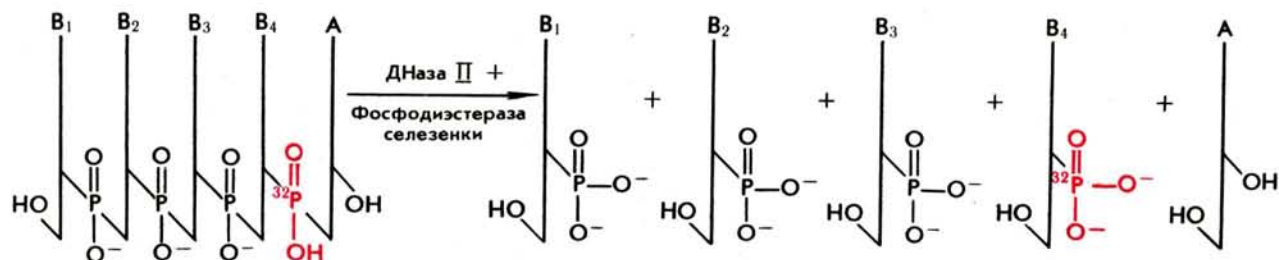
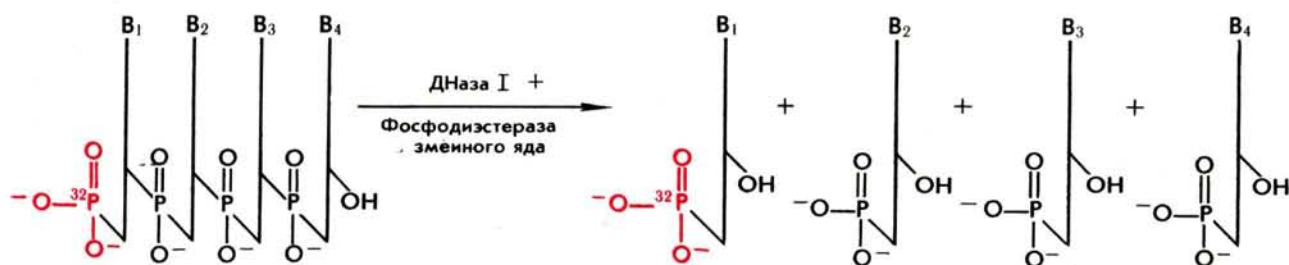
Кордицепин трифосфат



2', 3' – Дидезоксинуклеозидтрифосфат

Введение в 3'-концевое звено РНК 3',5'-дифосфатов, меченных ^{32}P по 5'-фосфатной группе, может быть осуществлено с помощью РНК лигазы, присоединяющей субстрат к 3'-ОН-группе. 3'-Конец РНК может быть маркирован также тритием с помощью химических методов: окислением периодатом и восстановлением бортригидом натрия. При этом используется РНК, не содержащая 3'-фосфатной группы.

Необходимым составным элементом анализа нуклеотидной последовательности во многих случаях является определение кон-



цевых групп. Это достигается введением метки (5'- или 3'-[³²P]-фосфата) в 5'- и 3'-концевые звенья олиго- или полинуклеотидов с последующим ферментативным гидролизом до соответствующих нуклеозидмонофосфатов. После разделения продуктов гидролиза идентифицируются меченые концевые звенья.

Для определения первичной структуры коротких олигонуклеотидов (до 15 — 20 звеньев) обычно используют метод «блуждающего пятна», или «сэндгерпринта». Меченный по одному из концов олигонуклеотид гидролизуется экзонуклеазой с противоположного конца в условиях неполного расщепления, так что образуется набор всех возможных фрагментов. При расположении полученных таким путем олигонуклеотидов в порядке возрастания длины каждые два соседних продукта будут отличаться друг от друга на одно концевое звено. Меченое же звено у всех олигонуклеотидов является общим (рис. 178).

Совершенно очевидно, что если разделить все полученные олигонуклеотиды и для каждого из них определить концевое звено, противоположное меченому, то после расположения всех фрагментов в порядке возрастания длины можно реконструировать последовательность исходного олигонуклеотида. Таким образом, проблема заключается в разделении продуктов и идентификации их концевых групп.

В методе «блуждающего пятна» эти две задачи решаются одновременно. Смесь меченых фрагментов подвергается двумерному разделению. Сначала оно проводится путем электрофореза на полосках ацетата целлюлозы при pH 3,5 (разделение по составу), а затем влажная полоска прикладывается к краю пластинки с ДЭА целлюлозой, которая сорбирует частично разделенные олигонуклеотиды, и разделение ведется в направлении, перпендикулярном первому (разделение по длине). В качестве элюента используется гидролизат РНК, содержащий олигонуклеотиды всех возможных длин и составов (такая процедура называется гомохроматографией).

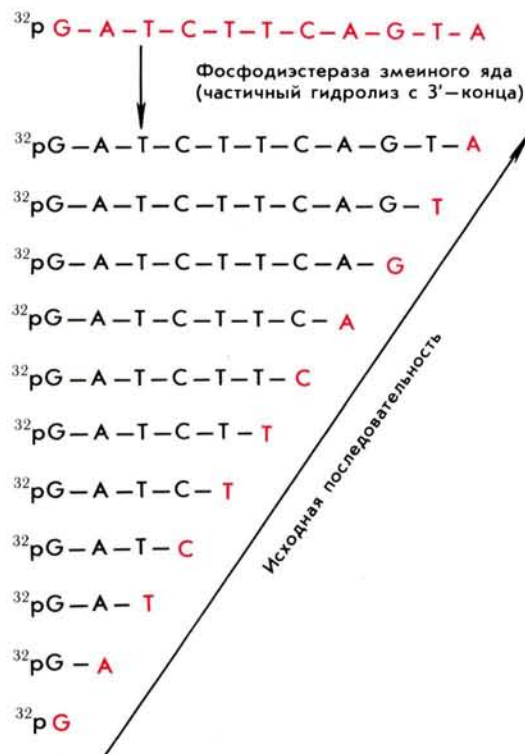


Рис. 178. Фрагменты частичного гидролиза 5'-меченого олигонуклеотида фосфодиэстеразой змеиного яда.

Результат разделения фиксируется радиоавтографией: для этого к пластинке прикладывается рентгеновская пленка, и те участки, которые контактируют с радиоактивными продуктами, засвечиваются. В результате каждому фрагменту соответствует отдельное пятно на пленке и фактически анализируется относительное расположение полученных пятен.

Если сравнивать подвижность каждого олигонуклеотида при электрофорезе с подвижностью получаемого из него продукта, укороченного на одно звено, то наблюдаются следующие закономерности: отщепление рТ приводит к уменьшению подвижности продукта по сравнению с исходным олигонуклеотидом вследствие резкого уменьшения заряда. Отщепление рG вызывает качественно такой же, но количественно меньший эффект. Отщепление рА, уменьшая длину олигонуклеотида и в значительно меньшей степени (по сравнению с рТ и рG) заряд, приводит к некоторому увеличению подвижности. Наконец, отщепление рС очень мало меняет заряд, но резко уменьшает длину, что существенно увеличивает подвижность продукта.

При гомохроматографии разделение происходит в соответствии со следующими закономерностями: чем больше длина олигонуклеотида, тем он менее подвижен, так что каждые два соседних пятна представляют собой олигонуклеотиды, отличающиеся на одно звено; если два соседних пятна получены в результате отщепления пуринового нуклеотида, то расстояние между ними по вертикали больше, чем при отщеплении пиримидинового нуклеотида.

В качестве примера рассмотрим анализ радиоавтограммы, приведенной на рисунке 179. Очевидно, что наименее подвижный при гомохроматографии компонент представляет собой исходный олигонуклеотид. Соседний с ним продукт образуется путем отщепления 3'-концевого звена: при электрофорезе подвижность его слегка увеличивается, а при гомохроматографии — резко возрастает. Отсюда делается вывод, что отщепленным звеном является А. Следующий продукт (3) отличается от продукта (2) также одним звеном. Он значительно менее подвижен при электрофорезе и несколько более подвижен при гомохроматографии, следовательно, (3) образуется из (2) в результате отщепления Т. Продолжая такой анализ, определяют звено, которым отличается друг от друга каждая пара соседних пятен, т. е. концевые звенья каждого олигонуклеотида смеси. «Читая» эти концевые нуклеотиды, можно восстановить исходную последовательность.

Используемые в методе «блуждающего пятна» правила схематически представлены в рамке на рисунке 179.

Отщепление Т резко уменьшает подвижность при электрофорезе и мало увеличивает при гомохроматографии.

Отщепление G незначительно уменьшает подвижность при электрофорезе и сильно увеличивает при гомохроматографии.

Отщепление А незначительно увеличивает подвижность при электрофорезе и сильно — при гомохроматографии.

Отщепление С сильно увеличивает подвижность при электрофорезе и незначительно — при гомохроматографии.

С помощью метода «блуждающего пятна» могут определяться последовательности олигонуклеотидов, содержащих до 20 звеньев. Одним из наиболее существенных его недостатков является недостоверность определения последовательности двух или трех звеньев, соседних с меченым звеном.

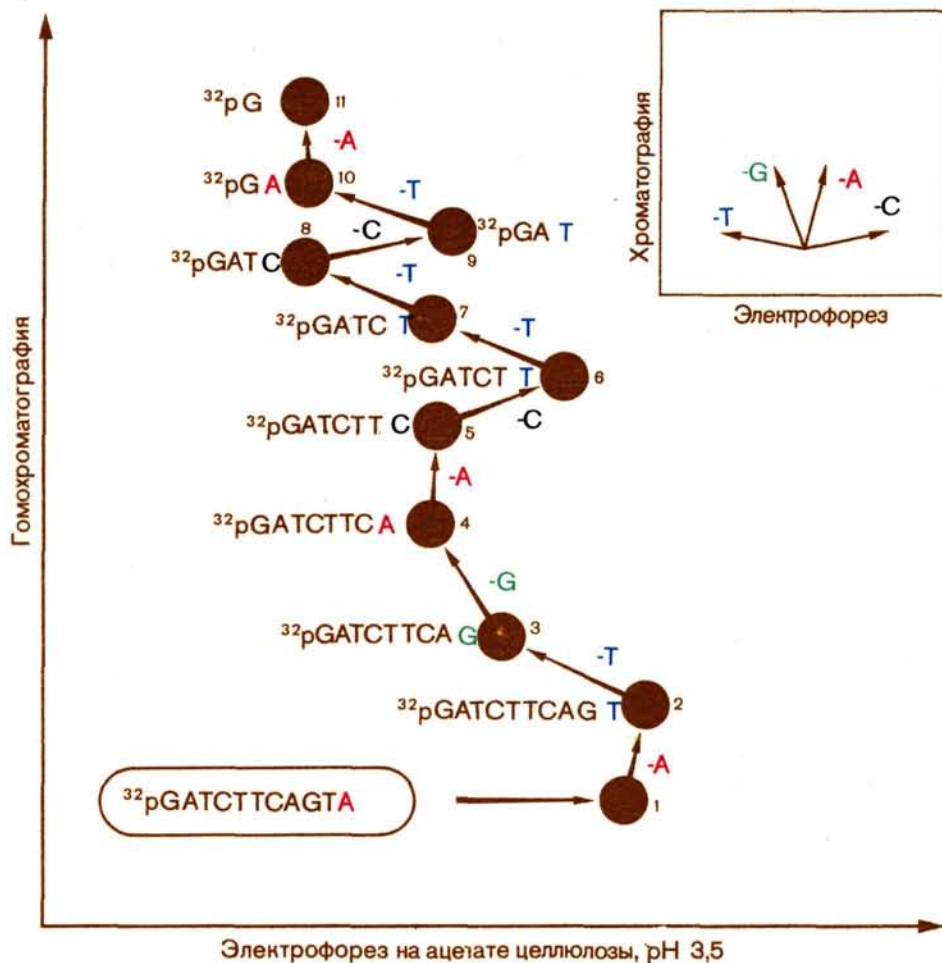
Современные методы определения последовательности фрагментов нуклеиновых кислот основаны на одном общем принципе. Этот принцип заключается в сравнении длин всех возможных концевых продуктов, полученных из исходного полимера таким образом, что все они имеют на одном конце одну и ту же последовательность, а на другом — один и тот же нуклеотид.

В таблице 12 представлены наборы концевых продуктов разной длины, имеющих одно и то же 5'-концевое звено (G), а оканчивающихся аденозином (колонка А), гуанозином (колонка G), цитидином (колонка С) или тимидином (колонка Т). В колонке А находятся пентануклеотид, ундека- и тридекануклеотид, длины которых совпадают с положением А в исходном полинуклеотиде. Аналогично в колонке С длины фрагментов (три-, гекса-, нона-, дека-, тетрадека- и пентадека-) соответствуют положению С в исходном нуклеотиде. То же справедливо для соединений, оканчивающихся G и Т.

Следовательно, если для полинуклеотида получить полный набор концевых продуктов, специфически «оборванных» у определенного типа звеньев, то из анализа их длины легко определить положение данного звена в исходном полинуклеотиде. Проводя подобную операцию для каждого из четырех нуклеотидных звеньев, можно вывести полную последовательность исследуемого полимера.

Однако определение абсолютных длин фрагментов — операция весьма затруднительная, и поэтому современные методы анализа заменяют его сравнением длин продуктов, оканчивающихся разными типами звеньев. Если нуклеотиды (табл. 12) записывать в последовательности увеличения их длины на одно звено начиная с самого короткого продукта (колонка G, затем колонки Т, С, снова Т, А и т. д.), то получается формула GTCTACGGCCATACC, соот-

Рис. 179. Двумерное разделение смеси радиоактивных нуклеотидов.



ветствующая последовательности исходного олигонуклеотида. При таком рассмотрении учитываются не абсолютные значения длин олигонуклеотидов, сравнение ведется по принципу «короче — длиннее».

Таким образом, для полного анализа последовательности любого полинуклеотида необходимо иметь, во-первых, метод получения четырех наборов специфических концевых продуктов, подобных тем, которые приведены в таблице 12, и, во-вторых, метод, позволяющий проводить сравнение длин этих продуктов. Различие современных методов анализа заключается в способах получения наборов специфических фрагментов. Общность — в способе сравнения длин, которое во всех случаях производится путем электрофореза радиоактивных концевых продуктов в пластинках полиакриламидного геля. По окончании электрофореза положение продуктов в геле определяют путем радиоавтографии. Каждый продукт проявляется в виде темной полосы на рентгеновской пленке; сравниваются относительные подвижности полос в разных дорожках, подобно тому как сравнивались длины продуктов в таблице 1. Картина распределения полос на рисунке 180 соответствует последовательности олигонуклеотидов в таблице 12. Это следует из анализа относительных подвижностей продуктов: самый подвижный и, следовательно, самый короткий продукт обнаруживается в дорожке G, следующий по подвижности и длине — в колонке T, далее — в колонке C, следующие два — в колонках T и A соответственно и т. д. Выписывая таким образом названия колонок в порядке, в котором в них обнаруживаются последовательно удлиняющиеся продукты, получают формулу исходного олигонуклеотида.

Метод неполных специфических химических расщеплений (метод Максама—Гилберта) используется для определения последовательности ДНК. Меченые концевые продукты получают путем специфического расщепления полинуклеотида химическими реагентами по одному из звеньев. Обработка проводится в условиях неполной «статистиче-

Таблица 12.

Схема определения последовательности полинуклеотидов

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
5' р GTCTACGGCCATACTACCC 3'

Длина концевого продукта	Концевые продукты, заканчивающиеся звеном				Последовательность, выведенная из анализа
	A	G	C	T	
1	pG				5'
2				pGT	G
3			pGTC		T
4				pGTCT	C
5	pGTCTA				T
6			pGTCTAC		A
7		pGTCTACG			C
8		pGTCTACGG			G
9			pGTCTACGGC		G
10			pGTCTACGGCC		C
11	pGTCTACGGCCA				C
12				pGTCTACGGCCAT	A
13	pGTCTACGGCCATA				T
14			pGTCTACGGCCATAC		A
15			pGTCTACGGCCATACC		C
					3'

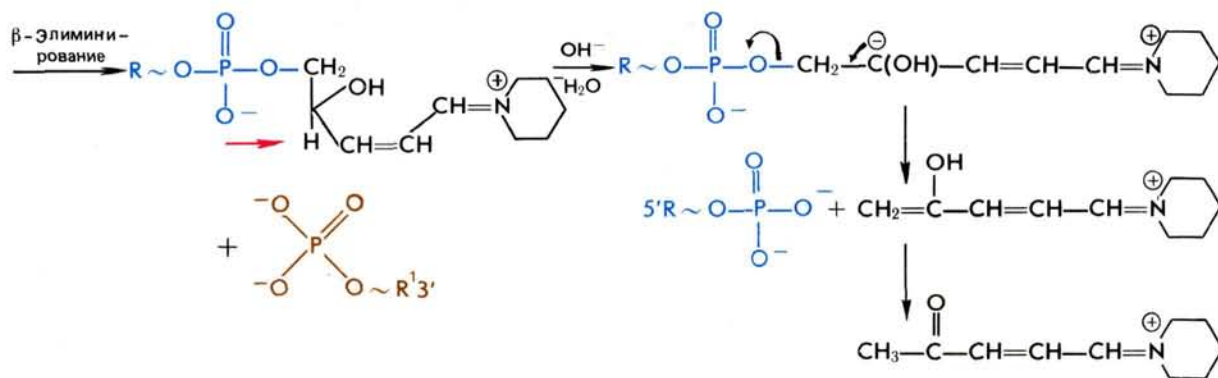
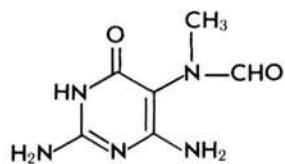
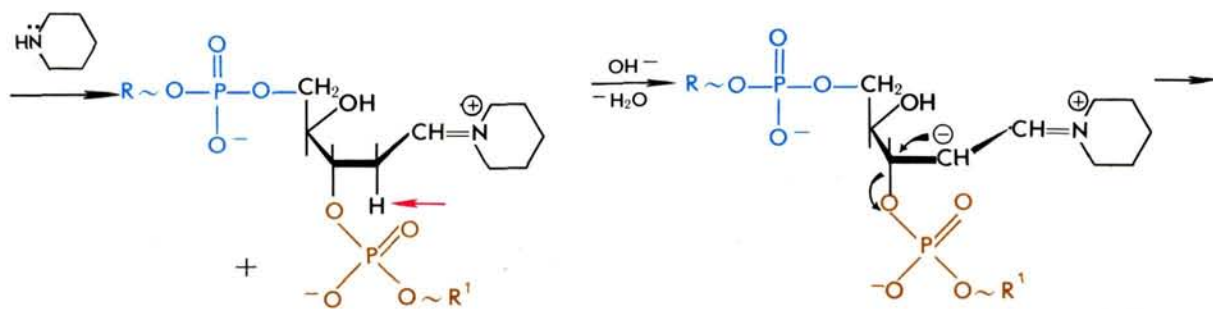
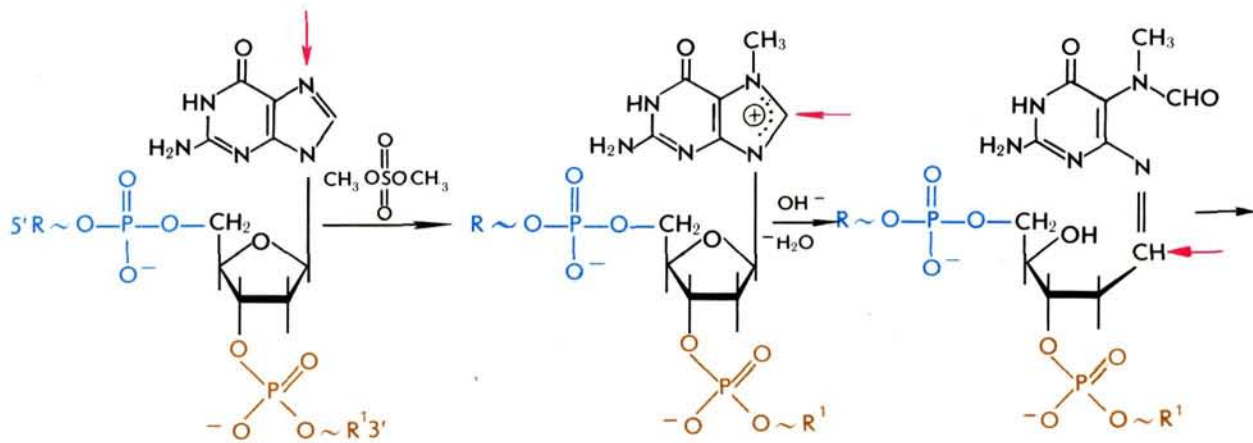


Рис. 181. Химическая модификация по гуанозиновым звеньям.

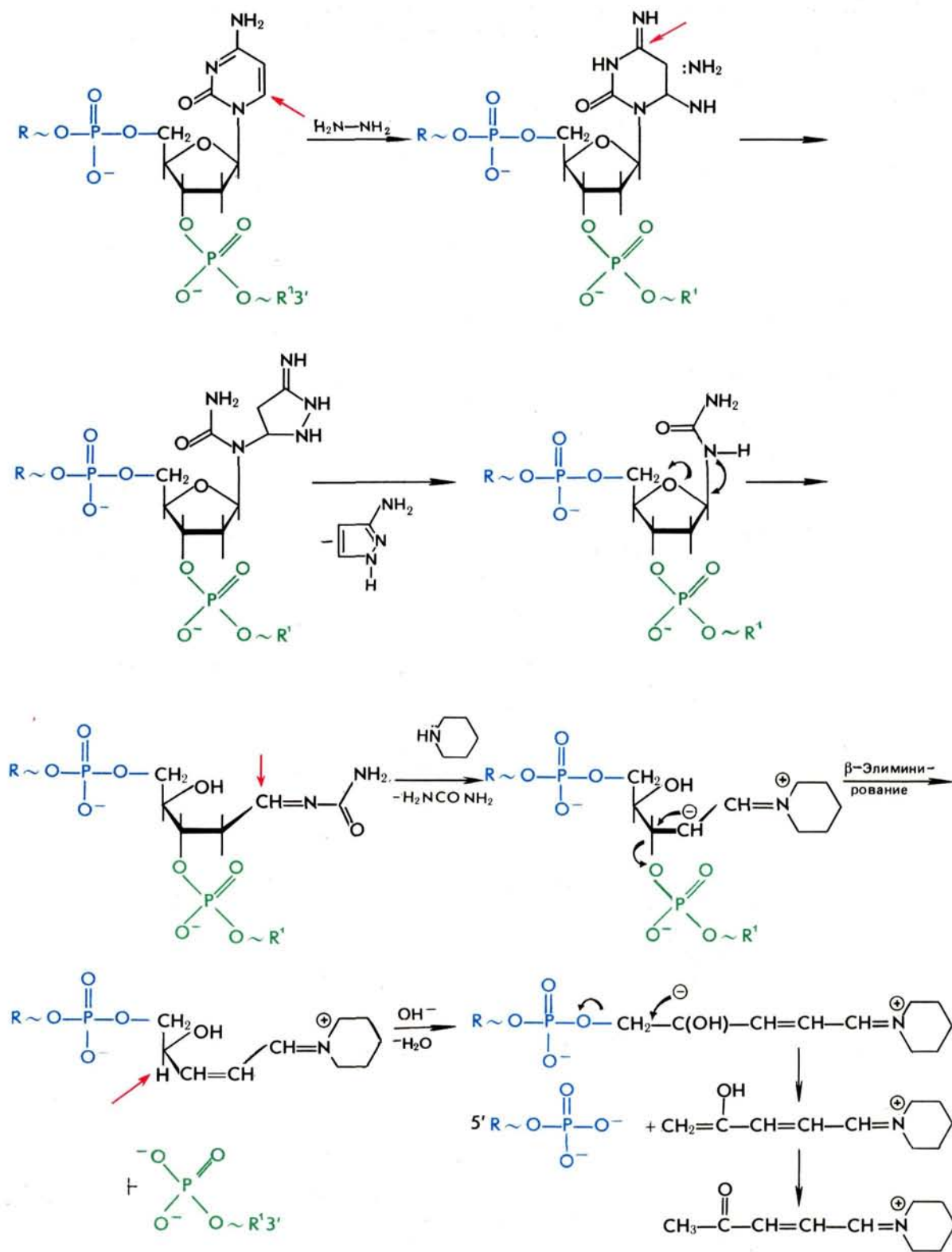
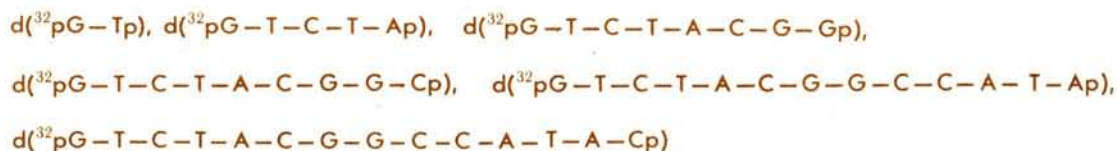


Рис. 182. Химическая модификация по цитозинным звеньям.

В. Расщепление по цитозину осуществляется гидразином при высокой концентрации NaCl с последующей обработкой продуктов модификации пиперидином (рис. 182), что приводит к образованию следующих олигонуклеотидов:



Г. Для определения положения тимидина используется деградация по остаткам пиримидинов, для чего ДНК последовательно обрабатывается гидразином при низкой концентрации NaCl, а затем пиперидином. Из модельного олигонуклеотида при этом, кроме соединений, приведенных выше, должны образоваться:



Продукты всех четырех реакций наносят в соседние лунки полиакриламидного геля, разделяют электрофорезом и радиоавтографируют. Анализ результатов, схематически представленных на рисунке 183, приводит к следующим выводам: самый «короткий» фрагмент (фосфат) находится в колонках G и A + G и, вероятно, образовался в результате расщепления по гуанозину; наличие полосы в колонке T + C и ее отсутствие в колонке C свидетельствует о том, что это продукт расщепления по тимидину; следом идет олигонуклеотид, присутствующий и в колонке C, и в колонке T + C, т. е. получившийся в результате расщепления по цитозину. Затем по подвижности располагаются продукты в колонке T + C (но не в C), A + G (но не в G); продолжая этот анализ, восстанавливаем структуру исходного олигонуклеотида.

В приложении к реальным полинуклеотидам метод дает возможность «прочесть» последовательность свыше 200 нуклеотидных звеньев на одном геле.

Проблемой, которую каждый раз приходится решать при использовании метода Максама — Гилберта, является получение полинуклеотидов, меченных только по одному из концов. Обычно для анализа используются двухцепочечные фрагменты ДНК (например, образовавшиеся после расщепления рестриктазами), а все методы введения концевых меток приводят к образованию фрагментов, меченных по двум 5'- или двум 3'-концам. Поэтому приходится прибегать к дополнительным операциям, таким, как разделение комплементарных цепей ДНК после введения метки.

Метод ДНК-полимеразного копирования в присутствии терминирующих аналогов трифосфатов (метод Сенгера). Этим методом чаще всего анализируются фрагменты ДНК, клонированные в одноцепочечных фагах, хотя в настоящее время разработаны варианты, применимые и к двухцепочечным ДНК. При этом исследуется не сам фрагмент, а комплементарная ему ДНК, которая синтезируется с помощью ДНК-полимеразы в условиях, приводящих к набору продуктов разной длины, содержащих одинаковый 5'-концевой участок, а на

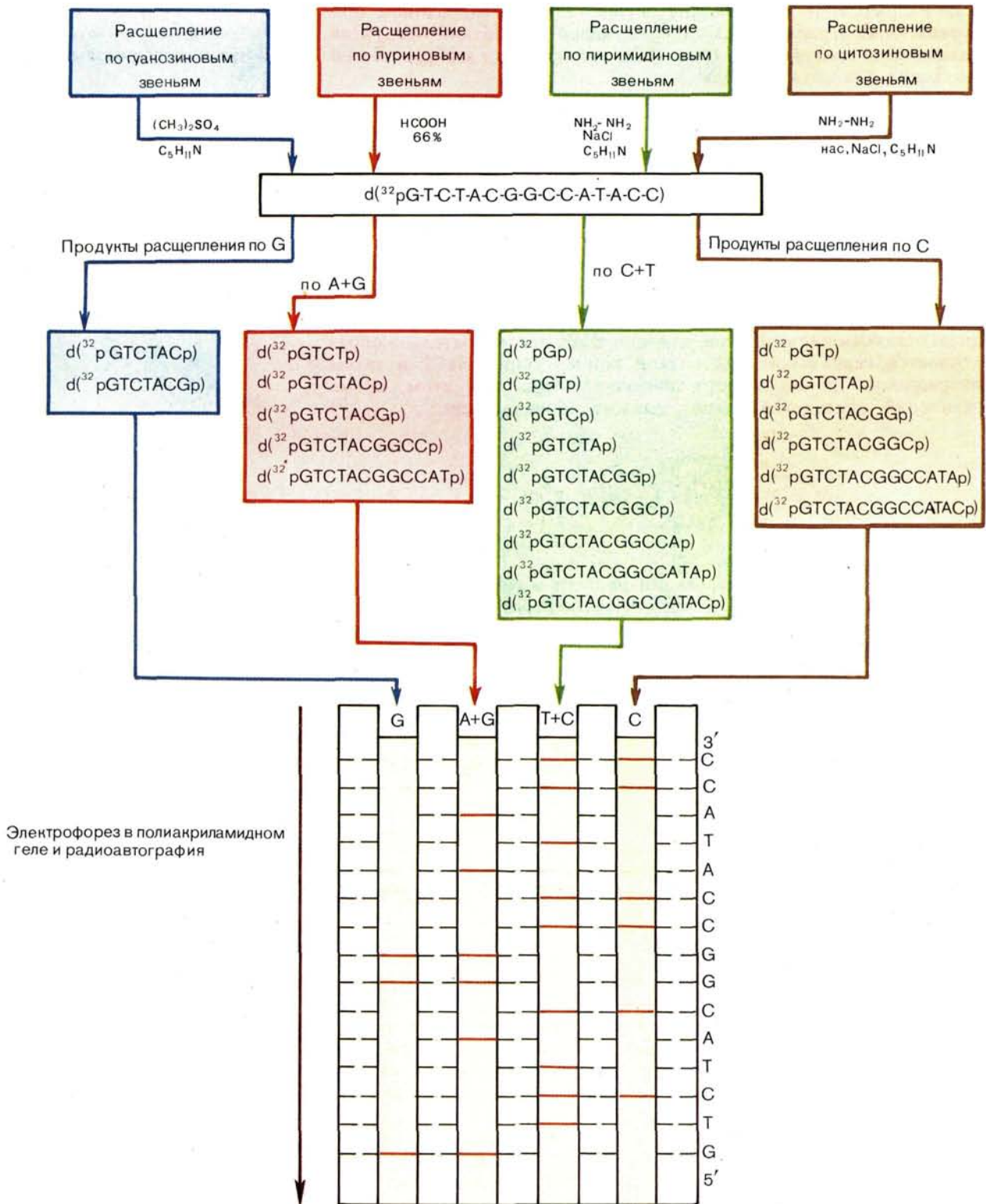


Рис. 183. Схема определения нуклеотидной последовательности (метод Максама — Гилберта).

3'-конце — звенья определенного типа (А, G, С или Т). Для получения такого набора фрагментов к смеси четырех природных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, используемых ДНК-полимеразой для синтеза копии, добавляют трифосфат аналога того нуклеозида, который желательнее иметь в качестве 3'-концевого звена. Этот аналог отличается от соответствующего природного субстрата лишь строением углеводного компонента, что позволяет ДНК-полимеразе включать его в цепь, но не дает возможности присоединять последующие звенья. Чаще всего в качестве таких терминирующих аналогов используют трифосфаты 2',3'-дидезоксинуклеозидов. Так, для получения набора фрагментов, оканчивающихся тимидином, в смесь для полимеризации добавляют 2',3'-дидезокситимидинтрифосфат; для обрыва по аденозину — 2',3'-дидезоксиаденозинтрифосфат и т. д. При введении в реакцию любого аналога ДНК-полимераза с определенной вероятностью включает его в цепь вместо природного субстрата, после чего синтез цепи обрывается. Включение аналога происходит по закону случая в любом месте синтезируемых цепей; в итоге получаются наборы олиго- и полинуклеотидов различной длины, но с одинаковыми звеньями на 3'-концах, как это показано на рисунке 184.

Для получения продуктов с уникальным 5'-концом синтез ДНК начинают с помощью затравки — олиго- или полинуклеотида, комплементарного матрице на участке, расположенном рядом с 3'-концевой областью матрицы. Затравка содержит свободную 3'-ОН-группу, необходимую ДНК-полимеразе для начала синтеза ДНК. Гибридуясь с матрицей в определенном месте и включаясь во вновь синтезируемую ДНК в качестве ее 5'-концевого участка,



Гилберт (Gilbert) Уолтер (р. 1932), американский биохимик. Окончил Гарвардский университет (1953); с 1968 г. — профессор этого университета, затем президент фирмы «Биоген». Выполнял основополагающие исследования по изучению механизма специфического взаимодействия белков и ДНК, установлению первичной структуры ДНК, предложил (1977, совместно с А. Максамом) метод расшифровки первичной структуры ДНК. Лауреат Нобелевской премии по химии (1980, совместно с Ф. Сенгером и П. Бергом).

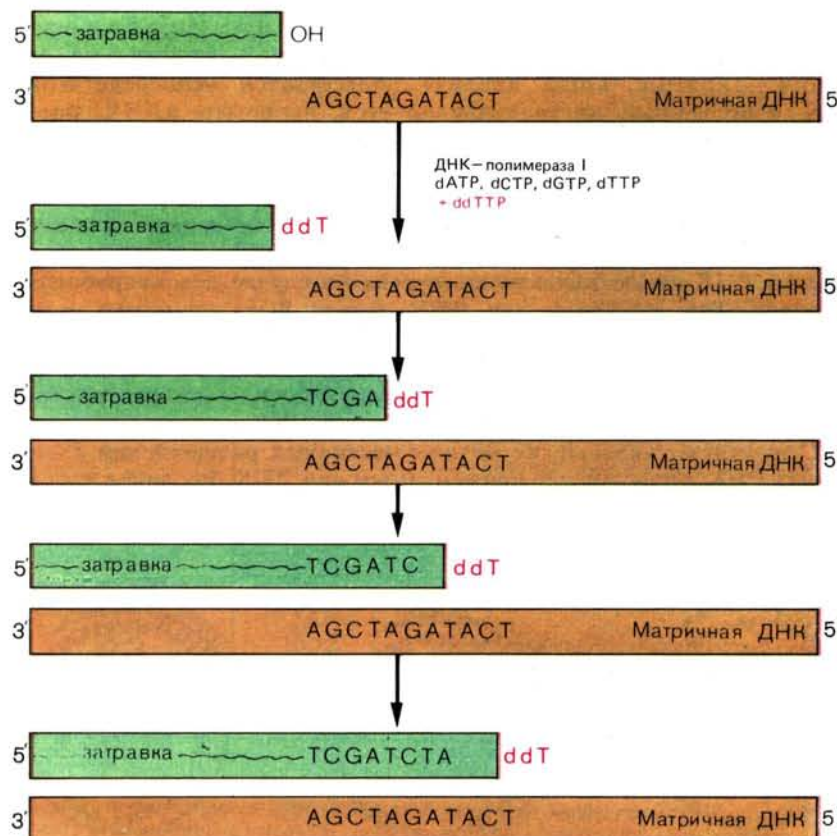


Рис. 184. Пример специфического обрыва синтезируемой полинуклеотидной цепи в присутствии терминирующего аналога 2,3-дидезокситимидинтрифосфата.

затравка обеспечивает уникальность этого звена для всех наборов специфически оборванных копий.

Для того чтобы синтезируемые продукты были радиоактивными, в качестве одного из четырех природных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов используется $[\alpha^{32}\text{P}]$ -меченый продукт. С этой целью смесь затравки и матрицы разделяется на четыре части: с одной проводится синтез в присутствии ddTTP с образованием фрагментов, терминируемых тимидином, с другой — в присутствии ddATP, с третьей — в присутствии ddGTP и с последней — в присутствии ddCTP. Все четыре радиоактивных набора продуктов наносятся на параллельные дорожки полиакриламидного геля, разделяются, радиоавтографируются и анализируются так же, как в методе Максама — Гилберта.

Как уже упоминалось, чаще всего в качестве матрицы для анализа используются фрагменты ДНК, клонированные в одноцепочечных фагах. Для унификации анализа последовательности любых фрагментов, клонированных в составе данного фага-вектора, можно использовать одну и ту же затравку. Для этого затравка должна быть комплементарна не клонированному фрагменту, а (+)-цепи фага вектора в том ее месте, которое граничит с 3'-концом клонированной вставки (рис. 185). В качестве затравок чаще всего используются синтетические олиго- и дезоксирибонуклеотиды. Для исключения дегградации затравки с 5'-конца в качестве ДНК-полимеразы применяется обычно «фрагмент Кленова» ДНК-полимеразы I *E. coli*.

Метод Сенгера наиболее часто используется для анализа последовательности ДНК после ее неспецифического расщепления и клонирования суммы получаемых фрагментов. Метод весьма эффективен и экономичен, так же как метод Максама — Гилберта, и позволяет анализировать последовательность свыше 200 звеньев на одном геле.

Методы быстрого определения последовательности РНК. Эти методы могут быть разбиты на две группы — прямые, когда анализу подвергается непосредственно РНК, и косвенные, когда анализируется, например, кДНК, полученная путем копирования РНК с помощью обратной транскриптазы и клонированная в составе какого-либо вектора, или соответствующий ген, кодирующий данную РНК после выделения его из библиотеки генов. Косвенные методы, естественно, являются методами анализа последовательности ДНК; прямые же методы анализа РНК аналогичны используемым в случае дезоксирибонуклеотидов. Так же как и для ДНК, может быть применен метод копирования с терминирующими аналогами трифосфатов, но вместо ДНК-полимеразы используют обратную транскриптазу, а в качестве затравки — синтетические олигонуклеотиды или рестриктивные фрагменты, комплементарные данной РНК.

Существуют химические методы частичных расщеплений 3'-меченных РНК, аналогичные применяемым для ДНК. Различие заклю-

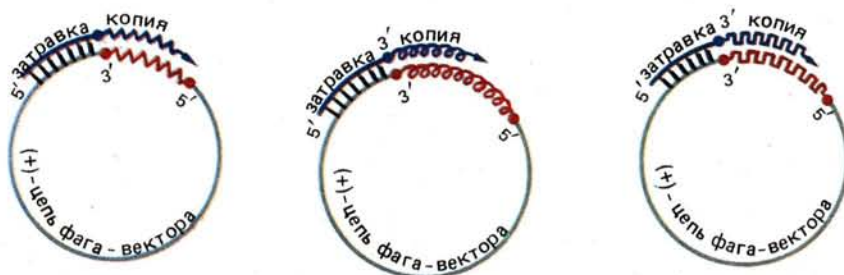


Рис. 185. Иллюстрация использования одной и той же затравки с данным вектором для анализа последовательности различных фрагментов.

чается в том, что при расщеплении модифицированной РНК по образующимся рибозильным звеньям или их производным нельзя использовать щелочные условия, поскольку происходит неспецифический гидролиз РНК. Поэтому расщепление проводят в слабокислой среде в присутствии аминов. Для модификации применяют диметилсульфат (G), гидразин + NaCl (C), гидразингидрат (U) и диэтилпирокарбонат, который модифицирует A и G, но преимущественно A. Однако наиболее широко распространены методы неполных расщеплений РНК специфическими рибонуклеазами. Как и в случае метода Максама — Гилберта, РНК маркируют с помощью полинуклеотидкиназы для 5'-конца или РНК-лигазы для 3'-конца. Затем меченую РНК разделяют на несколько порций и каждую порцию подвергают неполному расщеплению одной из специфических РНаз. Продукты, полученные из каждой порции, наносят в соседние лунки плоского полиакриламидного геля, разделяют и радиоавтографируют. Недостатком метода является малая специфичность РНаз к данному типу оснований, а также зависимость скорости расщепления от типа основания. Вследствие этого приходится использовать набор различных РНаз с перекрывающейся специфичностью.

Некоторые из применяемых для частичных расщеплений РНаз приведены в таблице 13.

Быстрые методы определения последовательности не решают всех задач, стоящих перед исследователем первичной структуры нуклеиновых кислот, поскольку они не дают информации о положении и природе минорных компонентов нуклеиновых кислот. Такие задачи встречаются при изучении структуры тРНК. В этих случаях сохраняют свое значение «старые» методы определения последовательности, заключающиеся в исчерпывающем или частичном гидролизе рибонуклеазами, выделении индивидуальных олигонуклеотидов, определении их нуклеотидного состава и идентификации минорных компонентов.

Таблица 13.

Рибонуклеазы, используемые для анализа последовательности РНК

РНаза	Специфичность	Применение
T2	Неспецифична	Для получения статистического набора олигонуклеотидов всех возможных длин
T1	G	Для анализа распределения гуаниловых остатков
U2	A > G	Для определения положения A остатков (разработаны условия расщепления исключительно по связям Ap↓N ¹)
A	U + C	Для анализа последовательности используется редко ввиду резкого различия в скоростях расщепления связей (Pu↓Pu ≫ Pu↓Pu)
Vc (пиримидил-РНаза из <i>Bacillus cereus</i>)	U + C	Для определения положения пиримидиновых звеньев
PhyM (из <i>Physarum polycerphalum</i>)	A + U	Широко используется как РНаза с перекрывающейся специфичностью для проверки расщеплений по A и для отличия U от C

¹ РНазы, выпускаемые некоторыми фирмами специально для анализа последовательности нуклеотидов в РНК (sequence grade), в определенных условиях проявляют исключительно высокую специфичность по отношению к основаниям.



Баев Александр Александрович (р. 1904), советский биохимик, академик АН СССР (1970). Окончил Казанский университет (1927), с 1959 г.— заведующий лабораторией функциональной энзимологии Института молекулярной биологии АН СССР и отделом молекулярной биологии и молекулярной генетики микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Основное направление исследований — строение нуклеиновых кислот и генная инженерия. Установил (1967) первичную структуру валиновой тРНК дрожжей. Разработал метод изучения функциональной топологии биополимеров (метод разрезанных молекул). Герой Социалистического Труда (1981), лауреат Государственной премии СССР (1969).

Для иллюстрации применяемых здесь методов и приемов рассмотрим определение структуры одного из гексануклеотидов, полученных при исчерпывающем гидролизе валиновой тРНК РНазой Т1 (А. А. Баев и сотр.).

А. Определение нуклеотидного состава, проведенное после щелочного гидролиза, дало результат:



Б. Из способа получения (гидролиз гуанилрибонуклеазой) было ясно, что Gr должно находиться на 3'-конце.

В. Исчерпывающий гидролиз фосфодиэстеразой змеиного яда дал единственный нуклеозид — цитидин. Отсюда следует, что олигонуклеотид содержит на 5'-конце цитидин и, таким образом, его структура С(А, U, ψ, С)Gr.

Г. Полный гидролиз пиримидил-РНазой привел к следующим продуктам: 2Cr + Arψr + Ur + Gr и, значит, его структура С(А, ψ, U, С)Gr.

Д. При частичном гидролизе пиримидил-РНазой был выделен пентануклеотид С(U, ψ, А, С). Дефосфорилирование и последующий исчерпывающий гидролиз последнего панкреатической РНазой обнаруживают среди нуклеотидов один нуклеозид — уридин, который, следовательно, находится на 3'-конце пентануклеотида. Следовательно, остаются возможными только две структуры гексануклеотида: С — А — ψ — С — U — Gr или С — С — А — ψ — U — Gr. Выбор между ними был сделан на том основании, что среди продуктов частичного гидролиза гексануклеотида панкреатической РНазой был обнаружен динуклеотид CrUr, а это возможно лишь в том случае, если верна первая из двух структур.

В заключение раздела, посвященного анализу последовательности нуклеиновых кислот, следует отметить, что новые методы обеспечили возможность полностью расшифровать строение ряда простейших геномов, к которым относятся бактериофаги φX174 (5255 звеньев), G-4 (5577 звеньев), T7 (39 936 п. о.), λ (48 592 п. о.), некоторых других фагов и вируса обезьян SV-40 (5226 п. о.), больших участков генома бактерий, животных, растений и т. п. Эти результаты заставили по-новому взглянуть на структуру и функцию генома и на его эволюцию. И тем не менее сегодня в середине 80-х годов расшифрована еще только очень незначительная часть генетической информации. Общая длина расшифрованных последовательностей составляет всего лишь несколько миллионов нуклеотидных звеньев, а это — только 0,001 длины генома человека.

Пространственная структура нуклеиновых кислот

Если мономерной единицей нуклеиновых кислот считать нуклеотидное звено, то для описания его конформации следует учитывать возможность вращений вокруг шести связей (рис. 186). Кроме того, надо принимать во внимание положение основания относительно углеводной части, которое определяется вращением вокруг N-гликозидной связи, и конформационные изменения фуранозного цикла. Все это делает конформационный анализ нуклеиновых кислот весьма сложным.

Конформации нуклеиновых кислот и их компонентов, так же как и белков (см. с. 87), часто описываются с помощью так называемых торсионных (двугранных) углов. При определении торсионного угла рассматриваются три смежные связи, например А — В, В — С и С — D (рис. 187). Торсионным углом вращения связи В — С называют угол между проекциями связей А — В и С — D на плоскость, перпендикулярную связи В — С. Если торсионный угол равен $\sim 180^\circ$, то это соответствует *транс*-конформации (t-конформация). При значениях торсионных углов около $+60^\circ$ или -60° конформации называются *гош*⁺ и *гош*⁻ (*g*⁺ и *g*⁻).

На рисунке 186 приведен фрагмент нуклеотидной цепи: жирной линией выделен ее остов, который включает в себя атомы О(5'), С(5'), С(4'), С(3'), О(3') и Р. Остальные атомы углеводных остатков и гетероциклические основания рассматриваются как боковые группы. В основной цепи можно выделить повторяющуюся единицу. Если выбрать в качестве начала отсчета атом С(3') основной цепи, тогда такой единицей будет последовательность атомов С(3')^α—О(3')^β—Р^γ—О(5')^δ—С(5')^ε—С(4')^ζ—С(3'), включающая в себя шесть различных связей α, β, γ, δ, ε, ζ. Соответствующие торсионные углы обозначают так же. Выбор начала отсчета может быть и другим, но использованный здесь является одним из наиболее простых. Повторяющаяся единица основной полинуклеотидной цепи называется нуклеотидной единицей.

Углеводные компоненты. Проблема пространственного строения углеводов обсуждается в главе «Углеводы», однако здесь целесообразно рассмотреть вопросы, непосредственно касающиеся нуклеиновых кислот. Фуранозное кольцо играет определяющую роль

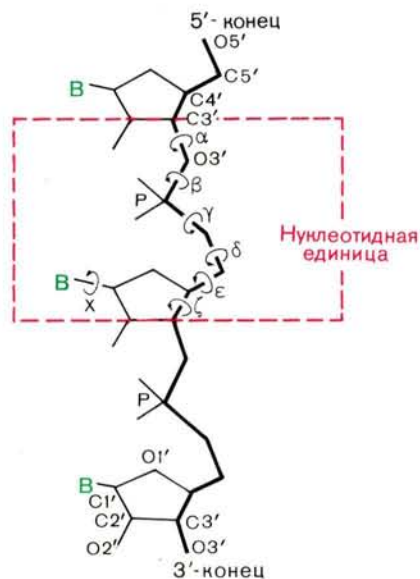


Рис. 186. Фрагмент нуклеотидной цепи. Нуклеотидная единица выделена рамкой.

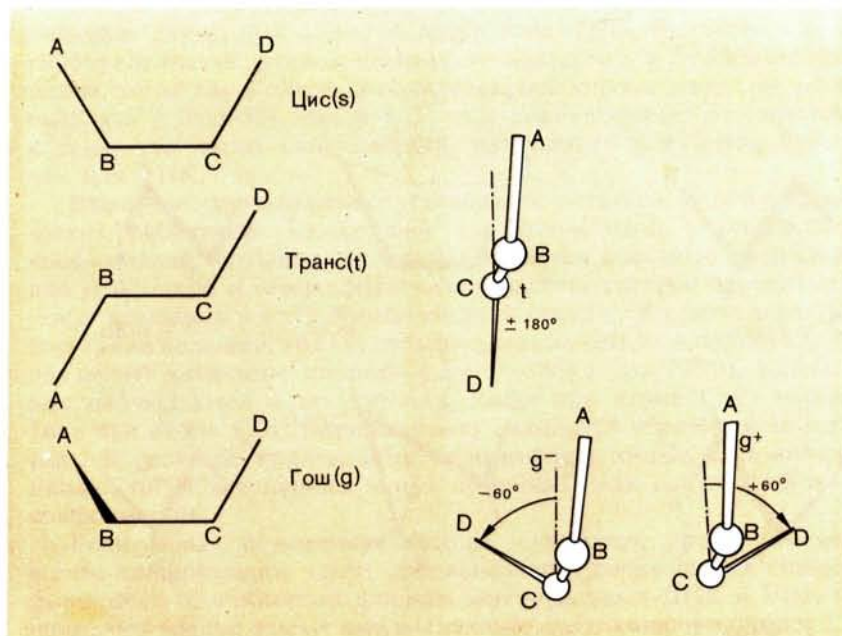


Рис. 187. Цис-, транс- и гош-конформации.

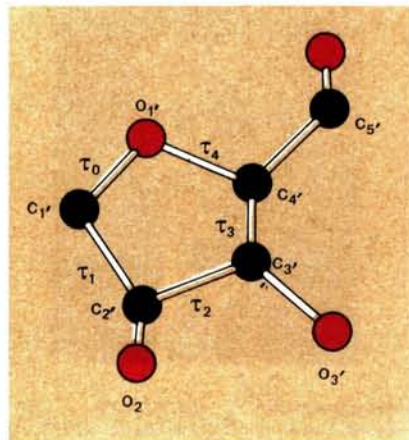
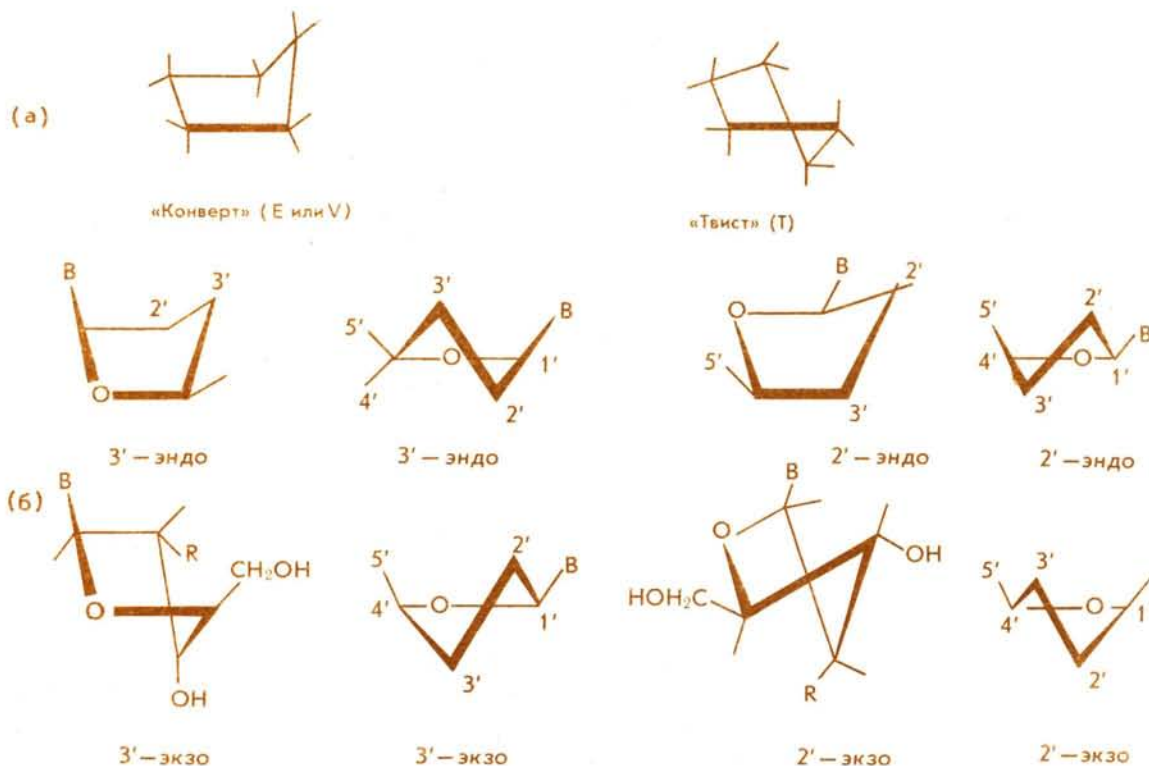


Рис. 188. Конформации цикlopentана (а) и углеводного цикла в нуклеозидах (б).



в конформации нуклеотидной единицы. Ниже приведены обозначения связей и торсионных углов в углеводном цикле.

Конформация углеводного цикла может быть определена как функция всех торсионных углов $\tau_0 - \tau_4$. Однако для более простого и наглядного описания конформации рассматривают отклонения определенных атомов от плоскости, образуемой тремя или четырьмя другими атомами. Пятичленный цикл углевода может принимать различные конформации аналогично циклопентану (рис. 188). Если четыре его атома лежат в плоскости, а пятый выведен из нее, то такие конформации называются конформациями типа «конверт» и обозначаются Е или V. Если три атома образуют плоскость, а два соседних выведены из нее, то конформация называется «твист» (Т). Дальнейшее определение конформации основывается на взаимном расположении атома С(5') и атома (или атомов), выведенного из плоскости цикла. Если атом п [С(2') или С(3')] выведен из цикла в ту сторону, с которой находится атом С(5'), то конформация называется *эндо*, а если отклонен в сторону, противоположную атому С(5'), — *экзо*-конформацией.

Варианты конформаций типа «конверт» и «твист» обозначаются следующим образом:

V^n или E^n — конверт с C_n -эндо-конформацией

V_n или E_n — конверт с C_n -экзо-конформацией

T_{n+1}^n — твист с C_n -эндо- и C_{n+1} -экзо-конформациями

T_n^{n+1} — твист с C_{n+1} -эндо- и C_n -экзо-конформациями.

Нуклеозиды и нуклеотиды. Для изучения пространственного строения нуклеиновых кислот широко используется метод рентгеноструктурного анализа моно-, олиго- и полинуклеотидов, который дает точные геометрические параметры молекул биополимеров и их компонентов в кристаллическом или твердом состоянии. Определение конформаций в растворах в настоящее время в основном про-

водится методом ЯМР-спектроскопии, хотя и такие методы, как ДОВ и КД, не потеряли своего значения.

Представляют интерес теоретические подходы, основанные либо на полуэмпирических расчетах потенциальных энергий при различных взаимных расположениях атомов, либо на квантово-химических расчетах (Б. Пюльман).

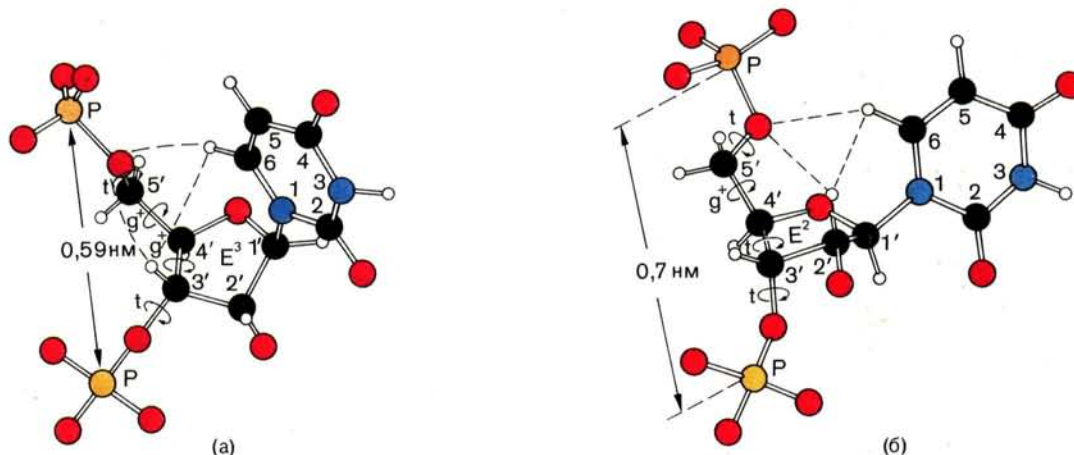


Рис. 189. Возможные конформации нуклеотидных единиц:

(а) — $C(3')$ -эндо-конформация;
(б) — $C(2')$ -эндо-конформация.

Гетероциклические основания нуклеиновых кислот являются практически плоскими структурами. Их атомы выходят из плоскости не более чем на 0,01 нм. С помощью рентгеноструктурного анализа получены геометрические характеристики оснований; оказалось, что связи $C—O$ (0,123 — 0,127 нм) короче связей $C—N$ ($>0,13$ нм) и связей $C—C$ ($>0,13$ нм). Следует отметить, что гликозидная связь незначительно выведена из плоскости оснований.

Фуранозный цикл углеводного компонента в нуклеозидах, нуклеотидах, олиго- и полинуклеотидах в подавляющем большинстве случаев, по данным рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, имеет предпочтительную $3'$ -эндо- или $2'$ -эндо-конформации. Нуклеотидная единица с $3'$ -эндо-конформацией имеет меньшую длину, чем $2'$ -эндо-изомер (рис. 189). В олиго- и полирибонуклеотидах углевод чаще всего находится в $3'$ -эндо-конформации, тогда как в олиго- и полидезоксирибонуклеотидах он может быть как в $3'$ -эндо-, так и в $2'$ -эндо-конформации. Это приводит к тому, что число конформаций, возможных для ДНК, больше, чем для РНК.

Взаимное расположение углеводных остатков и гетероциклических оснований. Важнейшей характеристикой в определении конформаций нуклеиновых кислот является взаимное расположение углеводной и гетероциклической частей, которое определяется углом вращения вокруг N -гликозидной связи χ . В кристаллическом состоянии большинство нуклеозидов, моно-, олиго- и полинуклеотидов имеют *анти*-конформацию ($\chi = 0 - 90^\circ$) (рис. 190). Исключения наблюдаются в тех случаях, когда при атоме $C(8)$ пуринов [или при атоме $C(6)$ пиримидинов] находится объемный заместитель. В растворе производные пиримидинов имеют *анти*-конформацию, тогда как пурины могут принимать как *син*-, так и *анти*-конформации.

Если моно- и олигонуклеотиды, существуя предпочтительно в *анти*-конформации, могут довольно легко переходить в *син*-конформацию, то в обычных формах двуспиральных ДНК и РНК мономерные звенья имеют исключительно *анти*-конформацию.



Пюльман (Pullman) Бернар (р. 1919), французский химик, ведущий ученый в области квантовой химии, иностранный член АН СССР (1982). Окончил Парижский университет (1946), с 1963 г. — директор Института физико-химической биологии в Париже. Основные работы посвящены квантовой химии органических молекул, биохимии и биофизике. Выяснил электронную структуру молекул ряда биологически важных соединений, в том числе ДНК.

В конформационном анализе производных нуклеиновых кислот иногда используется концепция жесткой нуклеотидной единицы. Согласно этой концепции нуклеотиды имеют более жестко фиксированную конформацию, чем нуклеозиды. Конформационная гибкость полинуклеотидов в основном обусловлена легкостью враще-

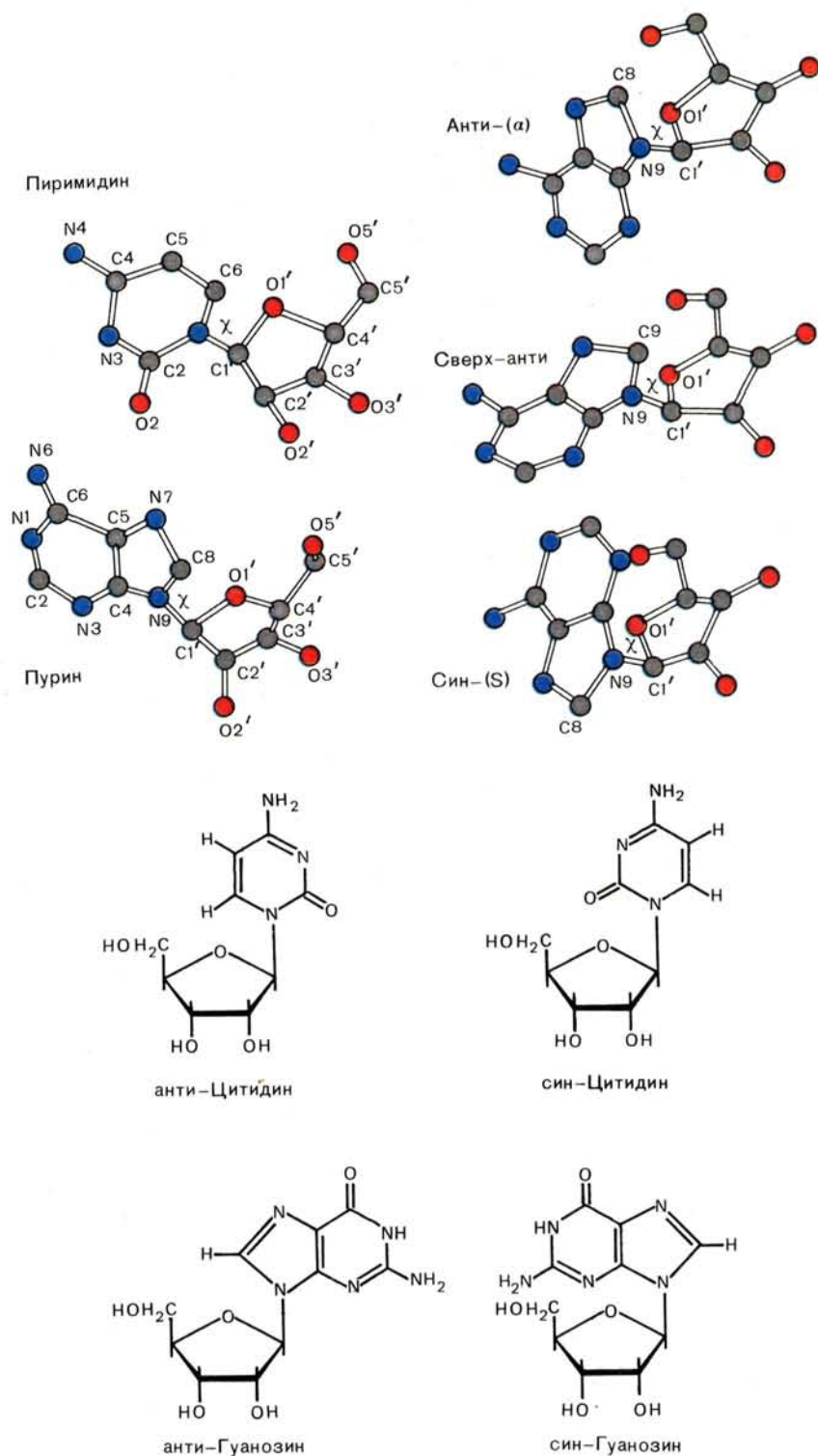


Рис. 190. Анти- и син-конформация в нуклеотидах.

ния вокруг фосфодиэфирных связей при сохранении конфигурации остальных. Правда, в тРНК и некоторых других случаях анализ детальной структуры обнаружил целый ряд отклонений от ожидаемой жесткой конформации.

При сопоставлении свойств моно- и полинуклеотидов следует иметь в виду, что принципиальным отличием полинуклеотидов от соответствующих мономеров является сильно выраженное взаимодействие между соседними основаниями, которые в водных растворах и в кристаллах стремятся расположиться таким образом, чтобы их плоскости были приблизительно параллельны. «Вертикальные» взаимодействия между основаниями, расположенными «стопкой», называются «стэкинг»-взаимодействиями; они обусловлены в основном ван-дер-ваальсовыми силами.

На существование таких взаимодействий в растворах олигонуклеотидов указывают отклонения их физико-химических характеристик от аналогичных характеристик, наблюдаемых для смеси мономерных компонентов, состав которых идентичен нуклеотидному составу олигонуклеотидов. Так, коэффициент молярной экстинкции олиго- и полинуклеотидов меньше, чем сумма коэффициентов молярных экстинкций входящих в него мономеров (этот эффект называется гипохромным эффектом).



Уилкинс [Wilkins] Морис Хью Фредерик (р. 1916), английский биофизик. Окончил Кембриджский университет, с 1946 г.— в Королевском колледже в Лондоне. Получил высококачественные рентгенограммы ДНК, на основе которых была установлена ее пространственная структура. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1962, совместно с Дж. Уотсоном и Ф. Криком).

Конформации нуклеиновых кислот

Двуспиральные полинуклеотиды. В большинстве случаев ДНК существует в виде «двойной спирали» Уотсона — Крика (рис. 191). Ее основные характеристики сводятся к следующему. Две полидезоксирибонуклеотидные цепи соединены друг с другом с помощью водородных связей и образуют правовинтовую спираль вокруг общей оси. Цепи двойной спирали антипараллельны и комплементарны, т. е. образование водородных связей (поперечных) всегда происходит между основаниями С и G или А и Т.

Гетероциклические основания обращены внутрь двойной спирали, и их плоскости приблизительно перпендикулярны ее оси. Двойная спираль в первом приближении регулярна, т. е. все ее витки имеют практически одинаковые размеры, на каждый виток приходится одинаковое число пар оснований и каждая пара оснований повернута относительно другой на один и тот же угол. С наружной стороны спирали находится гидрофильный углеводно-фосфатный остов.

Комплементарность двух цепей приводит к очень простому принципу удвоения генов, или репликации (рис. 192). Для этого достаточно, чтобы цепи ДНК разделились и на каждой из них была синтезирована новая комплементарная цепь. В результате образуются две дочерние молекулы ДНК, идентичные исходной.

Качественного представления о структуре ДНК недостаточно для понимания многих аспектов ее функционирования, в частности механизмов взаимодействия с белками. Для этого необходима информация о деталях структуры и возможностях ее изменения под действием различных факторов. В настоящее время накоплен очень большой материал по дифракции рентгеновских лучей на ориентированных волокнах ДНК и по строению моно- и олигонуклеотидов в кристаллах, позволяющий дать сравнительно точное описание возможных структур ДНК. Известно, что существует большой набор различных конформаций ДНК, которые меняются и переходят друг в друга в зависимости от внешних условий.



Уотсон [Watson] Джеймс Дьюи (р. 1928), американский биохимик, один из основоположников молекулярной биологии. Образование получил в Чикагском университете и университете штата Индиана. Основные работы посвящены биосинтезу белка и изучению структуры ДНК. Совместно с Ф. Криком расшифровал структуру ДНК и предложил ее модель в виде двойной спирали (1953). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1962, совместно с Ф. Криком и М. Уилкинсом).

Рассмотрим более детально конформационные характеристики двойной спирали ДНК (рис. 193). Шагом спирали (H) называют длину одного витка; расстояние между соседними звеньями обозначается h , а число звеньев на один шаг n . Легко видеть, что $h = H/n$. Угол поворота на один остаток $t = h/H \cdot 360$.

Конформации двойной спирали ДНК могут существенно различаться между собой, что прежде всего определяется изменениями

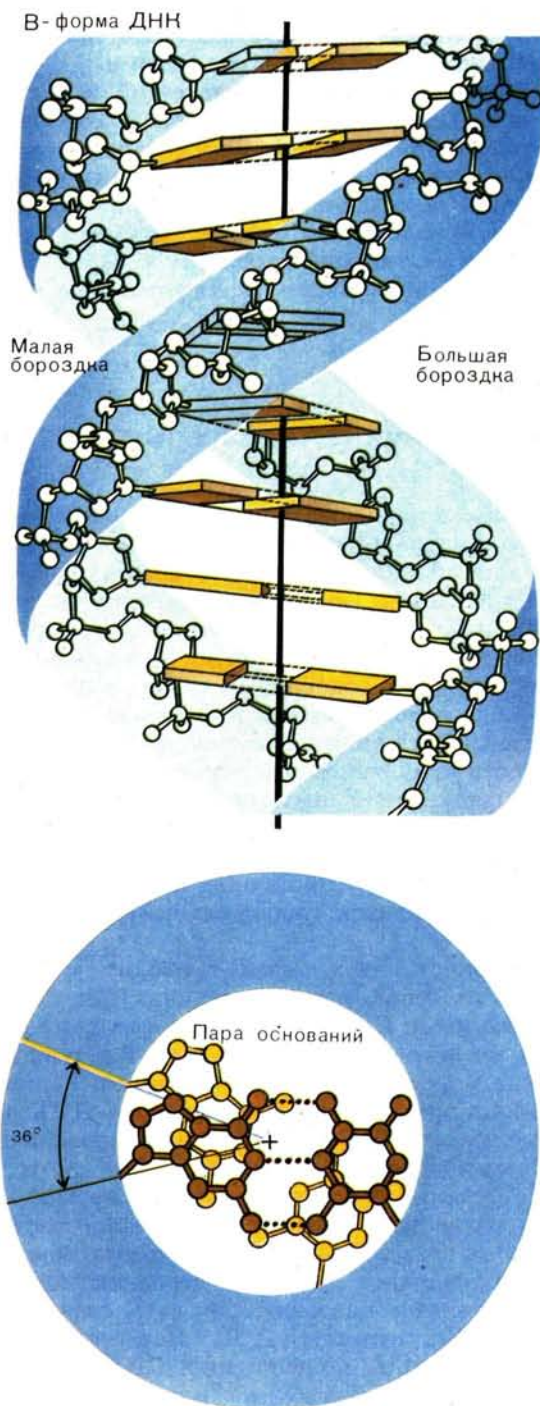
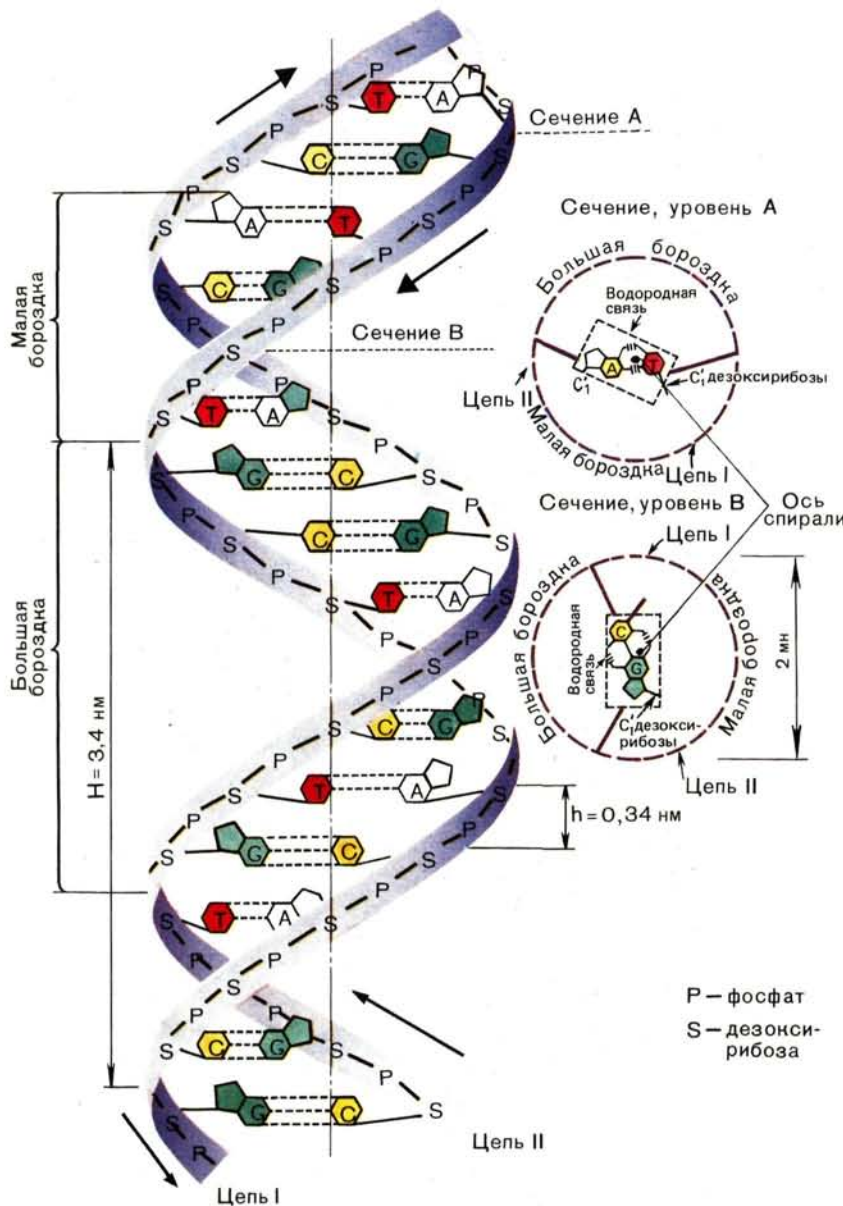


Рис. 191. ДНК в В-форме.

торсионных углов. Каждая конформация ДНК, согласно принятой номенклатуре, может быть описана семибуквенным обозначением торсионных углов $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$ и χ в порядке следования связей в нуклеотидной единице; например, $t\text{tg}^- \text{tg}^+ \text{ta}$ конформация соответствует В-форме ДНК, в которой она находится обычно в кристаллическом состоянии и в водных растворах (рис. 191 и 193). Как видно из рисунков, плоскости пар оснований в В-форме ДНК практически



Крик [Crick] Фрэнсис Харри Комптон (р. 1916), английский физик, один из основоположников молекулярной биологии. Окончил Лондонский университет (1937). Основные работы посвящены изучению структуры нуклеиновых кислот. В 1953 г. совместно с Дж. Уотсоном предложил модель ДНК в виде двойной спирали (модель Уотсона — Крика) и объяснил процесс репликации ее молекулы при делении клеток. В опытах на фагах T4 впервые установил основные принципы генетического кода. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1962, совместно с Дж. Уотсоном и М. Уилкинсом).

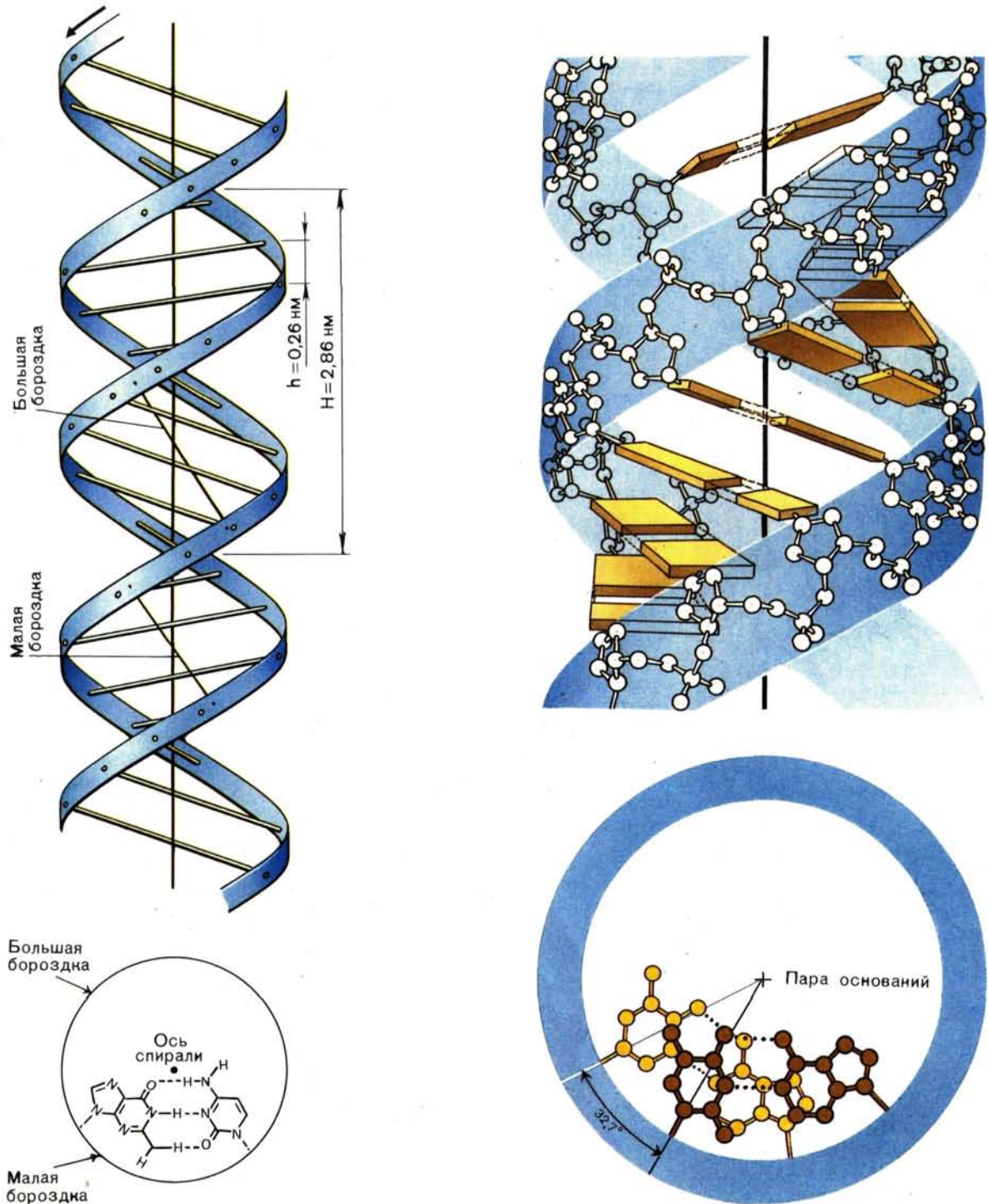


перпендикулярны оси спирали, проходящей, по существу, через центр каждой пары. Геометрические характеристики В-формы: $h = 0,34 \text{ нм}$, один виток спирали содержит 10 п. о. и его длина (H) равна $3,4 \text{ нм}$.

Рис. 192. Конформационные характеристики двойной спирали ДНК в В-форме.

При уменьшении степени гидратации ДНК переходит в А-форму (рис. 194), конформацию которой можно описать как $tg^-g^-tg^+g^+a$. Параметры А-формы следующие: $h = 0,26$ нм, один виток содержит 11 пар оснований и его длина равна $2,86$ нм. Нетрудно видеть, что в А-форме плоскости оснований параллельны друг другу, но наклонены к оси спирали, образуя с ней угол $\approx 20^\circ$. В то же время

Рис. 194. ДНК в А-форме.



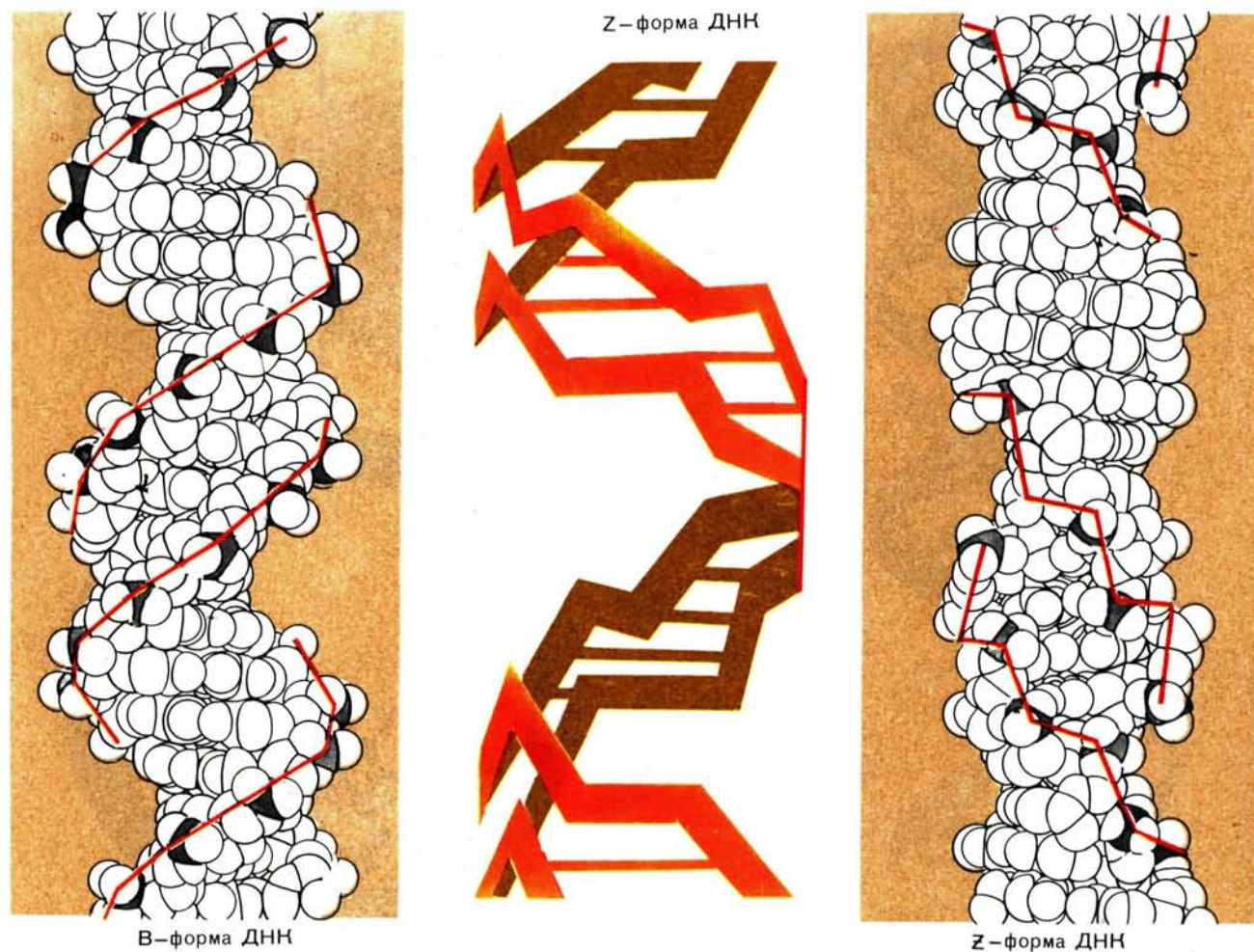
ось спирали проходит в стороне от пар оснований, в результате чего внутри спирали создается пустое пространство; при этом широкая бороздка становится уже, а узкая — шире (их часто называют большая и малая бороздки соответственно).

Уменьшение расстояния между основаниями и большая компактность спирали обусловлены тем, что угол, соответствующий связи $C(3')-C(4')$ в В-форме, имеет конформацию $t[C(2')\text{-эндо}]$, тогда как в А — $g^+[C(3')\text{-эндо}]$. Транс-конформация этой связи приводит к увеличению длины нуклеотидной единицы по сравнению с g^+ -конформацией.

ДНК способна переходить из А-формы в В-форму и обратно в зависимости от природы растворителя. Не исключено, что такие переходы имеют место и при взаимодействии с белками.

Долгое время считалось, что ДНК может быть только правовращающей и левовращающая спираль стереохимически невозможна. Однако недавно было доказано, что левовращающая спираль существует. Она была найдена в случае двуспиральных альтернирующих сополимеров: поли $[d(G-C)] \cdot$ поли $[d(G-C)]$ и поли $[d(G-T)] \cdot$ поли $[d(C-A)]$ (рис. 195). Необычное свойство левых спиралей состоит в том, что повторяющейся единицей в них

Рис. 195. ДНК в Z-форме.



является не мононуклеотид, а динуклеотид, поскольку каждые два соседних нуклеотида находятся в различных конформациях. Например, в одной из левовращающих форм первое нуклеотидное звено имеет конформацию $g^-g^+g^+tg^+s$, характеризующуюся *син*-положением пурина и *С(3')*-*эндо*-конформацией углевода; второе звено имеет *анти*-положение пиримидина и *С(2')*-*эндо*-конформацию углевода и характеризуется формулой $g^-g^-g^-tg^+ta$. Таким образом, общая формула повторяющейся динуклеотидной единицы ($g^-g^+g^+tg^+stg^-g^-g^-tg^+ta$). Такая спираль с характерным зигзагообразным строением получила название *Z*-формы. Получены данные, что *Z*-форма может существовать и в растворе.

Какие же силы способствуют образованию и сохранению двухспиральных структур? Долгое время считалось, что это — возникающие между цепями водородные связи. Однако сейчас стало ясно, что основной вклад в стабильность двухспиральных молекул вносят другие силы, прежде всего взаимодействия между плоскостями оснований в стопках, т. е. «стэкинг»-взаимодействия; существенную роль играют также взаимодействия между ДНК и водой, в результате которых ДНК стремится принять максимально компактную структуру для уменьшения поверхности соприкосновения с водой. При этом гидрофобные основания локализуются внутри спирали, а на ее поверхности образуется гидратируемая углеводно-фосфатная оболочка.

Дестабилизирующее воздействие оказывают силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженными фосфатами комплементарных цепей.

Циклические ДНК и суперспирализация. Многие двухцепочечные ДНК в природе являются циклическими: плазмиды, ДНК митохондрий и хлоропластов, ДНК многих вирусов и бактерий. Такие ДНК, как правило, существуют в суперспиральном состоянии. При этом двойная спираль закручивается сама на себя, как показано на рисунке 196, количество витков образующейся суперспирали зависит от внешних условий. Суперспирализация циклических ДНК приводит к сильному изменению физических свойств молекулы, в особенности гидродинамических и электрофоретических. В клетках суперспирализация осуществляется особыми ферментами, которые для бактерий сравнительно хорошо изучены и называются ДНК-гиразами (или топоизомеразы II). Другие ферменты — топоизомеразы I — могут уменьшать число супервитков в кольцевых молекулах, давая набор «изомеров» с различным числом витков.

Знак суперспирали определяется по взаимодействию ДНК с определенными химическими веществами, способными связываться с ней и раскручивать двойную спираль. Такими веществами являются, например, интеркалирующие красители. Наиболее часто для этих целей используется этидийбромид; степень раскручивания увеличивается с концентрацией красителя

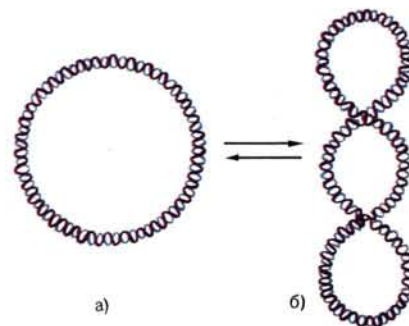
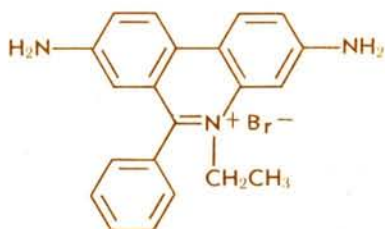


Рис. 196. Суперспирализация двухцепочечной ДНК под действием ДНК-гиразы: (а) — релаксированная форма; (б) — суперспирализованная форма.



Этидийбромид



Рич [Rich] Александр (р. 1924), американский ученый, работающий в области молекулярной биологии и биофизики. Образование получил в Гарвардском колледже и Гарвардской медицинской школе, с 1974 г. — профессор Массачусетского технологического института в Кембридже. Один из ведущих специалистов в области нуклеиновых кислот.

Суперспиральная ДНК при центрифугировании осаждается быстрее, чем релаксированная форма, т. е. лишенная суперспиральных витков. Если проводить центрифугирование в присутствии этидийбромидом и определять зависимость скорости седиментации циклической ковалентно замкнутой ДНК от ее концентрации, то можно определить знак суперспирали.

При суперспирализации ДНК приобретает «скрытую» конформационную энергию, влияющую на любой процесс, происходящий с изменением числа витков двойной спирали. Благодаря этому некоторые ферменты, вызывающие локальное расплетание ДНК (например, РНК-полимеразы, см. ниже), связываются с отрицательно суперспирализованной ДНК более эффективно. Другим следствием суперспирализации является реальная возможность образования участков вторичной структуры, которые термодинамически невыгодны и практически не существуют в линейной или релаксированной циклической ДНК.

Разрушение и восстановление двуспиральных структур. Денатурация, ренатурация, и гибридизация. Двуспиральные структуры очень стабильны в физиологических условиях при значениях рН, близких к нейтральным, температурах около 30 — 40 °С и в присутствии 0,15 моля соли. Однако увеличение или уменьшение рН, повышение температуры и добавление в среду некоторых веществ, таких, например, как мочевины, приводит к разрушению двухцепочечной структуры, предельным случаем которого является *денатурация*, т. е. полное разделение отдельных нитей.

Температура, при которой доли спирального и неспирального состояний равны, называется *температурой плавления* и обозначается T_m . Для каждой ДНК в постоянных условиях T_m постоянна и характеризует стабильность двуспиральной структуры. Другой характеристикой ДНК является ширина температурного перехода ΔT_m , которая отражает кооперативность перехода. Если бы все звенья разрушались одновременно, то ΔT_m была бы равна нулю. Однако процесс плавления идет через ряд промежуточных состояний, и поэтому ΔT_m имеет конечное значение.

Ширина интервала плавления для двухцепочечных синтетических полинуклеотидов, таких, как поли (dA) · поли (dT), значительно уже, чем у природных ДНК, что является следствием гетерогенности последних. Температура плавления ДНК линейно возрастает с увеличением доли G · C пар. На этом основан один из методов определения нуклеотидного состава ДНК.

Разрушенная двуспиральная структура в определенных условиях может быть восстановлена, по крайней мере частично. Этот процесс называют *ренатурацией*. Ренатурация происходит, если раствор денатурированной ДНК выдерживать определенное время в условиях, когда двуспиральная структура стабильна. Скорость ренатурации зависит от многих факторов, и в первую очередь от так называемой сложности ДНК, которая представляет собой число нуклеотидных пар в неповторяющихся последовательностях ДНК. Для ДНК вирусов и бактерий сложность ДНК равна числу нуклеотидных пар в геноме, поскольку в этом случае ДНК не содержит повторяющихся последовательностей достаточно большой длины. Чем выше сложность ДНК, тем медленнее идет ренатурация. Если ренатурации подвергают не целые, а фрагментированные молекулы, то скорость ренатурации возрастает с увеличением длины фрагментов.

Ренатурация широко применяется для исследования структуры ДНК. В частности, она используется для изучения сходства и различий разнородных ДНК. Две ДНК из разных источников денатурируют и затем смесь их ренатурируют. При этом, наряду с исходными нативными молекулами, образуются гибридные молекулы,

содержащие цепи из различных ДНК. Исследование таких гибридов под электронным микроскопом позволяет определить в них положение одно- и двухцепочечных участков. Двухцепочечные участки образуются в областях гомологии исследуемых ДНК. Ренатурация в этом случае называется *гибридизацией*.

Конформации одноцепочечных нуклеиновых кислот. Многие нуклеиновые кислоты — большинство РНК и ряд ДНК — существуют в одноцепочечной форме. Тем не менее они принимают в растворах и кристаллическом состоянии (в тех случаях, когда удается их закристаллизовать) конформации, в которых двухцепочечные участки чередуются с одноцепочечными. Наиболее хорошо изученными одноцепочечными полинуклеотидами являются тРНК.

Конформация тРНК. Транспортные РНК выполняют в клетках разнообразные функции. Однако основная их задача заключается в осуществлении трансляции. В 1965 г. Р. Холли установил первичную структуру тРНК^{Ala} из дрожжей. Тогда же, исходя из представления, что наиболее стабильное состояние тРНК соответствует образованию максимально возможного количества водородно-связанных пар оснований, а также основываясь на экспериментальных данных по неравномерному гидролизу молекулы рибонуклеазами, Р. Холли предложил модель вторичной структуры тРНК необычной формы — с чередующимися одно- и двухцепочечными участками — и назвал эту структуру «клеверным листом» (рис. 197).

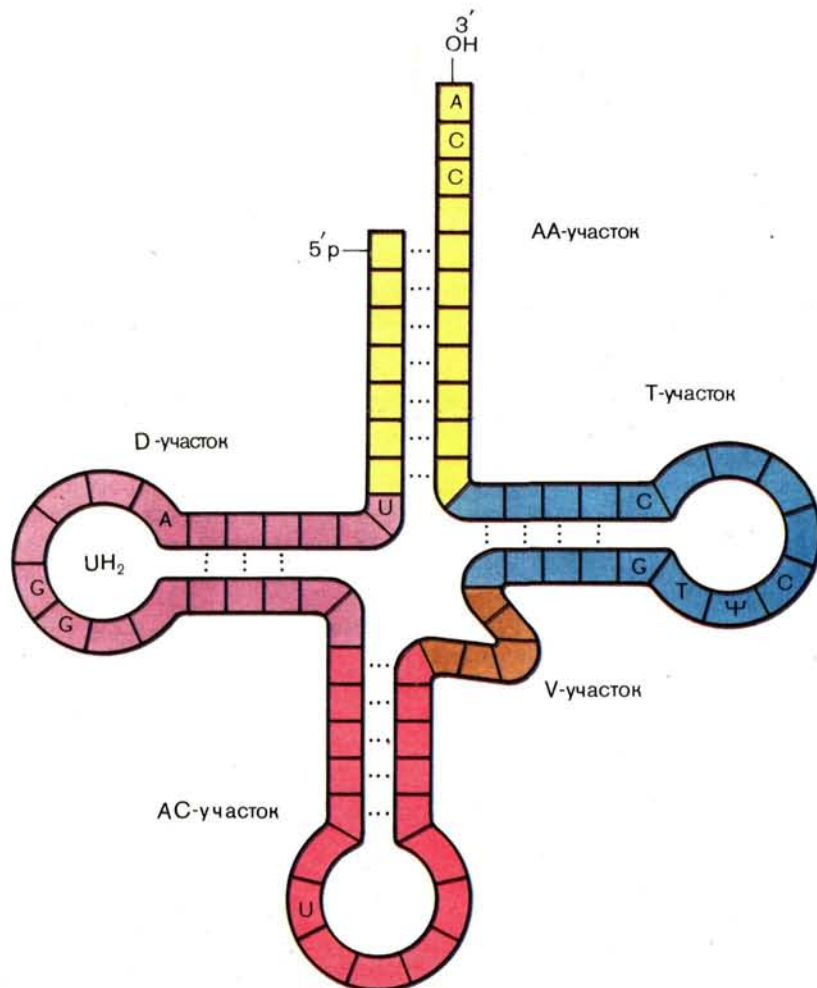


Рис. 197. Структура «клеверного листа» тРНК.



Клуг (Klug) Аарон (р. 1926), английский кристаллограф. Образование получил в университете Витватерсранда в Йоханнесбурге и Кейптаунском университете (ЮАР), с 1962 г. работает в лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже. Известен работами по изучению нуклеопротеидов методом рентгеноструктурного анализа. Лауреат Нобелевской премии по химии (1982).

С тех пор были определены последовательности более 100 тРНК из разных источников, и оказалось, что, несмотря на значительные различия первичных структур, все тРНК имеют сходную вторичную структуру типа «клеверного листа». Эта структура характеризуется пятью ответвлениями («лепестками»), в составе которых имеется одноцепочечный участок и двухцепочечный стебель. Каждому ответвлению присвоено свое название либо по структурному, либо по функциональному признаку: участок, включающий 3'-концевое звено тРНК, к которому присоединяется аминокислота, получил название аминоацильного (AA); содержащий в петле антикодон — антикодонового (AC); участок, в петле которого содержится общая для всех тРНК последовательность ТψС — Т-участка; участок, содержащий дигидроуридин, — D-участка. Наконец, фрагмент структуры, расположенный между Т- и AC-ответвлениями, имеет для всех тРНК различные размеры и называется переменным V-участком.

Структура типа «клеверный лист» объясняла характерную реакционную способность нуклеотидных звеньев в разных участках тРНК по отношению к химическим агентам и к действию рибонуклеаз. Однако гидродинамические характеристики молекулы свидетельствовали о ее более компактной упаковке, которая могла бы осуществляться за счет третичной структуры. Способ образования третичной структуры стал ясен после рентгеноструктурного анализа первой тРНК, которую удалось получить в кристаллическом состоянии (тРНК^{Phe} из дрожжей). Рентгеноструктурные исследования были выполнены одновременно двумя группами — в лабораториях А. Рича (США) и А. Клуга (Великобритания). Впоследствии были установлены третичные структуры еще нескольких тРНК. Третичная структура молекулы тРНК^{Phe} изображена на рисунке 198, она напоминает латинскую букву L.

Общие закономерности, найденные для структуры тРНК, по-видимому, реализуются и в других одноцепочечных полинуклеотидах. Те из них, для которых уже определены первичные структуры, могут быть представлены как образования с чередующимися двух- и одноцепочечными участками. Например, молекулы рибосомных 5S РНК имеют вторичные структуры, сходные с «клеверным листом» тРНК. Значительно более сложно выглядят структуры высокомолекулярных рибосомных или вирусных РНК (рис. 199). Несомненно, что такие РНК находятся в компактной форме, как это следует из их гидродинамических свойств, однако детали пространственной организации пока неизвестны.

Так же как и двухцепочечные полинуклеотиды, одноцепочечные молекулы могут денатурировать с разрушением вторичной и третичной структур. Денатурация наблюдается при повышении температуры, понижении ионной силы или добавлении в среду денатурирующих агентов — мочевины, органических растворителей и т. д.

Изучение плавления РНК различными методами (УФ-, КД- и ЯМР-спектроскопия) позволяет сделать вывод о многостадийном характере этого процесса. Кооперативность процесса плавления одноцепочечных молекул значительно меньше, чем в случае двуспиральных.

До сих пор рассматривались статические структуры ДНК и РНК, которые представляют собой среднее и наиболее вероятное состояние молекулы в данных конкретных условиях. Важно тем не менее понимать, что даже при низких температурах, далеких от температуры плавления, полинуклеотидная цепь находится в постоянном движении, определяемом тепловыми колебаниями. Нуклеотидные звенья сохраняют достаточную степень свободы и совершают локальные движения, значительные по амплитуде и частоте.

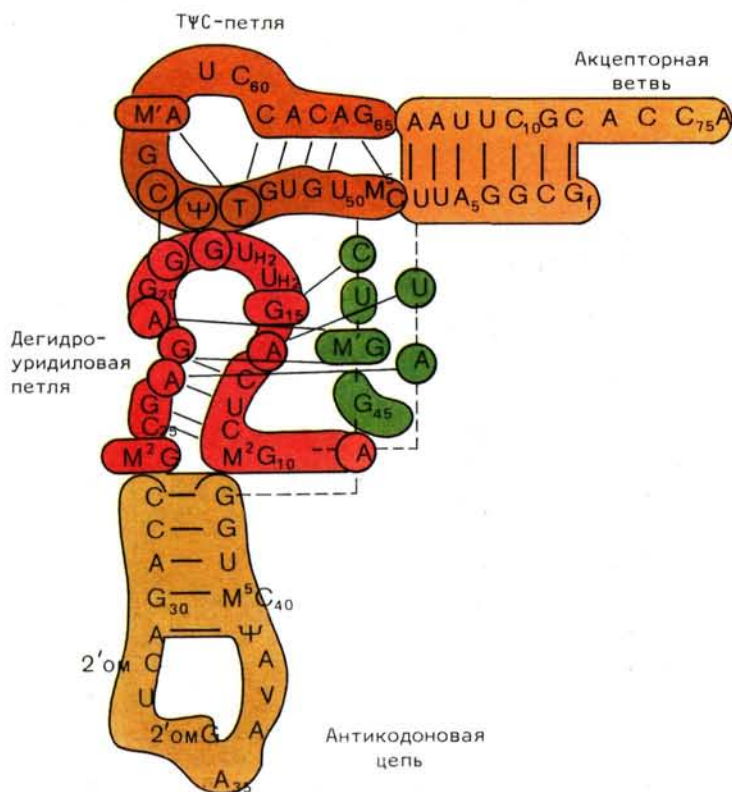
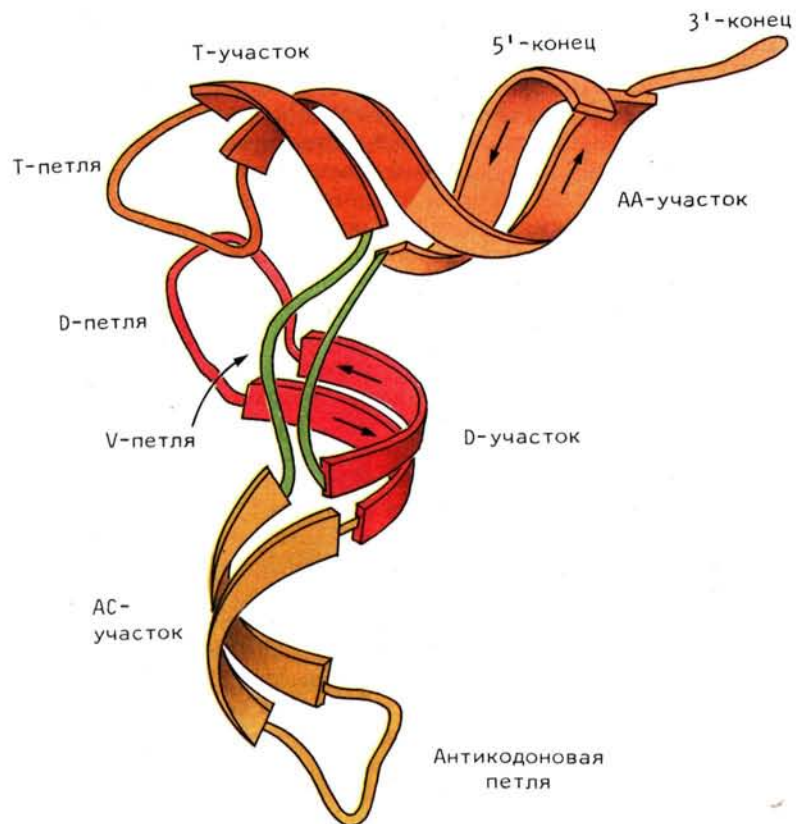


Рис. 198. Пространственная структура тРНК^{Phe} из дрожжей.

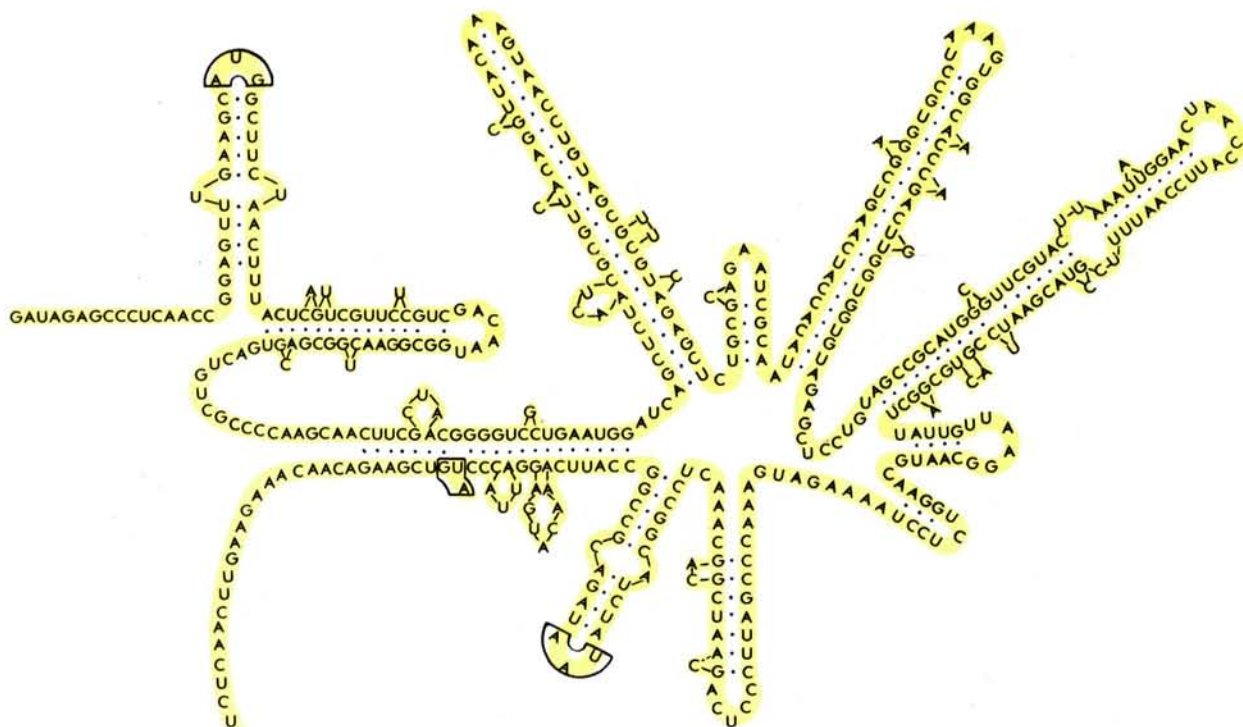
Вероятно, в основе их лежит конформационная гибкость фуранозного цикла нуклеотидной единицы, способной к переходу от $C(2')$ -эндо- к $C(3')$ -эндо-конформации, и наоборот. Подобные переходы, в свою очередь, сказываются на торсионных углах фосфодиэфирных и N-гликозидных связей и приводят к таким эффектам, как изменение перед плавлением и «дыхание» полинуклеотида.

О динамичности структуры полинуклеотидов свидетельствует ряд данных, полученных химическими методами. В частности, существование равновесия водородно-связанной и свободной форм оснований следует из результатов экспериментов по тритиевому или дейтерообмену. Другая группа данных, которая также позволяет предположить динамические нарушения вторичной структуры ДНК, основана на изучении ее взаимодействия с так называемыми интеркалирующими веществами. Эти соединения имеют плоские ароматические хромофоры, как, например, этидийбромид (см. с. 341).

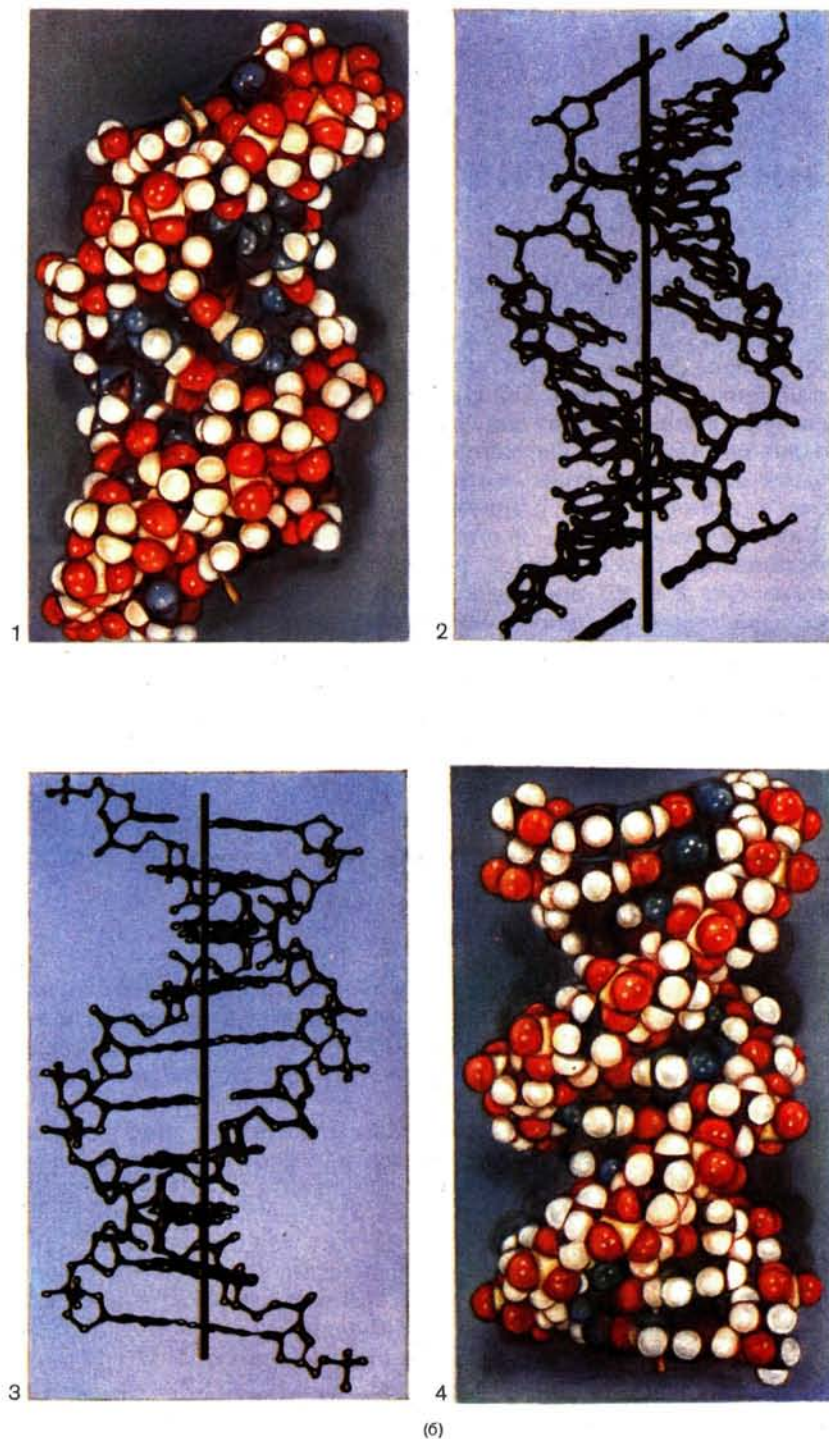
Рентгеноструктурный анализ комплексов таких соединений с синтетическими двухцепочечными олигонуклеотидами показывает, что плоские ароматические кольца красителей внедряются между парами оснований двойных спиралей. Механизм внедрения предполагает проникновение молекулы красителя между парами оснований в момент возникновения локального нарушения структуры, при этом водородные связи между парами оснований сохраняются, тогда как «стэкинг»-взаимодействия нарушаются.

Одним из вариантов такого нарушения структуры является образование так называемых «кинков», представляющих собой из-

Рис. 199. Участок вторичной структуры РНК фара MS2.



ломы двойной спирали, схематически изображенные на рисунке 200. Впервые гипотеза о возможности «кинков» была высказана Ф. Криком и А. Клугом для объяснения способа укладки ДНК в нуклеосомах хроматина. Хотя гипотеза не была прямо подтверждена экспериментально, она породила целый ряд гипотез о способах образования «кинков» в двуспиральных ДНК и их роли во взаимо-



(a)

Рис. 200. Схема образования «кинков» в ДНК (а). Образование «кинков» в ДНК (б).
 1 — β -«кинковая» структура ДНК;
 2 — β -«кинковая» компьютерная структура ДНК;
 3 — компьютерная структура ДНК в В-форме;
 4 — молекулярная модель ДНК в В-форме.



Корнберг [Kornberg] Артур (р. 1918), американский биохимик. Окончил Рочестерский университет (1941). Внес значительный вклад в изучение биосинтеза белков. Открыл фермент ДНК-полимеразу, с помощью которого синтезировал биологически активную молекулу ДНК. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1959, совместно с С. Очоа).

действию с интеркалирующими красителями и белками, содержащими способные к интеркаляции ароматические аминокислоты. Эти гипотезы сводятся к тому, что в момент образования «кинка» интеркалирующее вещество способно внедряться между парами оснований, которые удаляются друг от друга в месте излома. Иногда предполагают, что возникновение «кинков» предшествует плавлению двухцепочечных полинуклеотидов.

Синтез нуклеиновых кислот

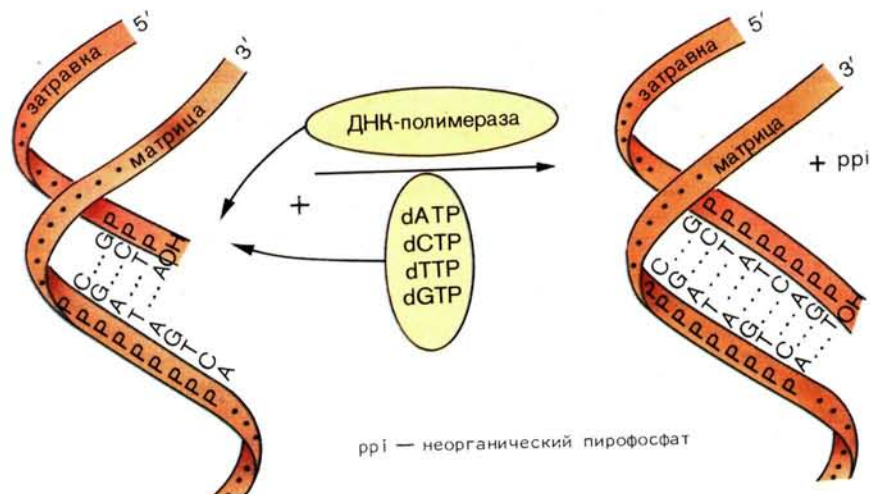
В настоящее время методы синтеза олиго- и полинуклеотидов разработаны в такой степени, что в короткие сроки могут быть получены искусственные фрагменты ДНК большой длины и практически любого состава. Достигнут существенный прогресс и в синтезе полирибонуклеотидов. Общая стратегия синтеза полинуклеотидов и нуклеиновых кислот заключается в комбинированном использовании химических и ферментативных методов. Относительно небольшие олигонуклеотиды синтезируют химически, а затем «соединяют» в длинные цепи с помощью соответствующих ферментов.

Синтетические олиго- и полинуклеотиды, а также полученные синтетическим путем гены и регуляторные области (промоторы, терминаторы и т. д.) широко используются в исследовании структуры и функции нуклеиновых кислот, генетической и белковой инженерии, биотехнологии. Синтез олиго- и полинуклеотидов, представляющий собой важный раздел биоорганической химии, имеет сегодня большое теоретическое и прикладное значение.

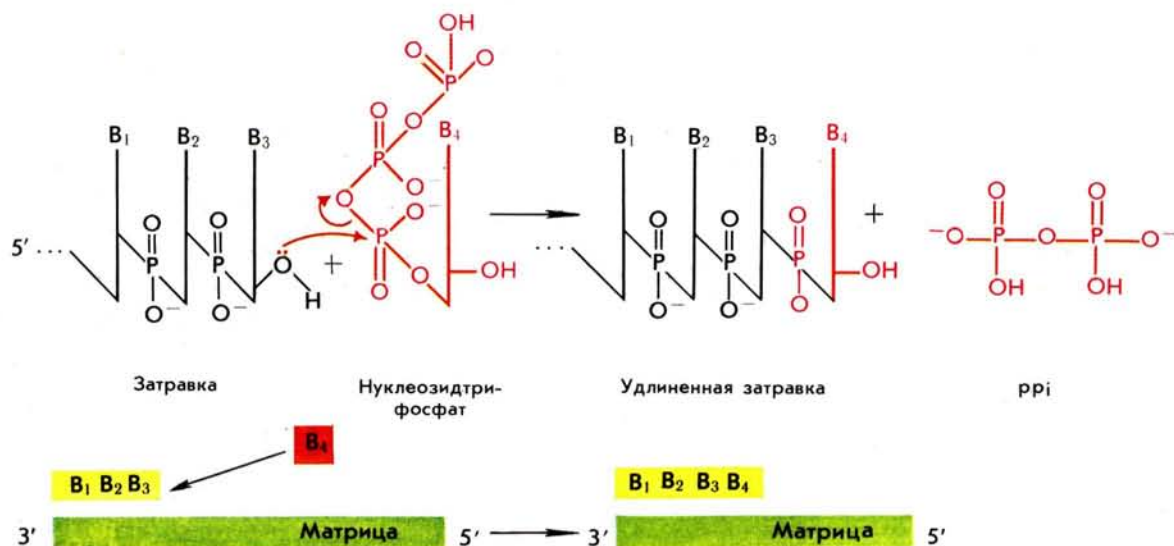
Ферменты биосинтеза нуклеиновых кислот

В этом разделе рассматриваются основные ферменты биосинтеза нуклеиновых кислот, поскольку многие из них широко используются в химико-ферментативном синтезе полинуклеотидов. Среди этих ферментов особый интерес представляют полимеразы и лигазы.

ДНК-полимеразы. ДНК-полимеразы относятся к типу ферментов, образующих фосфодиэфирные связи и использующих в качестве субстрата дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP). Необходимым условием работы таких ферментов, как правило, является наличие матрицы и затравки. Матрицей служит одноцепочечная ДНК, и ДНК-полимеразы ее копируют, синтезируя комплементарную полидезоксирибонуклеотидную цепь. Синтез не может начаться без затравки, представляющей собой олиго- или полинуклеотид, комплементарный матрице и имеющий свободную 3'-ОН-группу, с которой начинается присоединение первого нуклеотида вновь синтезируемой цепи



Таким образом, фермент выполняет функцию отбора нуклеозидтрифосфатов, комплементарных каждому следующему звену матрицы, и катализирует нуклеофильную атаку 3'-ОН-группы затравки на α -фосфатную группу трифосфата:



После присоединения каждого нового звена удлиненная цепь содержит на 3'-конце свободную гидроксильную группу, к которой может присоединяться новое звено. Процесс продолжается, пока ДНК не станет полностью двухцепочечной. Новая цепь растет в направлении от 5'-к 3'-концу, а матрица «считывается» в направлении от 3'-к 5'-концу.

Вышесказанное относится к общим свойствам всех матрично-зависимых ДНК-полимеризующих ферментов. Однако ферменты из разных источников обладают и индивидуальными особенностями.

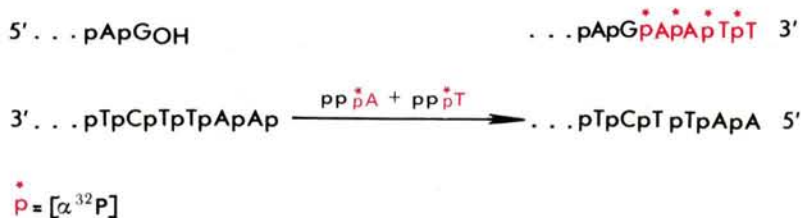


Темин (Temin) Говард (р. 1934), американский вирусолог. Окончил Калифорнийский технологический институт в Пасадене (1959), с 1971 г. — заведующий лабораторией в Висконсинском университете в Милуоки. Основные работы — по изучению РНК-содержащих вирусов. Обнаружил в вирусах саркомы Рауса ферментную систему, способную синтезировать ДНК на матрице РНК (1970, независимо от Д. Балтимора). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Р. Дульбекко и Д. Балтимором).

Так, ДНК-полимераза I из *E. coli* (открыта А. Корнбергом), помимо полимеразной активности, обладает еще двумя типами экзонуклеазной активности: как $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеаза она осуществляет с $5'$ -конца двухцепочечных ДНК деградацию, в результате которой происходит отщепление $5'$ -моно- и $5'$ -фосфорилированных коротких олигонуклеотидов, а как $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза последовательно отщепляет $5'$ -моонуклеотиды с $3'$ -концов двухцепочечных и одноцепочечных ДНК. Фермент работает в присутствии ионов Mg^{2+} .

При мягком протеолитическом расщеплении субтилизином ДНК-полимераза I дает два полипептида, один из которых обладает только $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активностью, тогда как другой сохраняет полимеразную и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазную активности. Последний фрагмент носит название большого фрагмента ДНК-полимеразы I или фрагмента Кленова.

ДНК-полимеразу I и фрагмент Кленова широко используют в генной инженерии и при анализе структуры ДНК для «заполнения» $5'$ -выступающих одноцепочечных концов или для удаления $3'$ -выступающих концов. В первом случае эти ферменты проявляют ДНК-полимеразную активность, а во втором — $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазную. При заполнении выступающих концов содержащими радиоактивную метку нуклеозидтрифосфатами ДНК оказывается меченой по концевым звеньям:



ДНК-полимераза I (но не фрагмент Кленова) широко используется для получения меченых ДНК методом так называемой *ник-трансляции* (от англ. nick, обозначающего «одноцепочечный разрыв»). Если одна из цепей ДНК содержит одноцепочечный разрыв так, что $3'$ -концевой нуклеотид в месте разрыва имеет $3'$ -ОН-группу, то ДНК-полимераза I в присутствии четырех нуклеозидтрифосфатов осуществляет матричный синтез. Одновременно она гидролизует существовавшую цепь за счет $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активности, как показано на схеме:



По мере синтеза удлиняется 5'-концевой фрагмент и укорачивается 3'-концевой фрагмент. В результате 3'-концевой фрагмент может быть полностью замещен вновь синтезированной ДНК. Если для *ник*-трансляции использовать меченые трифосфаты, то синтезированная ДНК получается меченой.

ДНК-полимераза бактериофага Т4 получается из клеток *E. coli*, инфицированных бактериофагом Т4. Фермент обладает ДНК-полимеразной и значительно более высокой по сравнению с ДНК-полимеразой I $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью, но, в отличие от последней, не проявляет $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазную активность.

ДНК-полимераза Т4 может быть использована в основном так же, как ДНК-полимераза I. Сильная $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность позволяет применять фермент для введения метки в ДНК без выступающих концов и с $3'$ -выступающими концами.

К двухцепочечному полинуклеотиду добавляют ДНК-полимеразу и один меченый dNTP. Фермент за счет $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности удаляет нуклеотиды с 3'-конца каждой из цепей вплоть до нуклеотида, который содержит то же гетероциклическое основание, что и добавленный в смесь dNTP. За удалением этого звена следует его восстановление за счет полимеразной активности фермента. Таким образом, устанавливается псевдоравновесие: происходит постоянное отщепление и включение 3'-концевого звена. При каждом акте включения используется молекула dNTP, при отщеплении удаляется 5'-нуклеозидмонофосфат. Результатом реакции является превращение трифосфата в монофосфат. Реакция идет до тех пор, пока не израсходуется весь нуклеозидтрифосфат. После этого начинается экзонуклеазное расщепление, которое может привести к полному гидролизу ДНК.

Особое значение имеет фермент **РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза)** (открыта Г. Теминым и независимо Д. Балтимором), источником которой обычно служит вирус миелобластома птиц. Фермент, подобно ДНК-зависимым ДНК-полимеразам, осуществляет зависимую от затравки и матрицы полимеризацию дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, синтезируя ДНК, комплементарную матрице. Затравкой служат дезоксирибо- или рибонуклеотиды, однако в качестве матрицы, наряду с одноцепочечной ДНК, фермент может использовать и одноцепочечную РНК. Фермент обладает также активностью рибонуклеазы и способен деградировать РНК в гибридном комплексе ДНК·РНК. Деградация происходит по экзонуклеазному типу как с 3'-, так и с 5'-концов РНК.

Обратные транскриптазы наиболее широко используются в генной инженерии для получения ДНК, комплементарных матричным РНК.

Важнейшим классом являются также **ДНК-зависимые РНК-полимеразы**. Эти ферменты катализируют синтез РНК, комплементарных ДНК-матрицам (транскрипцию), используя в качестве субстратов рибонуклеозидтрифосфаты. Общая схема синтеза такая же, как и у ДНК-полимераз, однако РНК-полимеразы способны начинать синтез без затравки, т. е. инициировать синтез РНК. Сигнал инициации синтеза заключен в специальных регуляторных последовательностях ДНК, называемых промоторами. (Более подробно о транскрипции см. с. 411).

Существует также большое число ферментов, аналогичных полимеразам, но способных к безматричному синтезу полинуклеотидов. Из них наибольшее применение нашла **концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (терминальная трансфераза)**. Концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (из тимуса телят) осуществляет последовательное присоединение нуклеотидных звеньев к 3'-ОН-концевым группам ДНК. Субстратами служат дезоксирибонуклео-



Балтимор (Baltimore) Дэвид (р. 1938), американский вирусолог. Образование получил в Массачусетском технологическом институте в Кембридже и Рокфеллеровском институте; с 1968 г.— профессор Центра онкологических исследований Массачусетского онкологического института. Основные работы — по расшифровке механизма биосинтеза белка. Изучал влияние онкогенных вирусов на генетический аппарат клетки. Открыл (1970, независимо от Г. Темина) явление обратной транскрипции, обнаружив в вирусе фермент-обратную транскриптазу. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1975, совместно с Р. Дульбекко и Г. Теминым).

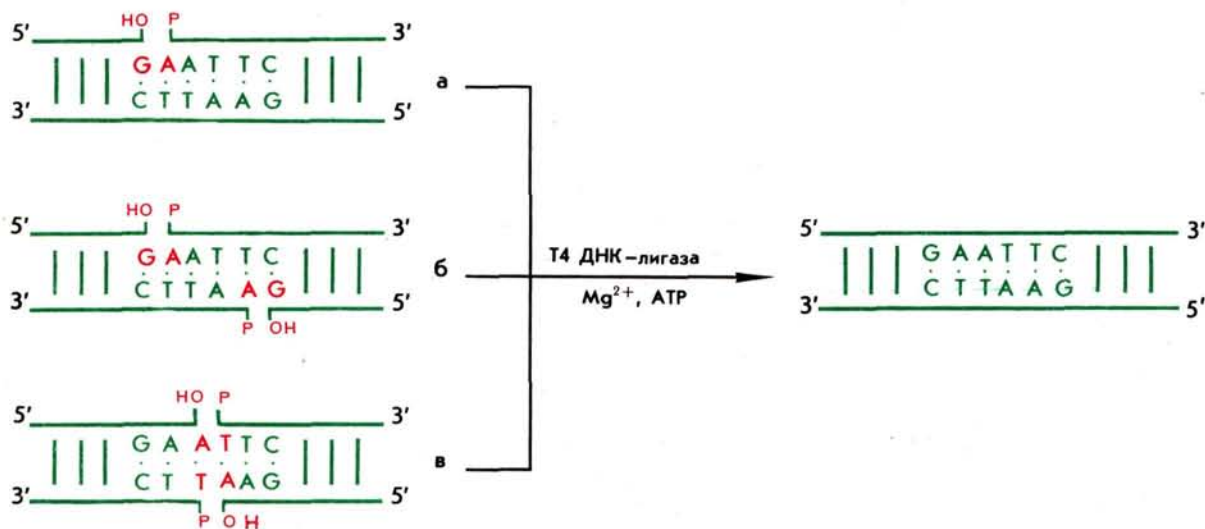
зидтрифосфаты. В присутствии ионов Mg^{2+} фермент преимущественно использует в качестве затравки одноцепочечные или двухцепочечные ДНК с 3'-выступающими концами (последние могут быть получены из полностью двухцепочечных ДНК с помощью экзонуклеазы фага λ). Однако в присутствии ионов Co^{2+} присоединение идет по любым 3'-ОН-концевым группам ДНК:



В результате к 3'-ОН-группам ДНК присоединяется полидезоксирибонуклеотидная одноцепочечная последовательность, состав которой зависит от состава смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, использованных в реакции. Если имеется один единственный трифосфат, то синтезируется гомополимер — поли·(dA), поли·(dT), поли·(dG) или поли·(dC).

Фермент используется в генной инженерии при клонировании фрагментов ДНК (см. с. 433) и в анализе последовательности ДНК для введения метки по 3'-концевым звеньям.

ДНК- и РНК-лигазы. Существуют ферменты, способные соединять между собой фосфодиэфирной связью целые фрагменты ДНК или РНК. Такие ферменты называются лигазами. Из многочисленного семейства лигаз наибольшее применение получили ДНК- и РНК-лигазы, синтезирующиеся в клетках, инфицированных бактериофагом Т4. Так, *Т4 ДНК-лигаза* катализирует образование фосфодиэфирной связи между 3'-ОН- и 5'- PO_4 -группами в одноцепочечных разрывах двухцепочечных ДНК (схема а) или между такими же группами двухцепочечных молекул ДНК, содержащих на концах комплементарные одноцепочечные последовательности (схема б).

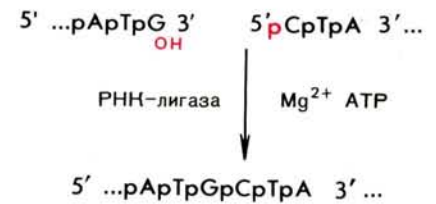


Такими комплементарными последовательностями могут быть, в частности, одноцепочечные участки, образующиеся при расщеплении ДНК какой-либо рестриктазой. На схеме б представлен пример образования «липких» концов при расщеплении ДНК рестриктазой EcoRI. Со значительно меньшей скоростью, но все же достаточно эффективно фермент соединяет между собой полностью двуспиральные фрагменты ДНК с 3'-ОН- и 5'-PO₄-группами (схема в).

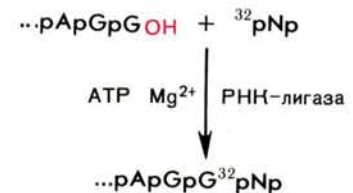
Фермент использует в качестве кофактора АТФ и требует для работы присутствия в среде ионов Mg²⁺.

ДНК-лигаза широко используется в генной инженерии для соединения фрагментов ДНК и при химико-ферментативном синтезе ДНК.

РНК-лигаза катализирует ковалентное связывание одноцепочечных ДНК или РНК, при условии, что они содержат концевые 3'-ОН- и 5'-PO₄-группы. Молекулы, содержащие 3'-ОН-группы, принято называть акцепторными, а 5'-PO₄ — донорными. В роли доноров выступают олигонуклеотиды и двухцепочечные ДНК. Минимальными донорами могут быть нуклеозид 3',5'-дифосфаты pNp и pdNp. Полирибонуклеотиды более эффективны в качестве акцепторов, чем полидезоксирибонуклеотиды. Тринуклеозиддифосфаты NpNpN — ОН являются минимальными акцепторами. Эта реакция лигирования иллюстрируется схемой.



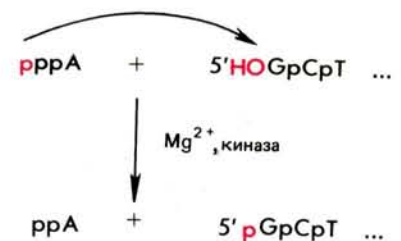
РНК-лигазу широко используют для введения метки в 3'-концевые звенья РНК. В качестве доноров служат 5'-³²P-меченые 3',5'-нуклеозиддифосфаты. Фермент находит применение в химико-ферментативном синтезе полирибонуклеотидов. Добавление его к ДНК-лигазе значительно ускоряет реакцию «сшивания» двухцепочечных молекул ДНК.



Следует упомянуть также ферменты, которые присоединяют фосфатные группы к ДНК и РНК, — так называемые *полинуклеотидкиназы*. Для включения метки в 5'-концы ДНК (или в синтетические олигонуклеотиды) широко применяется полинуклеотидкиназа бактериофага Т4. Основная реакция, катализируемая ферментом, заключается в переносе γ-фосфатной группы АТФ на 5'-ОН-группу олиго- и полинуклеотидов. Фосфорилируются как рибо-, так и дезоксирибопроизводные. Скорость фосфорилирования двухцепочечных молекул несколько ниже, чем одноцепочечных.

В результате реакции АТФ превращается в АДФ. Киназа осуществляет также обмен 5'-концевых фосфатных групп олиго- или полинуклеотидов с γ-фосфатной группой АТФ в присутствии избытка АДФ. Фермент используют для введения меченых фосфатных групп в 5'-концевые звенья ДНК. Для этого применяют АТФ, содержащий радиоактивный атом фосфора (³²P) в γ-положении: ³²pppA.

Т4-полинуклеотидкиназа широко используется для фосфорилирования олиго- и полинуклеотидов при работе с рекомбинантными ДНК, при химико-ферментативном синтезе нуклеиновых кислот и определении их последовательности.



Химический синтез олигонуклеотидов

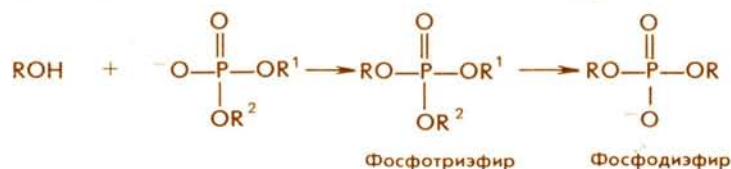
Ключевой стадией химического синтеза олигонуклеотидов является создание фосфодиэфирных связей между нуклеотидами. Можно выделить два основных подхода к решению этой задачи. Один из них использует в качестве источника фосфатной группы моноэтерифицированные фосфаты (фосфомоноэфиры), а другой — диэтерифицированные фосфаты (фосфодиэфиры).

В первом случае при химическом синтезе непосредственно образуется фосфодиэфирная связь, а во втором — получается триэфир фосфорной кислоты, который затем при полном деблокировании превращают в диэфир. Поэтому первый метод носит название *фосфодиэфирного*, а второй — *фосфотриэфирного*. Одним из распространенных вариантов фосфотриэфирного метода является *фосфитный метод*, в котором на первом этапе образуется фосфитный триэфир, окисляющийся затем в триэфир фосфорной кислоты

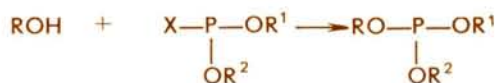
Фосфодиэфирный метод



Фосфотриэфирный метод



Фосфитный метод



R, R¹ — остатки нуклеозидов Фосфитный триэфир
R² — защитные группы

N-,O-Защитные группы. Поскольку нуклеозиды и нуклеотиды — полифункциональные соединения, все реакционноспособные группы, кроме тех, которые должны вступать в реакцию конденсации, необходимо блокировать, чтобы избежать нежелательных побочных реакций. защите подвергаются экзоциклические аминогруппы гетероциклических оснований, гидроксильные группы дезоксирибозы и,

в случае фосфотриэфирных методов, один из двух фосфатных гидроксидов. Основными требованиями к защитным группам являются стабильность в условиях конденсации, возможность введения и удаления без деструкции и модификации исходных и конечных продуктов и, наконец, возможность селективного удаления одних защитных групп при сохранении других.

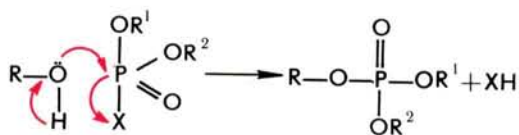
Основные защитные группы, применяемые в синтезе олигонуклеотидов, приведены в таблице 14. Аминогруппы оснований и 3'-гидроксильные группы дезоксирибозы защищаются путем ацилирования. Наиболее распространенными защитными группами при этом являются ацетильная — для 3'-гидроксила углевода, бензоильная — для аминогрупп цитидина и аденозина, анизоильная — для аминогруппы цитидина и изобутирильная — для аминогруппы гуанина. Все ацильные защитные группы могут быть удалены действием концентрированного водного аммиака.

Для блокирования 5'-гидроксильных групп обычно используют производные трифенилметана, которые легко удаляются действием кислот, в том числе и апротонных кислот Льюиса.

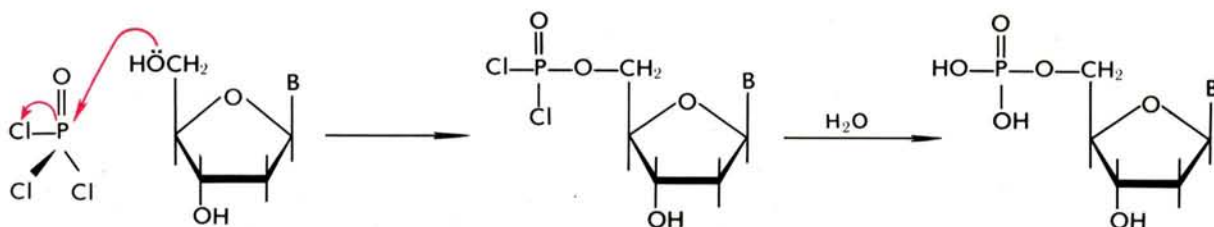
Фосфатная группировка защищается β-цианэтильной группой, которая может быть снята обработкой щелочью. В фосфотриэфирном методе в качестве второй Р-защитной группировки используют *p*- или *o*-хлорфенильные группы. Для их элиминирования применяются аммиак или ароматические альдоксины.

Две другие задачи, возникающие при создании фосфодиэфирных связей, состоят в выборе рациональных методов введения фосфатных групп в нуклеозиды и способов конденсации нуклеозидного и нуклеотидного компонентов.

Фосфорилирование нуклеозидов. В синтезе олигонуклеотидов разработаны два пути фосфорилирования нуклеозидов. В одном из них используются стабильные производные фосфорной кислоты, содержащие высокореакционноспособную группировку. В другом такая группировка создается прямо в процессе реакции за счет взаимодействия производного фосфорной кислоты с активирующим реагентом. В обоих случаях фосфорилирование гидроксильных групп сахара проходит в результате нуклеофильного замещения у атома фосфора фосфорилирующего компонента.

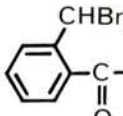

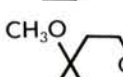
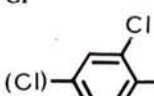
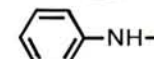
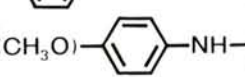


Первый путь реализуется, например, при взаимодействии оксихлорида фосфора с нуклеозидами, при этом с максимальной скоростью фосфорилируется 5'-ОН-группа. Первичный продукт реакции, содержащий связанные с фосфором атомы хлора, гидролизуются водой:



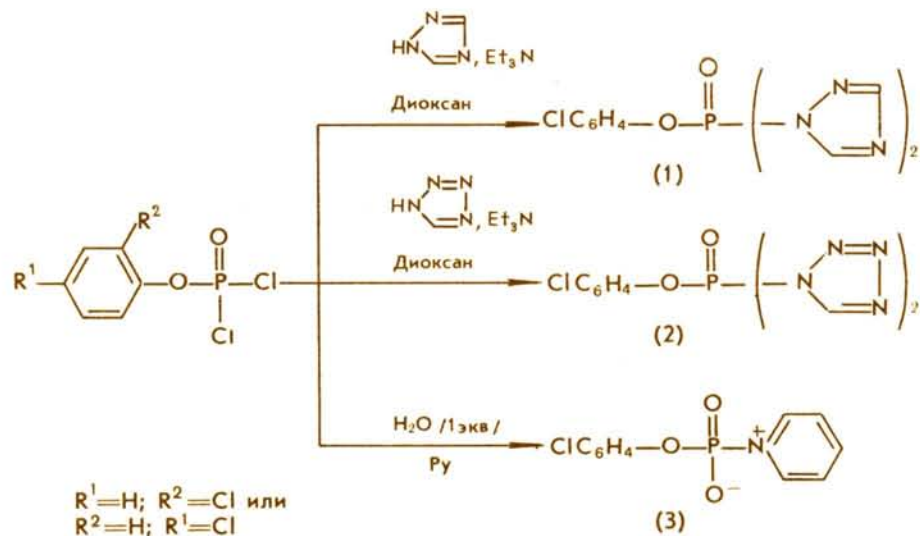
N-, O- и P-Защитные группы, используемые в синтезе олигонуклеотидов

Нуклеиновые кислоты

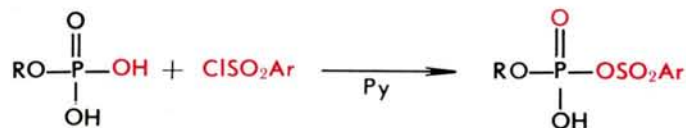
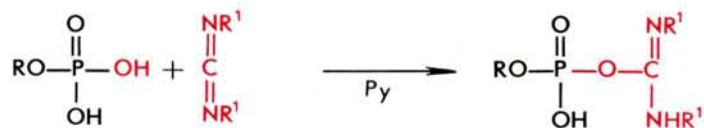
№ п/п	Защищаемая группа	Защитная группа	Формула	Сокращения	Условия отщепления
1	-NH ₂	Ацетильная	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-$	ac	Конц. NH ₃
2	"	Бензоильная	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}(=\text{O})-$	bz	"
3	"	Анизоильная	$\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(=\text{O})-$	an	"
4	"	Изобутирильная	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}-\text{C}(=\text{O})- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	ib	"
5	5'-OH	Тритильная	$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}-$	Tr	Бензолсульфо- кислота, три- хлоруксусная кислота, три- фторуксусная кислота, ZnBr ₂
6	"	Монометокситритильная	$\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{C}-$	MeOTr	
7	"	Диметокситритильная	$(\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4)_2(\text{C}_6\text{H}_5)\text{C}-$	(MeO) ₂ Tr	
8	"	Тритилоксиацетильная	$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{COCH}_2\text{C}(=\text{O})-$	Trac	Разб. NH ₃
9	"	Левулинильная	$\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$	Lev	NH ₂ NH ₂
10	"	о-Дибромметилбензоильная		DBMB	AgClO ₄
11	3'-OH	Бензоильная	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}(=\text{O})-$	Bz	Конц. NH ₃ , NaOH
12	"	Ацетильная	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-$	Ac	"
13	2'-OH	Тetraгидропиранильная		Thp	Разб. HCl
14	"	Метокситетрагидропиранильная		Mthp	"
15	Фосфатная	β-Цианэтильная	$\text{N}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	CNEt	NH ₃ , NaOH, триэтиламин
16	"	β, β, β-Трихлорэтильная	$\begin{array}{c} \text{Cl} \\ \\ \text{C}-\text{CH}_2- \\ \\ \text{Cl} \end{array}$	TCEt	H ₂ /Zn-Cu
17	"	(п-) или о-Хлорфенильная		ClPh	NH ₃ , разб. NaOH, син-2-нитро- бензальдегид или пиридин-2- карбальдегид
18	"	Анилидная и замещенные анилидные	 		Изоамилнитрит

В более жестких условиях при замещенной 5'-ОН-группе аналогичным образом можно получить 3'-фосфаты.

Для фосфорилирования гидроксильных групп остатка рибозы или дезоксирибозы используют также активированные фосфамиды, например фосфотри-(1) и тетразолиды (2), которые получают взаимодействием хлорфосфатов с триазолом или тетразолом. Эффективные фосфорилирующие реагенты (3) образуются также при действии 1 экв. H_2O в пиридине на арилдихлорфосфаты.

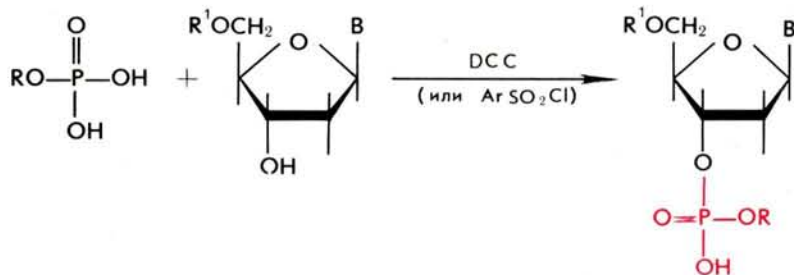


Как уже было отмечено, фосфорилирование нуклеозидов осуществляется также производными фосфорной кислоты в присутствии активирующих агентов, в роли которых могут выступать дициклогексилкарбодиимид (DCC) или арилсульфохлориды ArSO_2Cl . И в том и в другом варианте на первом этапе реакции происходит активация фосфатной группы с образованием промежуточных соединений, приведенных ниже

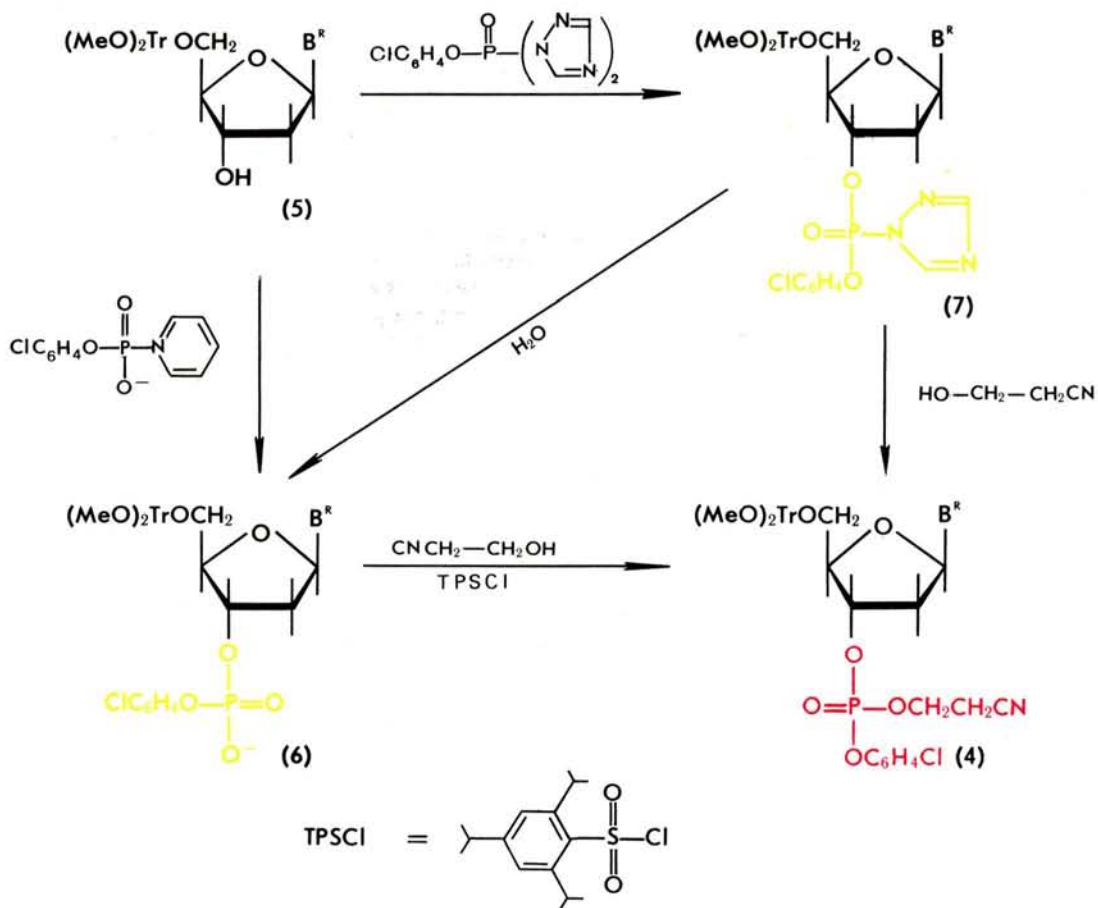


R — остаток нуклеозида

$R^1 = \text{C}_6\text{H}_{11}$



Механизмы дальнейших превращений этих соединений сложны, но в конечном счете происходит нуклеофильное замещение в фосфорилирующем агенте, причем роль нуклеофила играет защищенный нуклеозид со свободной гидроксильной группой. В понимание механизмов активации существенный вклад был внесен Д. Г. Кнорре.



Триизопропилбензолсульфохлорид

R—N-защитные группы

B^R—N-защитненное гетероциклическое основание

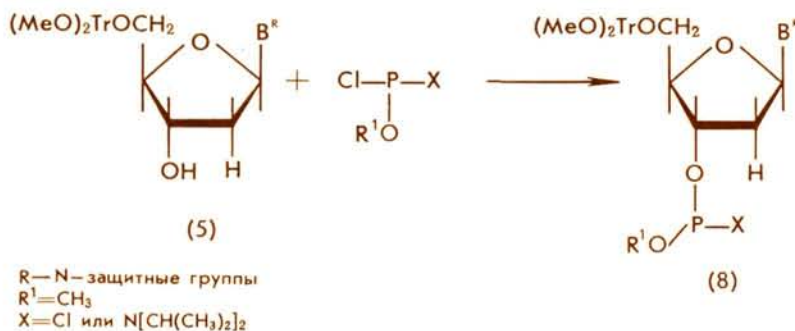
Недостатком карбодиимидного метода является малая скорость реакции и образование большого числа побочных продуктов. Использование арилсульфохлоридов позволяет избежать побочных реакций. В качестве активирующих агентов могут выступать арилсульфотри- или тетразолиды. Вероятно, в этом случае активными фосфорилирующими соединениями являются образующиеся в результате реакции фосфотри- и тетразолиды.

В качестве примера приведены два пути получения фосфорилированного производного (4) — ключевого соединения в фосфотриэфирном методе. Первый из них включает обработку исходного нуклеозида (5) бис-(триазолидом) *n*-хлорфенилфосфорной кислоты с последующим превращением промежуточного продукта (7) в триэфир (4) действием этиленциангидрина. Второй — получение диэфира нуклеотида (6), а затем превращение его в триэфир (4) с помощью конденсирующего агента.

В последние годы в связи с разработкой фосфитного варианта фосфотриэфирного метода синтеза олигонуклеотидов все большее значение приобретают методы введения в нуклеотиды производных фосфористой кислоты с образованием соединений типа (8)



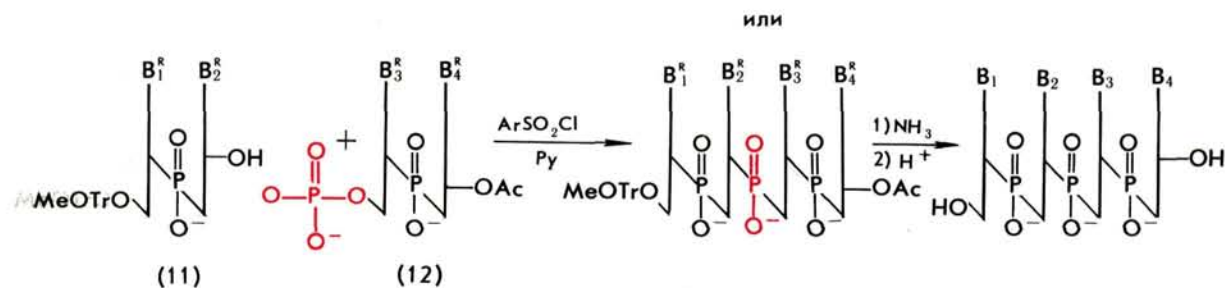
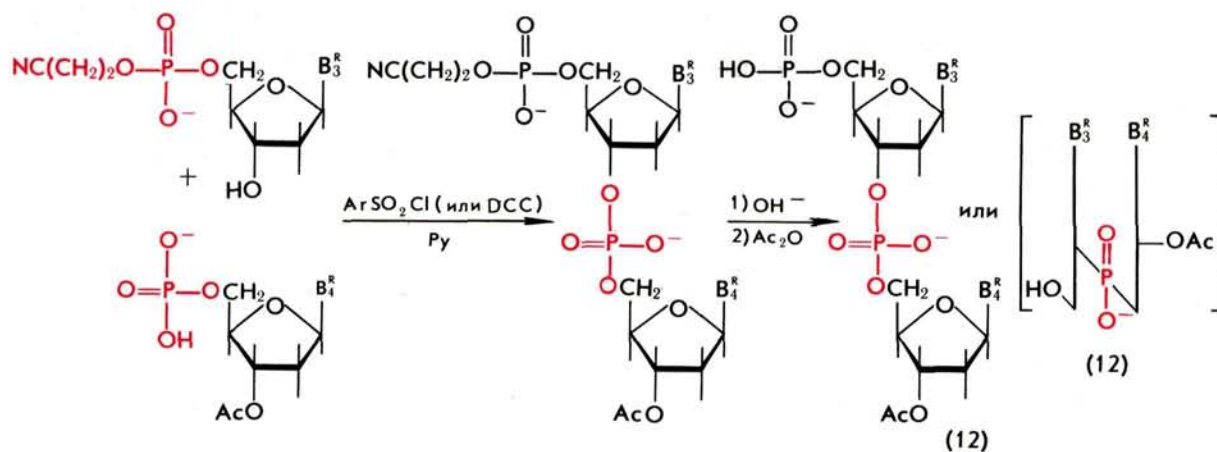
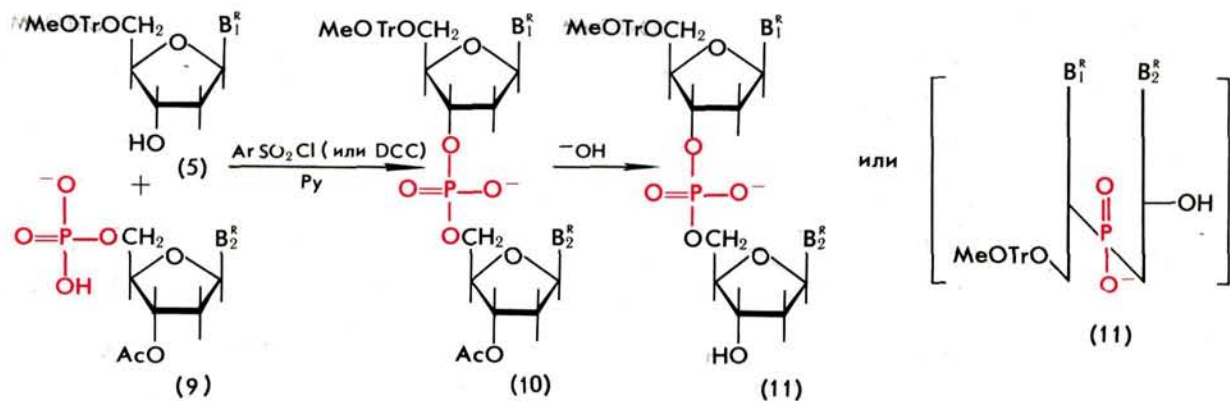
Кнорре Дмитрий Георгиевич (р. 1926), советский химик и биохимик, академик АН СССР (1981). Окончил Московский химико-технологический институт им. Д. И. Менделеева (1947). Директор Института биоорганической химии СО АН СССР (Новосибирск) и профессор Новосибирского университета. Основные работы посвящены изучению направленной химической модификации нуклеиновых кислот и белков, механизма пептидного синтеза.



Фосфодиэфирный метод синтеза олигонуклеотидов. Согласно использовавшейся ранее методологии, разработанной в лаборатории Г. Кораны, фосфодиэфирный метод включает в себя конденсацию нуклеозидного компонента с незащищенной 3'-ОН-группой (5) с нуклеотидным компонентом, имеющим свободную 5'-фосфомоноэфирную группу (9) (рис. 201).

В качестве конденсирующих агентов применяются арилсульфохлориды или DCC. Образующийся защищенный динуклеозидмонофосфат (10) либо полностью деблокируется, либо в нем удаляется только ацильная группа, блокирующая 3'-гидроксил. В последнем случае образуется динуклеозидмонофосфат (11) со свободной 3'-ОН-группой, используемый в качестве нуклеозидного компонента для присоединения следующего звена.

Метод синтеза, при котором на каждом последующем шаге присоединяется мономерное звено, называется ступенчатым. Обычно таким образом синтезируются не более чем 3 — 4-звенные олигонуклеотиды, что связано с трудностями отделения продукта конденсации от исходного олигонуклеотида по мере увеличения длины цепи, поскольку они различаются всего на одно звено. Для синтеза более длинных олигонуклеотидов используют блочный метод. К динуклеотиду со свободной 3'-гидроксильной группой (11)



$\text{B}^R = \text{bzA; anC; ibG}$ или T

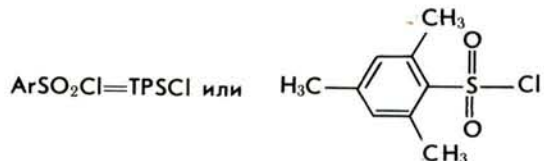


Рис. 201. Общая схема синтеза тетра-
нуклеотида фосфодиэфирным методом.

(нуклеозидный компонент) присоединяют динуклеотид с незащищенной 5'-фосфатной группой, но защищенным 3'-гидроксилем (12) (нуклеотидный компонент).

Однако и при использовании блочного метода синтез сравнительно длинных (более 10—12 звеньев) олигонуклеотидов фосфодиэфирным методом оказывается затруднительным в связи с многочисленными побочными реакциями с участием незащищенной фосфатной группы. Существенный прогресс в синтезе олигонуклеотидов, позволивший получать длинные последовательности, связан с применением усовершенствованного фосфотриэфирного метода.

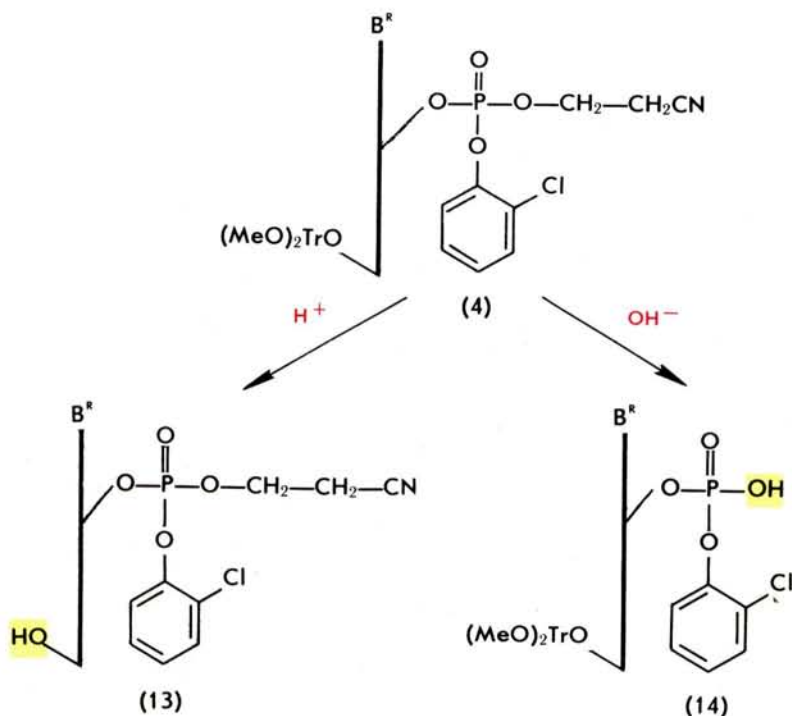
Фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов. Фосфотриэфирный метод является исторически более ранним методом синтеза олигонуклеотидов. Именно таким путем А. Тоддом и М. Микельсоном был получен первый синтетический олигонуклеотид. Однако широкого распространения метод не имел ввиду отсутствия достаточно эффективных защитных групп и конденсирующих агентов. С появлением соответствующих реагентов фосфотриэфирный метод и его варианты практически заменили фосфодиэфирный метод.

В современном фосфотриэфирном методе используется ключевое соединение (4), которое легко может быть превращено как в нуклеозидный (13), так и нуклеотидный (14) компоненты.

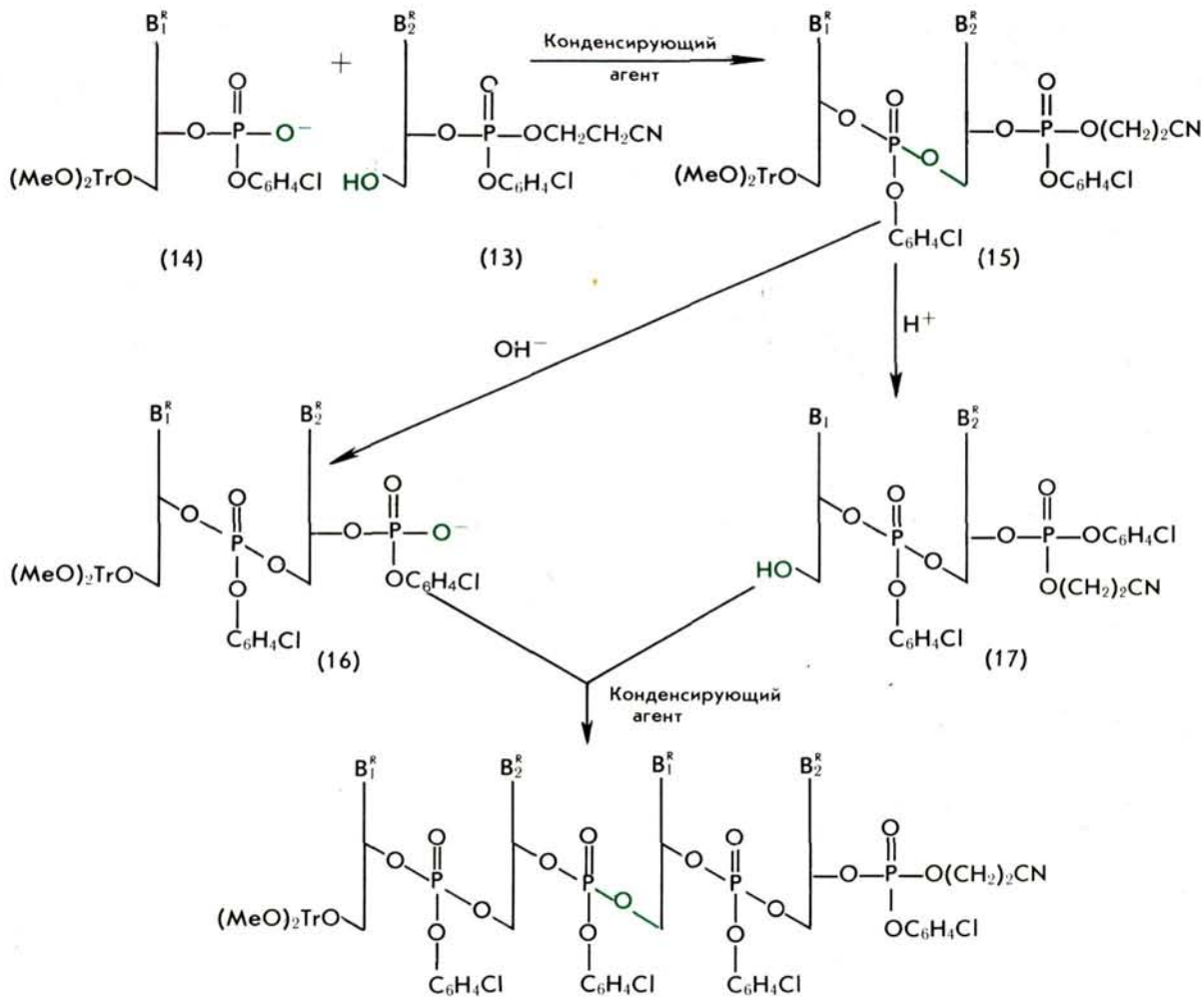
5'-Диметокситригильная группа избирательно удаляется действием слабой кислоты (например, бензолсульфокислоты в хлороформе или с помощью бромистого цинка), β -цианэтильная группировка — действием щелочи, при этом *o*- или *p*-хлорфенильная группа остается в нуклеозидном и нуклеотидном компонентах в качестве защиты для межнуклеотидного фосфата.



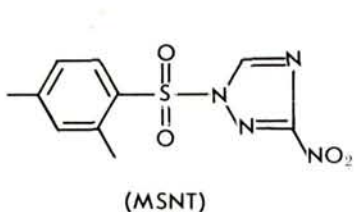
Тодд [Todd] Александер Робертус (р. 1907), английский химик-органик и биоорганик. Образование получил в университетах Глазго и Франкфурта-на-Майне (1931), с 1944 г. — профессор Кембриджского университета. Автор фундаментальных трудов по изучению структуры нуклеиновых кислот, синтезу витаминов. Синтезировал (1936) витамин В₁. Совместно с Д. Брауном предложил общую схему строения РНК. Лауреат Нобелевской премии по химии (1957).



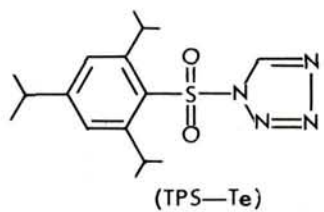
R — N-защитная группа



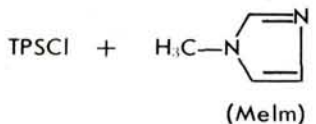
Конденсирующие агенты, используемые в триэфирном методе:



Мезитилсульфо - 3-нитро -
1, 2, 4 - триазаolid



Триизопропилбензолсульфо-
тетразаolid



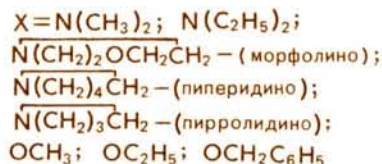
N - Метилимидазол

Рис. 202. Фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов.

При конденсации нуклеозидного (13) и нуклеотидного компонентов (14) образуется полностью защищенный динуклеозид-монофосфат (15). Дальнейшее удлинение цепи (так же как и в диэфирном методе) может идти ступенчатым или блочным методом (рис. 203). В первом случае в качестве нуклеозидных компонентов выступают олигонуклеотиды с 5'-концевой незащищенной гидроксильной группой, а в качестве нуклеотидных — мононуклеотиды с незащищенной 3'-фосфодиэфирной группой. Цепь обычно наращивается от 3'- к 5'-концу. Во втором случае и нуклеозидным и нуклеотидным компонентами служат олигонуклеотиды, подобные (16) и (17). Фосфотриэфирным способом удается стабильно получать 15 — 20-звенные олигонуклеотиды, а также более длинные полинуклеотиды, вплоть до 50 — 60-звенных.

В качестве конденсирующих реагентов в фосфотриэфирном методе ранее чаще всего применялись арилсульфоазолиды: 4-нитроимидазолиды, 1,2,4-триазолиды, 3-нитро-1,2,4-триазолиды и тетразолиды (рис. 202). В то же время хорошо зарекомендовавшие себя в диэфирном методе синтеза арилсульфохлориды оказались неэффективными из-за медленного протекания реакции и низкого выхода целевого продукта. Однако в ходе недавних исследований (В. А. Ефимов, О. Г. Чахмахчева) по синтезу олиго- и полинуклеотидов было обнаружено, что в присутствии некоторых нуклеофильных катализаторов арилсульфохлориды оказываются значительно более эффективными конденсирующими реагентами для создания фосфотриэфирной связи, чем самые активные из арилсульфоазолидов. Одним из таких нуклеофильных катализаторов является N-метилимидазол (MeIm), в присутствии которого реакция межнуклеотидной конденсации протекает за несколько минут. Использование MeIm дало возможность проведения реакций не только в пиридине, но и в других органических растворителях (диоксан, ацетонитрил, хлористый метилен, хлороформ, нитрометан).

Дальнейшее усовершенствование фосфотриэфирного метода, позволившее проводить межнуклеотидную конденсацию за 1 — 2 мин, основано на использовании в качестве конденсирующих реагентов арилсульфохлоридов в присутствии 4-замещенных производных N-окисей пиридина и хинолина



Фосфитный метод. Широкое применение в последнее время получил фосфитный способ синтеза олигонуклеотидов (с. 366). Фосфитное производное (8) может содержать в качестве замести-

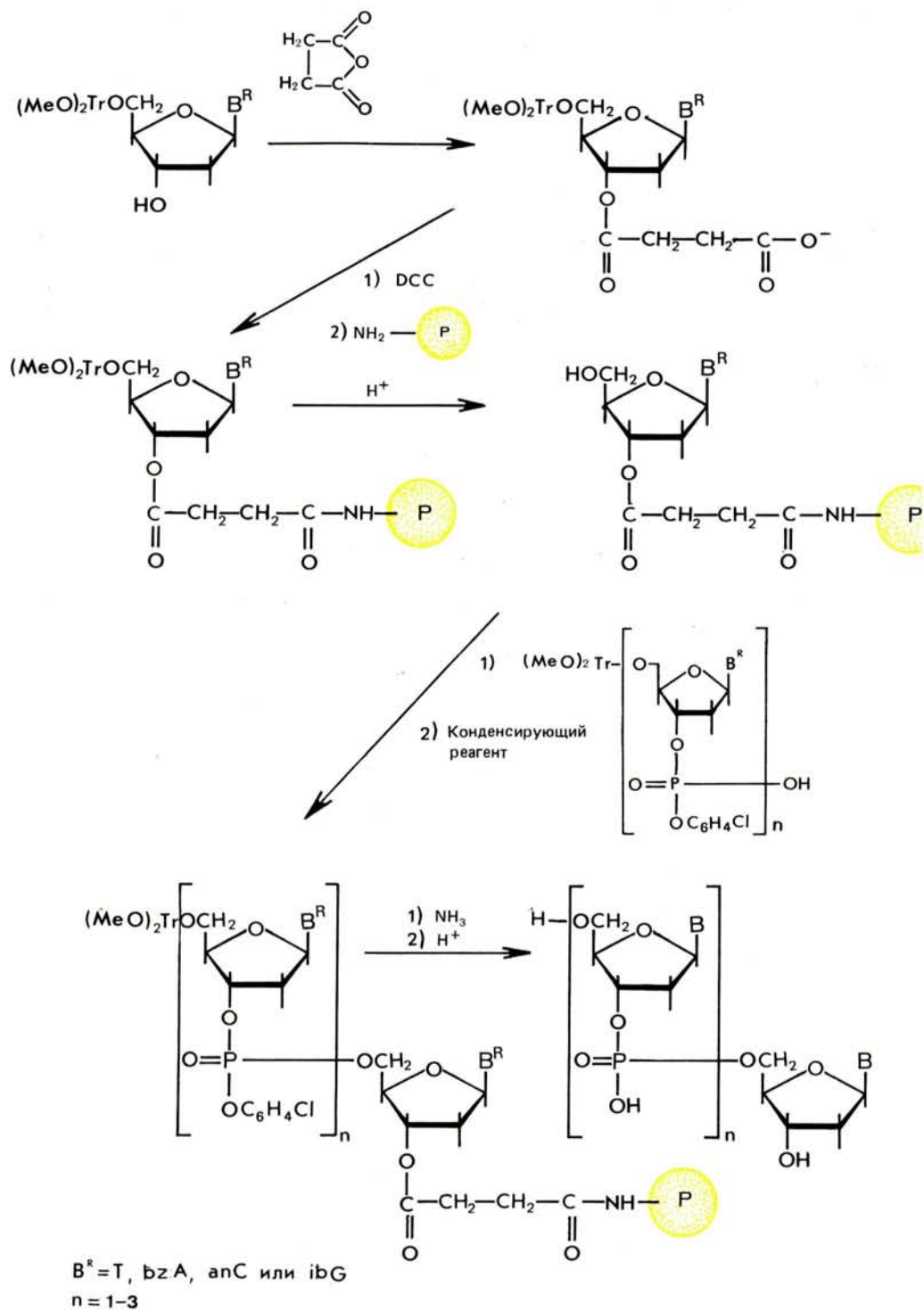
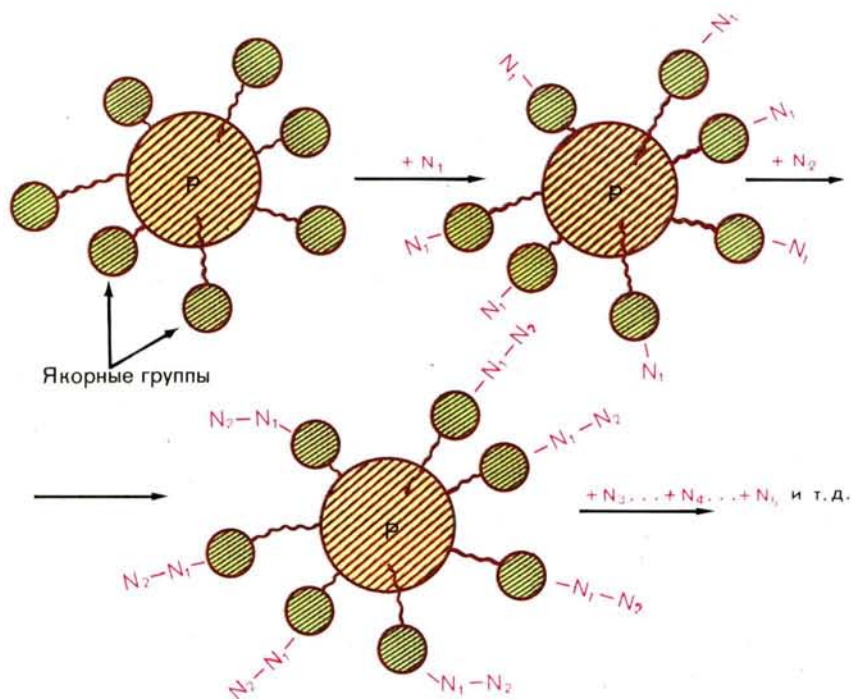


Рис. 203. Твердофазный фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов (фосфатный вариант).

теля галоген, тетразол или вторичный амин (в последнем случае метод называют фосфамидитным). В результате конденсации образуется динуклеотид метоксифосфин (18), который может быть далее окислен в мягких условиях с образованием фосфотриэфира (19). Наиболее эффективен фосфитный метод в твердофазном синтезе олигонуклеотидов (рис. 204).

Синтез на полимерных носителях. Так же как и в случае полипептидов, синтез олигонуклеотидов может быть осуществлен ступенчатым удлинением цепи, ковалентно привязанной одним из концов (5' или 3') к полимерному носителю. Синтез олигонуклеотидов на полимере начал развиваться в 60-х годах усилиями ряда групп: Ф. Крамера (ФРГ) и Г. Кораны с сотр. (США), З. А. Шабаровой, М. А. Прокофьева с сотр. (СССР). Такой подход принципиально более эффективен, чем синтез в растворе, так как существенно облегчается отделение продукта от исходных веществ, что приводит к сокращению времени синтеза. Кроме того, все операции легко могут быть автоматизированы (первые автоматические системы были предложены М. Гайтом и М. Карузерсом). Принципиальная схема синтеза на полимерном носителе выглядит следующим образом:



Для осуществления таким способом синтеза достаточно длинных полимеров необходимы высокие выходы на каждой стадии конденсации. Существенным фактором успеха при твердофазном синтезе является также качество полимерного носителя, который должен быть инертным, содержать стерически доступные функциональные группы для присоединения первого звена, иметь достаточный размер пор, чтобы обеспечить свободную диффузию реагентов, и, наконец, неспецифически не связывать реагенты и продукты.

Найден целый ряд полимеров, удовлетворяющих этим требованиям. К их числу относятся полиакриламид, полиакрилморфолид, полидиметилакриламид, полистирол, силикагель, пористое стекло, бумага и т. д.

Синтезы олигонуклеотидов с использованием фосфатного и фосфитного фосфотриэфирных методов приведены на рисунках 203 и 204. На первой стадии нуклеозид присоединяют с помощью якорной группы к полимерному носителю. Затем его 5'-гидроксильную группу деблокируют кислотной обработкой и конденсируют с нуклеотидным компонентом. У образующегося полностью защищенного динуклеозидмонофосфата удаляют диметокситритильную группу и присоединяют следующий нуклеотид и т. д. На последней стадии продукт отщепляют от полимерного носителя, снимают защитные группы и очищают хроматографией или электрофорезом в полиакриламидном геле.

Фосфотриэфирный и фосфитный методы дают высокие выходы на каждой стадии синтеза и с успехом используются для синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях.

В настоящее время существуют синтезаторы олигонуклеотидов, работающие по заданной программе.

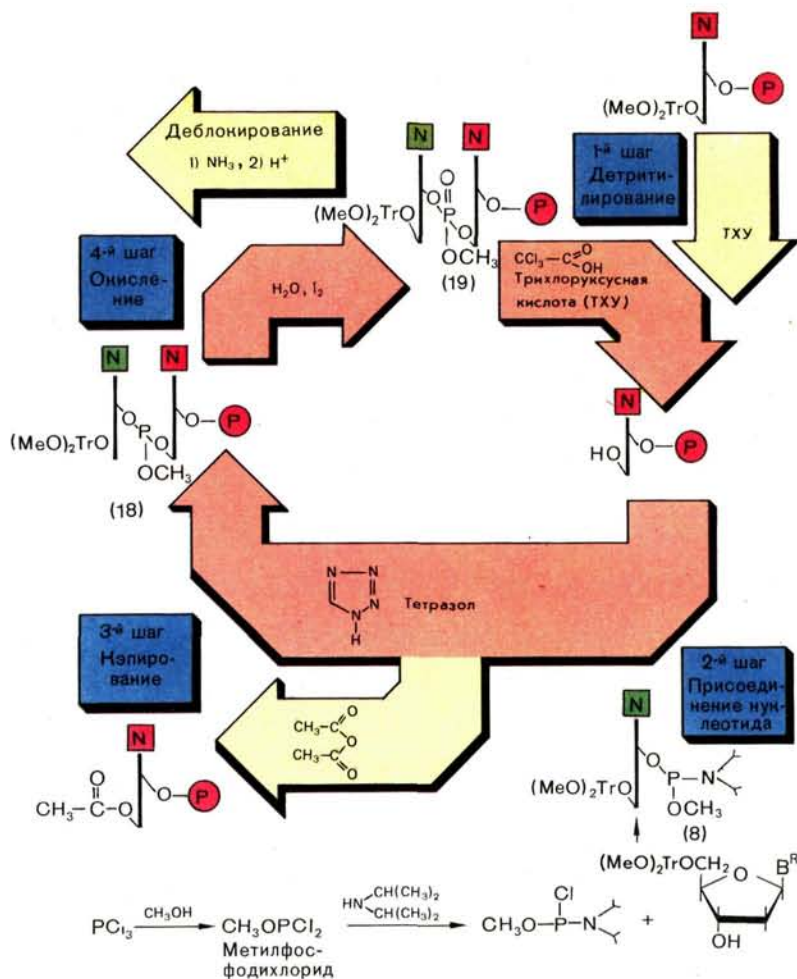
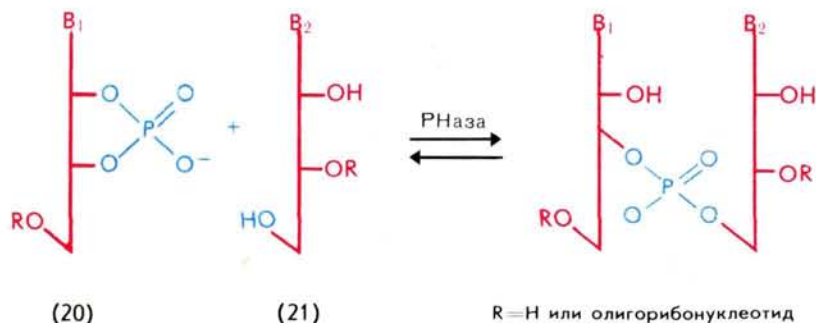


Рис. 204. Твердофазный фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов (фосфитный вариант).

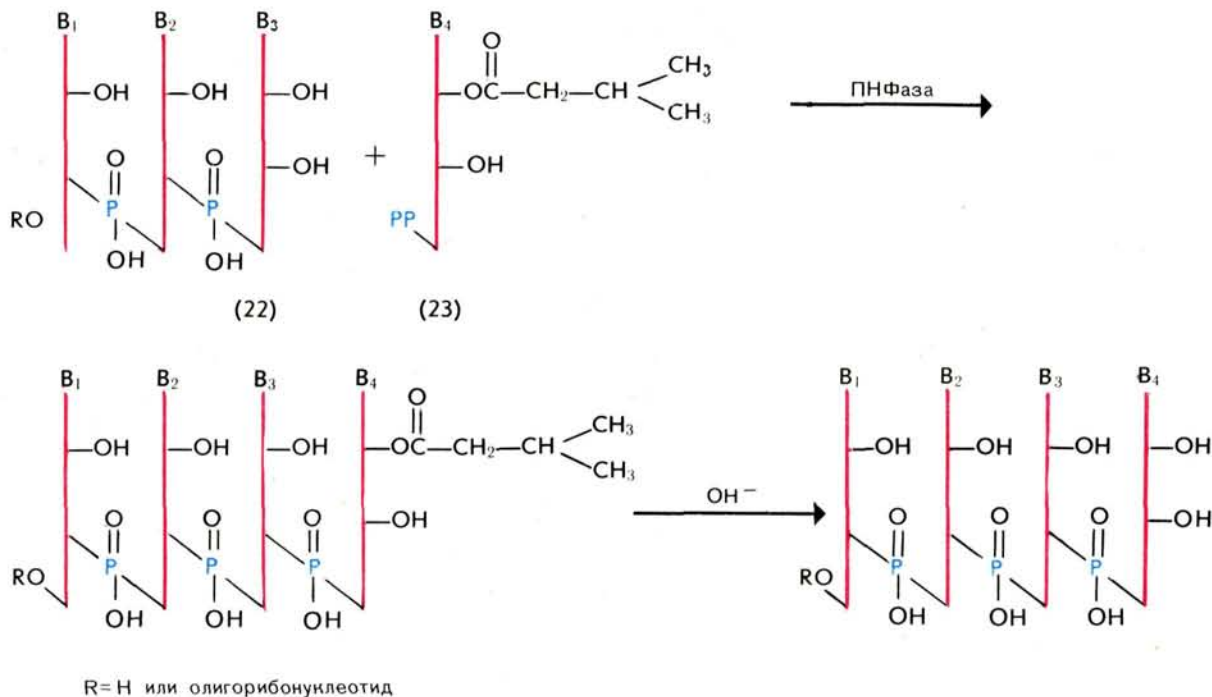
Синтез полирибонуклеотидов

Синтез сравнительно коротких олигорибонуклеотидов может быть осуществлен химическим или ферментативным методом. Более длинные последовательности получают путем соединения коротких фрагментов с помощью РНК-лигазы.

Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов. Как правило, для синтеза сравнительно коротких фрагментов — ди- и тетра-нуклеотидов используют реакцию, катализируемую рибонуклеазами:



Эта реакция обратна реакции гидролиза и заключается во взаимодействии 2',3'-рибонуклеозидциклофосфата (20) (нуклеотидный компонент) с 5'-ОН-группой рибонуклеозида (21) (нуклеозидный



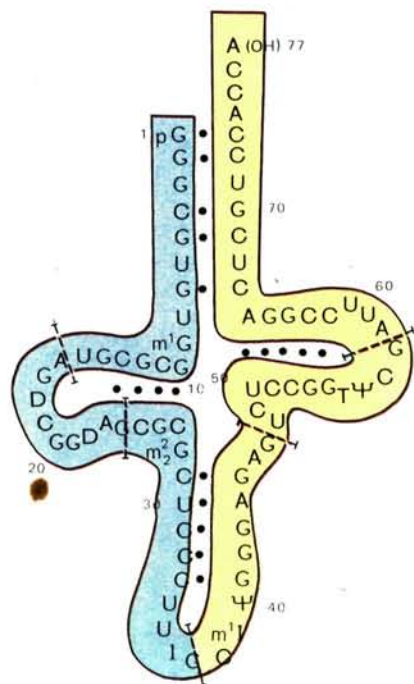


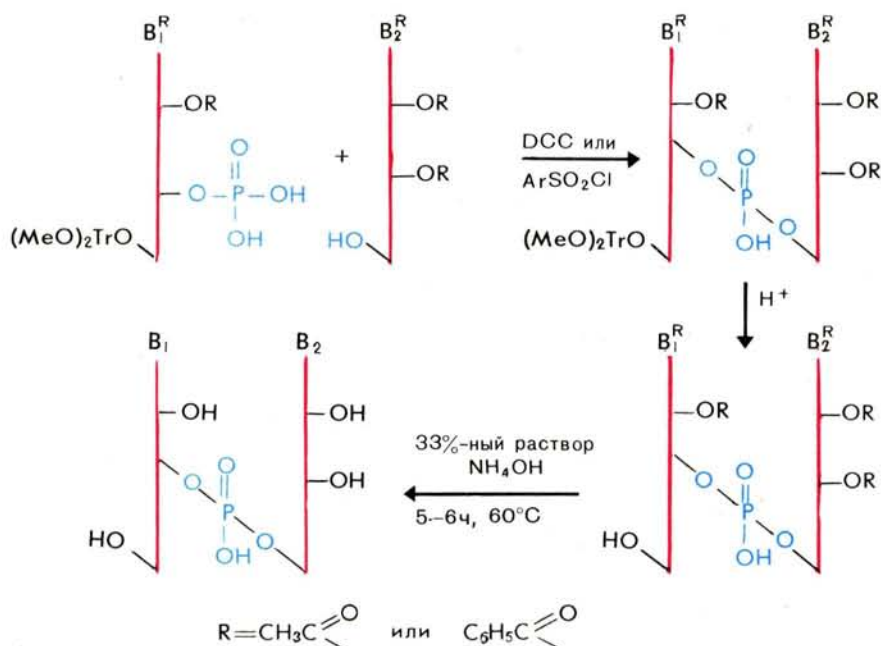
Рис. 205. Структура дрожжевой аланиновой тРНК, полученной химико-ферментативным синтезом.

компонент). В качестве нуклеотидного и нуклеозидного компонентов выступают как мономеры, так и олигонуклеотиды. При использовании неспецифических рибонуклеаз (таких, как РНазы из *Bacillus subtilis* или *Penicillium brevicompactum*) природа оснований B_1 и B_2 не очень существенна. Могут быть применены и специфические РНазы, например гуанилрибонуклеаза (РНаза T_1), если B_1 представляет собой гуанин, или панкреатическая РНаза для пиримидиновых оснований. При увеличении длины синтезируемого продукта все большую роль играет его гидролиз РНазами. В таком случае для наращивания цепи выгодно использовать специфические РНазы, неспособные расщеплять уже имеющуюся цепь. Помимо рибонуклеаз, для ферментативного синтеза олигонуклеотидов находят применение полинуклеотидфосфорилаза (ПНФаза). Для того чтобы фермент присоединял только одно звено к 3'-концу олигонуклеотида-затравки (22), одну из гидроксильных групп дифосфата (23) блокируют объемистым ацильным заместителем, который после реакции удаляют мягкой щелочной обработкой.

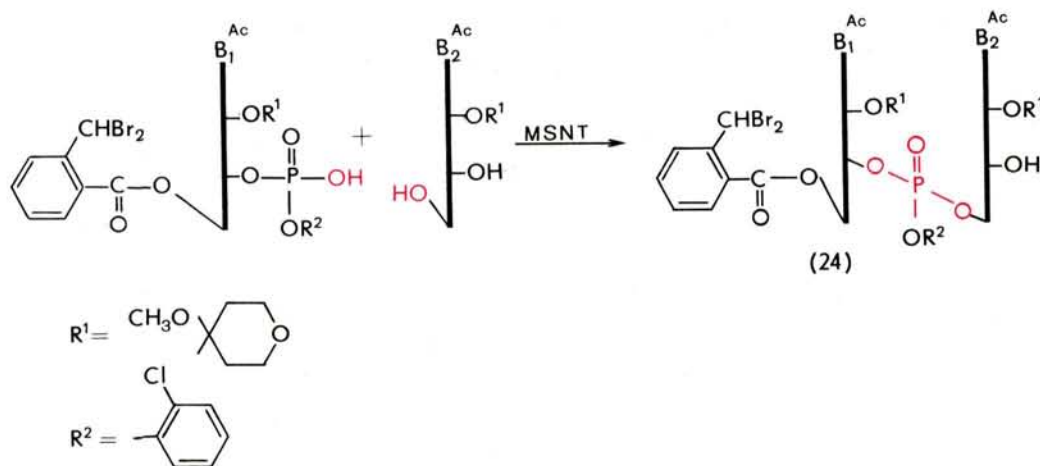
Синтез олигорибонуклеотидов может быть осуществлен комбинацией РНаз и ПНФазы.

Химический синтез олигорибонуклеотидов. Олигорибонуклеотиды синтезируют фосфодиэфирным, фосфотриэфирным и фосфитным методами с использованием в основном аналогичных приемов и реагентов, описанных для ДНК-ряда. Дополнительной проблемой является необходимость избирательной защиты 2'-ОН-группы рибозы, а также лабильность фосфодиэфирной связи олиго- и полирибонуклеотидов в щелочной среде.

Фосфодиэфирный метод был использован Г. Кораной для синтеза всех ди- и тририбонуклеотидов при установлении генетического кода. Пример получения рибодинуклеозидмонофосфата с применением фосфодиэфирного способа дан на схеме:



Рассмотрим один из примеров синтеза защищенного рибонуклеозидмонофосфата (24) с помощью фосфотриэфирного метода. В этом случае с целью защиты 5'-гидроксильной группы использована *o*-дибромметилбензоильная защита, которая легко снимается действием ионов серебра, а 2'-гидроксильная группа рибозы блокируется неустойчивой в кислых условиях метоксипиранильной группировкой. Остальные защитные группы и конденсирующие агенты не отличаются от используемых в синтезе олигодезоксирибонуклеотидов



Одним из примеров синтеза природных рибополинуклеотидов является полный химико-ферментативный синтез дрожжевой аланиновой тРНК (рис. 205), осуществленный большой группой

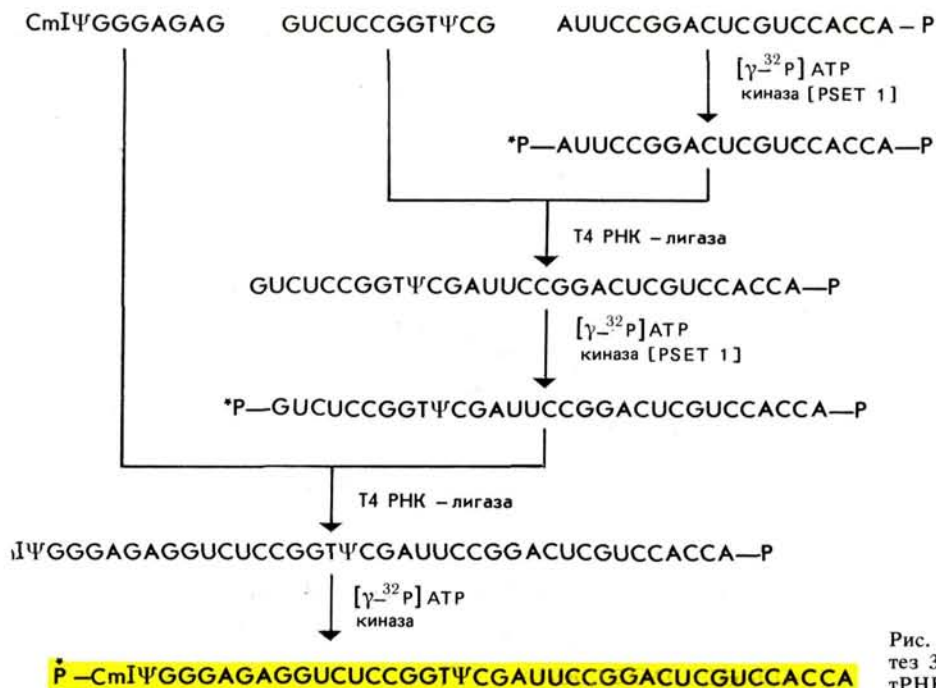


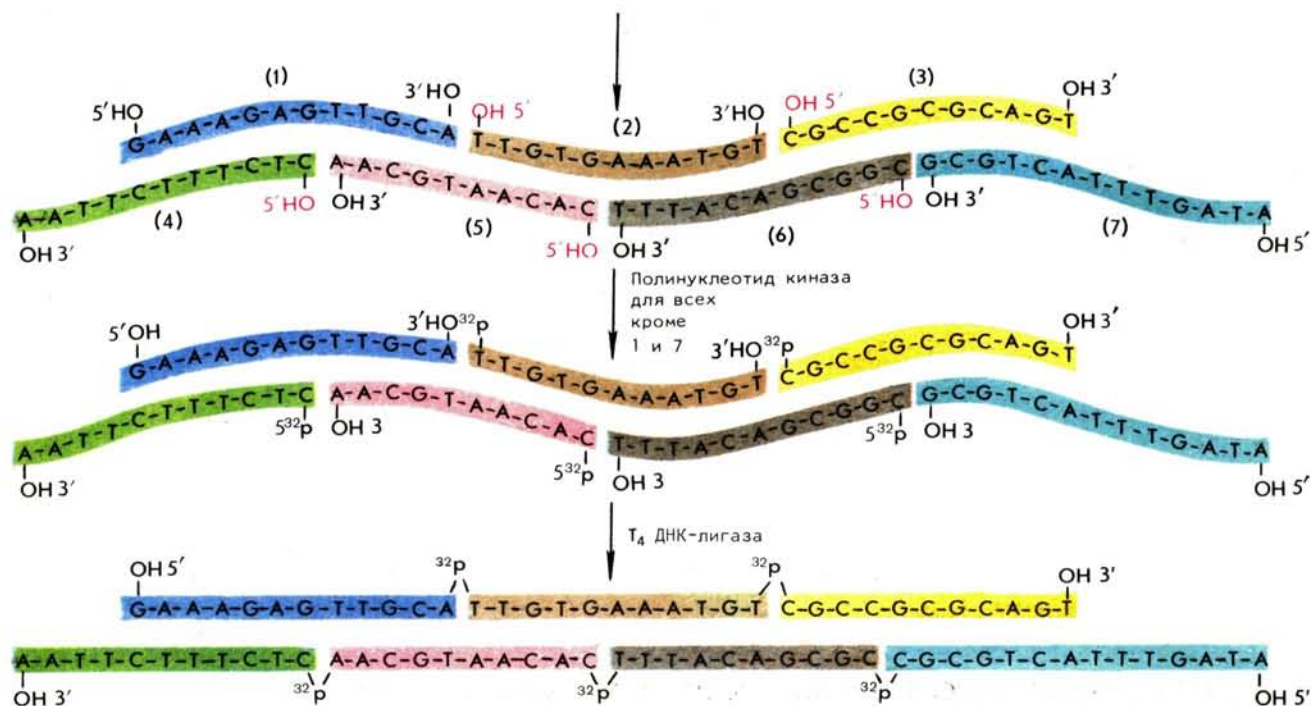
Рис. 206. Химико-ферментативный синтез 3'-половины дрожжевой аланиновой тРНК (нуклеотиды 36—76).

китайских химиков под руководством профессора Ван Иньяля. Отличительной особенностью синтеза явилось то, что синтетическая тРНК содержала минорные нуклеотиды. Для синтеза 76-нуклеотидная последовательность тРНК была разбита на 6 олигонуклеотидных сегментов величиной от 9 до 19 звеньев. Синтез этих сегментов был проведен фосфотриэфирным методом, полученные олигонуклеотиды далее «соединялись» друг с другом при помощи Т4 РНК-лигазы, как показано на рисунке 206. Изучение биологической активности синтетической тРНК показало, что она обладает полной активностью природной дрожжевой аланиновой тРНК в реакциях аминокислотирования и образования пептидной связи на рибосоме.

Химико-ферментативный синтез фрагментов ДНК

Комплекс современных методов синтеза нуклеиновых кислот позволяет исходя из мононуклеотидов получать гены, кодирующие белки длиной более 100 аминокислотных остатков. Первым этапом работы является химический синтез олигодезоксирибонуклеотидов, которые затем с помощью ферментов нуклеинового обмена, таких, как Т4 полинуклеотидкиназа, Т4 ДНК-лигаза и ДНК-полимеразы, превращаются в двухцепочечные фрагменты ДНК (рис. 207). Мето-

Рис. 207. Общая стратегия синтеза двухцепочечной ДНК.



дология сборки синтетических олигомеров в протяженные дуплексы впервые была предложена в конце 70-х годов Г. Кораной и сотр. и долгое время оставалась практически неизменной. Разработанный ими подход (рис. 208, *a*) состоит в многократном последовательном соединении при помощи Т4 ДНК-лигазы 10 — 20-звенных олигонуклеотидов с комплементарными, взаимно перекрывающимися последовательностями оснований сначала в небольшие дуплексы с выступающими одноцепочечными последовательностями на концах, а затем — в целый ген, который клонируют в векторной молекуле (см. с. 431). Этим способом был получен целый ряд полинуклеотидов, в том числе гены некоторых интерферонов человека, с длиной более 500 п. о.

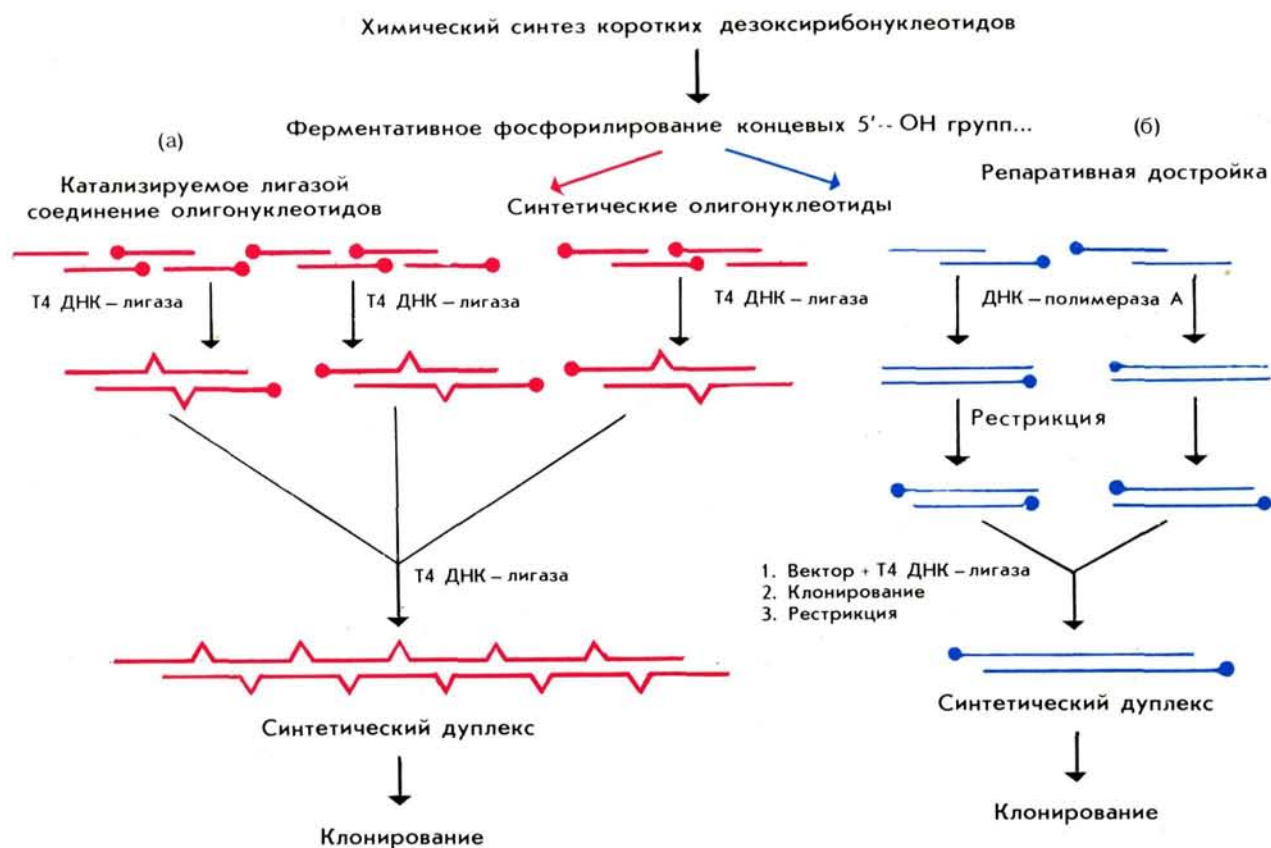


Рис. 208. Два подхода к получению двухцепочечных полинуклеотидов методами химико-ферментативного синтеза: *a* — использующий для соединения отдельных фрагментов реакцию, катализируемую Т4 ДНК-лигазой; *b* — с применением репаративной достройки частичного дуплекса с помощью ДНК-полимеразы (* — 5'-фосфорилированный олигонуклеотид; — олигонуклеотид, не имеющий фосфатной группы на 5'-конце).

С развитием методов синтеза олигонуклеотидов стало возможным получать чисто химическими способами 30 — 60- и даже 100-звенные олигомеры. С одной стороны, это привело к упрощению описанной методологии (за счет существенного сокращения числа лигазных реакций при сборке гена), а с другой — создало основу для разработки принципиально иного подхода к получению синтетических дуплексов. Такой подход, предложенный К. Итакура и сотр., заключается в репаративной достройке с помощью ДНК-полиме-



Корана [Khorana] Хар Гобинд (р. 1922), американский биохимик, иностранный член АН СССР (1971). Образование получил в Пенджабском и Ливерпульском университетах, с 1970 г. — в Массачусетском технологическом институте. Основные работы — в области синтеза нуклеиновых кислот. Внес большой вклад в расшифровку генетического кода. Впервые синтезировал ген аланиновой тРНК (1970). Выполнил ряд важных работ по структуре мембранных белков. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Р. Холли и М. Ниренбергом).

разы *E. coli* частичного дуплекса, образованного 3'-концевыми последовательностями двух длинных олигонуклеотидов, в полностью двухцепочечный фрагмент ДНК. Последний после образования на одном из его концов «липкого» сайта (действием соответствующей рестриктазы) соединяется в составе векторной молекулы с другим, аналогично синтезированным дуплексом (рис. 208, б). Одним из примеров применения этого способа явился синтез фрагмента гена человеческого лейкоцитарного интерферона α_2 длиной 132 п. о.

Хотя первый из описанных выше подходов теоретически пригоден для построения генов любой длины, на практике по мере увеличения числа последовательных лигазных «сшивков» становится все труднее очищать продукты реакции и получать их в достаточном для дальнейшей работы количестве. Кроме того, увеличивается расход исходных синтетических олигонуклеотидов. В то же время второй подход пригоден только для получения фрагментов длиной не более 200 — 250 п. о. В связи с этим для облегчения сборки гена (очистки фрагментов и экономии нуклеотидного материала) более целесообразно составлять его из отдельных модулей, предварительно очищенных промежуточным клонированием.

Клонирование синтетических полидезоксирибонуклеотидов

Одним из этапов синтеза искусственных двухцепочечных фрагментов ДНК является их клонирование в составе многокопийного вектора с тем, чтобы синтезированная последовательность сохранялась и при необходимости могла быть наработана в достаточных количествах. С этой целью синтез двухцепочечных фрагментов осуществляют таким образом, чтобы они содержали на концах участки, идентичные получающимся при расщеплении ДНК определенной рестрикционной эндонуклеазой. В качестве примера на рисунке 209 приведена последовательность фрагмента ДНК, кодирующего короткий нейропептид — лейцин-энкефалин. Наряду с собственно кодирующей последовательностью фрагмент содержит иницирующий АТГ (присоединенный к ней для обеспечения инициации трансляции) и терминирующий ТАА кодоны, а также выступающие одноцепочечные последовательности, соответствующие тем, которые образуются на концах ДНК при действии эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* и *BamHI*. Таким образом, этот фрагмент может быть вставлен в векторную плазмиду *pBR322*, расщепленную нуклеазами *EcoRI* и *BamHI*, и клонирован в *E. coli*.



Рис. 209. Кодирующая последовательность лейцин-энкефалина с иницирующим и терминирующим кодонами.

При необходимости рекомбинантную плазмиду выделяют из клетки, а требуемый фрагмент вырезают из нее действием двух рестриктаз, как показано на рисунке 210. Если синтезируется очень длинная последовательность, то синтез планируют таким образом, чтобы можно было клонировать составные части последовательности (модули) по отдельности.

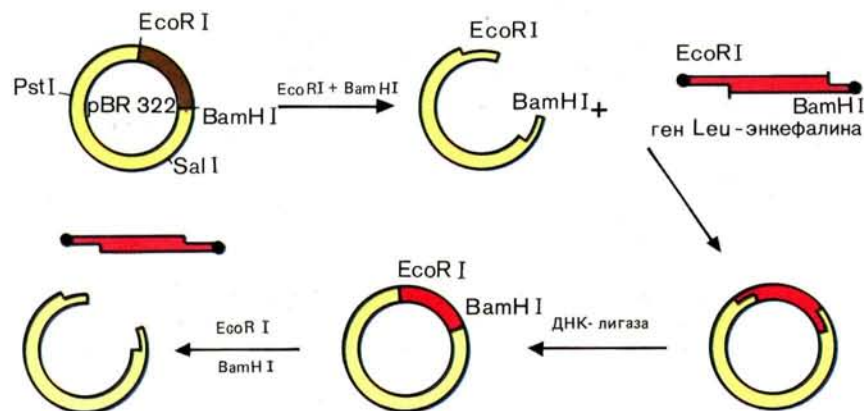


Рис. 210. Клонирование и «вырезание» синтетического фрагмента из вектора pBR322.

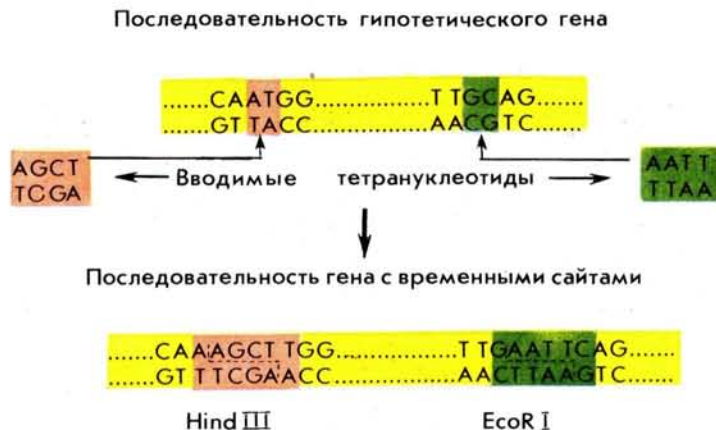
Как показано выше, для успешного клонирования модулей синтетического гена на определенных участках его последовательности должны содержаться подходящие сайты (места), узнаваемые эндонуклеазами рестрикции. Эти сайты должны быть уникальны как для самого гена, так и для вектора, в котором он клонируется. Рестриктные сайты необходимы для введения каждого модуля в плазмиду или фаговую ДНК, его регенерации из векторной молекулы после клонирования и соединения с другими частями целевого гена. Обычно для этого используются сайты, имеющиеся в последовательности синтезируемого гена. Так, последовательность, которую планируется синтезировать (рис. 211), содержит участок расщепления BamHI во внутренней области и участки расщепления рестриктазами EcoRI и SalI на концах. Части I и II этой последовательности синтезируются отдельно и клонируются в плазмиде pBR322. После «размножения» клонированных фрагментов в составе рекомбинантных плазмид они могут быть выделены и соединены по липким концам с образованием нужной последовательности.

Однако чаще всего необходимых внутренних сайтов в гене либо не имеется, либо их мало [не более 1—2 на несколько сотен пар оснований (п.о.)]. Это сильно ограничивает возможности химико-ферментативного синтеза двухцепочечных ДНК и создает необходимость в разработке и использовании для получения полинуклеотидов специальных приемов.

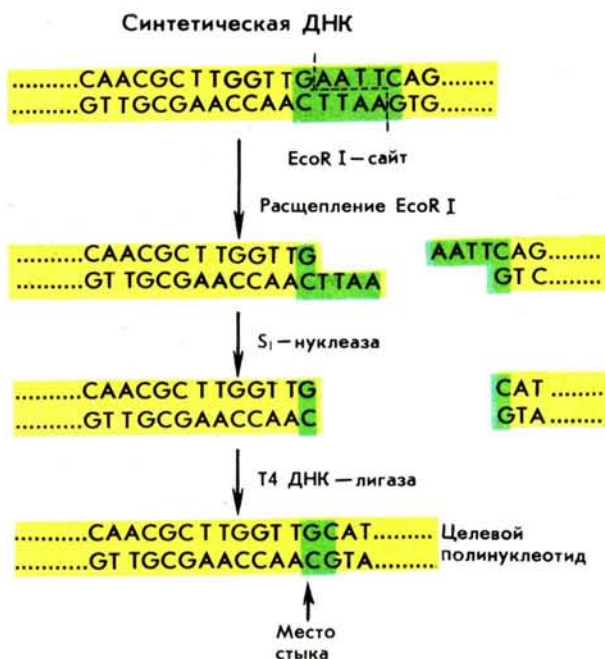
Было предложено несколько таких подходов С. Нарангом (Канада), Р. Ву (США) и В. А. Ефимовым (СССР).

В качестве примера рассмотрим один из них. В его основу были положены модульный принцип конструирования ДНК и использование временных сайтов уникальных эндонуклеаз рестрикции для последовательного клонирования отдельных фрагментов и сборки целевого полинуклеотида. Дополнительные рестриктные сайты вводятся в последовательность гена в произвольно выбранные места,

содержащие какой-либо самокомплементарный динуклеотид АТ, ТА, СG или GС. Для этого последовательность гена как бы раздвигается и между ними вводится тетра- или пентануклеотид, образуя соответствующие рестриктные сайты.



Для удаления созданного дополнительного рестриктного сайта синтезированная ДНК расщепляется соответствующей рестриктазой, образующиеся выступающие одноцепочечные последовательности удаляются действием S_1 -нуклеазы Asp. oгузае и «тупые» концы молекулы соединяются с помощью Т4 ДНК-лигазы. Разбивка последовательности ДНК на модули проводится произвольно.



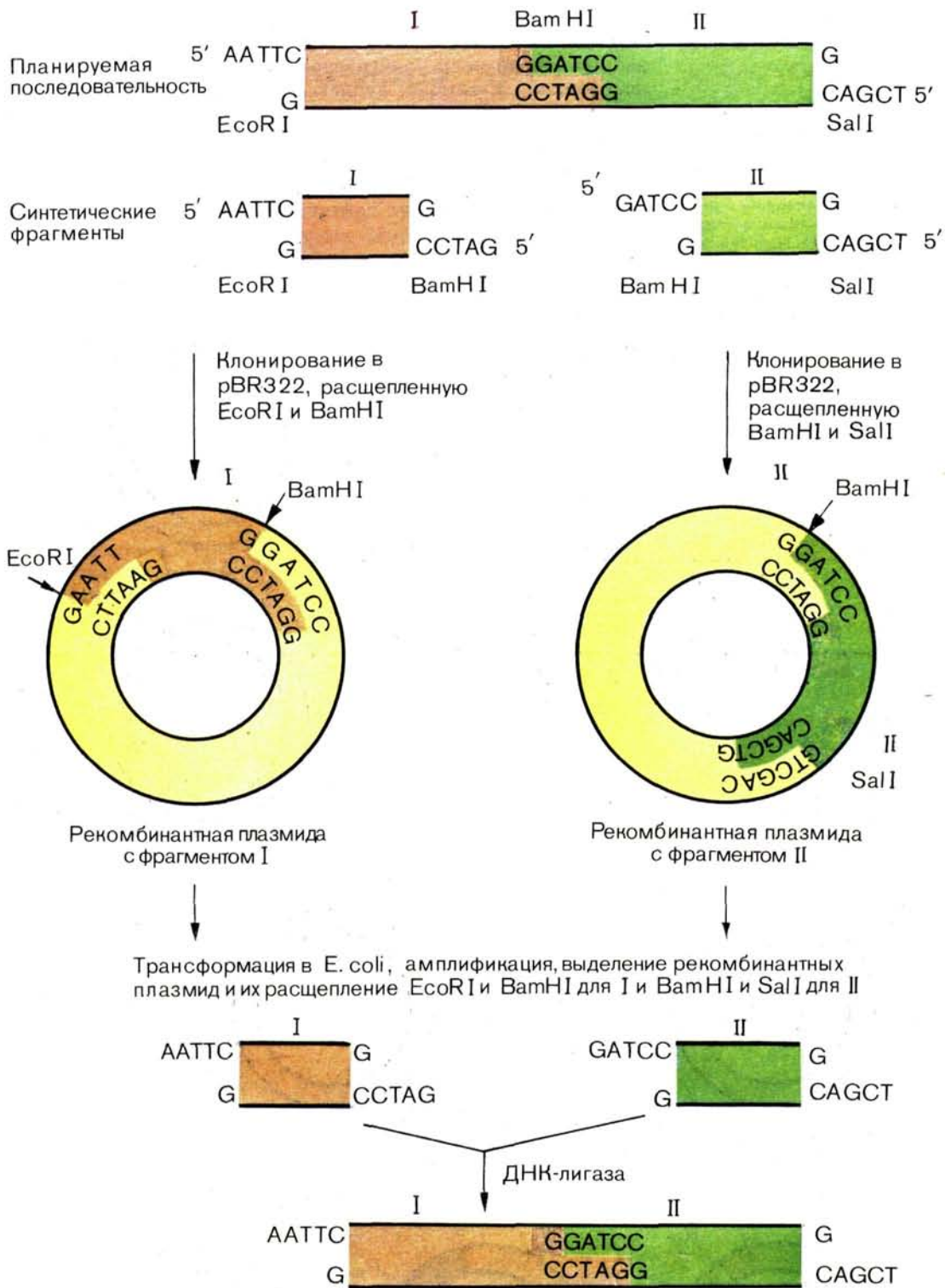


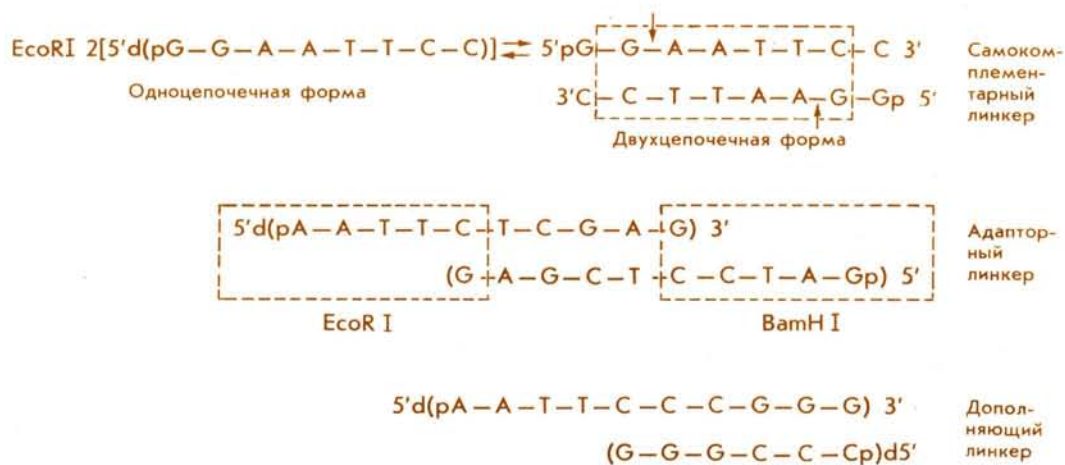
Рис. 211. Создание синтетических генов с промежуточным клонированием.

Использование синтетических олиго- и полинуклеотидов в биоорганической химии и биотехнологии

Диапазон применения синтетических олиго- и полинуклеотидов необычайно широк. Прежде всего при изучении белков нередко осуществляется синтез соответствующих генов и их фрагментов (если число аминокислотных остатков не превышает 200—250). Путем экспрессии генов с помощью генноинженерных приемов получают значительные количества труднодоступных белков и пептидов, а также их аналогов.

Однако наиболее широкое применение находят сравнительно короткие олигонуклеотиды. Для того чтобы придать фрагменту нуклеиновой кислоты необходимые для встраивания в определенный участок векторной молекулы липкие концы, синтезируются так называемые линкеры, т. е. двухцепочечные олигонуклеотиды, содержащие последовательность, расщепляемую той или иной рестрикционной эндонуклеазой. Обычно в качестве линкеров применяются самокомплементарные олигонуклеотиды длиной 8—10 нуклеотидных звеньев. На рисунке 213 демонстрируются некоторые типы линкеров.

Рис. 213. Типы линкеров, используемые в генноинженерных исследованиях.



При работе с рекомбинантными молекулами ДНК возникает необходимость замены одного типа липких концов на другой. Для этой цели используются адапторные линкеры — частично двухцепочечные нуклеотиды, содержащие липкие концы, соответствующие двум разным рестриктазам. Третий тип линкеров позволяет перейти от тупого конца ДНК к липкому, и их можно назвать дополняющими.



Фёршт (Fersht) Алан Рой (р. 1943), английский химик-биоорганик. Окончил Кембриджский университет (1968), с 1978 г.— профессор Лондонского университета. Один из основоположников белковой инженерии.

С помощью синтетических фрагментов ДНК можно модифицировать природные гены, вводя в них определенные изменения. Так, синтетические олигонуклеотиды были использованы для превращения гена интерферона человека в форму, пригодную для прямой экспрессии в клетках *E. coli* (рис. 214). Интерферон синтезируется в виде предшественника, и его превращение в истинный белок происходит в результате отщепления сигнального пептида. Клетки *E. coli* не могут осуществлять данный процесс, и поэтому от гена интерферона человека была *in vitro* с помощью рестрикционной эндонуклеазы *Sau3AI* отщеплена часть, кодирующая сигнальный пептид. Однако фермент вместе с частью, кодирующей сигнальный пептид, отщепляет и кодон первой аминокислоты зрелого белка. Для восстановления полного гена к его остатку присоединяли синтетический фрагмент, содержащий кодон первой аминокислоты, иницирующий кодон, а также липкий конец *EcoRI* для введения промотора. Таким образом был восстановлен целый ген, пригодный для прямой экспрессии интерферона в клетках *E. coli*.

Очень важным является использование синтетических олигонуклеотидов в качестве гибридизационных проб (зондов) для поиска нужных рекомбинантных колоний в геноинженерных экспериментах. Олигонуклеотид синтезируется в соответствии с данными, полученными из известной структуры белка или ДНК, и после введения концевой метки ^{32}P используется для гибридизации *in situ* с рекомбинантной ДНК бактериальных клонов, выращенных на нитроцеллюлозных фильтрах и иммобилизованных на них. Для того чтобы поиск нужного гена был эффективным, олигонуклеотид должен иметь последовательность, комплементарную фрагменту искомого гена. Естественно, чем больше длина нуклеотида, тем меньше вероятность встретить соответствующую ему последовательность одновременно в нескольких участках генома. Необхо-

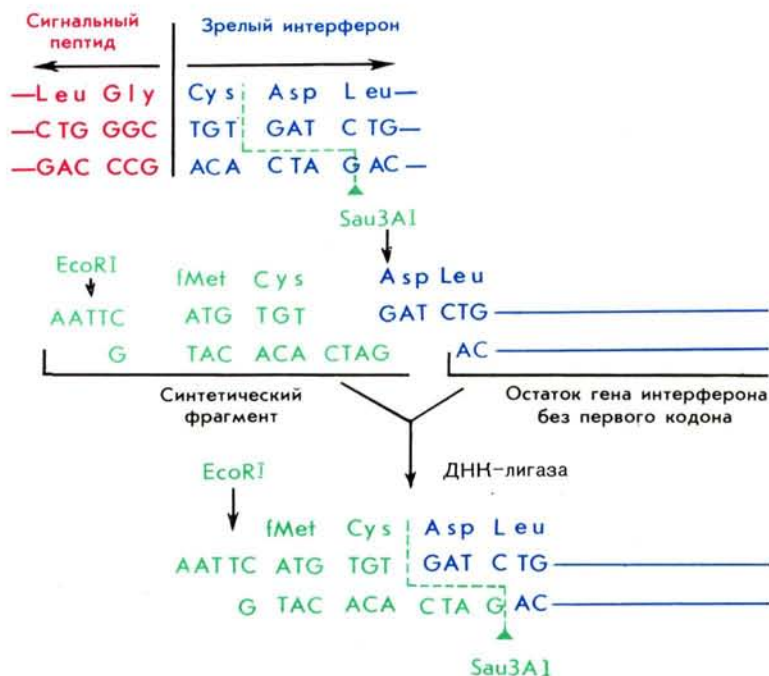


Рис. 214. Превращение гена интерферона человека в форму, пригодную для экспрессии в *E. coli*.

дмая длина олигонуклеотида, в свою очередь, зависит от сложности генома: чем он сложнее, тем она должна быть больше для обеспечения уникального узнавания.

Расчеты показывают, что для специфичного связывания с геном в геноме, например для бактериофага λ , достаточна длина 12 нуклеотидных звеньев, последовательность 15 звеньев идентифицирует уникальный ген в дрожжевом геноме, а 18—20-членные олигонуклеотиды используют для поиска генов в банке генов млекопитающих.

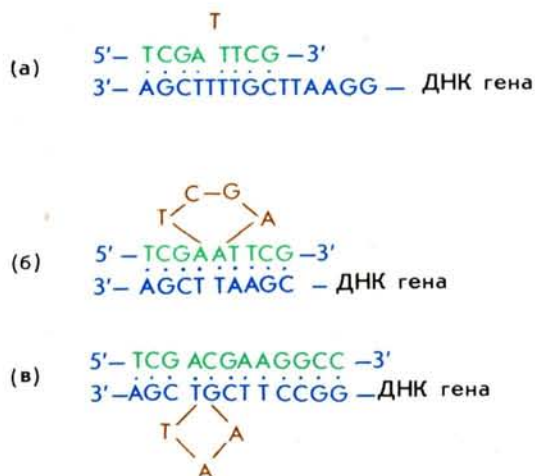


Рис. 215. Структура синтетических олигонуклеотидов, предназначенных для замены одного нуклеотида на другой (а), введение вставки (б) и делеции (в) в ген, клонированный в однонитевом фаге.

Особое место занимает область применения синтетических олигонуклеотидов для введения направленных изменений в структуру гена и затем — в структуру соответствующего белка, называемая белковой инженерией. Чаще всего для этой цели гены клонируют в ДНК нитчатых фагов, хотя возможно применение и других векторов, например плазмид. Для того чтобы ввести мутацию в определенный участок гена с известной структурой, клонированного в фаге (M13 или fd), синтезируется олигонуклеотид, частично комплементарный последовательности, которая содержится в (+)-цепи ДНК однонитевого фага. Отступления от комплементарности в синтезированном олигонуклеотиде определяются задаваемой мутацией. Это может быть простая замена комплементарного нуклеотида на другой, некомплементарный, делеция или вставка нескольких нуклеотидов, как показано на рисунке 216. Частично комплементарный синтетический олигонуклеотид гибридизуется с одной из цепей гена в одноцепочечной фаговой ДНК (рис. 217), и затем с помощью ДНК-полимеразы (не содержащей 5'→3'-экзонуклеазной активности) в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов синтезируется вторая цепь, причем синтетический олигонуклеотид играет роль затравки.

Вновь образованная двухцепочечная ДНК ковалентно замыкается с помощью ДНК-лигазы. Эта ДНК представляет собой гетеродуплекс, в котором комплементарность нарушена в месте введения мутации. Одна цепь гетеродуплекса представляет собой диккий тип, а другая — мутантный. Ковалентно замкнутым гетеродуплексом трансформируются клетки *E. coli*. В результате репликации эти



Рис. 216. Принцип олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

ми. Если известна структура активного центра фермента и его комплекса с субстратом, то с помощью направленного мутагенеза и генноинженерных приемов можно заменить определенные аминокислоты активного центра на другие, изменив тем самым каталитические свойства фермента. Так, А. Фёршт, Г. Винтер и сотр. (Великобритания) путем замены треонина на аланин в активном центре тирозил-тРНК-синтетазы улучшили константу связывания фермента с АТР в 100 раз.

Такие пути улучшения старых и создания новых белков открывают большие возможности для медицины и биотехнологии.

В последние годы в связи с интенсивным развитием физико-химической биологии, генной инженерии и биотехнологии все возрастающее практическое значение приобретает химико-ферментативный синтез фрагментов нуклеиновых кислот, в том числе искусственных генов биологически активных пептидов и белков.

В частности, в СССР получены бактериальные штаммы, способные продуцировать проинсулин человека — биосинтетический предшественник инсулина. Проинсулин состоит из одной полипептидной цепи длиной 86 аминокислотных остатков и может быть превращен

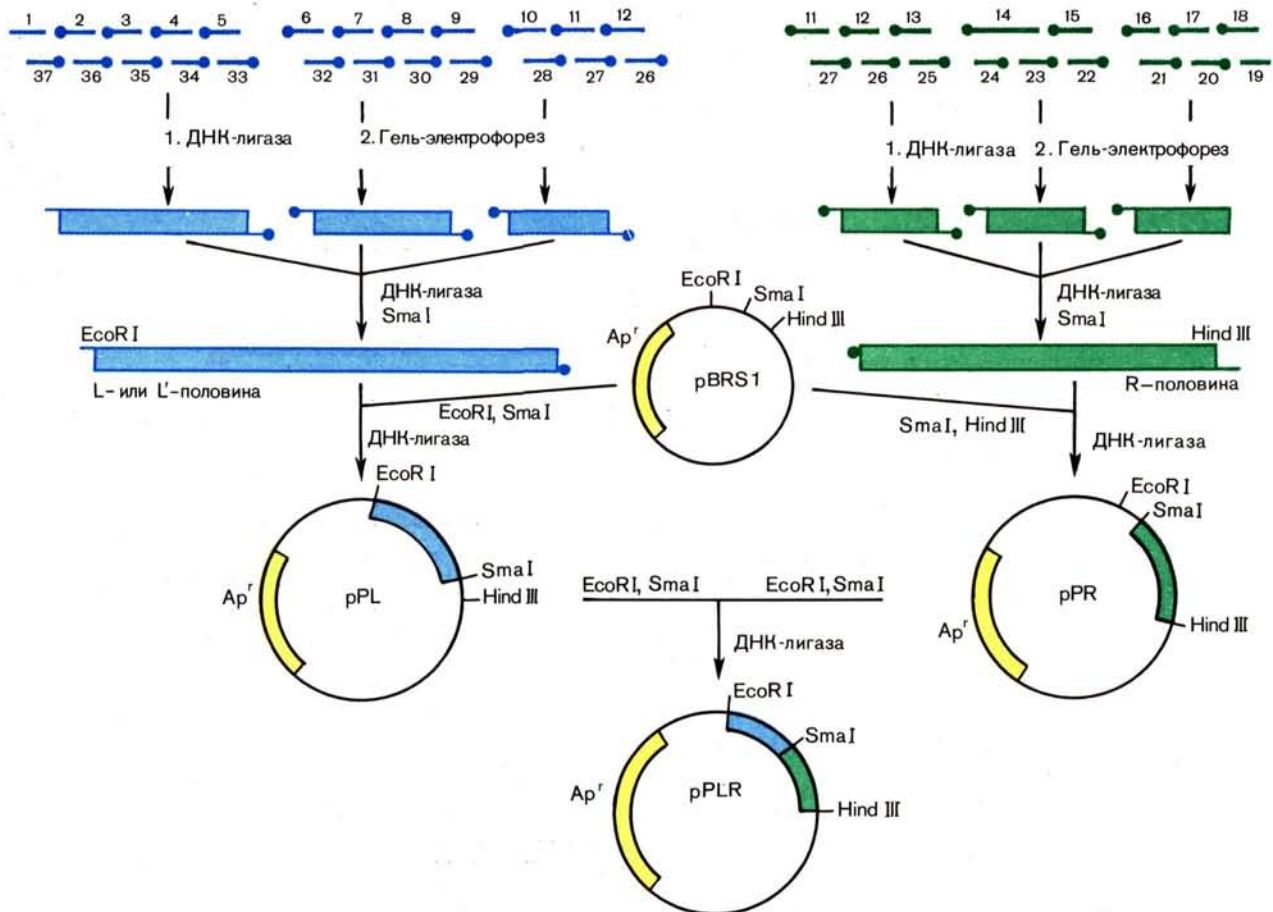


Рис. 218. Схема сборки синтетического гена проинсулина человека из отдельных олигонуклеотидов и его клонирование в плазмидном векторе.



Колосов Михаил Николаевич (1927—1985), советский химик-органик, академик АН СССР (1974). Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1948), с 1959 г. работал в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области химии нуклеиновых кислот, антибиотиков и других природных соединений. Синтезировал тетрациклин и изучил механизм его действия. Осуществил синтезы структурных генов валиновой тРНК, α -интерферона человека и др. Лауреат Ленинской премии (1985).

в инсулин путем направленного протеолиза. В основу бактериальных штаммов — продуцентов проинсулина человека положены рекомбинантные плазмиды, несущие синтетический ген проинсулина. Эта последовательность фрагмента ДНК, длиной около 300 нуклеотидных пар, получена химико-ферментативным синтезом (рис. 217, 218). С использованием синтетического гена были получены бактериальные штаммы — продуценты проинсулина человека в составе химерных белков, в частности гибрида с β -галактозидазой *E.coli* (рис. 219) и гибрида с α -амилазой *V.subtilis*. Во всех случаях достигнут высокий уровень экспрессии проинсулина, который превращался в инсулин путем ферментативного гидролиза.

В 1982 г. группами М. Н. Колосова и Л. С. Сандахчиева был завершен полный химико-ферментативный синтез структурного лейкоцитарного интерферона человека α_2 . Искусственный ген интерферона (рис. 220) кодирует полипептид длиной 165 аминокислотных остатков. В процессе синтеза кодирующие триплеты были

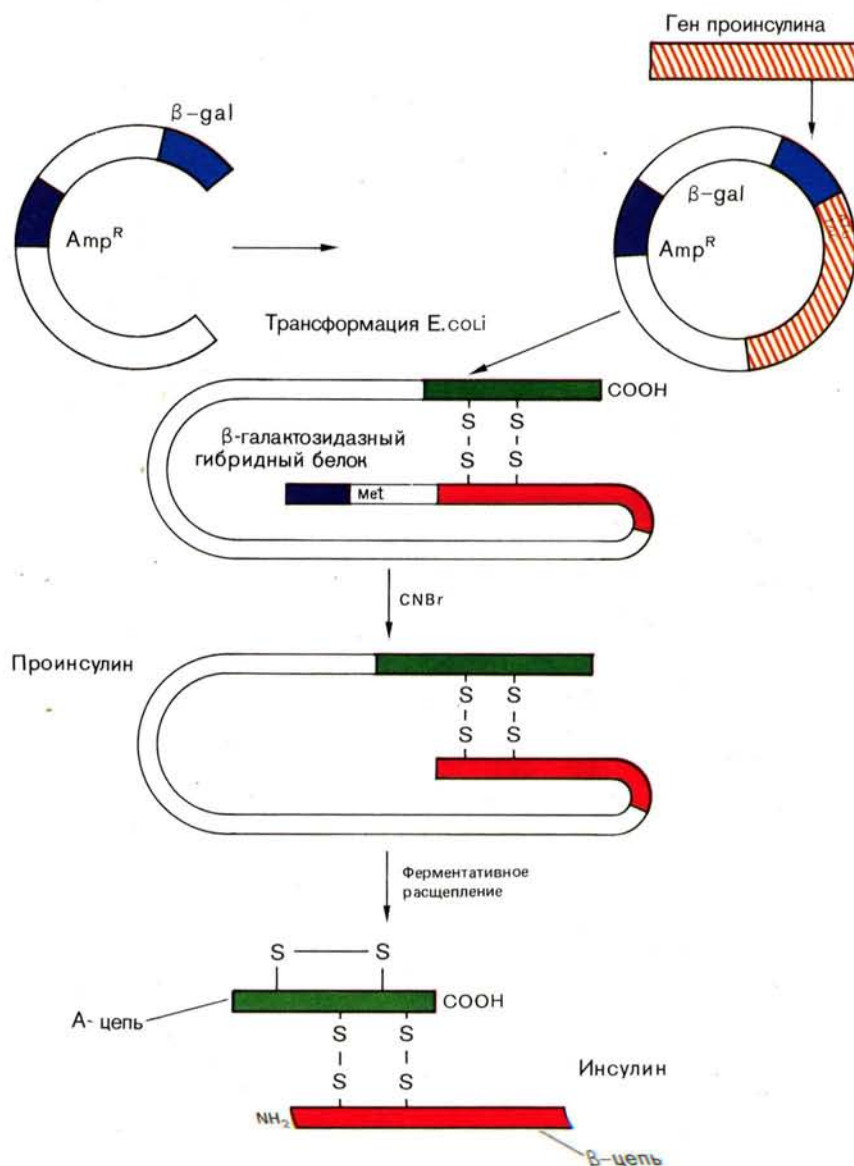


Рис. 219. Экспрессия гена проинсулина человека в составе гибридного белка с β -галактозидазой.

выбраны в соответствии с частотой встречаемости в *E.coli* для достижения высокого уровня экспрессии гена. Далее структурный ген интерферона человека α_2 был присоединен к синтетическим участкам ДНК, контролирующим экспрессию генов в *E.coli* (среднестатистический бактериальный промотор, оператор *lac*-оперона *E.coli* и участок связывания рибосомы). Все это вместе составляет фрагмент ДНК величиной свыше 600 п.о., что является к настоящему времени одной из самых длинных синтетических последовательностей ДНК.

Химическая модификация нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты — полифункциональные соединения, содержащие большое число реакционноспособных групп. При действии различных химических реагентов в них могут модифицироваться все компоненты: гетероциклические основания, углеводные остатки и остатки фосфорной кислоты.

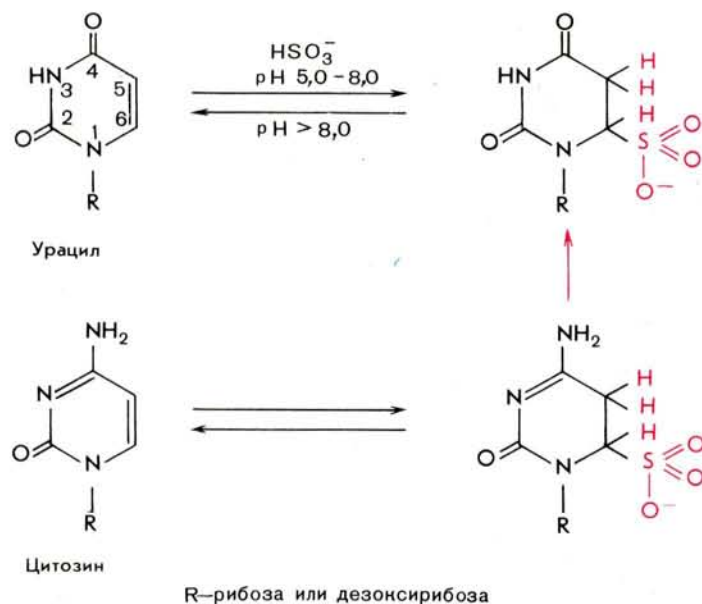
Реакционная способность мономерных структур в составе полимера в значительной степени изменяется под влиянием пространственных факторов. Наибольшее значение имеют методы селективной модификации, широко применяемые при исследовании первичной и пространственной структуры нуклеиновых кислот, введении искусственных мутаций и изучении связи между строением и биологической функцией.

Модификация гетероциклических оснований

Гетероциклические основания определяют специфические свойства нуклеиновых кислот. Их реакционноспособность по отношению к различным агентам зависит от природы основания, условий проведения реакции, а для олиго- и полинуклеотидов — вторичной структуры соответствующего соединения.

Реакции пиримидиновых оснований с бисульфитом натрия. Бисульфит-ион способен обратимо присоединяться к С(5)—С(6)-двойным связям цитозина, урацила и тимина в мягких условиях, образуя соответствующий аддукт, неустойчивый в случае тимина; практическое значение имеют только реакции с урацилом и цитозином. Продукты присоединения к урацилу и цитозину довольно стабильны в нейтральной и кислой средах, но отщепляют бисульфит-ион в щелочной среде.

Важным свойством 5,6-дигидропроизводных цитозина указанного типа является повышенная реакционность аминогруппы, которая легко замещается под действием различных нуклеофильных агентов. Замещение аминогруппы на гидроксигруппу приводит к производному урацила, которое легко превращается в урацил при слабощелочных значениях pH. Таким образом, эта реакция дает возможность специфического преобразования цитозиновых колец в урацильные.

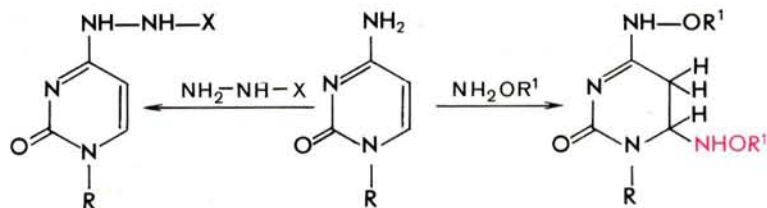


Реакция бисульфита с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами протекает значительно медленнее, чем с мономерами, и практически не идет с двухцепочечными молекулами.

Модификация нуклеиновых кислот бисульфитом часто используется как способ введения мутационных замен. С этой целью участок ДНК, выбранный для введения мутаций, превращают в одноцепочечный и затем обрабатывают бисульфитом в условиях неполного дезаминирования. Таким образом, например, пары G·C могут быть заменены на пары A·T (такие замены называются транзициями).

Специфичность к вторичной структуре используется также для анализа пространственного строения полинуклеотидов. Так, обработка тРНК бисульфитом приводит к модификации только цитозиновых оснований, находящихся в петлях.

Реакции с гидразином и гидроксиламином. Гидразин, его алкильные и ацильные производные, а также гидроксиламин и его O-алкильные производные широко применяются в исследованиях нуклеиновых кислот. В водных растворах при кислых значениях pH эти реагенты специфически взаимодействуют с производными цитозина.



X = H, Alk, Ac

R — рибоза или дезоксирибоза

R¹ = H, Alk

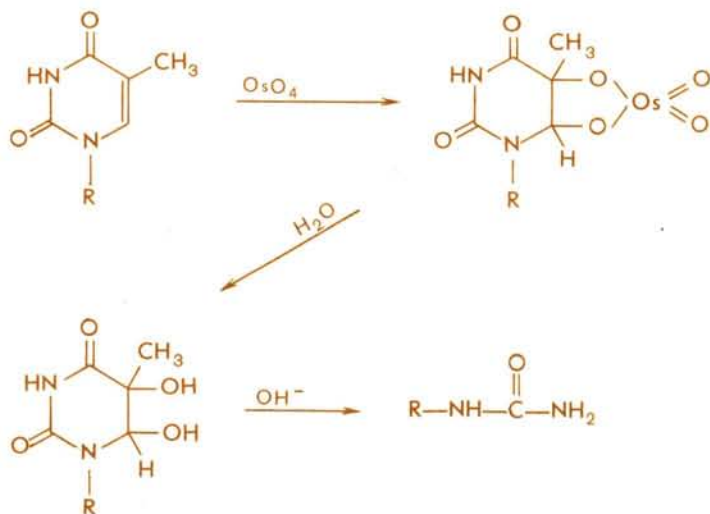
В случае гидразина и его производных наблюдается лишь замещение аминогруппы, тогда как производные гидроксилamina одновременно присоединяются по двойной связи, образуя аддукт.

В щелочных условиях реакции с гидразином и гидроксилaminом приводят к расщеплению гетероциклических колец пиримидинов (см. с. 325), практически не затрагивая пуриновых оснований. Реакция ДНК с гидразином, сопровождающаяся расщеплением по пиримидиновым звеньям, используется при определении нуклеотидной последовательности ДНК в методе Максама — Гилберта.

При анализе первичной структуры нуклеиновых кислот для специфического расщепления по урацильным или цитозиновым звеньям может быть использована также и реакция с гидроксилaminом в щелочной среде.

Окисление. Реакция с OsO₄, широко применяемая в органической химии для гидроксирования двойных связей, гладко протекает и в случае пиримидиновых оснований. Скорость реакции возрастает в ряду T > U > C, так, тимидин реагирует почти на два порядка быстрее цитидина и в 10 раз быстрее уридина. Поэтому ее можно рассматривать как специфический метод модификации тимидина.

При взаимодействии тимидина с OsO₄ образуется циклический эфир осмиевой кислоты, который легко гидролизуеться до диола, а



R — дезоксирибоза

последний под действием щелочи превращается в замещенную мочевины. Если модификации подвергаются денатурированные полидезоксинуклеотиды, то обработка после реакции щелочью создает возможность их специфического расщепления по тимидиновым звеньям.

Диольные соединения образуются при взаимодействии пиримидиновых оснований и с такими окислителями, как KMnO_4 , H_2O_2 . Однако в этом случае быстро происходит разрушение цикла.

Реакция с OsO_4 может использоваться для установления положения тимидиновых звеньев при определении первичной структуры ДНК методом Максама — Гилберта.

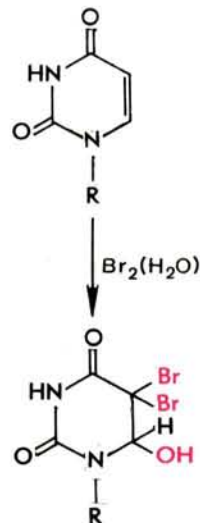
Галогенирование. Одним из распространенных методов модификации оснований в нуклеиновых кислотах является галогенирование. Реакция протекает различно в водных и безводных средах.

Наиболее активные галогенирующие агенты — хлор и бром. При бромировании (или хлорировании) производных нуклеиновых кислот в водных нещелочных средах происходит присоединение галогена по С(5)—С(6) двойной связи колец пиримидина и разрушение гуанина. Аденозин в этих условиях с галогенами не реагирует.

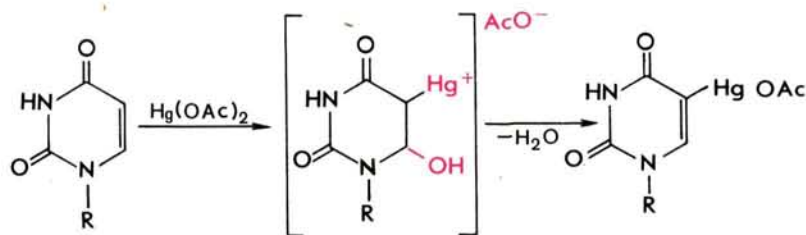
С практической точки зрения важна реакция иодирования нуклеиновых кислот в водных растворах. При действии I_2 или I^- -ионов в присутствии треххлористого таллия (TlCl_3) на одноцепочечные ДНК преимущественно иодируется цитозин, образуя 5-иодопроизводные. При реакции с РНК наряду с 5-иодцитозином образуется 5-иодо-6-гидрокси-5,6-дигидроурацил. При использовании радиоактивного ^{125}I удается получить меченые полинуклеотиды с высокой удельной активностью, которые применяются в опытах по гибридизации.

В безводных растворителях под действием Cl_2 , Br_2 или соответствующих N-галогенимидов происходит электрофильное замещение водорода у атомов С(5) пиримидиновых оснований и С(8) гуанина с образованием соответствующих галогенпроизводных. Эти соединения используются в качестве субстратов РНК- и ДНК-полимераз для синтеза специфически меченных полинуклеотидов.

Меркурирование. Широко распространенная в органической химии реакция непредельных соединений с ацетатом ртути в случае нуклеиновых кислот проходит в мягких условиях (вода, рН 6,0—7,0,



R—рибоза или дезоксирибоза



R—полинуклеотидная цепь

40—50 °С) и специфична по отношению к пиримидиновым основаниям. Результатом реакции является образование производных 5-ацетоксимеркуриоурацила и 5-ацетоксимеркуриоцитозина.

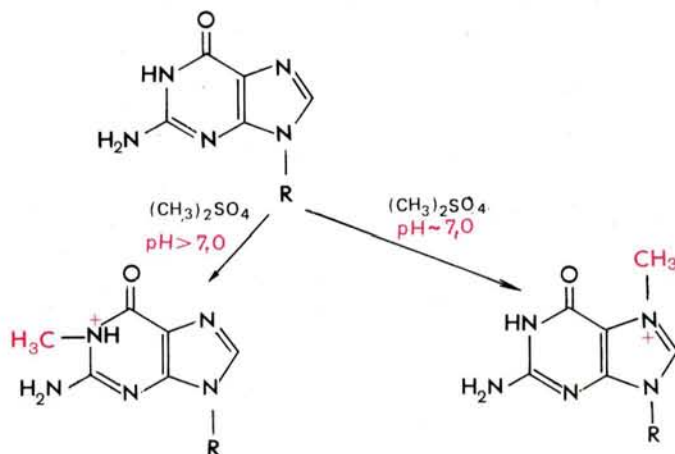
5-Меркурипроизводные вследствие легкого обмена атома ртути на атомы галогена или трития используются для получения специфически меченных пиримидиновых оснований нуклеиновых кислот.

Алкилирование. Реакции алкилирования имеют большое значение для изучения нуклеиновых кислот. С одной стороны, многие алкилирующие реагенты являются мутагенами и канцерогенами, а с другой стороны, реакции алкилирования, осуществляемые в мягких условиях, широко используются для исследования структуры и функции полинуклеотидов.

Наиболее хорошо изучено взаимодействие нуклеиновых кислот и их компонентов с диметилсульфатом $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$. Эта реакция протекает в мягких условиях в водных растворах.

Направление реакции алкилирования определяется природой гетероциклического основания и условиями эксперимента. Гуаниновое кольцо в нейтральной среде алкилируется преимущественно по атому N(7), а в щелочной — по атому N(1). Исчерпывающее метилирование приводит к 1,7-диметилгуанину.

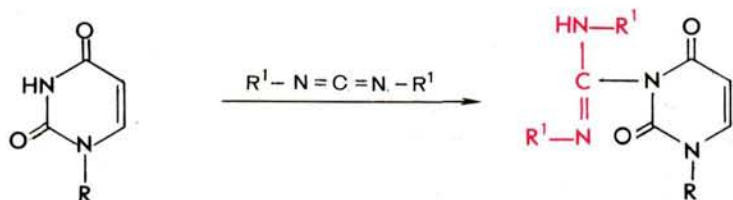
В аденине и его производных все три атома азота могут подвергаться метилированию, однако скорость реакции убывает в ряду $\text{N}(1) > \text{N}(7) > \text{N}(3)$. Единственным продуктом метилирования цитозина является 3-метилцитозин.



В ДНК метилированию подвергаются атомы N(3) аденина, выходящие в малую бороздку В-формы ДНК, и в большей степени атомы N(7) гуанина, выходящие в большую бороздку. Основания двухцепочечных ДНК, метилированные по атомам N(3) и N(7), продолжают образовывать комплементарные пары, но эффективность их взаимодействия понижается.

7-Метилгуанин и 3-метиладенин легко отщепляются от полидезоксирибонуклеотидной цепи в результате разрыва N-гликозидных связей. Далее полинуклеотидная цепь может быть легко расщеплена по модифицированному звену действием щелочи или аминов (см. с. 322). Такой метод деградации используется для определения последовательности ДНК (локализация гуаниновых и адениновых звеньев по методу Максама — Гилберта).

Реакции с карбодиимидом. Для исследования вторичной структуры нуклеиновых кислот применяется реакция оснований с производными карбодиимида, в результате которой образуются соответствующие аддукты.



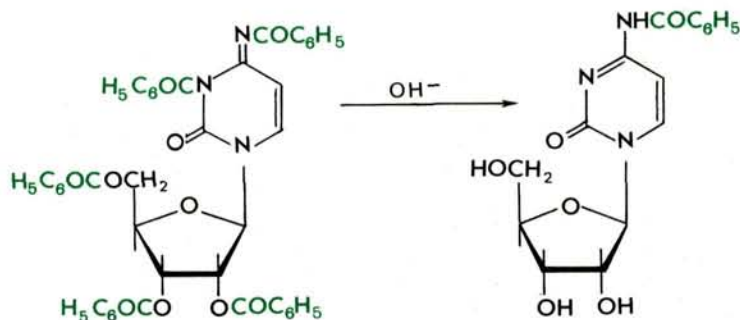
R – полинуклеотидная цепь

R¹-N=C=N-R¹ – водорастворимый карбодиимид

С наибольшей скоростью модифицируются редкие компоненты нуклеиновых кислот — инозин и псевдоуридин. Реакция с карбодиимидом практически не идет с двухцепочечными полинуклеотидами. В нуклеиновых кислотах, содержащих как двухцепочечные, так и одноцепочечные участки, модифицируются только последние, что используется при исследованиях вторичной структуры тРНК.

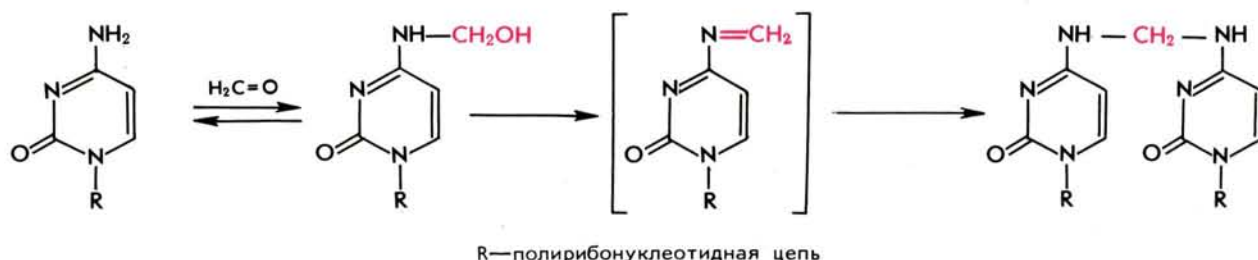
Ацилирование. В реакцию ацилирования под действием ангидридов и галогенангидридов органических кислот вступают как амино- и иминогруппы, так и гидроксильные группы углеводных и фосфатных остатков.

Например, при действии на цитидин бензоилхлорида в безводном пиридине при 100 °С образуется пентаацилированное производное. В мягких щелочных условиях избирательно снимаются бензоильные группы, связанные с гидроксильными группами углевода и атомом N(3), но сохраняется бензоильная группа у экзоциклического атома азота

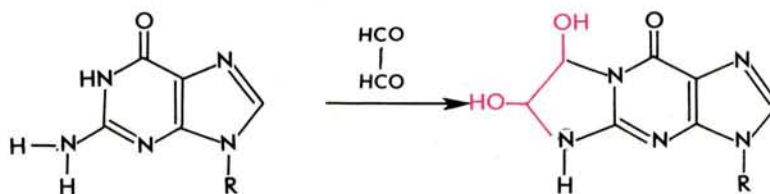


Реакции с альдегидами. Реакция аминогрупп гетероциклических оснований нуклеиновых кислот с формальдегидом приводит к образованию аминотилольных соединений. Следует подчеркнуть,

что реакция обратима: при удалении формальдегида из реакционной смеси и даже при ее разбавлении наблюдается быстрая регенерация исходных продуктов. В щелочной среде метилольное соединение через промежуточно образующееся основание Шиффа может реагировать с экзоциклической аминогруппой другого нуклеозида, давая стабильное бис-(нуклеозидил) метиленовое производное



Широко применяется реакция оснований нуклеиновых кислот с α -дикарбонильными соединениями, такими, как глиоксаль. Аденин и цитозин при этом дают аминометилольные производные, а гуанин образует трициклический продукт за счет конденсации amino- и иминогрупп с обеими карбонильными группами глиоксаля:



Реакция нуклеиновых кислот с глиоксальем может рассматриваться как специфическая по отношению к гуаниновым звеньям; скорость ее взаимодействия с одноцепочечными полинуклеотидами значительно выше, чем с двухцепочечными. Она применялась при изучении первичной структуры РНК как метод ограничения действия гуанилрибонуклеазы. Реакции с альдегидами широко используются для фиксации одноцепочечных участков нуклеиновых кислот при изучении их с помощью электронной микроскопии.

Взаимодействие с азотистой кислотой. Аминосодержащие основания нуклеиновых кислот при обработке HNO₂ претерпевают

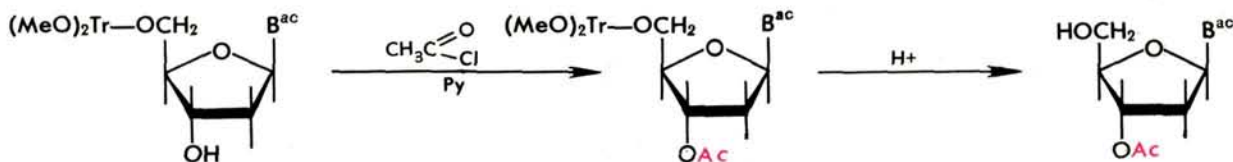
дезаминирование, в результате этого цитозин превращается в урацил, аденин — в гипоксантин, а гуанин — в ксантин. Реакция с HNO_2 применяется для исследования вторичной структуры тРНК. Необходимо также отметить, что азотистая кислота является сильным мутагеном.

Модификация углеводных остатков

Углеводно-фосфатный остов во многом определяет конформацию и физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Расщепление нуклеиновых кислот различными ферментами связано со спецификой строения углеводно-фосфатной цепи: в частности, многие ферменты отличают дезоксирибонуклеиновые кислоты от рибонуклеиновых, концевую фосфатную группу от группы, участвующей в образовании фосфодиэфирной связи, 5'-фосфат от 3'-фосфата и т. п.

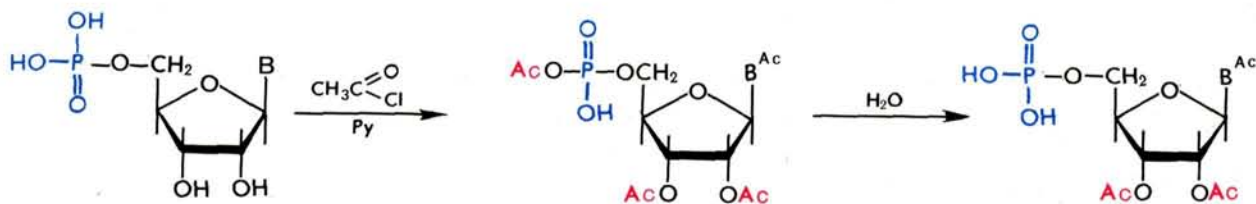
Ацилирование. При действии на нуклеозиды ангидридов или хлорангидридов уксусной или бензойной кислот в безводном пиридине в мягких условиях гладко ацилируются гидроксильные группы остатка углевода. В случае цитидина, аминогруппа которого более реакционноспособна, чем у других оснований, ацилируется также и аминогруппа. Избирательное ацилирование гидроксильных групп сахара достигается проведением реакции в ледяной уксусной кислоте. При действии уксусного ангидрида в нейтральных водных растворах также образуются только O-ацильные производные нуклеозидов.

В реакциях ацилирования первичные гидроксильные группы более реакционноспособны, чем вторичные. Для избирательного ацилирования определенных гидроксильных групп углеводного остатка все другие необходимо защищать. Например, 3'-ацилированные дезоксинуклеозиды получают действием галогенангидридов в пиридине на 5'-O-защищенные нуклеозиды с последующим удалением защитной группы

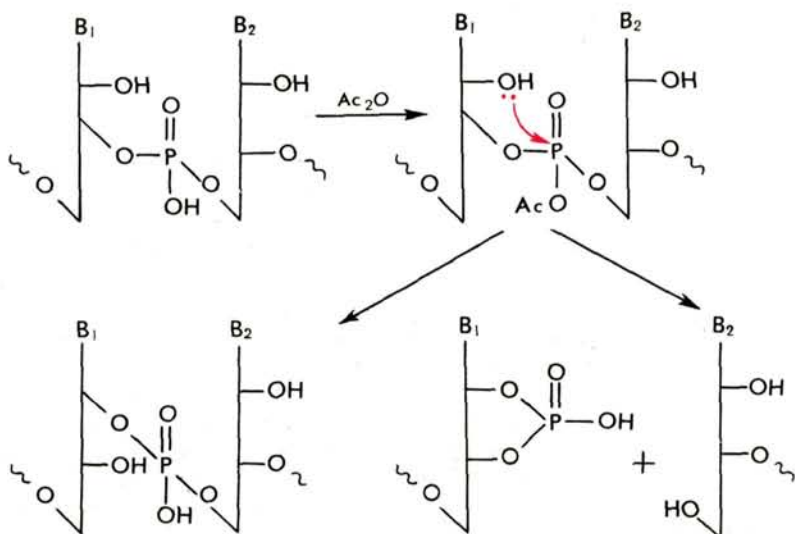


При ацилировании нуклеотидов в безводной среде в реакцию вступает также и фосфатная группа, образуя смешанные ангидриды, которые легко гидролизуются в водных растворах.

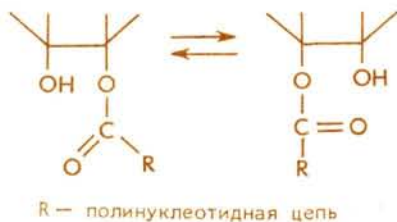
Ацилирование олиго- и полинуклеотидов обычно осуществляется действием уксусного ангидрида в водных растворах при pH 7,0. Олигодезоксинуклеотиды в таких условиях превращаются в 5'-O-ацетаты, в олиго- и полирибонуклеотидах ацетируются также 2'-ОН-группы.



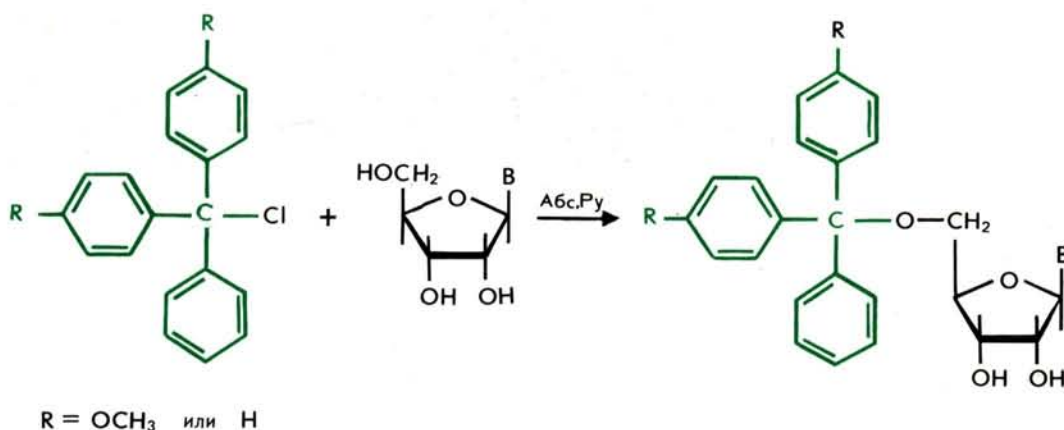
Смешанные ангидриды в случае олигорибонуклеотидов могут образовываться в результате взаимодействия с гидроксильной группой межнуклеотидного атома фосфора, хотя его реакционная способность ниже, чем у концевых монофосфатов. В определенных условиях эта реакция вызывает расщепление олигонуклеотидов и миграцию фосфатной группы от 3'- к 2'-гидроксильной группе рибозы. Обе реакции объясняются атакой 2'-гидроксильных групп рибозы на атом фосфора в смешанном ангидриде, в результате которой разрывается связь фосфата с 3'-, либо с 5'-гидроксильной группой



Рибонуклеотиды и рибонуклеозиды с ацилированными 3'- или 2'-гидроксигруппами легко претерпевают перегруппировки с миграцией ацильной группы на соседний гидроксил, в результате чего из индивидуальных соединений образуются смеси 2'- и 3'-изомеров. Скорость перегруппировки и состав смеси зависят от природы ацильного радикала:

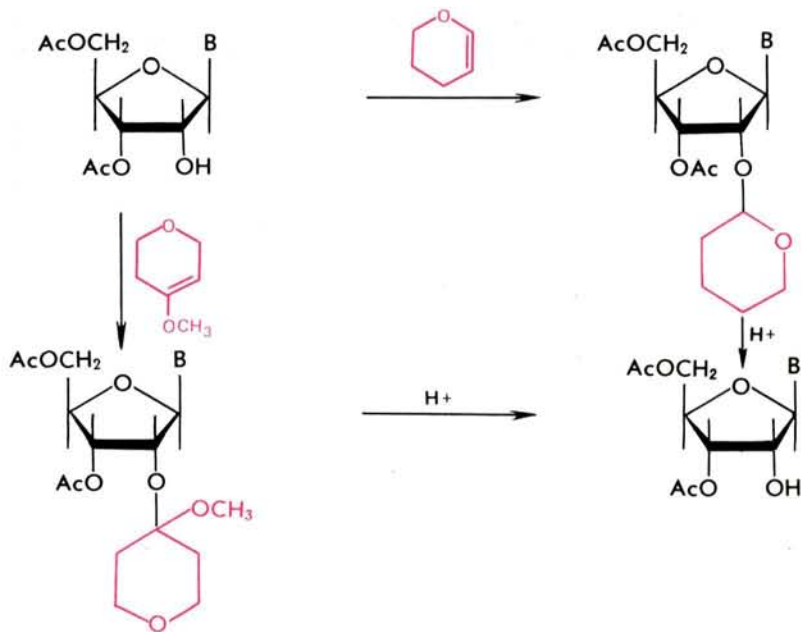


Алкилирование. Из алкилирующих реагентов наиболее широкое применение нашли трифенилхлорметан и его производные, селективно взаимодействующие с первичными гидроксильными группами углеводных остатков:



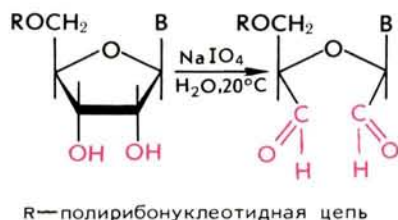
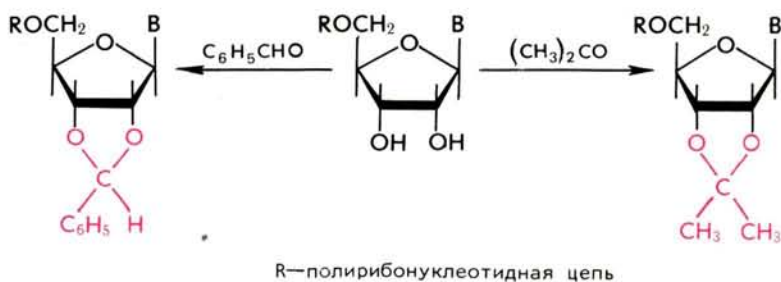
Чаще всего в синтезе олигонуклеотидов для блокирования 5'-гидроксильных групп используются монометокси- и диметокситрифенилметильные производные. Это связано с тем, что образуемые ими эфиры с нуклеозидами гидролизуются в значительно более мягких условиях, чем трифенилметильные. Деблокирование проходит под действием кислот. Введение каждой метоксигруппы ускоряет процесс примерно в 10 раз, что существенно снижает побочные эффекты при синтезе олигонуклеотидов.

Для защиты гидроксильных групп углеводов используется также реакция с виниловыми эфирами, приводящая к образованию ацеталей. Обычно в качестве алкилирующего реагента в этом случае применяют дигидропиран или 4-метокси-3,4-дигидропиран. Реакция проводится в присутствии кислотных катализаторов в органических растворителях



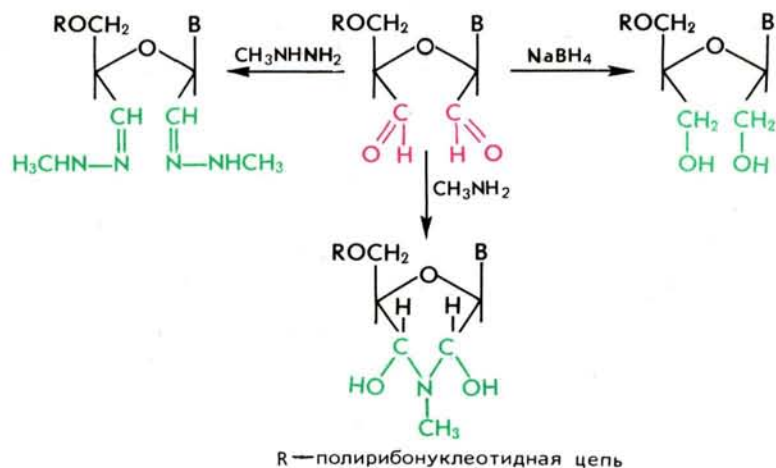
Тетрагидропиранильные защитные группы снимаются в слабкокислой среде.

Реакции с карбонильными соединениями. Рибонуклеозиды, содержащие незамещенные 2'- и 3'-гидроксильные группы, в присутствии кислотных катализаторов легко вступают в реакцию с альдегидами и кетонами, образуя циклические ацетали или кетали. В частности, для защиты α -диольных групп рибонуклеозидов нередко используется взаимодействие с бензальдегидом или ацетоном. В первом случае образуются бензильденные, во втором — изопропилиденные производные рибонуклеозидов. Циклические производные легко расщепляются в слабкокислой среде



Окисление. Широкое применение в химии нуклеиновых кислот находит окисление *цис*-гликольной группы в рибонуклеозидах, олиго- и полирибонуклеотидах. Эта реакция проходит в мягких условиях под действием солей иодной кислоты с образованием диальдегида. Такого рода диальдегиды весьма реакционноспособны.

Они восстанавливаются боргидридом натрия до диолов, вступают в реакцию с гидразинами, давая гидразоны, и реагируют с аминами с образованием циклических производных:



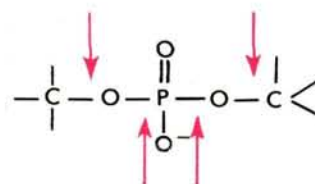
В том случае, если α -диольная группа принадлежит нуклеозид-5'-фосфату, олиго- или полинуклеотиду, окисление с последующей обработкой щелочью или аминами приводит к расщеплению фосфоэфирной связи с одновременным отщеплением основания. Реакция дает возможность избирательно отщеплять 3'-концевые звенья у полирибонуклеотидов и используется при анализе последовательности РНК.

Расщепление N-гликозидных связей. N-Гликозидные связи нуклеозидов и нуклеотидов весьма устойчивы в нейтральной и щелочной средах и расщепляются при этих значениях pH только в жестких условиях. Однако они относительно лабильны в кислой среде, что послужило основой первых методов определения нуклеотидного состава нуклеиновых кислот (гидролиз хлорной кислотой в течение 1 ч при 100 °С). Для нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов соблюдается закономерность: скорость гидролиза соединений дезоксирибы на 2—3 порядка выше скорости гидролиза соединений рибозы, а в каждом ряду N-гликозидные связи пуриновых оснований значительно более лабильны, чем пиримидиновых. На этом различии основан метод селективного расщепления молекул ДНК по пуриновым звеньям (апуринизация), широко применяющийся в структурных исследованиях.

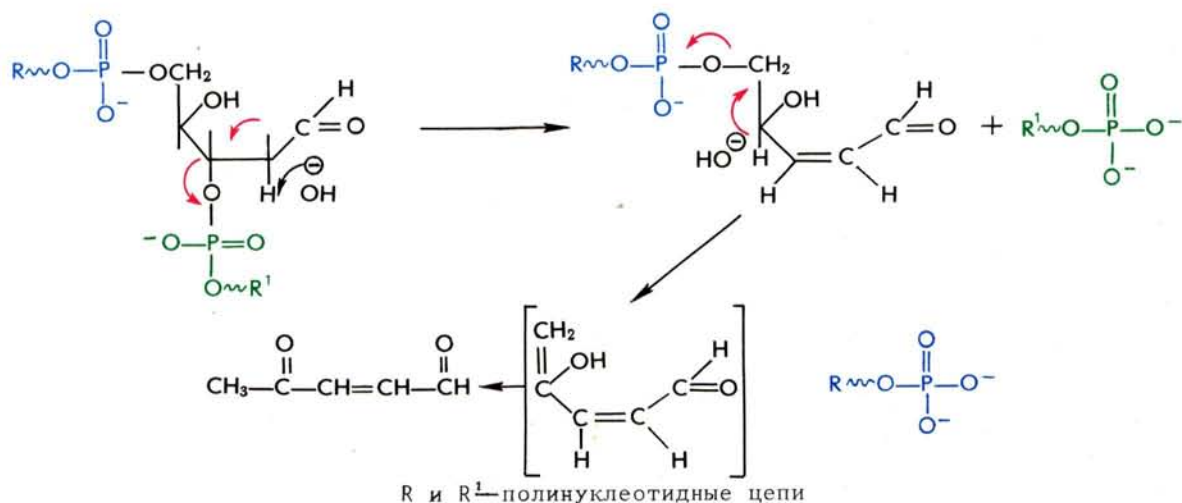
Расщепление фосфоэфирных связей

Расщепление фосфоэфирных связей может проходить с разрывом C—O или P—O связей.

Разрыв по связи C—O (β -элиминирование) становится возможным после удаления соответствующего гетероциклического основания и образования карбонильной группы в β -положении к



фосфодиэфирной группировке. Если β -элиминирование происходит в углеводных остатках, содержащих 3'- и 5'-фосфаты, то на первой стадии образуется неопределенный альдегид с сопряженной системой двойных связей, имеющий в β -положении 5'-фосфатную группу. Эта группа далее отщепляется по механизму β -элиминирования с образованием гипотетического продукта, который, как любой виниловый спирт, претерпевает дальнейшие превращения.



Реакции β -элиминирования широко используются при определении первичной структуры нуклеиновых кислот. На них, в частности, основаны методы специфичных расщеплений ДНК и РНК после деструкции различного типа оснований химическими агентами.

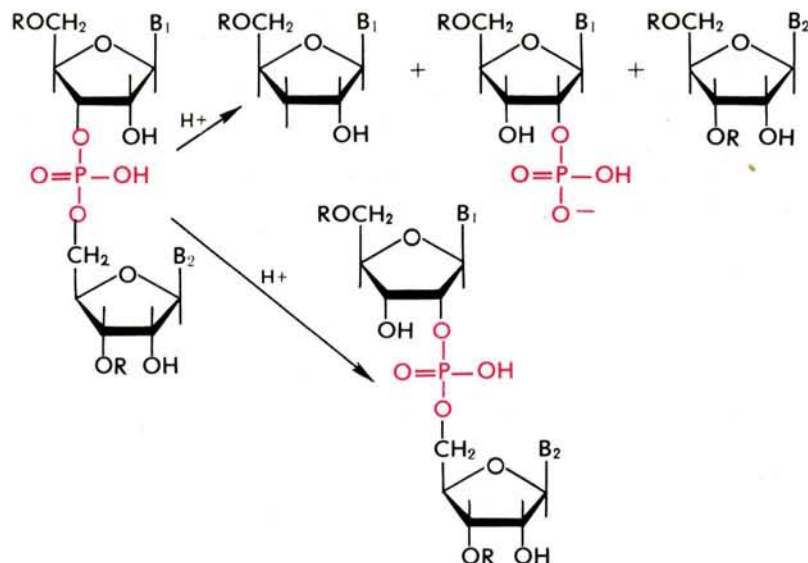
Среди реакций, протекающих с разрывом связей Р—О, практически важны кислый и щелочной гидролиз РНК или олигорибонуклеотидов. При щелочном гидролизе РНК конечным продуктом являются нуклеозид-2'(3')-фосфаты; ДНК в тех же условиях не расщепляется.

Щелочной гидролиз до мононуклеотидов применяется для определения нуклеотидного состава РНК.

Характерной особенностью поведения РНК и олигорибонуклеотидов в кислой среде является изомеризация природной 3' → 5'-фосфодиэфирной связи в 2' → 5'-фосфодиэфирную. Процесс идет конкурентно с расщеплением фосфодиэфирных связей. При неполном гидролизе РНК в образовавшихся олигонуклеотидах присутствует значительный процент олигомеров с изомерными связями. Продолжительный гидролиз в кислой среде, так же как и в щелочной, приводит к образованию мононуклеотидов.

С возможностью изомеризации фосфодиэфирной связи в кислой среде следует считаться во всех случаях, где РНК подвергается кислотной обработке, например в процессе снятия защитных групп при синтезе олигорибонуклеотидов.

Нуклеозид-2',3'-циклофосфаты, в которых фосфодиэфирная связь образована соседними гидроксильными группами рибозы, в



кислой и в щелочной среде гидролизуются быстрее, чем 3' → 5'-фосфодиэфиры, что связано с напряженностью пятичленного цикла. Особенно быстро гидролиз происходит в кислой среде. Поэтому кислотную обработку применяют для раскрытия циклофосфатных групп олигонуклеотидов, образующихся при гидролизе РНК рибонуклеазами.

Основные химические реакции нуклеиновых кислот и их компонентов позволяют получить представление о многообразии химических превращений, в которых участвуют нуклеиновые кислоты *in vivo* и *in vitro*.

Нуклеопро­теиды

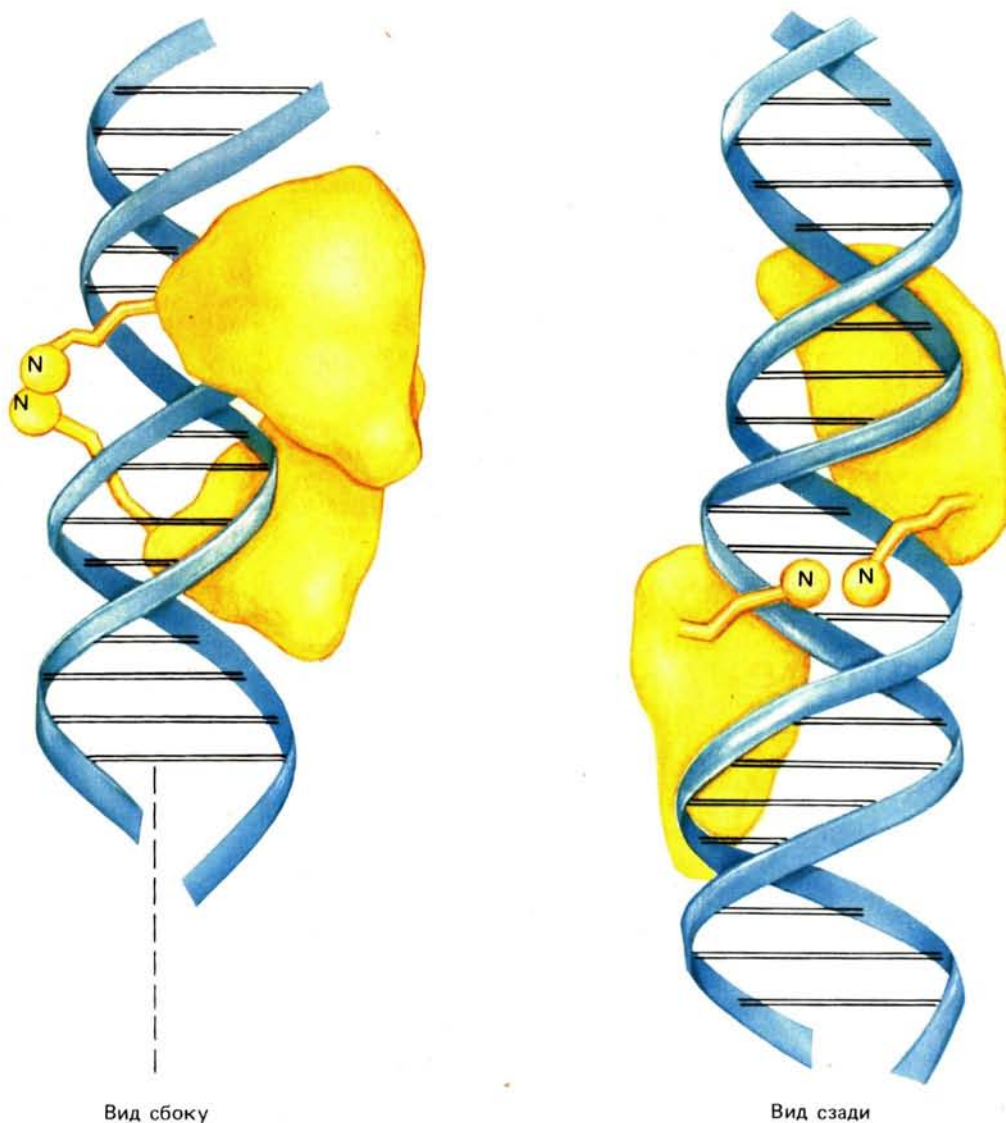
Все функции нуклеиновых кислот в организме осуществляются в комплексах с белками. В то же время лишь некоторые белки выполняют свои функции в комплексе с нуклеиновыми кислотами. Такие комплексы называются нуклеопро­теидами. Одни нуклеопро­теиды существуют в течение длительного времени, например хроматин, рибосомы, вирусные частицы. Другие возникают на короткое время и, выполнив свою функцию, диссоциируют—к ним относятся комплексы, образуемые ДНК- и РНК-полимеразами, регуляторными белками, репрессорами или активаторами и т. п. Нуклеопро­теиды осуществляют такие важные процессы в клетке, как репликация, транскрипция и трансляция, транспорт нуклеиновых кислот из ядра в клетку, секреция белков в эукариотических клетках и т. п.

Структура нуклеопротеидных комплексов

Нуклеопротеиды образуются, как правило, в результате нековалентных взаимодействий белков и нуклеиновых кислот. В связывании принимают участие электростатические и гидрофобные взаимодействия, водородные связи, а также уже упоминавшиеся «стэкинг»-взаимодействия; стабилизирующую роль в комплексах часто играют ионы металлов и другие кофакторы.

Для ряда белков, образующих комплексы с полинуклеотидами, а в некоторых случаях и для самих комплексов по данным рентгеноструктурного анализа построены достоверные трехмерные модели. Однако для сложных многокомпонентных нуклеопротеидов, таких, например, как рибосомы, этот метод пока неприменим. Информацию

Рис. 221. Модель взаимодействия оператора с cI -репрессором бактериофага λ .



об их строении можно получить с помощью электронной микроскопии в сочетании с химическими, иммунохимическими и физическими методами, позволяющими оценить пространственную конфигурацию комплексов и взаимное расположение отдельных компонентов. Широко используются модификация бифункциональными реагентами, моноклональные и поликлональные антитела, спектральные и расчетные методы, нейтронография.

Комплексы репрессоров с операторами. В качестве примера нуклеопротеидов, выполняющих в клетке регуляторную функцию, рассмотрим комплексы белков — репрессоров с ДНК. Репрессоры являются негативными регуляторами синтеза РНК на ДНК: связываясь со специальным участком ДНК, называемым оператором, они запрещают транскрипцию генов, находящихся под их контролем (см. с. 413). В результате этого взаимодействия образуются прочные комплексы, характеризующиеся константами связывания порядка $10^{10}—10^{14} \text{ M}^{-1}$. Как правило, репрессоры представляют собой небольшие белки, состоящие из нескольких идентичных субъединиц. Так, репрессоры умеренных бактериофагов (сI-репрессоры) состоят из двух субъединиц, репрессор лактозного оперона *E. coli* — из четырех. Самым маленьким из известных репрессоров является так называемый *cro*-белок бактериофага λ — каждая из субъединиц димера содержит 66 аминокислотных остатков (субъединица сI-репрессора фага λ состоит из 236, а lac-репрессора *E. coli* — из 347 аминокислотных остатков).

В настоящее время установлены первичные структуры многих репрессоров и операторов. Характерной особенностью нуклеотидных последовательностей операторов является их симметричный характер.

Симметричная структура операторов и субъединичное строение репрессоров позволили предположить, что с каждым из симметричных участков оператора взаимодействует одна из субъединиц соответствующего репрессора. Исследование доступности для различных химических реагентов участков оператора в комплексе с репрессором и в свободном состоянии показало, что основное взаимодействие происходит только с одной стороны двойной спирали ДНК и осуществляется через группы оснований, выходящих в большую бороздку. Эти представления в совокупности с данными рентгеноструктурного анализа ДНК-связывающего N-концевого домена сI-репрессора фага λ и *cro*-белка, которые удалось получить в кристаллическом состоянии, легли в основу построения моделей комплексов репрессоров с операторами.

Полученная для сI-репрессора модель представлена на рисунках 221 и 222. Согласно компьютерному анализу рентгеноструктурных данных, существует единственное удовлетворительное сочетание репрессора с оператором. Две субъединицы белка симметрично расположены с одной стороны двойной спирали ДНК, и лишь два контакта наблюдаются с противоположной стороны. N-Концевые гибкие участки репрессора как бы «обнимают» спираль ДНК, а две α -спирали (2 и 3) оказываются в большой бороздке и взаимодействуют с ДНК своими боковыми группами (рис. 222).

Аналогичное расположение двух α -спиралей в большой бороздке ДНК реализуется, по-видимому, и в случае *cro*-белка.

Анализ первичных структур многих репрессоров показывает, что во всех известных случаях определенные аминокислотные остатки консервативны и соответствующие участки полипептидных цепей могут образовывать две α -спирали, подобно спиралям 2 и 3 сI-репрессора. Возможно, это общий способ специфического взаимодействия регуляторных белков с ДНК. Окончательные выводы о структуре комплексов могут быть сделаны только после рентгеноструктурного анализа.

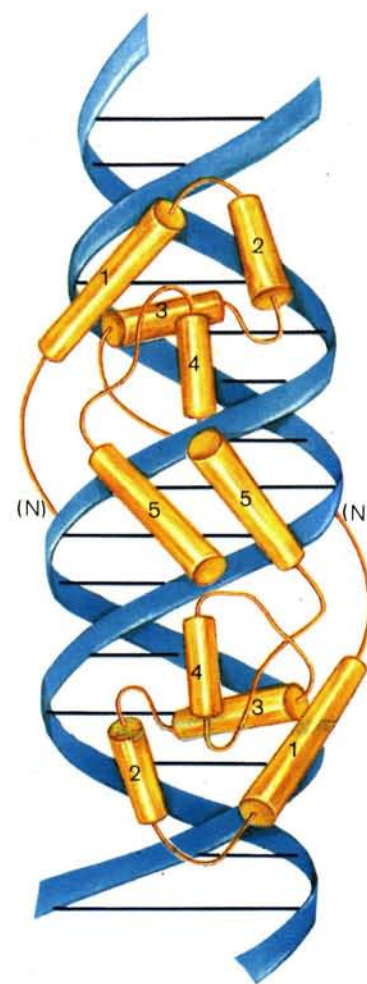


Рис. 222. Предполагаемая структура комплекса оператора с сI-репрессором. α -Спиральные участки репрессора изображены цилиндрами.



Мирзабеков Андрей Дарьевич (р. 1937), советский биохимик, академик АН СССР (1987). Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1962); с 1962 г. работает в Институте молекулярной биологии АН СССР, с 1984 г. — директор института. Основные работы — по изучению структур нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов и механизма их функционирования. Установил последовательность расположения гистонов вдоль ДНК в нуклеосомах. Лауреат Государственной премии СССР (1969).

Предварительные данные имеются и о структуре комплексов РНК-полимеразы с промоторами — участками ДНК, в которых начинается транскрипция (см. с. 413). Конечным результатом взаимодействия полного фермента с промотором является образование очень прочного комплекса, который и осуществляет инициацию синтеза РНК.

Хроматин. Нуклеосомы. Основной генетический материал в клетках эукариот сосредоточен в хромосомах клеточного ядра, где происходят процессы репликации и транскрипции. В промежутках между делениями клеток хромосомы вытянуты в длинные тонкие нити, в процессе деления они становятся короче и толще. В компактном состоянии ДНК длиной до нескольких сантиметров упаковывается в хромосомы, длина которых измеряется микрометрами. Хромосомы состоят из нуклеопротеида, называемого хроматином. Основными компонентами хроматина являются ДНК, гистоны и негистоновые белки. Гистоны представляют собой небольшие белки основного характера, отличающиеся высокой степенью эволюционной консервативности. По соотношению остатков основных аминокислот (Lys/Arg) гистоны разделяют на 5 классов: H1, H2A, H2B, H3, H4. Наиболее консервативны аргининбогатые гистоны H3 и H4, в остальных вариации в последовательности аминокислот в зависимости от источника более значительны. Негистоновые белки — это

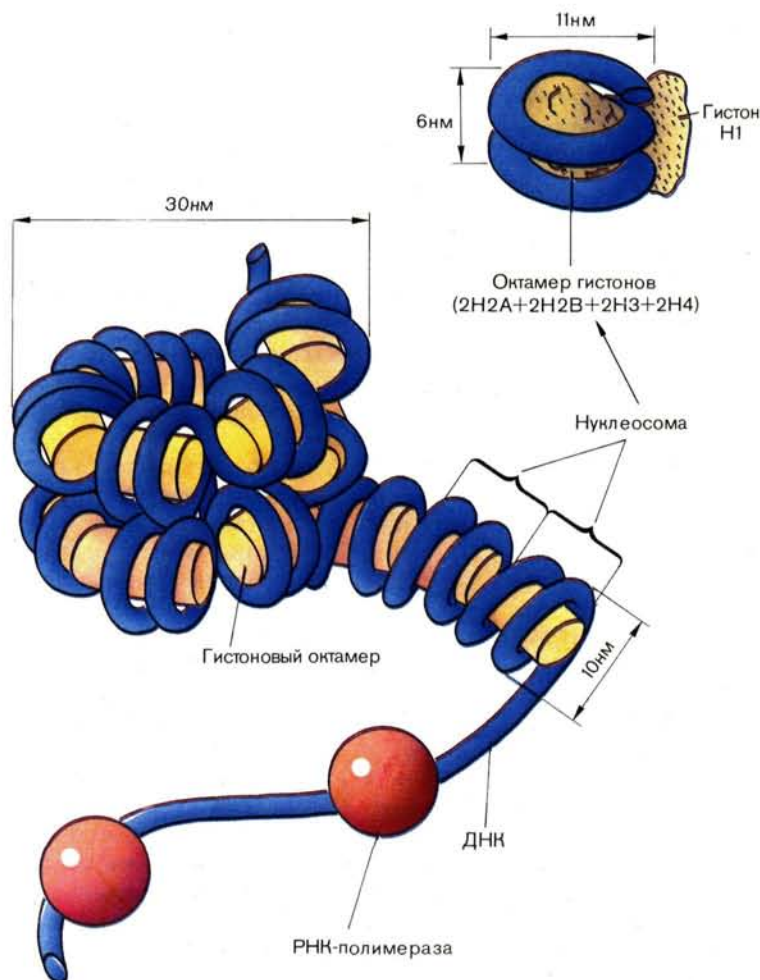


Рис. 223. Структура хроматина и строение нуклеосомы.

общее название всех других белков хроматина разной природы, различных свойств и функций. ДНК в составе хроматина предположительно находится в В-форме, хотя имеются данные, что в отдельных участках хроматина существует Z-форма ДНК. На ДНК приходится около половины массы хромосом, вторую половину их составляют белки.

Знание статических и динамических свойств хроматина необходимо для понимания механизмов репликации и транскрипции. В изучении структуры хроматина за последнее время был достигнут значительный прогресс. В 1974 г. было показано (Р. Корнберг), что хроматин состоит из дискретных частиц — нуклеосом, соединенных «перемычками» — участками свободной ДНК. Непрерывный дуплекс ДНК переходит из одной частицы в другую, образуя структуру, напоминающую нитку бус. Мономерные нуклеосомы можно получить мягкой обработкой хроматина микрококковой нуклеазой. Нуклеосома представляет собой компактную нуклеопротеидную частицу, состоящую из нуклеосомного ядра, линкерной ДНК и связанной с ней одной молекулы гистона Н1 (рис. 223). Размер участка ДНК, приходящегося на одну нуклеосому, — около 200 п. о. — в пределах одного источника является величиной постоянной. При более глубоком нуклеазном гидролизе линкерная ДНК отщепляется, что приводит к потере гистона Н1,

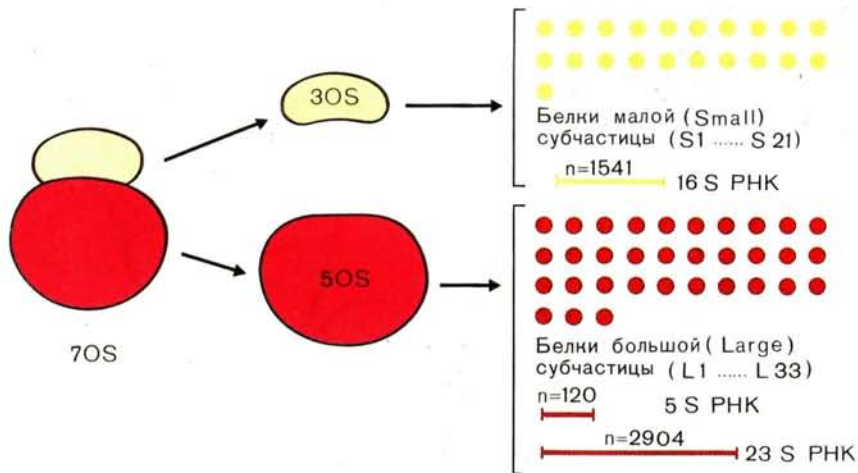


Рис. 224. Схематическое строение рибосом *E. coli* (n — число нуклеотидных остатков в молекуле РНК).

при этом остается нуклеосомное ядро. В нуклеосомном ядре, имеющем форму диска диаметром 11 нм и высотой около 6 нм (А. Круг, Дж. Финч), двойная спираль ДНК (140—150 п. о.) лежит на поверхности и накручена на октамер гистонов Н2А, Н2В, Н3 и Н4, каждый из которых представлен двумя копиями.

В исследованиях взаимодействия гистонов с ДНК в составе хроматина значительная роль принадлежит А. Д. Мирзабекову, Г. П. Георгиеву и др.

В клеточном ядре хроматин уложен очень плотно. Наивысшая степень компактизации хроматина наблюдается в хромосомах на стадии митоза.

Рибосомы. Во всех организмах реализация генетической информации, заключенной в нуклеиновых кислотах, в конкретные

белковые структуры происходит на клеточных органеллах — рибосомах. Прокариотические клетки содержат рибосомы с константой седиментации 70S (S — единица Сведберга) — 70S рибосомы, цитоплазма клеток эукариот — 80S рибосомы. Рибосомы хлоропластов и митохондрий близки по размерам прокариотическим. Все рибосомы состоят из двух неравных субъединиц: 80S рибосомы из 60S и 40S, 70S — из 50S и 30S субъединиц. Рибосома является рибонуклеопротеидом и состоит из РНК и белков. Наиболее полно изучены 70S рибосомы *E. coli*. Их схематическое строение представлено на рисунке 224.

Малая 30S субчастица рибосом *E. coli* состоит из одной молекулы РНК (16S РНК) и 21 молекулы рибосомных белков. В состав 50S субчастицы входят 2 молекулы РНК — 23S и 5S РНК и 33 белка.

В настоящее время установлены первичные структуры всех компонентов рибосом *E. coli*. Оказалось, что белки L7 и L12 имеют идентичные аминокислотные последовательности и отличаются

Рис. 225. Локализация на поверхности 30S субчастиц рибосом *E. coli* 3'-конца 16S РНК с помощью иммунной электронной микроскопии: *a* — фотография димера 30S субчастиц, полученная с помощью электронной микроскопии. Видна бивалентная молекула иммуноглобулина G (IgG), связывающая две 30S субчастицы в точках расположения 3'-концов их 16S РНК, модифицированных гаптемом, к которому и были получены специфические антитела; *b* — перенесение информации на пространственную модель 30S субчастицы.

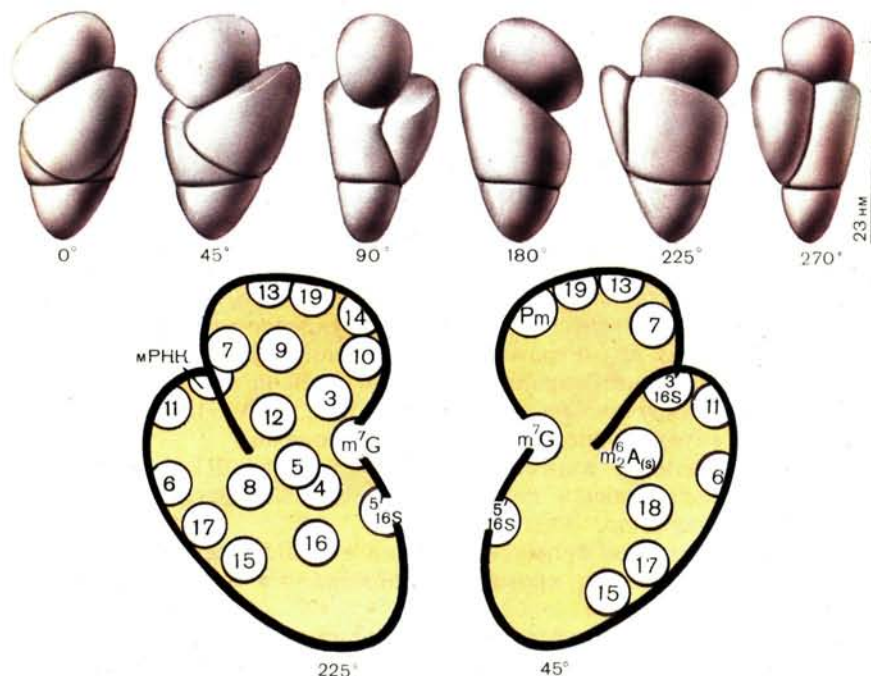
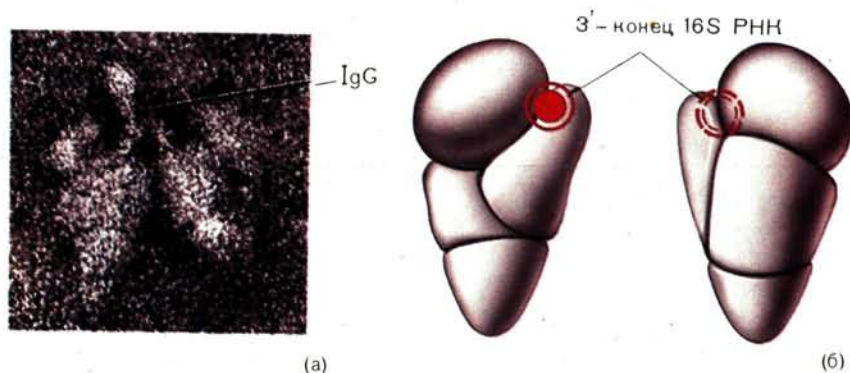


Рис. 226. Пространственная модель 30S субчастицы рибосом в различных проекциях, построенная по данным электронной микроскопии. Цифры в кружках — положение соответствующих белков, 3'-16S и 5'-16S — положение 3'- и 5'-концов 16S РНК; m^7G и $m^5A_{(3)}$ — локализация остатков 7-метилгуанина и двух 6-диметиладенинов, Pm — локализация места связывания антибиотика пурамицина (в н и з у).

только ацелированием N-концевой аминокислоты у L7. В отличие от других рибосомных белков, эти белки представлены каждый двумя копиями и в структуре 50S субчастицы образуют тетрамер L7/L12. Кроме того, идентичными оказались белки S20 и L26, так что число индивидуальных белковых компонентов в рибосоме меньше, чем сумма белков обеих субчастиц. Таким образом, 70S рибосома *E. coli* состоит из 3 молекул РНК (16S, 23S и 5S) и 53 различных белков. За исключением некоторых (S1, S2, S6, L7/L12), рибосомные белки имеют основной характер.

Рибосомы эукариот 80S устроены аналогичным образом, однако количество белков в субъединицах больше, РНК длиннее (18S и 28S), а большая субчастица содержит не одну (5S), а две молекулы малых рибосомных РНК — 5S и 5,8S.

Рибосома является нуклеопротеидом, способным к самосборке *in vitro* (М. Номура). Схемы (карты) последовательного присоединения рибосомных компонентов, приводящего к реконструкции

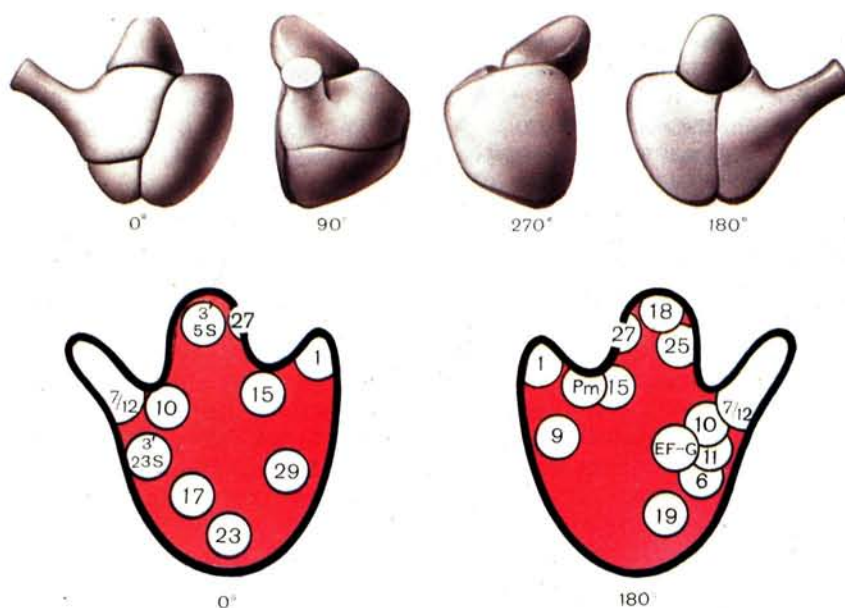


Рис. 227. Пространственная модель 50S субчастицы рибосом *E. coli*, представленная в различных проекциях (вверху). Расположение на поверхности 50S субчастиц структурных и функциональных центров (внизу). Обозначения: цифры в кружках — расположение соответствующих L-белков, 3'-5S и 3'-23S — локализация 3'-концов рибосомных 5S и 23S РНК, Pm и EF-G — локализация мест связывания пурамицина и фактора элонгации G соответственно.

активных субчастиц, хорошо известны. Возможность осуществления сборки с неполным набором компонентов, с заменой одного или нескольких из них на мутантные, химически модифицированные или гомологичные компоненты из другого организма, дает удобный метод структурно-функционального изучения рибосом.

В исследовании пространственной организации рибосом наибольшую роль сыграли методы электронной микроскопии, рассеяния нейтронов и химические методы ковалентного связывания компонентов друг с другом.

Особенно важная роль принадлежит электронной микроскопии в исследовании комплексов рибосом с антителами к индивидуальным рибосомным белкам или отдельным участкам рРНК, модифицированным низкомолекулярными химическими агентами (гаптенами) или несущим природную модификацию (6,6-диметиладенин, 7-метилгуанин). Этот подход называется иммунной электронной

микроскопией. Его возможности проиллюстрированы на рисунке 225, где представлена фотография димера 30S субчастицы рибосом, в котором 3'-концы 16S РНК, модифицированные гаптенем, соединены молекулой специфичного к гаптену иммуноглобулина G. Совокупность данных, полученных с помощью такого подхода, привела к созданию моделей субчастиц рибосом *E. coli* с относительным расположением важных структурных и функциональных центров на их поверхности (рис. 226—228). В этой области существенный вклад внесли три группы исследователей: М. Номура (США), Х. Г. Витман (ФРГ), А. С. Спири́н (СССР).

Вирусы и другие нуклеопротеиды. Приведенные примеры далеко не исчерпывают список известных нуклеопротеидных структур. Существует целый мир бактериальных, растительных и животных вирусов, в котором обнаружено поразительное многообразие вирусных частиц (вирионов) как по строению и составу, так и по способам хранения и воспроизведения генетической информации. В отличие от клеток, где хранителем наследственности всегда является двуспиральная ДНК, а РНК служит только для переноса и реализации генетической информации, вирусы в качестве генетического материала используют как ДНК (ДНК-содержащие вирусы), так и РНК (РНК-содержащие вирусы). Геномная ДНК может быть одноцепочечной или двуспиральной, кольцевой или линейной. РНК-содержащие вирусы также чрезвычайно разнообразны: они могут содержать одноцепочечную или двуспиральную РНК, их геном может быть представлен одной или сразу несколькими молекулами РНК, упакованными в одну капсиду.

В состав вирионов входят самые разнообразные белки — от белков, выполняющих чисто структурные функции, до сложных ферментов, необходимых вирусу для взаимодействия с клеткой-хозяином или для воспроизведения.

Из других нуклеопротеидных комплексов следует упомянуть информосомы (комплексы мРНК со специфическими белками в клетках эукариот), в изучение которых основной вклад внесен советскими исследователями (А. С. Спири́н, Г. П. Георгиев, Л. П. Овчинников), и комплексы аминоксил-тРНК-синтетаз с тРНК, исследованиям структуры которых уделяется большое внимание

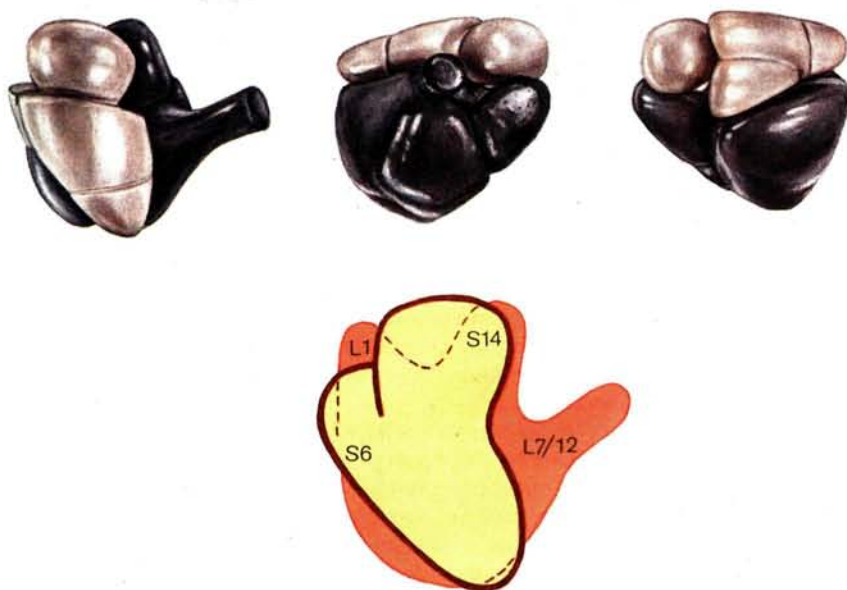


Рис. 228. Относительное расположение большой и малой субчастиц рибосом *E. coli* по данным электронной и иммунной электронной микроскопии.

как в зарубежных лабораториях (Ж.-П. Эбель), так и в СССР (Д. Г. Кнорре, Л. Л. Киселев).

Изучение структуры этих и других нуклеопротеидов является необходимым звеном в решении общей проблемы взаимодействия нуклеиновых кислот и белков в живой клетке — взаимодействия, обеспечивающего этапы воспроизведения и реализации ее наследственной информации.



Спирин Александр Сергеевич (р. 1931), советский биохимик, академик АН СССР (1970). Окончил Московский университет (1954), с 1967 г. — директор Института белка АН СССР. Основные работы посвящены биохимии нуклеиновых кислот и биосинтезу белка. Установил структурные превращения рибосом и сформулировал один из основных принципов их строения и самосборки, открыл информосомы. Предложил модель молекулярного механизма работы рибосомы. Лауреат Ленинской премии (1976) и Государственной премии СССР (1986).

Проблемы нуклеиново-белкового узнавания

Все компоненты нуклеопротеидных комплексов синтезируются отдельно и затем собираются в функционирующую структуру. Для того чтобы сборка произошла и прошла правильно, они должны «узнать» друг друга и получить программу сборки. Узнавание нуклеиновой кислоты белком представляет собой процесс, каждая стадия которого осуществляется за счет нуклеиново-белковых взаимодействий.

Взаимодействия в процессе узнавания могут быть специфическими и неспецифическими. Под специфическим нуклеиново-белковым взаимодействием подразумевается кооперативное взаимодействие определенных групп белка и нуклеиновой кислоты, возникающее за счет характерного для данного белка и данной нуклеиновой кислоты пространственного расположения этих групп. Примеры специфических взаимодействий: репрессоры и операторы, РНК-полимераза и промоторы.

Неспецифические взаимодействия значительно более однородны и обуславливаются только электростатическими или гидрофобными связями. Например, РНК-полимераза образует неспецифические комплексы с любыми полианионами — гепарином, полиинозиновой кислотой, одноцепочечной и двухцепочечной ДНК.

Проблема узнавания значительно более сложна, чем определение структуры уже существующего нуклеопротеида. Например, имеются последовательности ДНК, которые посредством специфических взаимодействий с белками осуществляют регуляцию функционирования ДНК. К таким функционально значимым участкам ДНК относятся промоторы, операторы, терминаторы, участки начала репликации и многие другие последовательности. Эти последовательности должны быть узнаны белком, выполняющим регуляторную функцию, т. е. они должны отличаться от всех других последовательностей генома. Если однотипных участков в данном геноме не один, а несколько, как в случае промоторов, то они должны нести и одинаковые элементы последовательности. Задача поисков регуляторных последовательностей очень сложна даже в случае сравнительно простых геномов, таких, как геном *E. coli*. Так, репрессор лактозного оперона узнает в ДНК *E. coli* только одну последовательность *lac*-оператора и тем самым отличает ее от 10^7 других последовательностей.

Накопление экспериментальных данных по нуклеиново-белковому узнаванию позволяет постепенно подходить к выяснению существующих закономерностей. В частности, выдвинута достаточно обоснованная концепция, что любой полипептид способен специфически связываться с нуклеотидной цепью, комплементарной его матрице, или с кодируемым комплементарной цепью полипептидом (называемым антипептидом).

В качестве подтверждения этого предположения недавно были синтезированы антипептиды для АКТГ и γ -эндорфина. Структуры антипептидов были выведены из последовательностей РНК, комплементарных мРНК для данных пептидов. Оказалось, что соответствующие пептид и антипептид (рис. 229) образуют в растворе

(1-24)

АКТГ H-Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys Arg Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro-OH

H-Gly Val His Leu His Arg Ala Pro Leu Leu Ala His Arg Leu Ala Pro Ala Glu Val Phe His Gly Val Arg-OH

Рис. 229. Структуры фрагментов 1—24 АКТГ и антипептида к нему.

прочные комплексы (константа связывания $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$), причем антипептид способен конкурировать при связывании даже со специфическими к пептиду антителами. Эти результаты объясняются гидрофобно-гидрофильными взаимодействиями, специфичность которых вытекает из природы самого генетического кода.

Процессы с участием нуклеиновых кислот: репликация, транскрипция и трансляция

Основная функция нуклеиновых кислот заключается в хранении, воспроизведении и передаче генетической информации. Являясь системами динамическими, нуклеиновые кислоты осуществляют все процессы с высокой скоростью и эффективностью, постоянно взаимодействуя с соответствующими белками, прежде всего с ферментами. Главными процессами с их участием являются репликация, транскрипция и трансляция.

Репликация

Репликацией называется процесс удвоения ДНК. Принципиальный механизм его вытекает из строения двуспиральной молекулы ДНК (см. с. 335). В результате репликации образуются две молекулы ДНК, представляющие собой точные копии исходной молекулы. Каждая из вновь образовавшихся молекул содержит одну цепь исходной ДНК и одну вновь синтезированную цепь. Иными словами, репликация полуконсервативна—половина родительской молекулы сохраняется в дочерней молекуле.

Однако этот принципиальный механизм даже в простейших случаях реализуется путем сочетания многих сложных процессов, в которые вовлечены многочисленные ферменты и регуляторные белки.

Лучше всего процессы репликации изучены для наиболее простых систем — бактерий, бактериофагов и внехромосомных генетических элементов бактерий — плазмид.

Принято использовать понятие «репликон», предложенное в 1963 г. Ф. Жакобом, С. Бреннером и Ф. Кьюзеном для обозначения генетической единицы репликации, т. е. сегмента ДНК, который автономно воспроизводится (реплицируется) в процессе клеточного роста и деления. Каждый репликон должен иметь систему «управления» собственной репликацией. Хромосома *E. coli*, плазмиды, ДНК бактериофагов представляют собой репликоны разной сложности, способные к автономной репликации в клетке и имеющие систему инициации. Репликон может содержать в себе гены, кодирующие синтез всех белков, необходимых для репликации (хромосома *E. coli*), части таких белков (некоторые сравнительно крупные бактериофаги) или использовать для своей репликации практически только чужие белки (мелкие фаги M13 или G-4, содержащие однонитевые циклические ДНК).

Ключевую роль в процессе репликации играют реплицирующие ДНК-полимеразы, которые осуществляют матричный синтез ДНК из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Фермент синтезирует нить ДНК, комплементарную родительской нити (называемой матрицей), последовательно присоединяя к 3'-концу растущей цепи мононуклеотидные звенья, комплементарные звеньям матрицы (рис. 230). При этом ДНК-полимераза катализирует нуклеофильную атаку 3'-ОН-группы концевого нуклеотида растущей цепи на α -фосфатную группу дезоксирибонуклеозидтрифосфата, отбираемого ферментом на основе его комплементарности соответствующему звену матрицы. В результате отщепляется пирофосфат и образуется фосфодиэфирная связь. Растущая цепь удлиняется на одно звено, и процесс повторяется с новым дезоксирибонуклеозидтрифосфатом. Для того чтобы ДНК-полимераза могла начать синтез, необходимо существование уже готового фрагмента ДНК или РНК, комплементарного матрице и содержащего свободную 3'-ОН-группу. Этот фрагмент называют затравкой. В процессе синтеза дочерних цепей родительская двухцепочечная ДНК расплетается, образуя структуру, по форме напоминающую латинскую букву Y. Такая структура называется репликативной вилкой.

Процессы с участием нуклеиновых кислот: репликация, транскрипция и трансляция



Бреннер [Brenner] Сидней (р. 1927), английский ученый, работающий в области молекулярной биологии и молекулярной генетики. Образование получил в университете Витватерсранда (ЮАР) и Оксфордском университете, с 1957 г. работает в лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже (Великобритания). Вместе с Ф. Жакобом и М. Меселсоном экспериментально подтвердил идею о существовании РНК-посредника.

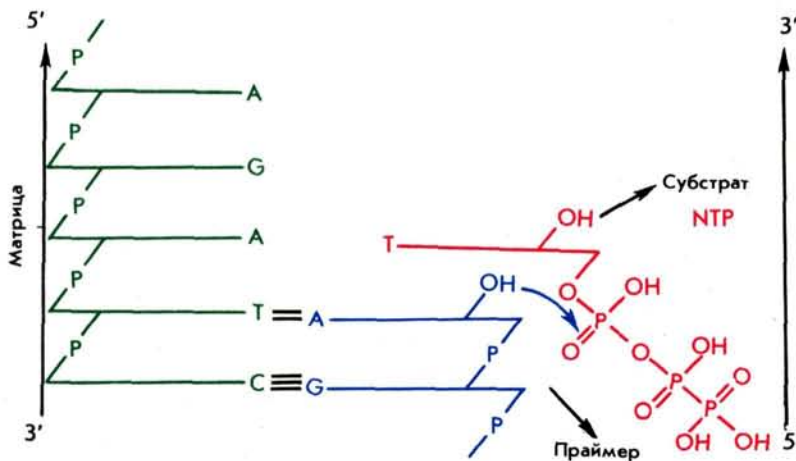


Рис. 230. Синтез комплементарной цепи ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой.

Репликация хромосомы *E. coli*

Хромосома *E. coli* представляет собой циклическую двухцепочечную ДНК, длина которой равна приблизительно $3,8 \cdot 10^6$ звеньев. Хромосома существует в комплексе с белками и клеточной мембраной и довольно плотно упакована (такой упакованный комплекс называется нуклеоидом). Схема репликации хромосомы *E. coli* изображена на рисунке 231. Каждый цикл репликации начинается в определенном месте хромосомы, называемом *ori*. Термин *ori* обозначает специфические последовательности ДНК-репликонов, служащие сигналом инициации репликации (от английского *origin of replication*). Начавшись, репликация протекает одновременно в двух направлениях, так что образуются и движутся две репликативные вилки. Скорость движения каждой вилки составляет около 800 нуклеотидов в секунду и не зависит от условий роста клеток; таким образом, бактериальная хромосома всегда реплицируется примерно за 40 мин. Образовавшиеся две циклические ДНК разделяются (рис. 232).

Репликация хромосомы *E. coli* осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы III, действующего в ансамбле с множеством других белков, выполняющих функции расплетения цепей ДНК (хеликаза), связывания одноцепочечной ДНК (SSb белок), синтеза праймера (праймаза), лигирования ДНК-фрагментов (ДНК-лигаза) и т. д. Сам фермент ДНК-полимераза III не способен начать репликацию. Инициация репликации начинается с расплетения нитей родительской ДНК в области *ori C* (рис. 231) и синтеза короткого РНК-транскрипта, который служит праймером (затравкой) для синтеза ДНК. В некоторых случаях (ColE1 плаزمид, ДНК нитевидных фагов типа M13) праймер синтезируется клеточ-

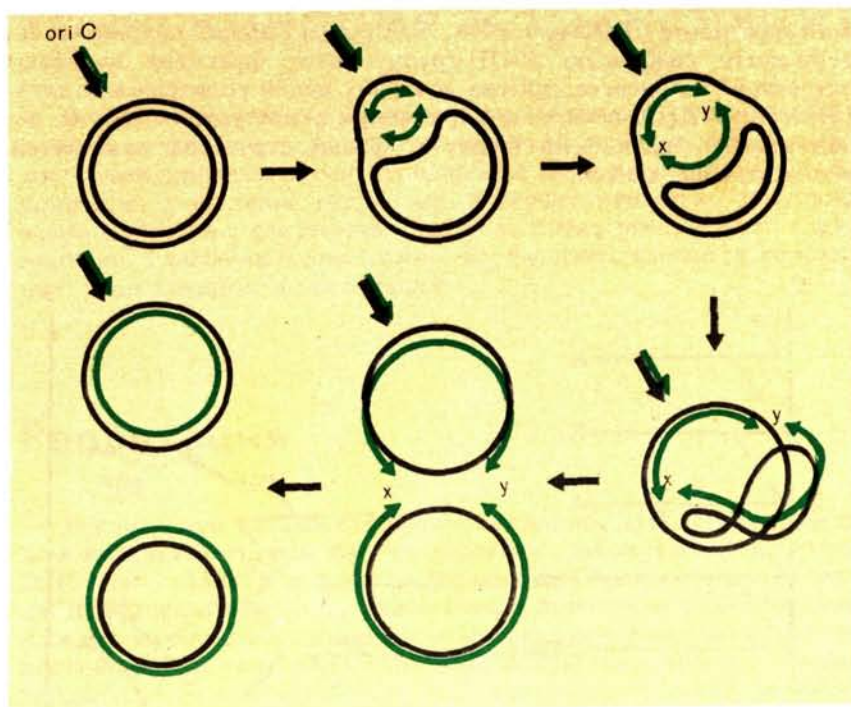


Рис. 231. Схема репликации хромосомы *E. coli* (X и Y — две репликативные вилки).

ной ДНК-зависимой РНК-полимеразой, в остальных — специальными ферментами-праймазами. В *E. coli* праймаза активируется примосомой — мультимерным белковым комплексом, содержащим около 20 полипептидных цепей (7 различных субъединиц), в функцию которого входит изменение конформации одной из цепей ДНК, необходимое для взаимодействия с праймазой (рис. 232).

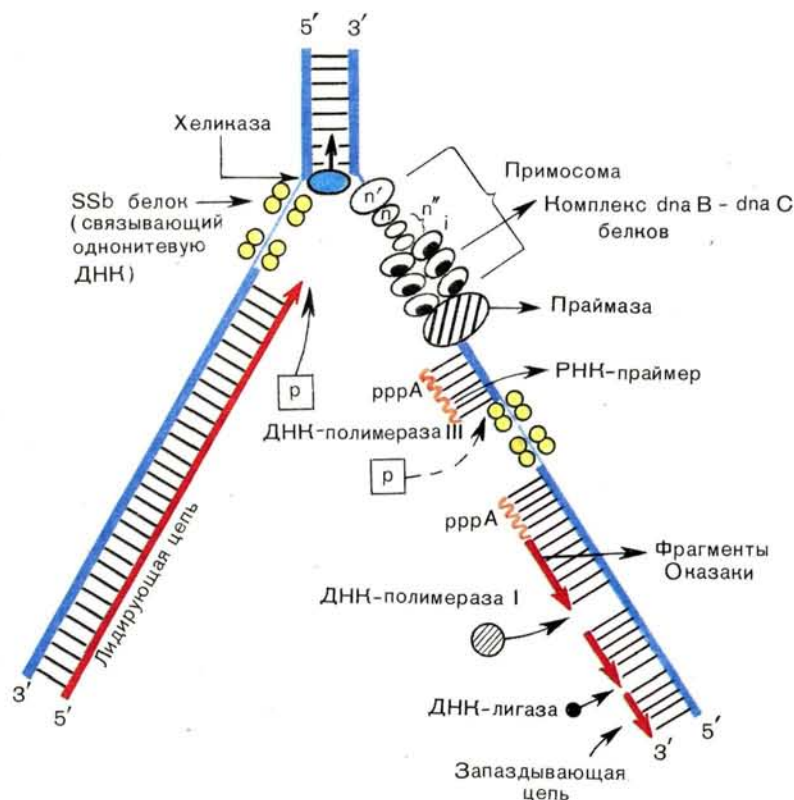


Рис. 232. Репликация ДНК в *E. coli*. Схема событий в репликативной вилке: п', п, п'', i, dna B, dna C, SSb — белковые продукты соответствующих генов хромосомы *E. coli*, вовлеченные в репликацию.

После инициации начинается продвижение репликативных вилок — элонгация. Одна из цепей вновь синтезируемой ДНК удлиняется в том же направлении, в котором движется репликативная вилка, причем синтез осуществляется непрерывно. Эту цепь ДНК называют лидирующей. Другая цепь — запаздывающая, синтезируется короткими фрагментами Оказани (рис. 232). Синтез каждого фрагмента иницируется вблизи начала репликационной вилки и продолжается в противоположную от нее сторону до тех пор, пока 3'-конец вновь синтезируемой ДНК не достигнет 5'-конца предыдущего фрагмента Оказани. Инициация синтеза этих фрагментов осуществляется праймазой, которая в качестве затравки синтезирует короткие фрагменты РНК, далее они удлиняются ДНК-полимеразой III, являющейся основным реплицирующим ферментом *E. coli*. Длины фрагментов Оказани равны примерно 1000 нуклеотидов. В репликативной вилке «работают» также еще два белка. Один из них (SSb белок) специфически связывает одноцепочечные ДНК, облегчая расплетение двойной спирали и одновременно защищая одноцепочечные участки от действия нуклеаз. Другой — ДНК-расплетающий белок (хеликазы) — движется вдоль двойной цепи,

расплетая ее при одновременном гидролизе АТР (см. с. 408). Наконец, еще один фермент — ДНК-гираза, или ДНК-топоизомераза II, предотвращает накопление положительных супервитков, вызываемое расплетением двойной спирали, образуя в циклической ковалентнозамкнутой ДНК одноцепочечные разрывы и затем снова «сшивая» ее.

Фермент ДНК-полимераза I удаляет РНК-затравку и достраивает фрагменты, а ДНК-лигаза соединяет между собой соседние фрагменты Оказаки фосфодиэфирной связью, которая образуется между 3'-гидроксильной группой одного и 5'-фосфатом другого фрагментов. Терминация синтеза ДНК определяется специфической последовательностью. Детали этого процесса пока неизвестны. Наконец, две дочерние хромосомы, образовавшиеся после репликации, прикрепляются к мембране. Рост участка мембраны между точками прикрепления раздвигает их, и разделение клеток завершает процесс.

Репликация ДНК бактериофагов и плазмид

Наиболее хорошо изучена репликация бактериофагов, содержащих в своем вирионе небольшие (около 5000 нуклеотидных звеньев) циклические одноцепочечные ДНК. К ним относятся, например, фаг ψ X-174 и широко используемые в генной инженерии фаги M13 и fd. Их репликация состоит из трех разных по механизму этапов.

На первом этапе при попадании в клетки *E. coli* одноцепочечная циклическая ДНК фага, или (+)-цепь, превращается в двухцепочечную ковалентно замкнутую сверхспиральную ДНК, так называемую RF-I форму (от английского *replicative form*). В качестве промежуточного продукта образуется циклическая двухцепочечная ДНК с одним разрывом, или RF-II форма. Формы RF-I и RF-II образуются в результате синтеза цепи ДНК, которая комплементарна (+)-цепи; новую цепь называют (-)-цепью. Второй этап заключается в репликации RF-I формы для увеличения ее содержания в клетке. Наконец, на третьем этапе синтезируется в больших количествах вирусная (+)-цепь, которая затем упаковывается в вирусную оболочку.

Репликация плазмид, используемых в качестве векторов в генной инженерии, протекает значительно медленнее, чем репликация хромосомы *E. coli*, и, по-видимому, не требует прикрепления ДНК к клеточной мембране. В частности, репликация плазмиды ColEI протекает только в одном направлении, т. е. осуществляется с образованием одной репликативной вилки. Для репликации ColEI нужны только белки, кодируемые хромосомой, и участок *ori* плазмиды, где происходит инициация репликации. Инициация синтеза ДНК в этом случае осуществляется с участием РНК-полимеразы *E. coli*.

Репликация в эукариотических клетках

ДНК эукариотических хромосом находится в комплексе с равным по весу количеством гистонов. Как уже было отмечено, примерно каждые 200 п. о. ДНК образуют суперспираль, накрученную на октамер гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Такая структурная единица

называется нуклеосомой. Следуя друг за другом, нуклеосомы образуют хроматин (см. с. 400).

Отличительным свойством репликации у эукариот является то, что реплицируются нуклеосомы: при синтезе дочерних цепей они на какое-то время разрушаются, но позади репликативной вилки вновь собираются, причем в сборке участвуют как старые, так и вновь синтезированные гистоны (рис. 233). Таким образом, синтез гистонов должен быть скоординирован с репликацией. Действительно, ингибирование синтеза гистонов влечет за собой ингибирование репликации, и наоборот.

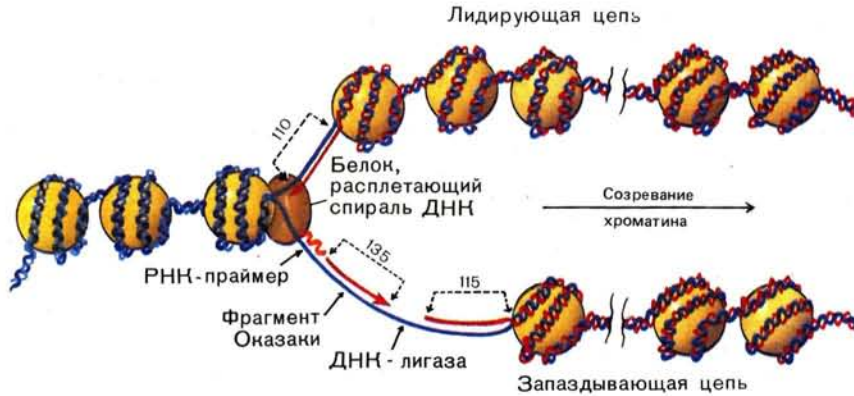


Рис. 233. Схема репликации хроматина.

Так же как у прокариот, репликация состоит из трех основных стадий: инициации, элонгации и терминации. Репликация эукариотической ДНК происходит одновременно во многих областях хромосомы и, по-видимому, иницируется на определенных последовательностях ДНК, которые хорошо идентифицированы у ряда вирусов. Инициация, как и у прокариот, требует участия специфических белков.

Элонгация синтеза осуществляется ДНК-полимеразами. В клетках эукариот известно три типа ДНК-полимераз: α , β и γ . Предполагается, что репликацию основной клеточной ДНК осуществляет полимераз α , репарацию повреждений — полимераз β , а репликацию ДНК митохондрий — полимераз γ . Так же как и у прокариот, в репликативной вилке одна из цепей является ведущей (лидирующей), а другая — отстающей (запаздывающей) (рис. 234). Лидирующая цепь синтезируется непрерывно, тогда как запаздывающая — фрагментами Оказаки. Эти фрагменты также иницируются короткими РНК, которые синтезируются, по-видимому, РНК-полимеразой I. В распространении репликативной вилки принимают участие дестабилизирующие двойную спираль ДНК-связывающие белки.

Транскрипция

Процесс биосинтеза РНК в клетке называется транскрипцией. Его результатом является образование РНК, комплементарных отдельным участкам ДНК. При этом в каждом участке РНК комплементарна только одной определенной нити ДНК.

Процесс биосинтеза РНК осуществляется ферментами — РНК-полимеразами, которые используют ДНК в качестве матрицы. Как и в случае репликации, механизм образования фосфодиэфирных связей включает в себя катализируемую ферментом нуклеофильную атаку 3'-гидроксильной группы растущей цепи на α -фосфатную группу присоединяемого субстрата (рибонуклеозидтрифосфата). При образовании фосфодиэфирной связи от трифосфата отщепляется неорганический пирофосфат. Каждый вновь присоединяемый нуклеозид комплементарен тому звену матрицы, которое является ближайшим 5'-соседом только что скопированного звена. Цепь РНК растет в направлении $5' \rightarrow 3'$ по мере движения РНК-полимеразы по копируемой цепи ДНК в направлении от 3'-конца к 5'-концу. Схема процесса транскрипции показана на рисунке 234.

Как и репликация, транскрипция состоит из трех основных этапов: инициации, элонгации и терминации. В отличие от ДНК-полимераз, РНК-полимеразы способны к самостоятельной инициации синтеза РНК, которая осуществляется в определенных точках ДНК. Место инициации синтеза РНК определяется специальными регуляторными участками ДНК — промоторами. Терминация синтеза также происходит на специфических участках ДНК — терминаторах. Процесс транскрипции регулируется разнообразными способами, что позволяет клетке приспосабливаться к изменениям условий существования. Наиболее хорошо изучены транскрипция и способы ее регуляции у бактерий и бактериофагов.

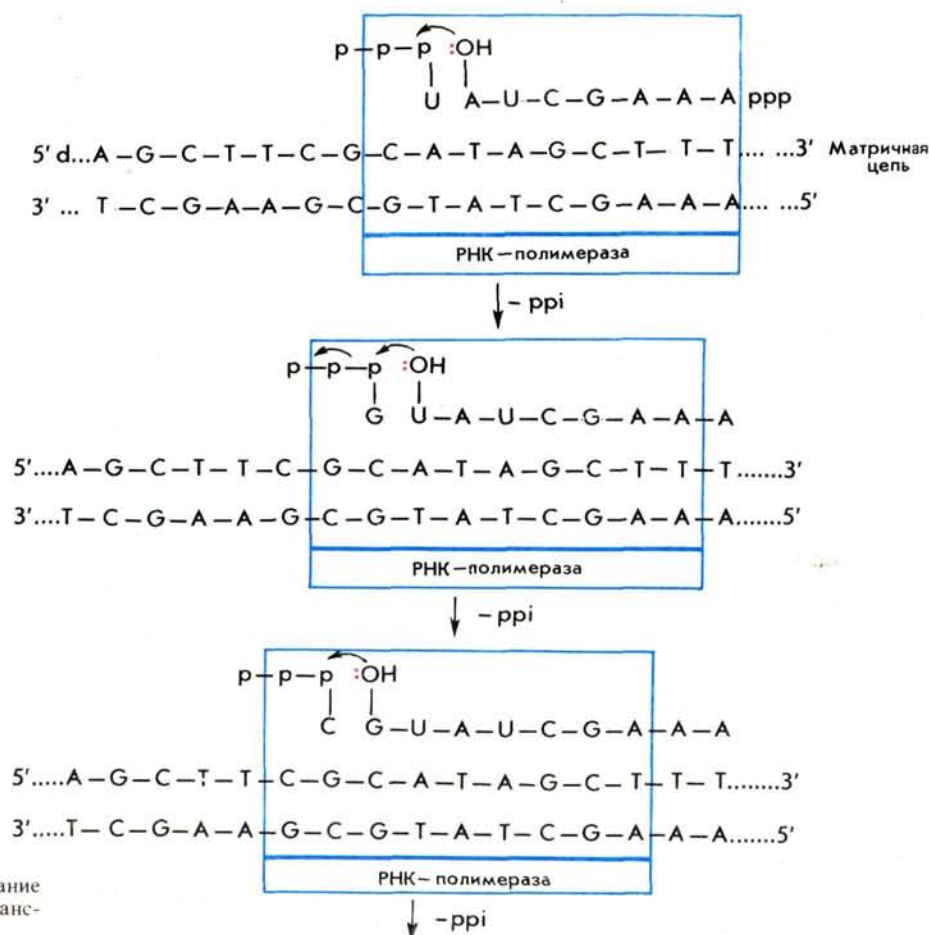


Рис. 234. Последовательное копирование одной из цепей ДНК в процессе транскрипции.

Процессы с участием
нуклеиновых кислот:
репликация, транскрипция
и трансляция



Свердлов Евгений Давидович (р. 1938), советский химик-биоорганик, член-корреспондент АН СССР (1984). Окончил Московский государственный университет (1961), работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шелякина АН СССР. Основные работы — в области химии нуклеиновых кислот и генной инженерии. Осуществил клонирование генов интерферона человека и получил штаммы-суперпродукты этих белков. Предложил ряд методов исследования первичной и высших структур нуклеиновых кислот. Лауреат Государственной премии СССР (1982) и Ленинской премии (1985).

Бактериальная хромосома содержит около 4000 генов, которые могут транскрибироваться как независимо друг от друга, так и координированно. Независимая транскрипция гена возможна, если он обладает собственным промотором и терминатором транскрипции. При координированной транскрипции группа генов имеет общий промотор и общий терминатор и составляет один непрерывный участок ДНК; мРНК, иницируемая на общем промоторе, содержит информацию для синтеза нескольких полипептидов и называется полицистронной. Группа генов, которые транскрибируются совместно, называется опероном.

РНК-полимеразы бактерий содержат четыре субъединицы — α , β , β' и δ , которые образуют комплекс $\alpha_2\beta\beta'\delta$, называемый полным ферментом (холоферментом). Первичная структура α, β, β' -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli* была установлена Е. Д. Свердловым, В. М. Липкиным, Н. Н. Модяновым, Г. С. Монастырской и др. (СССР). Полный фермент $\alpha_2\beta\beta'\delta$ способен «узнать» промотор и связаться с ним с образованием прочного комплекса (рис. 235). В ряде случаев доказано, что при образовании такого комплекса в промоторной последовательности (включающей в среднем около 40 п. о.) расплетается небольшой (10—15 п. о.) участок ДНК. Вслед за этим происходит инициация синтеза РНК, в результате которой образуется первая фосфодиэфирная связь. Первый нуклеотид на 5'-конце синтезируемой РНК называется иницирующим. Чаще всего это пуриновый нуклеотид. После того как синтезируется сравнительно короткий олигорибонуклеотид, δ -субъединица отделяется от фермента, и дальнейшую полимеризацию (элонгацию) осуществляет комплекс $\alpha_2\beta\beta'$, который называется минимальным ферментом (кор-ферментом). δ -Субъединицу можно рассматривать как фактор позитивной регуляции транскрипции.

Для терминации транскрипции на ДНК имеются особые сигналы — терминаторные последовательности. В этом случае терминация осуществляется минимальным ферментом, но иногда необходим дополнительный белковый фактор, названный «ро» (ρ). Таким образом, общая схема транскрипции выглядит так, как изображено на рисунке 235.

В бактериальной клетке существует очень большое число промоторов, различающихся по нуклеотидной последовательности и эффективности инициации синтеза РНК. Часто их условно делят на сильные и слабые. Сильные промоторы обеспечивают высокий уровень синтеза РНК с оперонов, находящихся под их контролем, а слабые — соответственно низкий уровень. Использование промоторов различной силы является одним из способов регуляции синтеза РНК в клетке. Количество синтезированной РНК определяет уровень биосинтеза белка. Многие белки требуются клетке на протяжении всей ее жизни. Их количество зависит главным образом от эффективности промоторов, иницирующих синтез соответствующих мРНК. Однако у клетки существуют и более радикальные способы регуляции на уровне транскрипции. Она их использует в случае необходимости для того, чтобы включать или выключать транскрипцию некоторых генов, ускорять или замедлять ее.

Рассмотрим некоторые из них на примере регуляции лактозного оперона *E. coli*, обеспечивающего способность бактериальной клетки использовать в качестве источника углерода дисахарид лактозу. Этот оперон, называемый *lac*-опероном, явился одной из первых систем, позволивших Ф. Жакобу и Ж. Моно сформулировать концепцию регулируемого оперона.

Если клетки *E. coli* растут в среде, содержащей лактозу, то в них синтезируется фермент β -галактозидаза, гидролизующий этот дисахарид до глюкозы и галактозы, которые далее усваиваются клеткой. Оказывается, что если источником углерода для *E. coli* является глюкоза, то β -галактозидаза не синтезируется. Однако если в среду, в которой растут клетки, добавить негидролизующий аналог лактозы — изопропил- β -D-тиогалактозид, то начинается (индуцируется) синтез β -галактозидазы. Соединения, которые, подобно лактозе и изопропил- β -D-тиогалактозиду, способны индуцировать синтез белков (в данном случае β -галактозидазы), в других условиях называются индукторами.

Механизм индукции β -галактозидазы хорошо установлен. В лактозный оперон, кроме гена, кодирующего β -галактозидазу *lacZ* входят еще два структурных гена *lacY* и *lacA* (рис. 236), транскрипция которых проходит под контролем одного промотора, называемого *lac*-промотором. Ген *lacZ* кодирует β -галактозидазу, ген *lacY* — белок галактозидпермеазу, который обеспечивает транспорт галактозидов из среды в клетку, и ген *lacA* — фермент тиогалактозид ацетилтрансферазу (рис. 236, а). Перед *lac*-опероном находится еще один ген, названный *lacI*, который кодирует белок-регулятор

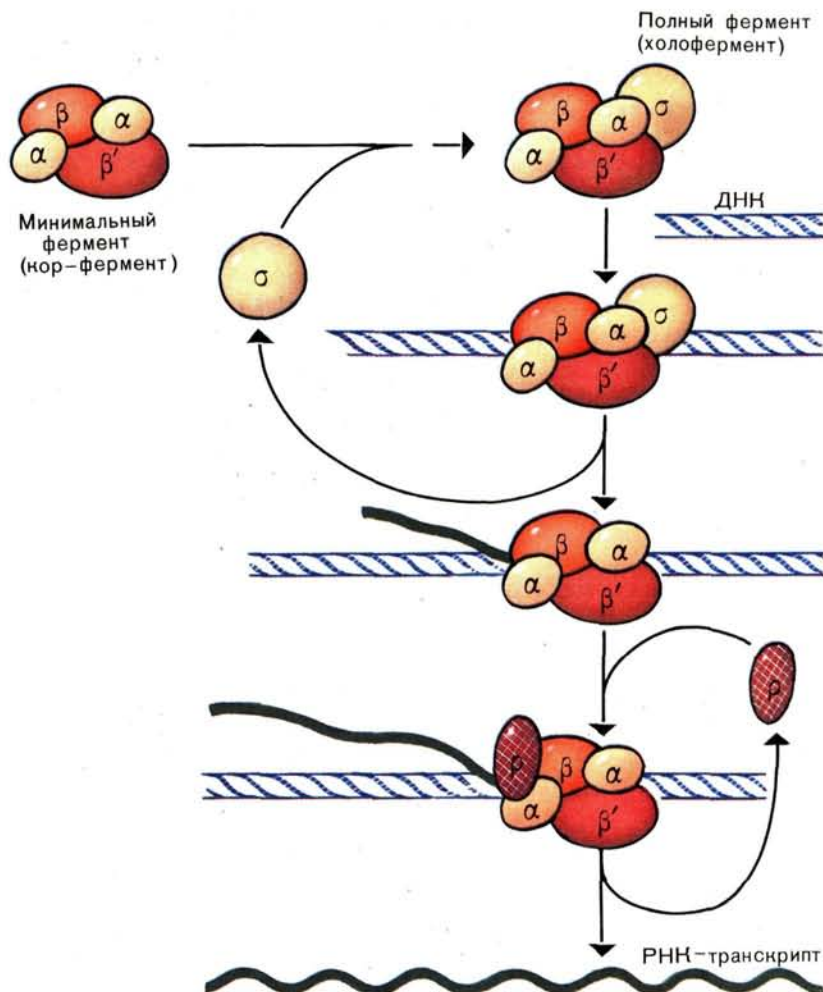


Рис. 235. Схема синтеза РНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы.

способный прочно связываться со специальным участком ДНК — оператором. И *lac*-промотор, и *lac*-оператор находятся между геном *lacI* и *lac*-опероном. В отсутствие лактозы белок гена *lacI* связывается с операторным участком ДНК в непосредственной близости от промотора и препятствует взаимодействию с ним РНК-полимеразы. Другими словами, белок запрещает (репрессирует) транскрипцию; он назван *lac*-репрессором (рис. 236, б). Регуляция по типу запрета транскрипции называется негативной.

При появлении в среде лактозы или другого индуктора последний связывается с репрессором, образуя прочный комплекс. В результате репрессор отделяется от ДНК, освобождая промотор для взаимодействия с РНК-полимеразой. Однако в случае *lac*-оперона удаление репрессора оказывается недостаточным для того, чтобы началась эффективная транскрипция. В системе участвует еще один регуляторный элемент, который активирует транскрипцию. Активация происходит за счет взаимодействия комплекса цикло-АМР-связывающего белка САР (от англ. catabolite activator protein) и 3', 5'-цикло-АМР с участком ДНК, также примыкающим к промотору, но со стороны, противоположной оператору (рис. 236, в). Такой тип регуляции называется позитивным.

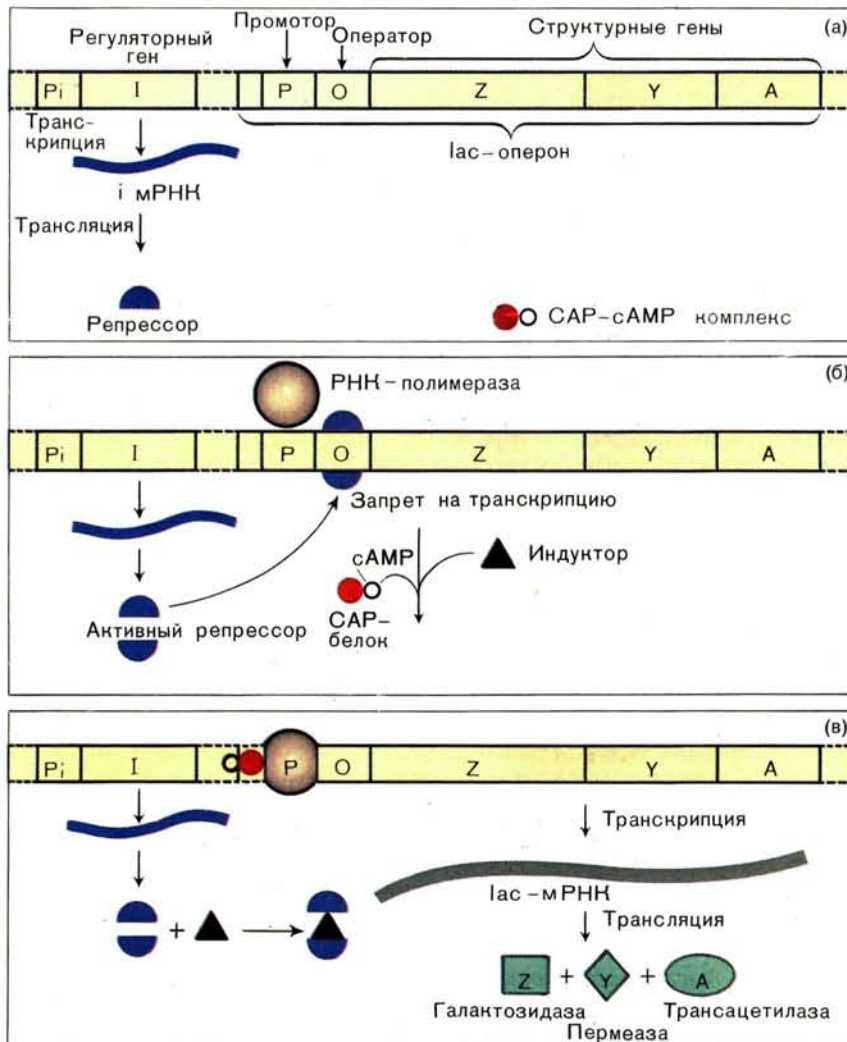


Рис. 236. Структура *lac*-оперона *E. coli* (а) и механизмы регуляции его транскрипции: репрессии (б), активации и индукции (в).

Транскрипция в клетках эукариот



Жакоб [Якоб] Франсуа (р. 1920), французский микробиолог и генетик. Окончил Парижский университет (1947), с 1965 г. — профессор кафедры генетики клетки в Коллеж де Франс. Основные работы посвящены генетике бактериальных клеток и вирусов. Предложил схему регуляции активности генов. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с А. М. Львовым и Ж.-П. Моно).

Даже самая маленькая эукариотическая клетка в 5—10 раз больше бактериальной и устроена значительно сложнее. В каждой эукариотической клетке транскрибируется только незначительная часть ДНК. В клетках различных тканей транскрипция затрагивает как общие для всех видов клеток данного организма гены, так и специфичные для данной ткани.

При клеточной дифференцировке, происходящей в процессе эмбрионального развития, транскрипция различных генов претерпевает последовательные изменения как качественного, так и количественного характера. Каждая стадия дифференциации включает в себя активацию очень большого числа структурных генов. Образование индивидуальных тканей связано с синтезом мРНК, которые кодируют белки, характерные для данной ткани. Несмотря на то, что во всех тканях одного и того же организма имеется полный набор хромосом и генов, в одних видах клеток наблюдается транскрипция тех генов, которые не транскрибируются в других. Это означает, что и в процессе дифференцировки и функционирования клеток должны существовать способы контроля транскрипции, необходимые для активации или репрессии определенных генов. Существует несколько принципиальных различий в условиях транскрипции у про- и эукариот: количество ДНК у эукариот в расчете на клетку в несколько тысяч раз больше, чем у прокариот, и если у бактерии существует одна хромосома, то у эукариотических клеток гены распределены между разными хромосомами. Кроме того, в эукариотах транскрибируется хроматин, расположенный в ядре, а синтезированная информационная РНК транспортируется в цитоплазму, тогда как у бактерий ядра нет и синтеза РНК и белка не разделены в пространстве.

Сложность регуляции транскрипции в эукариотических клетках проявляется в том, что в них различные типы РНК синтезируются с помощью различных РНК-полимераз. В эукариотической клетке обнаруживается четыре типа РНК-полимераз, три из которых — РНК-полимеразы I, II и III — локализованы в ядре и одна — в митохондриях. Клетки растений содержат еще одну полимеразу, локализованную в хлоропластах. В ядре РНК-полимераза I обнаруживается в ядрышках — структурных образованиях, где сосредоточены гены рибосомных РНК, тогда как полимеразы II и III — в нуклеоплазме. РНК-полимераза I отвечает за синтез рибосомных 18S, 28S и 5,8S РНК. Рибосомная 5S РНК и транспортные РНК синтезируются РНК-полимеразой III. РНК-полимераза II осуществляет синтез предшественников мРНК.

Для каждой из полимераз существуют свои способы контроля, которые осуществляются специфическими белками-регуляторами, взаимодействующими с полимеразами и определенными последовательностями ДНК. Кроме того, у эукариот появляется еще один новый тип контроля — контроль на уровне регуляции макроструктуры хроматина. При этом определенные участки хромосомы оказываются способными к активной транскрипции, тогда как транскрипция других запрещена.

Установлено, что структура хроматина в той области, где происходит транскрипция генов, отличается от структуры нетранскрибируемых участков. Структура хромосомы в транскрибируемой области меняется, на ней образуются утолщения (так называемые «пуффы») и т. п. Электронная микроскопия показывает, что активный хроматин значительно менее компактен, чем неактивный, и в ряде случаев даже теряет нуклеосомную структуру. При этом изменения в структуре хроматина предшествуют активации транскрип-

ции, а не наоборот. Высказывается предположение, что изменение структуры хроматина связано с действием негистоновых белков, модификацией гистонов или модификацией ДНК.

Обнаружены особые регуляторные элементы, названные энхансерами (от английского enhance — усиливать), которые резко увеличивают эффективность транскрипции эукариотических генов. Особенностью этих элементов является то, что они проявляют свою активность независимо от ориентации и положения относительно активируемого гена: они могут находиться перед геном, внутри гена или за ним.

В том случае, когда гены являются индуцируемыми, по-видимому, должен существовать механизм, включающий в себя взаимодействие регуляторных молекул со специфическими последовательностями ДНК. Примером индуцируемых генов являются гены, регулируемые стероидными гормонами. По-видимому, индукция происходит за счет связывания комплекса гормона и специфического белка-рецептора с регуляторной последовательностью ДНК, что приводит к резкой активации транскрипции.

Процессинг РНК

В результате транскрипции получается РНК, которая еще не готова к выполнению своих функций. Она содержит целый ряд «лишних» последовательностей, которые должны быть удалены, и, кроме того, не содержит минорных компонентов.

Под термином «процессинг» понимают совокупность ферментативных процессов, в результате которых синтезируемая в процессе транскрипции РНК превращается в функционально полноценную молекулу.

В наиболее изученной из прокариотических клеток — кишечной палочке *E.coli* не известны примеры процессинга мРНК. Эти молекулы синтезируются сразу в «зрелом» виде. В то же время все стабильные РНК *E.coli* (т. е. рибосомные и транспортные РНК) синтезируются в виде предшественников, которые затем превращаются в зрелые молекулы. В этот процесс вовлечена серия ферментов, в том числе эндо- и экзонуклеазы.

В отличие от прокариот, в клетках эукариот все РНК, в том числе и информационные, образуются в результате процессинга. Предшественники эукариотических мРНК называются гетерогенными ядерными РНК (гяРНК).

Основные стадии процессинга гяРНК изображены на рисунке 237. Сразу после начала транскрипции предшественник мРНК присоединяет так называемый «кэп» к 5'-концевому звену, в результате чего образуется сочленение $m^7G^5'ppp^5'Nm$, в котором концевой 7-метилгуанозин связан 5', 5'-пирофосфатной связью с метилированным 5'-концевым нуклеотидом РНК. После транскрипции в ядре к 3'-концу образовавшейся гетерогенной ядерной РНК добавляется сегмент поли(А). Практически у всех исследованных мРНК, содержащих поли(А), на расстоянии 10—25 нуклеотидов от места ее присоединения обнаруживается консервативная последовательность AAUAAA, которой приписывается роль сигнала присоединения поли(А).

Присоединение поли(А) обычно предшествует так называемому «сплайсингу» гяРНК. Термин «сплайсинг» берет свое начало от английского слова splice, которое в морской практике означает

Процессы с участием
нуклеиновых кислот:
репликация, транскрипция
и трансляция



Георгиев Георгий Павлович (р. 1933), советский биохимик, академик АН СССР (1987). Окончил 1-й Московский медицинский институт (1956), с 1963 г. работает в Институте молекулярной биологии АН СССР. Основные работы посвящены изучению механизма реализации генетической информации. Исследовал ядерные рибонуклеопротеидные частицы, содержащие про-мРНК (ядерные информосомы). Изучил в геноме животных подвижные, рассеянные по хромосомам генетические элементы. Лауреат Ленинской премии (1976) и Государственной (1983) премии СССР.

«сращивать концы тросов». Этот процесс обусловлен сложным строением большинства эукариотических генов, в которых кодирующая последовательность не является непрерывной, как в мРНК, а разбита вставками некодирующих последовательностей, называемых интронами, как это показано на рисунке 237. Таким образом, в обычном гене эукариотического организма кодирующие последовательности (экзоны) перемежаются некодирующими последовательностями (интронами). Первичный продукт транскрипции — гяРНК содержит и экзоны, и интроны. Для образования мРНК из нее необходимо убрать интроны и соединить экзоны в непрерывную кодирующую последовательность. Это и происходит в процессе сплайсинга.

Метилирование мРНК также является одной из ступеней процессинга. В результате этой модификации мРНК содержит в среднем приблизительно один остаток 6-метиладенина (m^6A) на каждые 400 остатков А.

Претерпевшая процессинг мРНК в виде нуклеопротеидного комплекса покидает ядро через поры в ядерной мембране и поступает в цитоплазму для трансляции. В эукариотической клетке вся РНК, за исключением транспортной, содержится в виде нуклео-

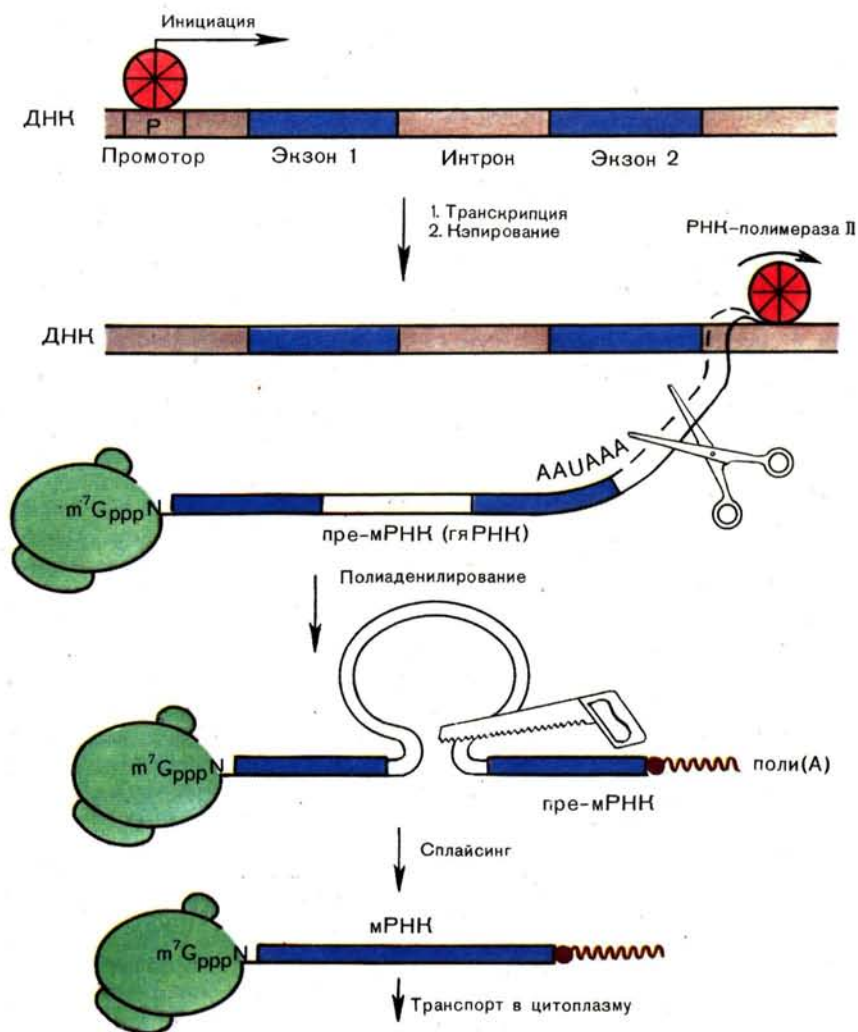


Рис. 237. Схема процессинга пре-мРНК (гяРНК) в ядре.



Ниренберг (Nirenberg) Маршалл Уоррен (р. 1927), американский биохимик. Окончил университет в Майами (1948), с 1962 г. — заведующий лабораторией биохимической генетики Лингвского национального института сердца в Бетесде. Ему принадлежат основополагающие труды по расшифровке генетического кода. Синтезировал и испытал все 64 теоретически возможных тринуклеотида, укомплектовал кодовый словарь. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Р. Холли и Г. Кораной).

протеидных комплексов. Так, зрелая мРНК в ядре связана с определенным набором белков, называемых информосомами (Г. П. Георгиев), и в комплексе с ними переносится в цитоплазму, где формируются другие мРНК-содержащие рибонуклеопротеидные частицы — информосомы (А. С. Спиринов, Л. П. Овчинников).

В составе информосом мРНК защищена от клеточных нуклеаз и время жизни ее достаточно велико по сравнению с мРНК в прокариотических клетках.

Роль белков, связанных с мРНК, а также функция поли(А)-концов, как, впрочем, и «кэп»-структур на 5'-конце, еще далеко не ясна. Например, в ряде случаев наблюдается укорочение поли(А) в цитоплазме, а некоторые мРНК (например, мРНК гистонов) вообще лишены этой последовательности. Таким образом, к настоящему моменту основные пути экспрессии генов эукариот представляются только в самом общем виде и предстоит еще долгая кропотливая работа, чтобы выяснить детали механизма процесса.

Трансляция

Важным этапом на пути экспрессии гена является трансляция синтезированной мРНК. Трансляция — сложный многоступенчатый процесс синтеза полипептидной цепи согласно информации, заключенной в последовательности нуклеотидов мРНК. Трансляция осуществляется на рибосоме, в нее вовлечены также белковые факторы, ГТР и аминоацил-тРНК — молекулы тРНК, несущие активированные аминокислоты. Как и другие процессы матричного синтеза, процесс трансляции условно делят на три стадии: инициация, элонгация и терминация.

При инициации происходит специфическое связывание рибосомы с мРНК и с первой аминоацил-тРНК, называемой инициаторной, в результате чего образуется комплекс, способный к синтезу белка, — инициаторный комплекс. При элонгации осуществляется последовательное связывание аминоацил-тРНК с образованием пептидных связей по программе, задаваемой последовательностью кодонов в мРНК. Терминация представляет собой отщепление готовой белковой цепи от трансляционного комплекса. Все этапы синтеза белка осуществляются при участии специальных белковых факторов, которые называются соответственно факторами инициации IF, элонгации — EF и терминации RF. Энергия для процесса трансляции черпается при гидролизе ГТР.

В ходе трансляции нуклеотидная последовательность мРНК считывается в направлении от 5'-к 3'-концу. Считывание происходит по законам генетического кода, согласно которым каждой аминокислоте соответствует триплет нуклеотидов (кодон), каждый кодон кодирует только одну аминокислоту, а последовательность кодонов в мРНК определяет аминокислотную последовательность синтезируемого белка. Функцию узнавания кодона осуществляет не сама аминокислота, а молекула тРНК, к которой она присоединена и которая содержит последовательность нуклеотидов, комплементарную кодону, — антикодон. Иными словами, тРНК служит адаптором, обеспечивающим соответствие между кодоном и кодируемой им аминокислотой. Наличие адаптора — основное отличие трансляции, как процесса матричного синтеза, от транскрипции и репликации, в которых продукт имеет ту же химическую природу, что и



Очоа [Очоа] Северо (р. 1905), американский биохимик испанского происхождения. Образование получил в университетах Малаги и Мадрида, в настоящее время руководит Центром молекулярной биологии Мадридского университета. Автор фундаментальных работ по биохимии нуклеиновых кислот, изучению ферментативных превращений углеводов и жиров. Впервые осуществил (1955) ферментативный синтез РНК. Внес большой вклад в расшифровку генетического кода. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1959, совместно с А. Корнбергом).

матрица. Адапторная гипотеза биосинтеза белка была сформулирована Ф. Криком в 1958 г.

Генетический код един для всех организмов. Он содержит 64 кодона — число возможных сочетаний из четырех нуклеотидов по три (рис. 238). Три кодона — UAG, UGA и UAA — не кодируют аминокислоты, а являются сигналами окончания белкового синтеза. Они называются бессмысленными (nonsense) или стоп-кодонами. Остальные триплеты (61) — это смысловые кодоны, которые соответствуют 20 различным аминокислотам. История расшифровки генетического кода представляет собой цепь догадок, гипотез и открытий, связанных с именами Ф. Крика, С. Бреннера, М. Ниренберга, С. Очоа, Г. Кораны. Так как число триплетов превышает число аминокислот, генетический код является вырожденным. Большинство аминокислот кодируется несколькими кодонами. Каким образом реализуется такая ситуация? Для этого существует две возможности. Во-первых, одна молекула тРНК, специфичная к определенной аминокислоте, может взаимодействовать более чем с одним кодоном. Оказалось, что в этом случае точное образование комплементарных пар обязательно только для первых двух букв кодона, а в третьем положении допускается образование «неклассических» пар. Идея о том, что на спаривание третьего основания кодона накладываются менее жесткие ограничения, принадлежит Ф. Крику и была сформулирована в его гипотезе «качания» (wobble-гипотезе, или гипотезе неоднозначного соответствия). Согласно этой гипотезе, сейчас уже доказанной, допускается образование пар между U и G, с I (инозин) и U, C или A. Действительно, в тРНК, взаимодействующих более чем с одним кодоном, первым основанием антикодона (взаимодействующим с третьим основанием кодона) часто оказывается минорное основание инозин.

В клетке реализуется и другая ситуация, когда для одной аминокислоты существует несколько специфичных тРНК. Такие тРНК называются изоакцепторными.

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Stop UAG }	UGU } Cys UGC } UGA } Stop UGG } Trp	U C A G
C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } Arg CGC } CGA } CGG }	U C A G
A	AUU } Ile AUC } AUA } Met AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	U C A G

Рис. 238. Генетический код.

Активация аминокислот: тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы

Присоединение аминокислот к тРНК осуществляют специальные ферменты — аминоацил-тРНК-синтетазы (АРСазы). Для каждой аминокислоты существует один фермент, который узнает все изоакцепторы тРНК, способные присоединять эту аминокислоту; однако синтетазы одинаковой специфичности, но происходящие из разных источников, отличаются друг от друга. Реакция аминоацилирования тРНК протекает в две стадии, катализируемые одной и той же синтетазой (рис. 239).

Процессы с участием
нуклеиновых кислот:
репликация, транскрипция
и трансляция

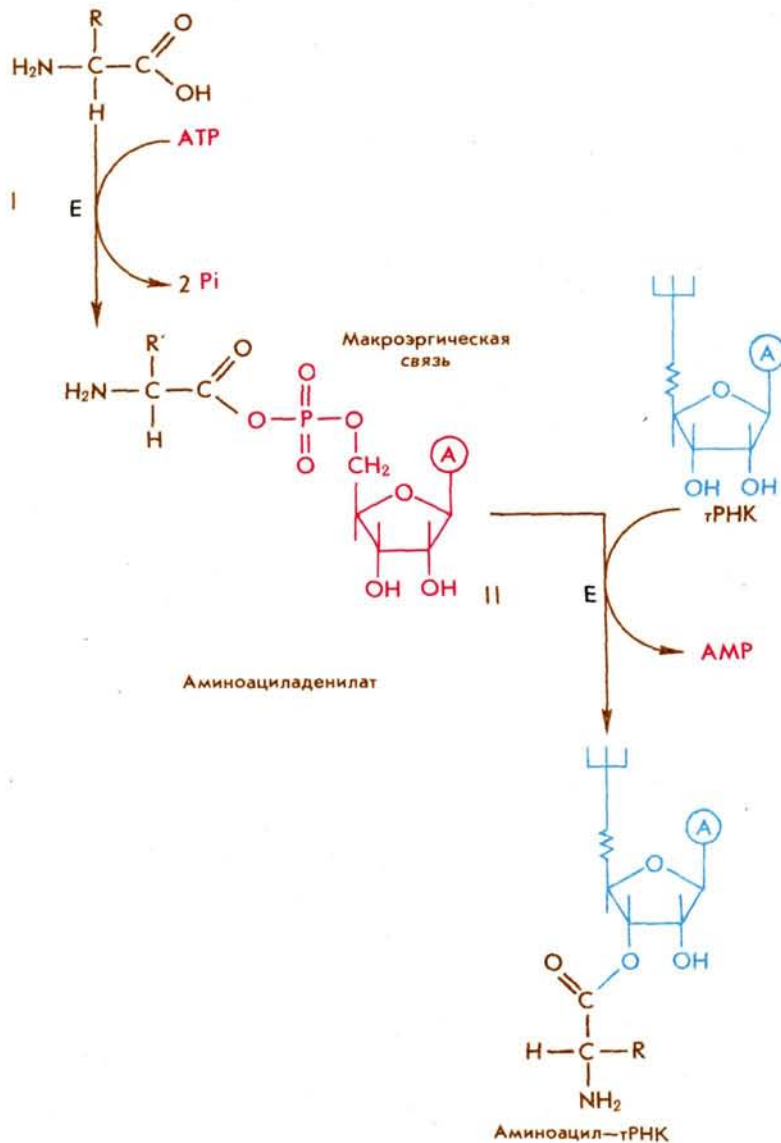


Рис. 239. Реакция аминоацилирования тРНК, катализируемая аминоацил-тРНК-синтетазой (Е).

Как в прокариотических, так и в эукариотических организмах синтез белка начинается с присоединения особой (инициаторной) тРНК, которая всегда несет остаток метионина. По ряду особенностей она отличается от тРНК, несущей ту же аминокислоту для продолжения синтеза белковой цепи. Для инициаторной тРНК существует своя синтетаза. В прокариотических клетках аминогруппа метионина, связанного с инициаторной тРНК, модифицируется с помощью специального фермента. Заряженная и формилированная инициаторная тРНК обозначается как $fMet\text{-}tRNA^{Met}$; обычная метионил-тРНК — как $Met\text{-}tRNA^{Met}$. У эукариот также существует особая инициаторная тРНК, несущая метионин, но формилирование отсутствует.

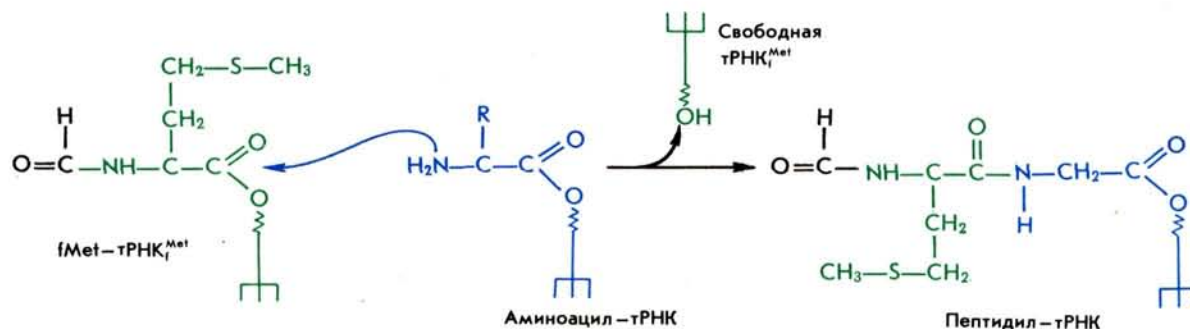


Рис. 240. Синтез первой пептидной связи.

В процессе белкового синтеза происходит последовательное присоединение аминокислот: сначала карбоксильная группа остатка формилметионина атакуется аминогруппой следующей аминокислоты с образованием пептидной связи (рис. 240), а далее процесс повторяется многократно до того момента, пока в мРНК не встретится терминирующий кодон.

Все эти события происходят на рибосоме и осуществляются с помощью факторов трансляции.

Белковые факторы, участвующие в трансляции

Помимо белков, входящих в состав рибосом, в биосинтезе белка принимает участие большое число белковых факторов, которые связываются с рибосомой только на определенных этапах трансляции и, выполнив свою функцию, отделяются. В *E.coli* в инициацию трансляции вовлечено три фактора — IF-1, IF-2 и IF-3 (IF — от initiation factor), которые представляют собой мономерные белки и обычно ассоциированы с 30S субъединицей рибосом. Факторы инициации катализируют реакции связывания мРНК (IF3) и формилметионил-тРНК (IF2) с рибосомой. IF1 стимулирует обе реакции, но играет подчиненную роль и не проявляет активности в отсутствие IF2 и IF3. У эукариот в инициацию вовлечено по мень-

шей мере 8 факторов (обозначаются EIF — eukaryote initiation factors), причем аналоги IF2 и IF3 имеют субъединичное строение. Так, EIF2, ответственный за связывание инициаторной тРНК, состоит из 9 субъединиц. Участие большого числа белковых факторов в эукариотической инициации, возможно, объясняется сложной системой контроля и регуляции этого процесса.

В *E.coli* на стадии элонгации работают три фактора — EF-Tu, EF-Ts и EF-G (EF — от elongation factor). Фактор Tu (u — от unstable, нестабильный) осуществляет транспортную функцию и переносит аминоксил-тРНК на рибосому, фактор Ts (s — от stable, стабильный) регенерирует активную форму Tu, образуя с ним комплекс Tu-Ts; EF-G участвует в транслокации, т. е. перемещении рибосом от кодона к кодону мРНК.

Такие же факторы существуют и у эукариот. Например, факторы EF-1 и EF-2 аналогичны по функции EF-Tu и EF-G соответственно.

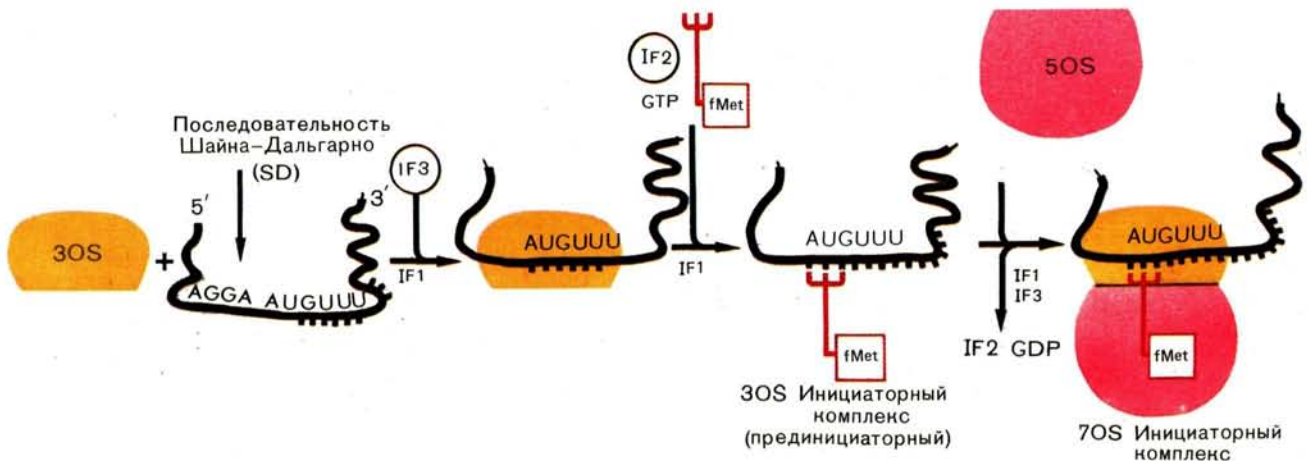
Наконец, в *E.coli* два белка катализируют на рибосоме гидролитическое отщепление полипептидной цепи от пептидил-тРНК. Эти белки проявляют специфичность по отношению к терминирующим кодоном: RF-1 осуществляет катализ, если терминирующими кодонами являются UAA и UAG, а RF-2 узнает кодоны UAA и UGA. Есть еще один фактор терминации — RF-3, который не имеет собственной каталитической активности, но стимулирует действие факторов RF-1 и RF-2. В клетках млекопитающих известен единственный RF-фактор, который узнает все три терминирующих кодона.

Процессы с участием
нуклеиновых кислот:
репликация, транскрипция
и трансляция

Инициация трансляции

Инициация трансляции в про- и эукариотических клетках имеет много общих черт. При инициации рибосомы диссоциируют на субъединицы и малая субъединица связывается с мРНК и инициаторной тРНК под действием IF-факторов. К образовавшемуся прединициаторному комплексу присоединяется большая субъединица, IF-факторы отщепляются и образуется зрелый 70S инициаторный комплекс, готовый к синтезу белка (рис. 241). Однако прежде

Рис. 241. Образование инициаторного комплекса у прокариот.



чем образовать преинициаторный комплекс, малой субъединице рибосомы приходится определить место начала синтеза белка, т. е. найти на мРНК инициирующий кодон (в общем случае это AUG, однако у прокариот иногда встречается GUG или даже AUU, причем все они связывают иницииаторную формилметионил-тРНК). В структуре любой мРНК последовательность AUG встречается многократно, тем не менее субчастица узнает именно тот кодон, который соответствует первой аминокислоте синтезируемого белка. У прокариот и эукариот это узнавание происходит по-разному, но в обоих случаях информацию о начале синтеза рибосома получает из структуры мРНК.

Прокариотические матрицы полицистронны и в большинстве случаев содержат в 5'-концевой области, а также в межцистронных областях нетранслируемые последовательности, которым принадлежит важная регуляторная роль. Существует гипотеза, выдвинутая в 1974 г. Дж. Шайном и Л. Дальгарно, согласно которой рибосома определяет место инициации с помощью образования комплекса между 3'-концевым участком рибосомной 16S РНК и участком мРНК, расположенным перед инициирующим кодоном. Действительно, анализ структуры большого количества генов показывает, что на расстоянии 3 — 12 нуклеотидов от инициирующего кодона в большинстве мРНК содержатся последовательности, комплементарные 3'-концу 16S РНК. Более того, в ряде случаев из инициаторного комплекса удается после нуклеазного гидролиза выделить дуплекс, содержащий 3'-концевой фрагмент 16S РНК и комплементарный ему участок мРНК (Дж. Стейц).

Известны мутации, которые уменьшают степень комплементарности между концом 16S РНК и областью, предшествующей инициирующему кодону. В таком случае скорость синтеза белка понижается. Есть и другие аргументы, которые подтверждают значение этой комплементарности для инициации трансляции. Последовательность в мРНК, предшествующую инициирующему кодону и комплементарную 3'-концу 16S РНК, называют последовательностью Шайна — Дальгарно, она обозначается по первым буквам фамилий авторов гипотезы SD. Однако для определения места и эффективности инициации недостаточно только сочетания последовательности Шайна — Дальгарно и инициирующего кодона. Несомненно, в этом процессе участвуют и другие элементы структуры мРНК. Существуют серьезные доводы в пользу того, что большую роль играет здесь вторичная структура мРНК.

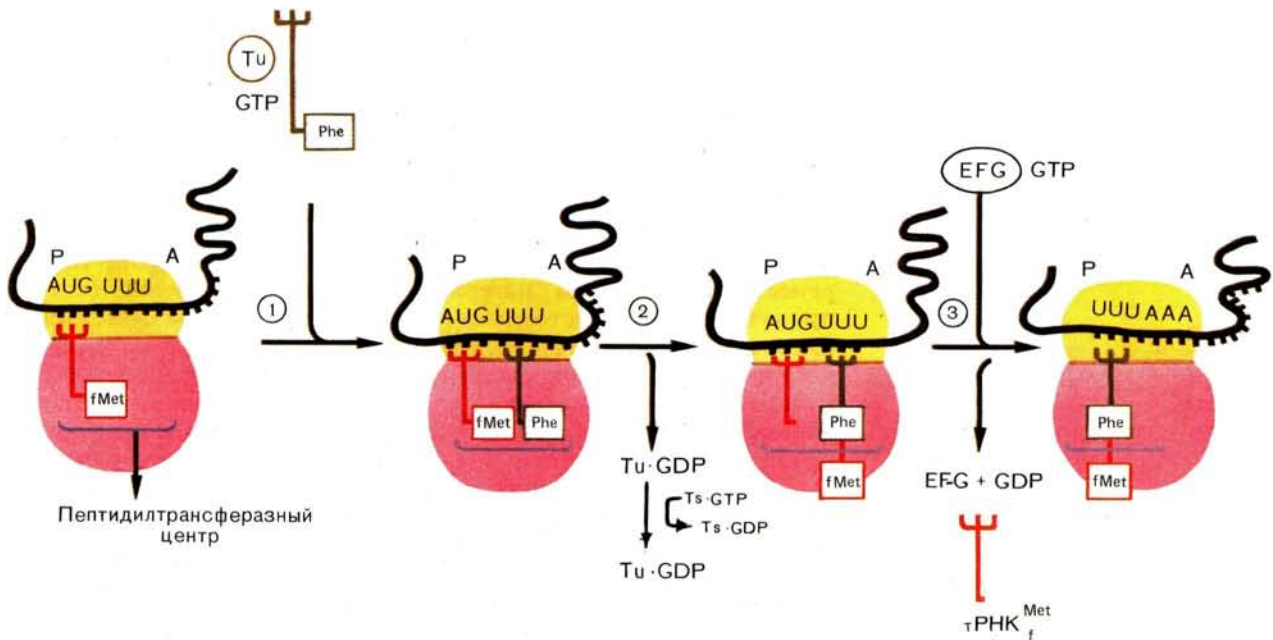
Последовательность, аналогичная Шайна — Дальгарно, как правило, отсутствует в эукариотических мРНК. Эукариотические матрицы моноцистронны и содержат на 5'-конце «кэп»-структуру, узнаваемую одним из факторов инициации эукариотической трансляции. Предполагается, что малая 40S субчастица рибосом связывается непосредственно на 5'-конце мРНК и как бы «едет» по ней в 3'-направлении до тех пор, пока не встретится первый AUG кодон, который в большинстве случаев и является инициирующим. Далее происходит присоединение 60S субчастицы, сборка полного инициаторного комплекса и начинается синтез полипептидной цепи. Эта так называемая «сканирующая модель» инициации трансляции у эукариот была предложена несколько лет назад М. Козак. Однако даже в этом случае инициирующий кодон, как было показано путем анализа известных 5'-концевых структур эукариотических матриц, находится в особом окружении, которое, по-видимому, и является сигналом остановки малой субчастицы и начала сборки полной транслирующей рибосомы.

Элонгация, в свою очередь, состоит из трех основных стадий: связывание аминоацил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация (рис. 242). В рибосоме условно выделяют два функ-

циональных центра — А-центр, в который помещается каждая вновь вступающая в реакцию аминоацил-тРНК, и Р-центр, в котором располагается тРНК с присоединенной к ней растущей пептидной цепью (пептидил-тРНК). Фактор элонгации EF-Tu образует комплекс с GTP, который, в свою очередь, взаимодействует с аминоацил-тРНК с образованием тройного комплекса. Комплекс связывается с рибосомой, так что аминоацил-тРНК оказывается в А-центре, и ее антикодон образует комплементарный комплекс с кодоном мРНК. При этом происходит гидролиз GTP и комплекс Tu-GDP отделяется от рибосомы. В результате аминоацил-тРНК в А-центре располагается рядом с пептидил-тРНК, которая находится в Р-центре и взаимодействует с предыдущим кодоном. Фермент пептидилтрансфераза, являющийся структурной частью 50S субчастицы, переносит пептидную цепь на новую аминокислоту, в результате чего вновь вошедшая аминоацил-тРНК превращается в пептидил-тРНК, а прежняя пептидил-тРНК оказывается незаряженной (рис. 242).

После этого происходит транслокация: новая пептидил-тРНК перемещается в Р-центр, незаряженная тРНК отделяется от рибосомы, рибосома передвигается по мРНК на один триплет и в А-центре оказывается следующий кодон мРНК. Рибосома готова к приему следующей аминоацил-тРНК. Транслокация катализируется фактором EF-G.

Рис. 242. Стадия элонгации. Синтез первой пептидной связи: 1 — EF-Tu — зависимое связывание аминоацил-тРНК с А-участком рибосомы; 2 — пептидилтрансферазная реакция; 3 — EF-G — зависимая транслокация.



Терминация

Наконец, последняя стадия — терминация осуществляется, когда рибосома достигает терминирующего кодона — UAA, UAG или UGA, который оказывается в А-центре. В этой ситуации к рибосоме

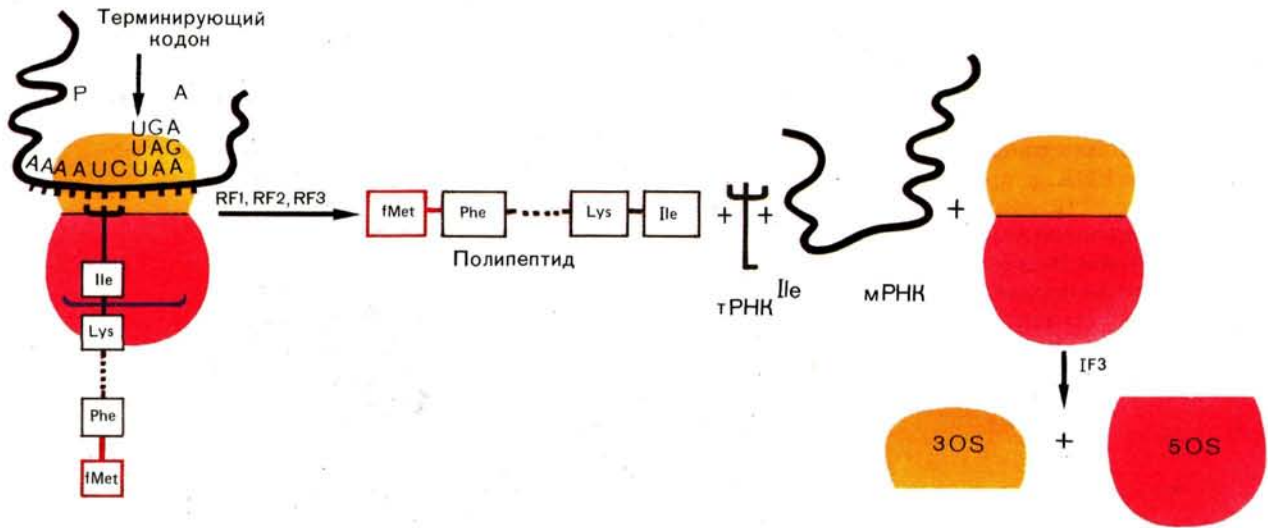


Рис. 243. Терминация белкового синтеза.

присоединяется один из RF-факторов, в результате чего происходит гидролиз сложноэфирной связи, соединяющей полипептид и тРНК. От пептидил-тРНК отщепляется готовая белковая цепь, незаряженная тРНК покидает рибосому, и процесс трансляции завершается (рис. 243).

Генная инженерия

Генная инженерия, или техника рекомбинантных ДНК, — это совокупность приемов, позволяющих путем операций *in vitro* перенести генетический материал из одного организма (который принято называть источником генов) в другой (называемый хозяином или реципиентом) таким образом, чтобы обеспечить наследование этих генов в новом для них организме. Перенос генов методами генной инженерии дает возможность преодолевать межвидовые барьеры и передавать отдельные наследственные признаки одних организмов другим (например, от человека или животного — бактерии и т. п.). В генной инженерии широко используются подходы и методы биоорганической химии.

В самом общем виде принцип генной инженерии изображен на рисунке 244. В какой-либо из заранее выделенных репликонов хозяина вводят *in vitro* нужный ген из другого источника. Полученную таким образом рекомбинантную молекулу, сохраняющую

свойства репликона, снова внедряют в клетку-хозяина, в которой он будет реплицироваться и стабильно передаваться клеткам-потомкам при делении.

Для реализации этой идеи требуется соответствующий репликон, который может легко выделяться, сохранять свои свойства и способен внедряться в клетку после введения в него чужеродной ДНК и, наконец, стабильно наследоваться. Репликоны, предназначенные для введения чужеродных ДНК в клетки, называются векторами.

В распоряжении исследователя должны быть способы соединения исходных генов с вектором и введения рекомбинантных репликонов в клетку-хозяина. Необходимо также уметь отличать клетки, содержащие рекомбинантный репликон, от исходных реципиентных клеток.

После введения нужного гена в реципиентную клетку задачи в зависимости от поставленной цели могут быть различными. Иногда оказывается достаточным просто внедрить чужеродный генетиче-

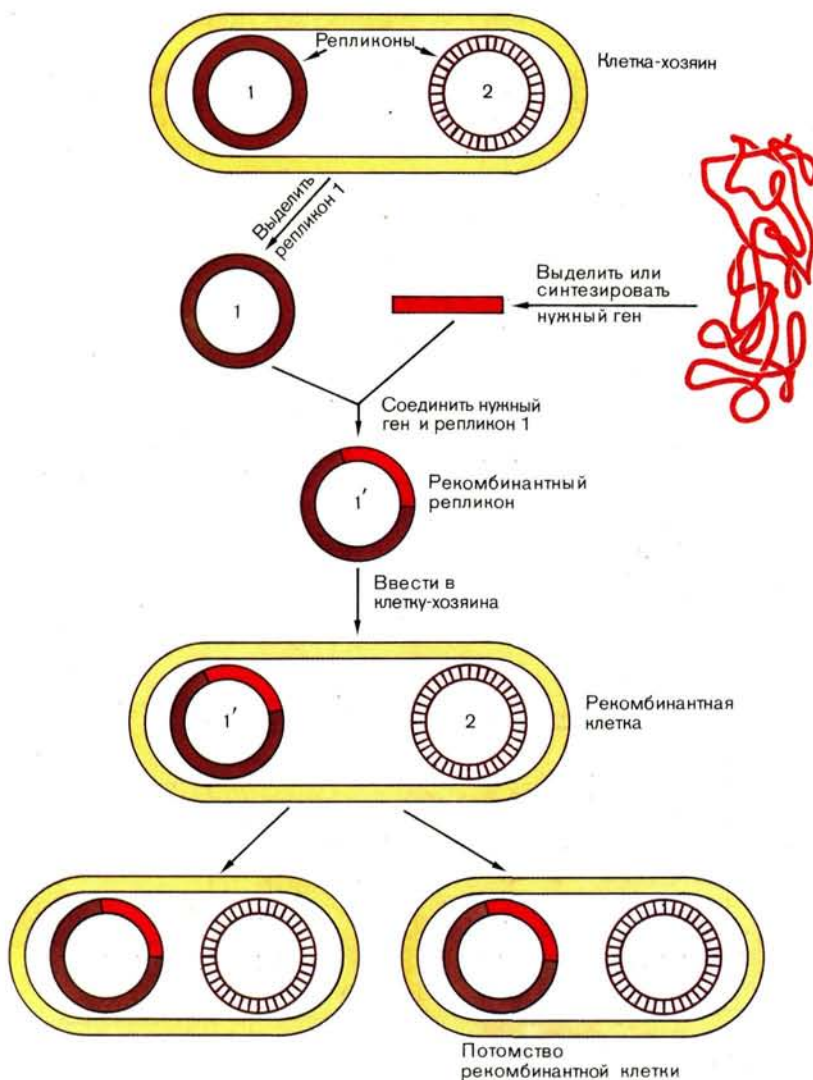


Рис. 244. Общий принцип генной инженерии.

ский материал, в более сложном случае требуется осуществить его экспрессию в новом хозяине.

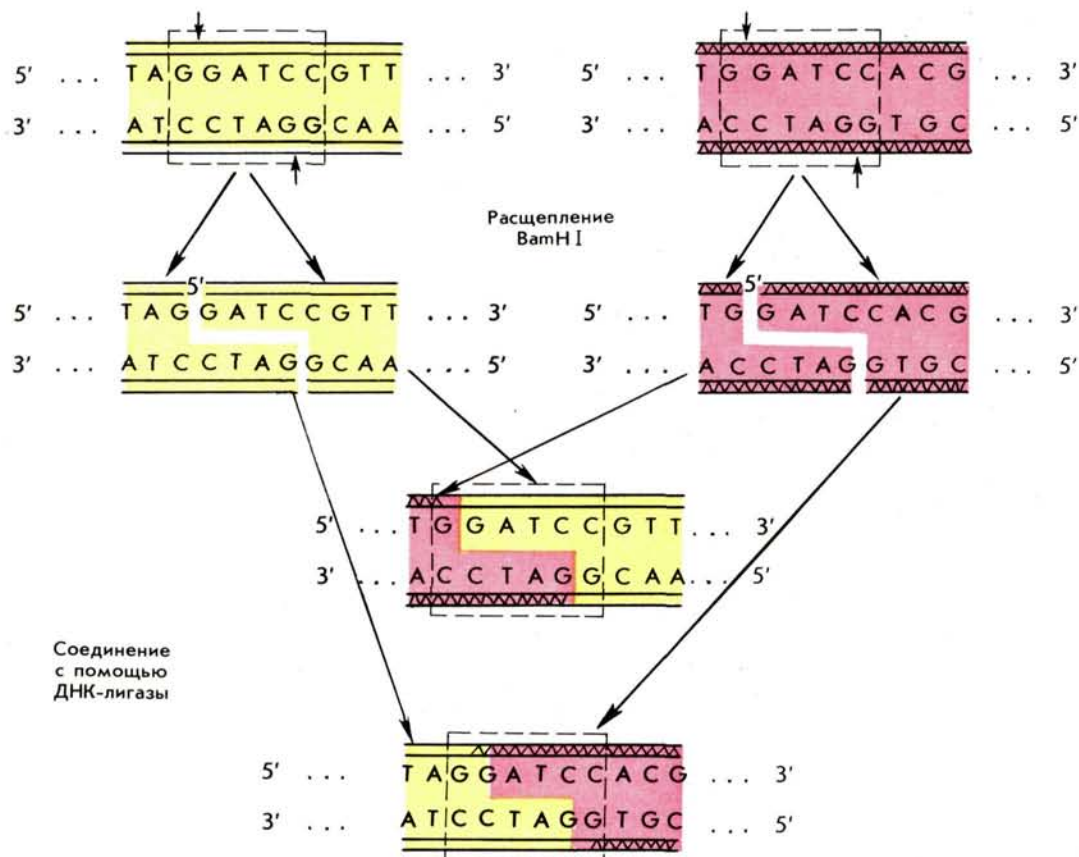
Методы решения всех этих задач целесообразно рассмотреть на примере наиболее хорошо изученного реципиента — кишечной палочки *E. coli*.

Способы соединения фрагментов ДНК, используемые в генной инженерии

Многие рестрикционные эндонуклеазы, расщепляя ДНК, дают *липкие концы* (см. с. 353) типа *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *SalI*, *PstI* и др. При расщеплении одной и той же рестриктазой различных ДНК образуются одинаковые липкие концы и полученные фрагменты соединяются друг с другом по этим концам ДНК-лигазой (рис. 245). Различные ДНК могут быть соединены при помощи ДНК-лигазы и по *тупым концам*.

Рис. 245. Расщепление молекул ДНК рестриктазой *BamHI* и соединение полученных фрагментов ДНК-лигазой.

Для обеспечения возможности расщепления рекомбинантных ДНК по местам соединения вектора и вставки используются также



специальные приемы, наиболее распространенным из которых является метод линкеров (см. с. 377).

Нередко применяется *коннекторная техника* получения рекомбинантных ДНК. Она заключается в том, что с помощью концевой нуклеотидилтрансферазы (см. с. 351) к 3'-концу одного фрагмента присоединяется гомополинуклеотид, например поли(dT) или

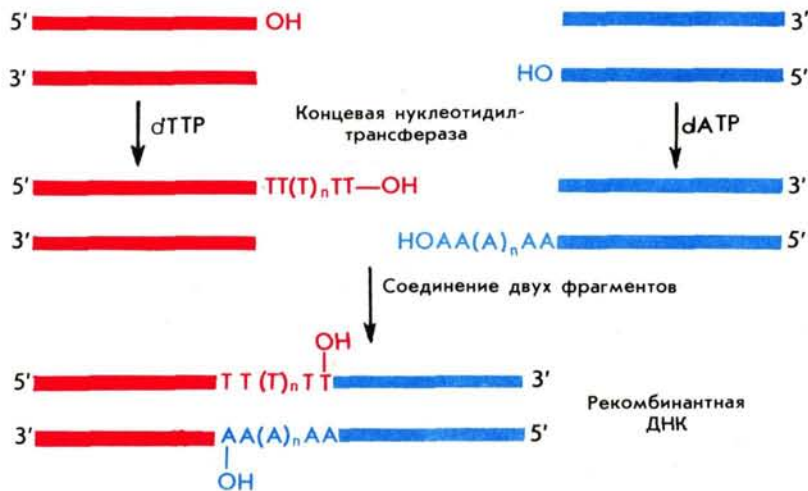


Рис. 246. Соединение двух фрагментов ДНК коннекторным методом.

Таблица 15.

Эндонуклеазы рестрикции, наиболее широко используемые в генной инженерии

Bam H I	G↓GATC C C CTAG↑G	Aha III	TTT↓AAA AAA↑TTT
Bgl II	A↓GATC T T CTAG↑A	Alu I	AG↓CT TC↑GA
EcoR I	G↓AATT C C TTAА↑G	Hae III	GG↓CC CC↑GG
Hind III	A↓AGCT T T TCGA↑A	Hinc II	C A GTT↓GAC CAA↑CTG G T
Hpa II	C↓CG G G GC↑C	Hind II	GTP _γ ↓PuAC CAP _u PyTG
Kpn I	G GTAC↓C C↑CATG G	Hpa I	GTT↓AAC CAA↑TTG
Pst I	C TGCA↓G G↑ACGT C	Pal I	GG↓CC CC↑GG
SaL I	G↓TCGA C C AGCT↑G	Pvu II	CAG↓CTG GTC↑GAC
Tag I	T↓CG A A GC↑T	Sma I	CCC↓GGG GGG↑CCC

поли(dC), а к 3'-концу другого фрагмента — полинуклеотид, комплементарный используемому в первом случае, т. е. поли(dA) или поли(dG) (рис. 246). При добавлении фрагментов друг к другу они комплексуется за счет образования комплементарных пар оснований между концевыми гомополинуклеотидами, а затем соединяются в клетке-хозяине с помощью ее ферментативного аппарата.

Векторы, используемые в *E. coli* — плазмиды и бактериофаги

Молекула вектора должна отвечать определенным требованиям: быть небольшой, содержать уникальные участки расщепления рестрикционными эндонуклеазами, иметь маркеры для оптимальной селекции рекомбинантных клеток. В качестве векторов для включения чужеродной ДНК в клетки *E. coli* используются плазмиды (термин предложен Дж. Ледербергом) и бактериофаги. И те и другие являются репликаонами.

Многие плазмиды, представляющие собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, содержат гены, которые придают содержащим их бактериям некоторые фенотипические признаки, такие, как устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов и т. д.

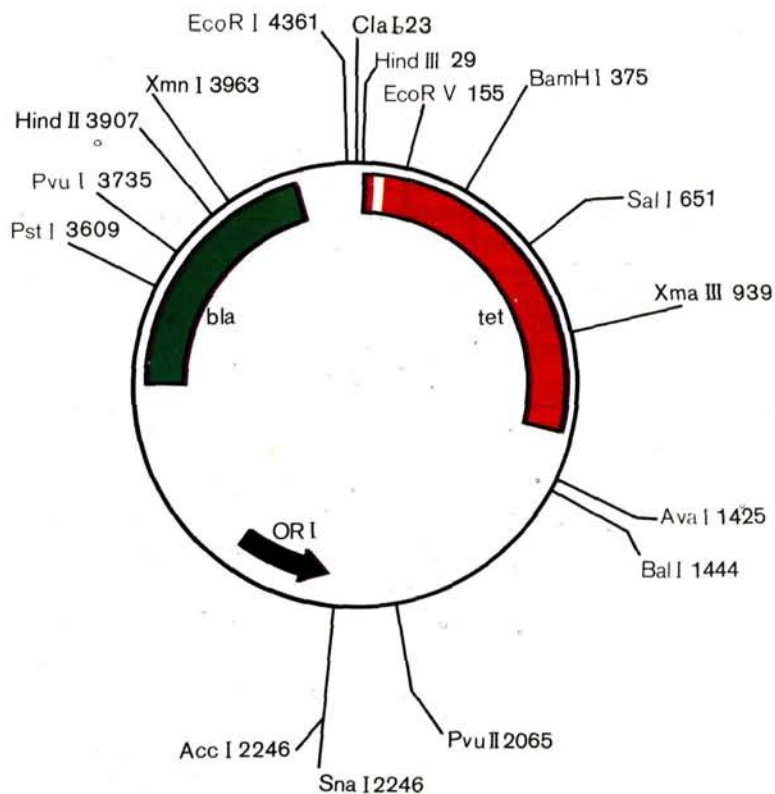


Рис. 247. Плазмида pBR322.

Если основная бактериальная ДНК имеет длину около $5 \cdot 10^6$ п. о., то размеры плазмид составляют всего несколько тысяч пар оснований. Они легко выделяются и очищаются.

Специально сконструированы векторные плазмиды, позволяющие отличать клетки, содержащие рекомбинантные молекулы, от исходных бактериальных клеток. В качестве примера на рисун-

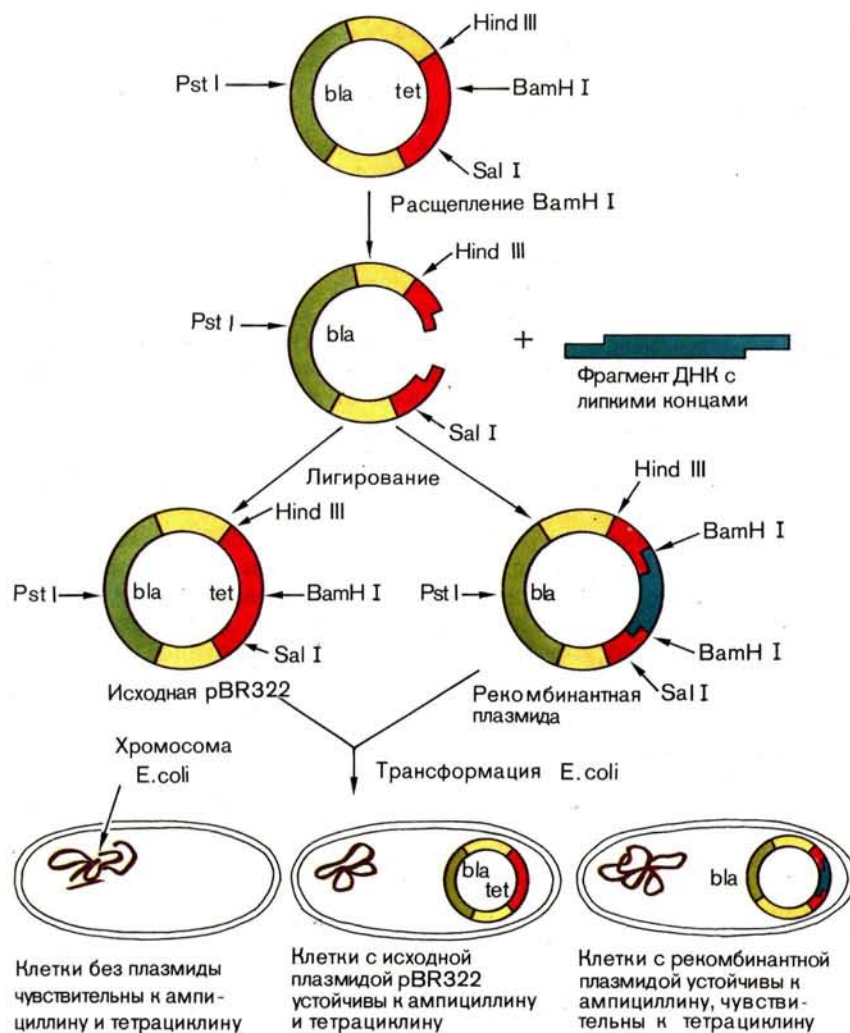


Рис. 248. Схема использования плазмиды pBR322 для отбора клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды.

ке 247 приведена плазмиды pBR322, она содержит два гена, программирующие устойчивость к двум различным антибиотикам — тетрациклину (ген *tet*) и ампициллину (ген *bla*). В гене *tet* находятся уникальные участки расщепления рестриктазами HindIII, BamHI и SalI, а в гене *bla* — участок расщепления PstI. Если «разрезать» плазмиду любой из рестриктаз, участок расщепления которой находится в гене *tet*, и соединить ее методом липких концов с чужеродным фрагментом ДНК, то в полученной рекомбинантной молекуле останется нетронутым только ген *bla*, а ген *tet* утрачивает свою активность, поскольку его последовательность разрывается

вставкой. Наоборот, при разрезании плазмиды рестриктазой PstI и внедрении в этот участок фрагмента ДНК инактивируется ген bla, тогда как ген tet продолжает обеспечивать синтез белка, придающего *E. coli* устойчивость к тетрациклину. Использование такой методологии позволяет быстро идентифицировать клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды. Применение подобного приема показано на рисунке 248. Расщепление исходной плазмиды pBR322 по сайту BamHI и последующее лигирование с фрагментом ДНК приводит к смеси исходных и рекомбинантных плазмид. При введении этой смеси в *E. coli* образуются клетки трех типов — не содержащие плазмиду, содержащие исходную pBR322 и клетки с рекомбинантной плазмидой. Их легко отличить по различной устойчивости к антибиотикам.

Анализируемую ДНК можно вводить и в другие репликоны, способные размножаться в клетках *E. coli*, например в бактериофаги. Из множества известных фагов чаще всего в качестве векторов используют сконструированные производные фага λ и фагов M13 и fd.

Большое разнообразие векторов существует на основе бактериофага λ , в них используется особенность фага, состоящая в том, что значительная часть его ДНК не нужна для размножения фага в клетке (рис. 249). Это позволяет вводить чужеродную ДНК в ДНК фага λ при использовании его в качестве вектора, причем длина вставляемого фрагмента может быть существенно больше величины фрагмента, встраиваемого в плазмиду.

Важную группу векторов, широко используемых при установлении первичной структуры ДНК, составляют нитевидные бактериофаги, такие, как M13, fd и f1. Фаг M13 представляет собой одноцепочечную циклическую ДНК длиной около 6500 нуклеотидов. После инфицирования бактериальной клетки одноцепочечная ДНК фага превращается в двухцепочечную репликативную форму (RF), которая во всех отношениях подобна плазмиде. Кроме того, фаговая ДНК содержит короткий участок (500 нуклеотидов), названный межгенной последовательностью (МП), несущественный для ее жизнеспособности (рис. 250).

Таким образом, выделив репликативную форму ДНК и расщепив ее в области несущественного участка, можно с помощью лигазы вставить в место разрыва чужеродную ДНК. Введение рекомбинантной двухцепочечной молекулы в клетку *E. coli* приводит к ее

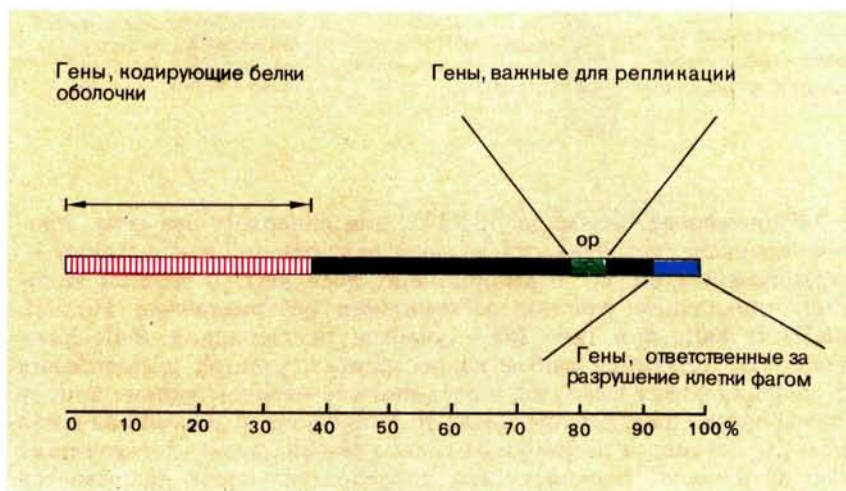


Рис. 249. Упрощенная генетическая карта фага λ (зачерченный участок соответствует генам, несущественным для размножения фага).

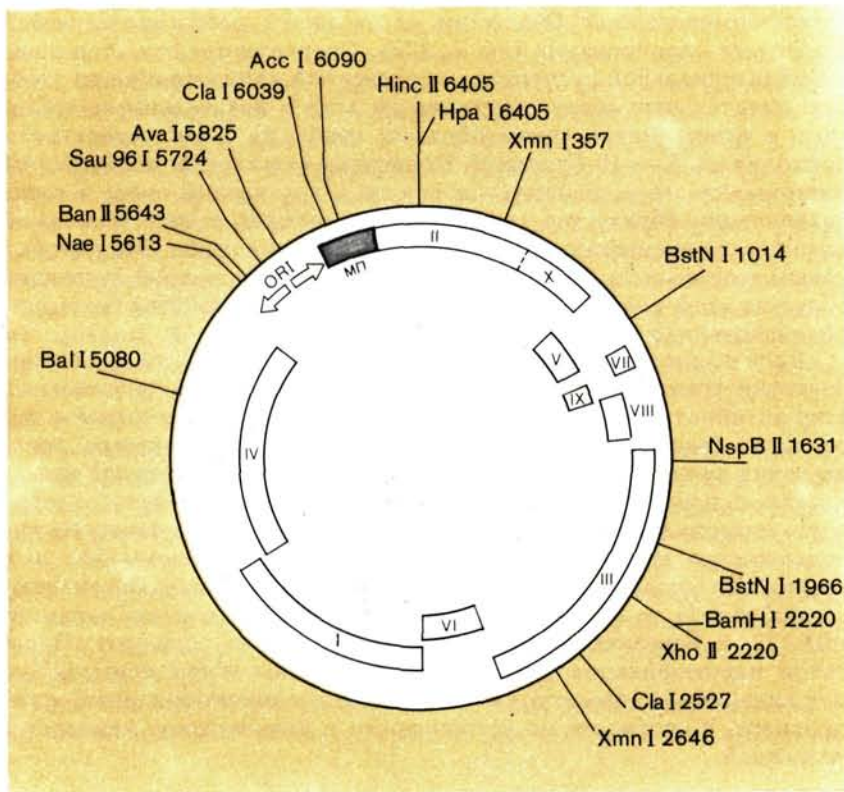


Рис. 250. Фаг M13 (темный участок МП соответствует генам, несущественным для его жизнеспособности).

репликации, синтезу (+)-цепи, упаковке последней в белковый чехол и выделению фага в среду. Далее инфицированная нитевидным фагом клетка, продолжая делиться, хотя и с замедленной скоростью, постепенно выделяет в окружающую среду большое количество фага. Этот фаг содержит в вирионе одноцепочечную циклическую ДНК, в которую встроена одна из цепей чужеродной ДНК.

Трансформация, трансфекция, клонирование и селекция

Процесс введения плазмиды в клетку, вызывающий наследственные изменения в ней, называется *трансформацией*. Процесс инфекции клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, называется *трансфекцией*. Практически наиболее общий способ трансформации и трансфекции основан на том, что при обработке клеток бактерий CaCl_2 их мембрана становится проницаемой для ДНК. Эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку низка. Для плазмид типа pBR322 можно получить $10^6 - 10^7$ трансформантов при добавлении 1 мкг плазмиды к обработанным CaCl_2 клеткам, т. е. из каждых $10^4 - 10^5$ плазмид в клетки попадает только одна. Поэтому среди бактерий, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается



Рис. 251. Чашка Петри с колониями *E. coli*.

трансформированной. Отделение ее от общей массы выполняется в процессе клонирования (см. с. 372). Операция заключается в посеве бактериальной суспензии определенной концентрации на твердую питательную среду, например на агар с питательными добавками в чашке Петри таким образом, чтобы на 1 см^2 поверхности приходилось 5 — 10 бактерий. Бактериальная клетка, попавшая на поверхность агара, начинает делиться, и в конечном счете в точке локализации образуется семейство ее потомков в виде маленькой колонии, по внешнему виду похожей на шляпку гриба. Эта колония называется *клоном* (рис. 251). Каждая клетка исходной суспензии образует свой клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника (позитивная колония).

Если в качестве вектора служит плазмида pBR322, то для отбора бактерий-трансформантов используют добавление в питательный агар антибиотика — ампициллина или тетрациклина, в зависимости от того, какой из генов, *bla* или *tet*, остался интактным после введения чужеродной ДНК. На такой среде клоны образуют только клетки с плазмидами. Для отделения рекомбинантных бактерий часть материала каждого клона переносится на другую чашку Петри, содержащую антибиотик, ген устойчивости к которому был разрушен при создании рекомбинантов. На этой чашке Петри дают клоны только те бактерии, которые содержат исходную плазмиду pBR322, а рекомбинантные бактерии клоны не образуют. После такой идентификации рекомбинантные клоны могут применяться для дальнейшего анализа. Отбор по определенному биологическому признаку, в частности по устойчивости к антибиотику, называется *селекцией*.

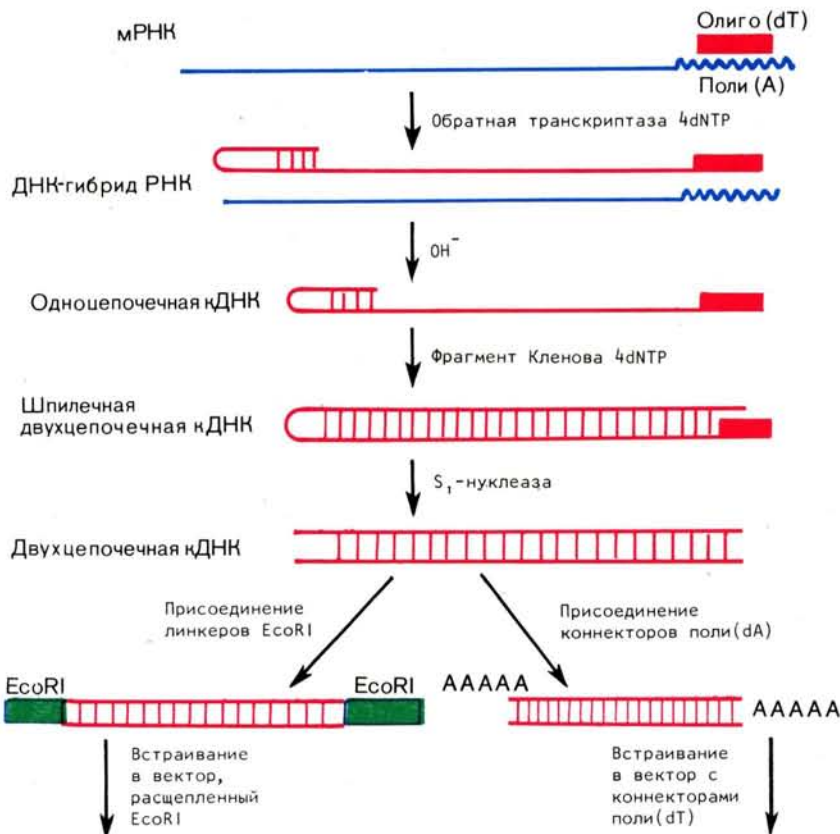


Рис. 252. Схема подготовки кДНК для клонирования.

Клонирование при использовании в качестве векторов бактериофага λ осуществляется следующим образом: к суспензии бактерий, обработанных CaCl_2 , добавляется ДНК фага и осуществляется посев на чашку Петри с питательным агаром так, чтобы на 1 см^2 поверхности попадало 5 — 10 клеток с проникшей в них ДНК фага. Клетки, не содержащие ДНК фага, размножаются на агаре и дают мутный ровный «газон», заполняющий всю поверхность чашки. Однако в тех точках, куда попали бактерии с ДНК фага, остаются прозрачные круглые просветы, называемые бляшками или негативными колониями. Образование бляшек связано с тем, что ДНК фага реплицируется в клетке и дает зрелые фаговые частицы. Затем фаговые частицы попадают в среду, заражают окружающие клетки и разрушают их. В результате каждая бляшка состоит из потомков фагов, содержащих одну и ту же ДНК — копию ДНК, попавшей в клетку.

Фаги типа M13 не дают негативных колоний, поскольку они не разрушают клетки. Однако в месте их размножения клетки *E. coli* замедляют деление, что приводит к появлению на общем мутном газоне более прозрачных бляшек. Способы селекции основаны либо на том, что в несущественную область фага (МП) вводят ген, программирующий устойчивость к антибиотикам и разрушающийся при внедрении в него чужеродной ДНК, либо на различии цветных реакций, даваемых клетками, зараженными исходным и рекомбинантным фагами.

Получение ДНК для клонирования. ДНК для клонирования может быть получена химико-ферментативным синтезом, обратной

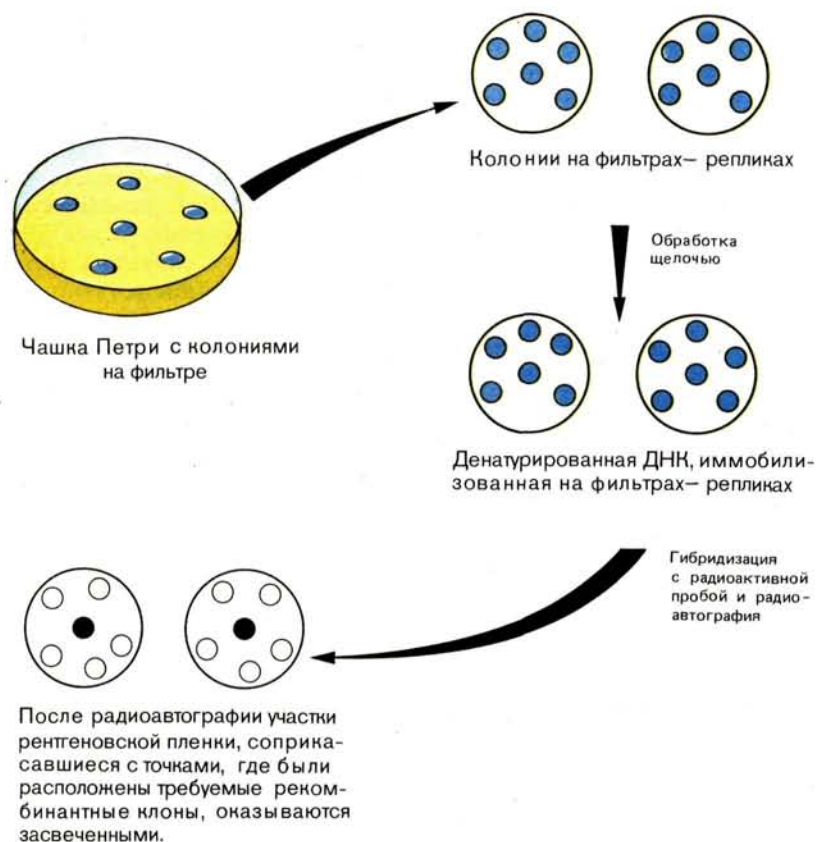


Рис. 253. Метод радиоавтографии в применении к поиску рекомбинантных клонов.

транскрипцией мРНК или путем непосредственного расщепления геномной ДНК нужной рестрикционной эндонуклеазой.

При обратной транскрипции эукариотической мРНК чаще всего используется тот факт, что на ее 3'-конце обычно содержится поли (А)-последовательность, благодаря которой в качестве затравки для обратной транскрипции можно применять олиго (dT). На первой стадии обратная транскриптаза синтезирует одноцепочечную ДНК, комплементарную мРНК. Эта ДНК обычно содержит на 3'-конце «шпильку». После удаления РНК обработкой щелочью или РНКазами образуемая одноцепочечная ДНК служит затравкой-матрицей для фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I, который при наличии четырех dNTP достраивает вторую цепь. В результате образуется шпильчатая структура, превращаемая в истинную двухцепочечную кДНК обработкой S₁-нуклеазой (рис. 252).

Далее полученную кДНК можно встроить в соответствующий вектор с помощью линкеров или коннекторной техники.

Идентификация клонов. Если вставка содержит гены, способные к экспрессии в новом хозяине, рекомбинантные клоны могут быть идентифицированы по синтезируемому ими продукту. Однако чаще приходится идентифицировать непосредственно нуклеотидную вставку, для чего используют методы гибридизации. Бактериальные (или фаговые) колонии выращиваются на нитроцеллюлозных фильтрах, помещенных на чашку Петри с питательной средой (рис. 253). После этого приготавливаются так называемые реплики — к фильтру с исходными колониями прижимается свежий нитроцеллюлозный фильтр, который затем переносится на чашку Петри с плотной питательной средой, где на нем образуются колонии, идентичные первым.

Далее фильтр-реплику подвергают щелочной обработке, клетки в колониях подвергаются лизированию, и денатурированная ДНК из клеток связывается с нитроцеллюлозой в том месте, где была расположена соответствующая колония. Если в распоряжении исследователя имеется радиоактивная (³²P- или ¹²⁵I-меченная) ДНК или РНК, комплементарная требуемой вставке, то при выдерживании фильтра в растворе, содержащем радиоактивный полинуклеотид, последний гибридизуется с комплементарными последовательностями. В результате те части фильтра, в которых находились рекомбинантные клоны с требуемой вставкой, оказываются радиоактивными и идентифицируются радиоавтографически.

Радиоактивные «пробы» получают химическим синтезом (в тех случаях, когда известна последовательность искомой вставки или белка, который она кодирует), выделением индивидуальных или сильно обогащенных мРНК с последующим их иодированием ¹²⁵I, а также ферментативным синтезом соответствующих кДНК с использованием ³²P-меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.

Проблемы экспрессии чужеродных генов

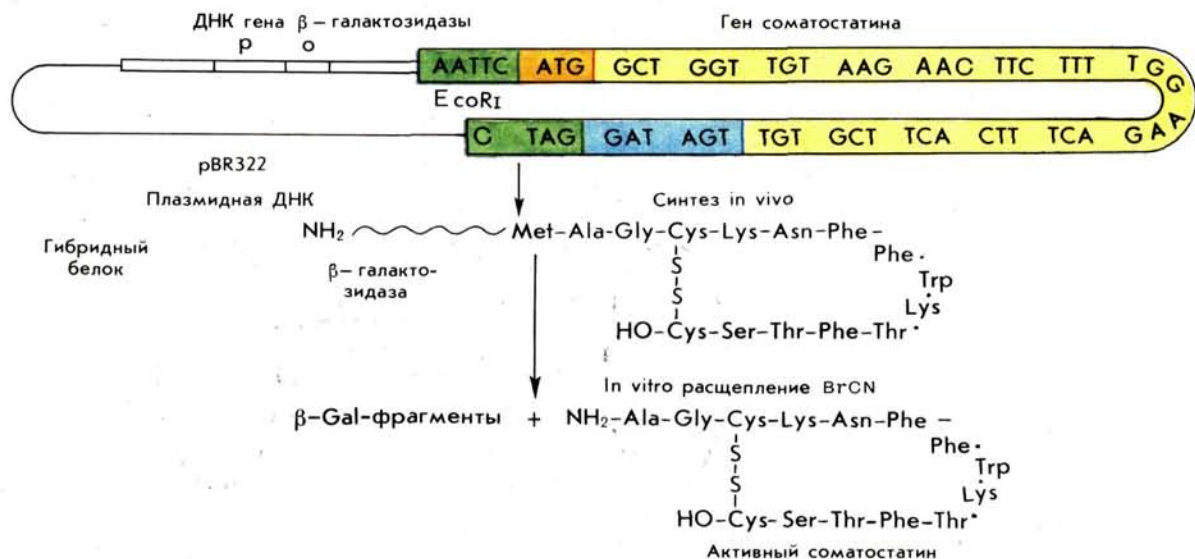
При включении бактериальных генов вместе с их регуляторными участками в *E. coli* они, как правило, экспрессируются, давая мРНК и белок. Это происходит потому, что в сигнальных последовательностях, управляющих транскрипцией и трансляцией в различных прокариотических организмах, много общего. Однако экспрессия генов эукариот в бактериях наблюдается очень редко, если не создавать специальные условия. Регуляторные сигналы эукариот сильно отличаются от регуляторных сигналов бактерий

и не узнаются бактериальными РНК-полимеразами и рибосомами. При клонировании не кДНК, а геномной ДНК эукариотической клетки экспрессия не происходит, поскольку в бактериальной клетке отсутствует система «сплайсинга».

Поэтому для осуществления экспрессии эукариотического гена соответствующая кДНК или синтетическая ДНК, содержащая кодирующую последовательность, присоединяется в составе векторной молекулы к регуляторным элементам бактерии — промотору и рибосом-связывающему участку.

Иногда присоединение ведется таким образом, что кодирующая часть эукариотического гена присоединяется к кодирующей части бактериального гена так, чтобы сохранялась «рамка» считывания. В последнем случае образуются гибридные белки, содержащие в N-концевой части бактериальный белок или его часть, а в С-концевой части — эукариотический белок. Примером использования такого способа экспрессии является получение гормона соматостатина в клетках *E. coli* (К. Итакура, Г. Бойер) (см. с. 267). Аминокислотная последовательность гормона известна, и исходя из нее, согласно генетическому коду, была выведена структура соответствующего искусственного гена. Осуществлен его синтез: ген содержал на N-конце кодон АТГ, кодирующий метионин, и липкий конец, соответствующий расщеплению рестриктазой *EcoRI* ААТТ, а на С-конце — два стоп-кодона (рис. 254). Этот фрагмент ДНК был присоединен к фрагменту гена β -галактозидазы *E. coli*, содержащему в С-концевой части участок расщепления *EcoRI*, и вместе со своим промотором и оператором был встроен в плазмиду рВR322. В результате такого соединения получен гибридный ген, в котором С-концевая часть гена β -галактозидазы заменена «геном» соматостатина. Между геном β -галактозидазы и собственно геном соматостатина находится кодон метионина. Транскрипция и трансляция этого гибрида осуществлялась за счет использования соответствующих сигнальных последовательностей β -галактозидазы. В результате образовался химерный белок, в котором соматостатин отделен от β -галактозидазной части остатком метионина. Поскольку соматостатин не содержит метиониновых остатков, то при расщеплении химерного белка бромцианом соматостатин был отделен

Рис. 254. Получение соматостатина через гибридный белок с β -галактозидазой.



в виде целого пептида. Такой способ экспрессии используется, когда возможно отщепление экспрессируемого пептида от N-концевой части химерного белка или когда достаточно получить гибридный полипептид, например в случае получения искусственных вакцин, где достаточно наличия необходимых антигенных детерминант.

Рис. 255. Схема расположения элементов для прямой экспрессии чужеродных генов в новом хозяине.



Для получения белков, содержащих более 150 аминокислот, чаще используется прямая экспрессия соответствующих генов, в результате которой сразу синтезируются требуемые белки лишь с незначительной модификацией. При этом кодирующая часть гена соединяется с бактериальным промотором, рибосомсвязывающим участком и иницирующим кодоном ATG (рис. 255).

Именно таким образом получены штаммы *E. coli*, продуцирующие гормон роста человека, интерфероны человека и другие белки, имеющие большое практическое значение. Присоединение к кодирующей части гена иницирующего кодона необходимо для обеспечения инициации трансляции. Это приводит к тому, что

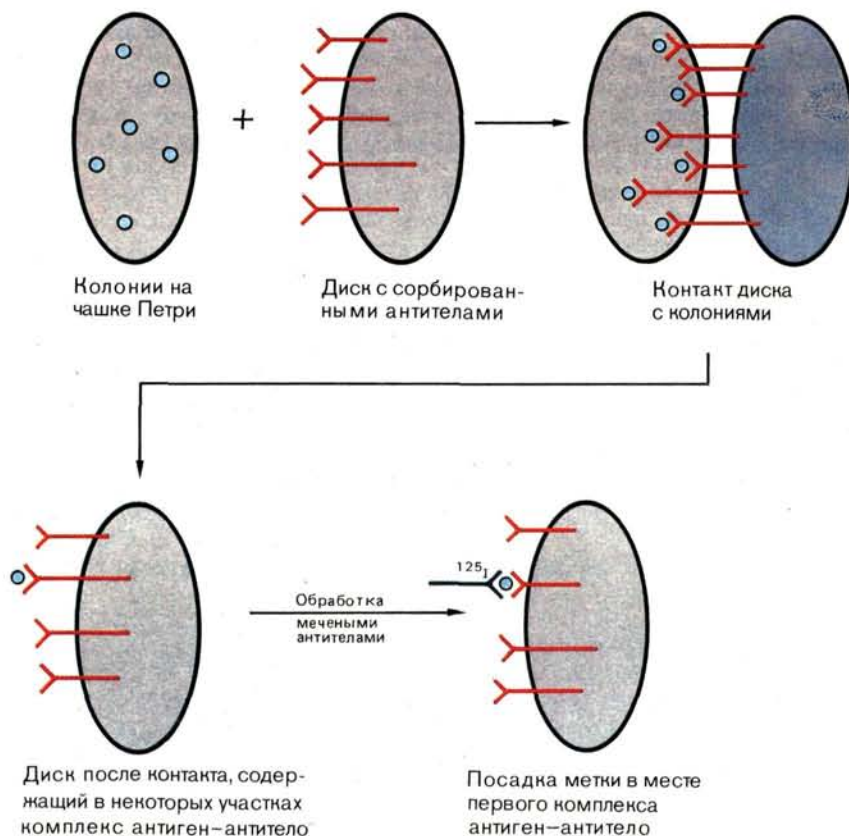


Рис. 256. Схема, демонстрирующая иммунохимическую идентификацию экспрессирующих клонов.

N-концевая часть синтезируемых таким способом полипептидов отличается от природных присутствием N-концевого формилметионина. Ферменты процессинга бактериальной клетки частично удаляют ее, однако часть синтезируемого белка все же сохраняет модификацию. Во многих случаях такая модификация не меняет физиологических свойств продукта, но при получении лекарственных препаратов необходимо учитывать возможный ее эффект.

Идентификация экспрессирующих рекомбинантных клонов. Метод идентификации экспрессирующих клонов зависит от свойств продукта экспрессии. Если этот продукт обладает собственной биологической активностью, то он может быть идентифицирован по ее проявлению. Например, если экспрессии подвергается ген, кодирующий фермент, то клоны идентифицируют по наличию в них соответствующей ферментативной активности; клоны, синтезирующие интерферон, — по противовирусной активности клеточных экстрактов и т. д.

Однако наиболее общими являются методы иммунохимического анализа, применимые как в случае прямой экспрессии, так и при синтезе гибридных белков.

Существует много вариантов иммунохимического анализа. Один из наиболее распространенных заключается в следующем. На диске из поливинилхлорида сорбируются немеченые антитела к исследуемому белку. Колонии прямо на чашке Петри лизируются в мягких условиях, и поливинилхлоридный диск вводится в контакт с поверхностью чашки. Продукты с антигенными детерминантами исходного белка образуют комплексы антиген — антитело с антителами, сорбированными на диске только в местах положения экспрессирующих клонов. Затем диск отмывается от неспецифически сорбированного антигена и обрабатывается раствором с мечеными (радиоактивно, флуоресцентно или иммуноферментно) антителами. Эти антитела образуют комплекс с антигеном за счет его других антигенных детерминант, в результате чего участки диска, содержащие первый комплекс антиген — антитело, оказываются мечеными (рис. 256). По положению меченых участков на диске легко идентифицировать экспрессирующие колонии.

Клонирование в различных организмах

В настоящее время разработаны системы клонирования в различных бактериях, дрожжах, грибах, растениях и млекопитающих. Наибольший интерес с практической точки зрения представляют системы клонирования в грамположительных бактериях, многие из которых являются промышленно используемыми, а также в дрожжах и клетках высших организмов.

Обычно векторы для клонирования в таких системах представляют собой двойные репликоны, которые могут существовать и в *E. coli*, и в той клетке-хозяине, для которой они предназначены. Это достигается созданием гибридных векторов, содержащих репликон какой-либо из плазмид *E. coli* и требуемый репликон, например плазмиды *V. subtilis* или дрожжей, что позволяет проводить первоначальное клонирование и отбор требуемых генов в хорошо изученной системе *E. coli*, а затем уже вводить выделенные рекомбинантные плазмиды в новый организм.

Такие векторы должны содержать в себе ген или гены, придающие клетке-хозяину легко тестируемый признак, например устойчивость к антибиотикам.

Клонирование в грамположительных бактериях. Наиболее широко используются методы клонирования в *B. subtilis* и стрептомицетах. Разработка систем векторов для *B. subtilis* основана на способности плазмид *Staphylococcus aureus*, несущих гены устойчивости к антибиотикам, к репликации и стабильному наследованию в сенной палочке. Для этих целей гибриды таких плазмид с плазмидами *E. coli* широко используются в качестве векторов для *B. subtilis*. Рекомбинантные штаммы несут признаки устойчивости к антибиотикам.

Стрептомицеты широко применяются в биотехнологии в качестве продуцентов антибиотиков. Конструирование векторов для клонирования в них началось с выделения плазмиды *Scp2* из *Streptomyces coelicolor*. На основе этой и подобных плазмид в настоящее время сконструированы векторы, придающие стрептомицетам устойчивость, например, к таким антибиотикам, как метиленомицин А.

Клонирование в дрожжах. Наиболее широко используются штаммы *Saccharomyces cerevisiae*. Работа с дрожжами облегчается тем, что, подобно бактериям, они могут расти в жидкой среде и давать колонии на твердой, генетически хорошо охарактеризованы и имеют сравнительно короткое время генерации. *S. cerevisiae* содержит плазмиду *Scp1*, представляющую собой циклическую молекулу длиной 2 мкм. Ее гибриды с плазмидами *E. coli* обычно и используют в качестве векторов. Селекция дрожжевых клонов, трансформированных такими рекомбинантными плазмидами, основана на применении в качестве клеток-хозяев определенных мутантов, не способных расти на среде, лишенной какого-либо питательного компонента. Векторная плазида, в свою очередь, содержит ген или гены, которые при попадании в клетку придают ей этот недостающий признак. Трансформанты легко отбираются по их способности давать колонии на обедненной среде.

Поскольку дрожжи представляют собой эукариотический организм, можно было бы ожидать, что гены различных эукариот, в том числе и те, которые содержат интроны, будут корректно экспрессироваться в дрожжевых клетках. Однако это не так. Например, экспрессия генов β -глобина кролика в дрожжах не происходит благодаря некорректности транскрипции и последующего «сплайсинга» РНК. Тем не менее, применяя приемы, аналогичные использованным при клонировании в бактериях, удастся достичь синтеза чужеродных белков в дрожжевых клетках. Такие клетки, подобно *B. subtilis*, секретируют значительное количество белков во внеклеточную среду, что используют также для секреции чужеродных белков. С этой целью к экспрессируемому гену присоединяется участок, кодирующий сигнальный пептид, обуславливающий секрецию и отщепляемый в ее процессе. В результате в клетке синтезируется белок, содержащий на N-конце сигнальный пептид. Этот белок секретируется в окружающую среду. Таким образом были получены, например, штаммы дрожжей, секретирующие интерферон человека.

Клонирование в клетках животных. Проблема клонирования в клетках животных имеет большое значение для исследования функционирования генов высших эукариот. Предварительно клонированные гены вводят в клетку животных различными путями. Один из путей включает в себя кон-трансформацию клеток требуемым геном, соединенным с одним из генов, для которых осуществляется селекция. Примером являются клетки мыши, дефектные по синтезу тимидинкиназы (ТК⁻-клетки). Клетки трансформируются фрагментами ДНК вируса герпеса (HSV), содержащего ген тимидинкиназы, и после трансформации приобретают способность к синтезу фермента, т. е. становятся ТК⁺-клетками. Клетки ТК⁺ легко отличаются от ТК⁻, поскольку они способны расти на средах с ами-

ноптеринном (блокирующим определенные стадии биосинтеза нуклеотидов), гипоксантином и тимидином.

Следовательно, при конструировании котрансформирующих векторов для трансформации клеток животных используются гибриды бактериальных плазмид с геном ТК из вируса герпеса. Предварительно клонирование и идентификация генов проводятся в клетках *E. coli* и затем рекомбинантная плазида вводится в ТК⁻-клетки. Среди образовавшихся ТК⁺-трансформантов отбираются нужные, например путем идентификации продуктов экспрессии клонированных генов.

Другой путь введения клонированных генов в эукариотические клетки аналогичен применяемому в случае *E. coli*, когда в качестве векторов используют бактериофаги. В качестве таких эукариотических векторов служат некоторые вирусы. Во многих из них существуют области для литического роста, которые могут быть заменены на чужеродные ДНК. Такие вирусы реплицируются в клетке-хозяине, экспрессируя чужеродные гены. Однако в вирусах животных размеры несущественных областей малы и не позволяют внедрить большие фрагменты ДНК. Некоторые гены животных имеют большие размеры (например, ген дигидрофолатредуктазы мыши — 42 тыс. п. о.). В большинстве случаев чужеродная ДНК замещает существенные гены, в результате чего рекомбинантные вирусы теряют способность к репликации. Для ее обеспечения используют вирусы-помощники, синтезирующие продукты недостающих генов. В присутствии помощников рекомбинантный вирус существует за счет этих продуктов. Примером вирусов, применяемых в качестве векторов, является вирус SV-40, геном которого представляет собой циклическую ДНК длиной 5243 п. о. с полностью известной последовательностью. Эукариотические векторы, использующие вирусы, способные формировать вирионы, обладают тем недостатком, что они убивают клетку-хозяина при своем размножении (так же как и бактериофаги). Поэтому постоянно делаются попытки разработать векторы, подобные плазидам. Обычно опухолевые вирусы, в том числе и SV-40, внедряют свою ДНК в хромосому клетки-хозяина. Однако вирус бычьей папилломы в трансформированных клетках существует в виде эписомы (около 100 копий на клетку) и используется в качестве основы для создания эписомных векторов.

Высокий темп исследований генной инженерии на клетках животных вселяет надежду, что в ближайшее время будут разработаны простые системы, которые позволят осуществить анализ механизмов экспрессии генов эукариот и дадут возможность создать животных, обладающих заданными свойствами.

Генная инженерия растений. Эта отрасль генной инженерии не так хорошо разработана, как в случае животных и тем более микробных клеток. Однако в настоящее время она привлекает очень большое внимание, поскольку открывает новые перспективы в растениеводстве. Обычная селекция новых сортов — процесс медленный, и кроме того, она ограничена природными видовыми барьерами. Введение новых генов с помощью техники рекомбинантных ДНК в растения могло бы ускорить этот процесс и существенно расширить его возможности. Кроме того растения обладают существенной особенностью: целое растение может быть выращено из отдельной клетки. Это не относится в равной степени ко всем растениям, например, клетки злаковых или бобовых только очень редко претерпевают такую редифференциацию, тогда как клетки табака, томата или моркови, как показала практика, подвергаются редифференциации сравнительно легко.

При растворении целлюлозной стенки растительной клетки ферментами-целлюлазами образуются протопласты, в которые

легко проникают макромолекулы, в том числе ДНК. Две различные клетки в виде протопластов соединяются с образованием гибридного протопласта (соматической гибридной клетки). Протопласты способны восстанавливать клеточную стенку и далее давать целое растение. Растение может быть получено из протопластов, включивших чужеродную ДНК, или из гибридных протопластов.

При наличии методов введения в растительные клетки определенных генов, способных к функционированию и стабильному наследованию, открываются реальные возможности создания растений с заранее заданными полезными признаками. Векторы для введения генов в растительные клетки могут быть основаны на репликациях растительных вирусов, однако до настоящего времени попытки получения таких векторов, удовлетворяющих, в частности, требованию стабильного наследования, были не очень успешны.

Наибольшее развитие получили векторы, сконструированные на так называемых Ti-плазмидах бактерий *Agrobacterium tumefaciens*. Эти бактерии инфицируют двудольные растения и вызывают образование корончатых галлов — своеобразных опухолей растений, клетки которых способны размножаться в культуре без добавления факторов роста. Было показано, что такая трансформация является следствием внедрения в геном растения части ДНК-Ti (tumor-inducing)-плазмиды, получившей название T (transforming)-ДНК. Трансформированные клетки приобретают способность синтезировать необычные аминокислоты — опины, например, нопалин или октопин, являющиеся производными аргинина и служащие источником питания *A. tumefaciens*. Какая именно аминокислота синтезируется, зависит от Ti-плазмиды, трансформировавшей клетку: одни бактерии *A. tumefaciens* несут октопиновые, а другие — нопалиновые плазмиды. И опухолевая трансформация, и синтез опинов вызваны T-ДНК. В T-ДНК содержится несколько генов, контролируемых отдельными промоторами, которые и определяют все свойства опухолевых клеток. Трансформация клеток T-ДНК стабильно наследуется; некоторые трансформированные культуры существуют без изменения уже более 20 лет. Интегрированная T-ДНК наследуется по законам Г. Менделя.

Ti-Плазмиды способны трансформировать практически все двудольные растения, что делает их перспективным вектором для введения чужеродных ДНК в растения (рис. 257).

К сожалению, трансформированные T-ДНК клетки не способны давать растения. Однако были получены мутанты T-ДНК, трансформирующие растительные клетки и не подавляющие их способности превращаться в растение. Внедрение чужеродных генов в T-ДНК, под контроль промоторов, способных функционировать в растении, которое может быть осуществлено с помощью специально сконструированных векторов, дает возможность включать их в геном растительных клеток и получать растения, содержащие новую генетическую информацию.

Для улучшения свойств сельскохозяйственных растений необходимо внедрение в них такой генетической информации, которая делала бы их устойчивыми к засухе, заморозкам, позволяла расти на засоленных почвах, придавала способность фиксировать азот и устойчивость к сельскохозяйственным вредителям. Это осуществляют переносом соответствующих генов из растений, обладающих подобными свойствами. Так, в качестве примера можно привести создание петунии (*Petunia*) или табака (*Nicotiana tabacum*), устойчивых к гербициду глифосату, путем введения в клетки растений гена, дающего резистентный к этому веществу фермент. Полученные клетки были затем превращены в целые растения. Внедрение полезной генетической информации осуществлено с помощью Ti-плазмиды.

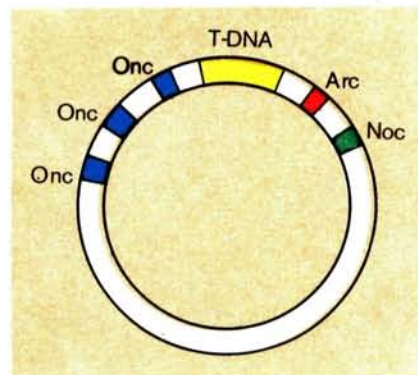


Рис. 257. Физическая карта нопалиновой Ti-плазмиды. Гены Onc ответственны за онкогенность, ген Nos — за синтез нопалина, ген Arc — за деградацию аргинина.

УГЛЕВОДЫ

Строение углеводов
и углеводсодержащих
биополимеров

Синтез углеводов
и углеводсодержащих
биополимеров

Отдельные представители углеводов
и углеводсодержащих
биополимеров



Колли Александр Андреевич (1840—1916), русский химик-органик. Окончил Московский университет (1860), в 1876—1903 гг.— профессор Московского Высшего технического училища. Основные работы — в области химии углеводов. Одним из первых установил строение глюкозы (1870). Первым синтезировал дисахариды (1879).

Углеводы относятся к числу наиболее распространенных в природе органических соединений: они являются компонентами клеток любых организмов, в том числе бактерий, растений и животных. Среди них встречаются как достаточно простые соединения с молекулярной массой около 200, так и гигантские полимеры, молекулярная масса которых составляет несколько миллионов. Углеводы появляются в растениях уже на ранних стадиях превращения углекислого газа в органические соединения в процессе фотосинтеза. Животные не способны сами синтезировать углеводы из углекислого газа и поэтому полностью зависят от растений как их поставщиков.

Функции углеводов в клетках весьма разнообразны. Они служат источником и аккумулятором энергии клеток (крахмал, гликоген), выполняют скелетные функции в растениях и некоторых животных, например в крабах, креветках, служат основой клеточной стенки бактерий, входят в состав некоторых антибиотиков. Большинство животных белков имеют детерминанты углеводной природы, являясь гликопротеинами. Нельзя забывать и о том, что углеводы D-рибоза и D-дезоксиррибоза — одни из главных компонентов нуклеиновых кислот. В последние годы большое внимание привлекают функции углеводов как рецепторов клеточной поверхности и антигенных детерминант природных биополимеров.

Исторический очерк. Еще в древние века человечество познакомилось с углеводами и научилось использовать их в практической деятельности. Хлопок, древесина, лен, тростниковый сахар, мед, крахмал — это лишь некоторые из углеводов, сыгравшие важную роль в развитии цивилизации.

В индивидуальном виде первые моносахариды — глюкоза и фруктоза — были выделены в конце XVIII — начале XIX века, однако установление их структуры стало возможным лишь с развитием учения о строении органических соединений. Определение элементного состава глюкозы, фруктозы, маннозы и других углеводов показало, что они имеют общую формулу $C_n(H_2O)_n$, т. е. как бы состоят из углерода и воды; отсюда углеводы и получили свое название.

Р. Фиттиг и А. Байер первыми предложили в 1868 — 1870 гг. правильную формулу глюкозы, однако оставалось неясным, каким образом моносахариды, имеющие идентичную формулу, могут различаться по физико-химическим свойствам. Это противоречие удалось разрешить Э. Фишеру с помощью стереохимических представлений Я. Г. Вант-Гоффа: он определил относительную конфигурацию ряда моносахаридов (глюкозы, фруктозы, маннозы, арабинозы), что заложило основу современной химии углеводов. Многие свойства моносахаридов тем не менее оставались необъясненными. В частности, число изомерных моносахаридов и их производных было вдвое больше, чем следовало из положений стереохимической теории, что свидетельствовало о наличии дополнительного асимметрического атома углерода. А. А. Колли объяснил этот парадокс образованием оксидного цикла за счет альдегидной группы и одного из гидроксильных, однако размер цикла — трехчленный — был предсказан им неправильно. Экспериментальное доказательство размера лактольного кольца было получено лишь в 20-х годах нашего века У. Хеурсом, применившим для решения задачи метод метилирования.

Одновременно было начато изучение строения полисахаридов, что также стало возможным благодаря работам У. Хеурса. Полисахариды, входящие в состав растений, бактерий и животных тканей, надолго привлекли внимание исследователей. Бактериальные полисахариды, образующие основные антигенные детерминанты бактерий и определяющие их серотип, и до настоящего време-

ни вызывают повышенный интерес прежде всего в плане получения вакцин к патогенным бактериям.

В дальнейшем внимание исследователей было привлечено к изучению углеводов-содержащих смешанных биополимеров — гликопротеинов, гликолипидов, протеогликанов и т. д., которые составляют основу клеток и жидкостей животных организмов и играют ключевую роль в процессах жизнедеятельности. Долгое время считалось, что высокомолекулярные углеводы представляют собой энергетический резерв клетки и не имеют никаких других существенных биологических функций. Отношение к гликоконъюгатам резко изменилось после того, как в 1969 г. обнаружилось, что опухолевая трансформация животных клеток приводит к заметному изменению спектра гликопротеинов и гликолипидов клеточных мембран. Стало очевидным, что такие изменения могут играть роль в распознавании опухолевых клеток иммунной системой организма и в метастазировании. Возникло более общее предположение, что углеводные детерминанты гликоконъюгатов клеточной поверхности участвуют в межклеточном узнавании. Эти гипотезы стимулировали изучение структуры углеводных цепей гликоконъюгатов, и заметные успехи были достигнуты в 70 — 80-е годы благодаря работам А. Кобаты, С. Корнфельда, С.-И. Хакомори и др. Сложность задачи потребовала привлечения всего арсенала химических, биохимических и физико-химических методов анализа. Среди исследованных гликопротеинов — групповые вещества крови, иммуноглобулины, компоненты системы комплемента, гликопротеины мембран животных клеток.

Важную роль в понимании химических свойств сахаров, особенно их циклических форм, сыграло развитие учения о конформациях молекул. основополагающими стали работы, выполненные в 50-е годы Р. Лемье. Действенным инструментом изучения конформаций сахаров в растворе становится ядерный магнитный резонанс. Многочисленные данные накоплены о конформациях сахаров в кристаллах с помощью рентгеноструктурного анализа, который успешно используется и при исследовании пространственной структуры углеводсодержащих биополимеров.

В 50-е годы работами Л. Лелуара, обнаружившего уридиндифосфатглюкозу, а позднее полипренильные производные сахаров, было положено начало изучению процесса биосинтеза углеводных цепей углеводсодержащих биополимеров.

Большой путь прошла и синтетическая химия углеводов. Полный синтез моносахаридов (глюкозы, маннозы и фруктозы), осуществленный еще в конце XIX в. Э. Фишером, в настоящее время не находит применения — гораздо легче получить моносахариды из природных источников. В те же годы Э. Фишером был разработан метод получения гликозидов простейших спиртов, однако начало направленному синтезу гликозидов и олигосахаридов было положено в 1901 г. В. Кёнигсом и Э. Кнорром, предложившими использовать в качестве гликозилирующего агента гликозилгалогениды. Классический метод Кёнигса — Кнорра и его модифицированные варианты оставались единственными способами гликозилирования сложных спиртов до 60-х годов нашего столетия, когда в ряде стран, в том числе в СССР, были разработаны рациональные методы синтеза углеводов (ортоэфирный, оксазолиновый и др.). Несмотря на большие трудности, это направление существенно продвинулось вперед, в настоящее время осуществлен химический синтез многих сложных гетероолигосахаридов (состоящих из различных моносахаридных остатков), полисахаридов и неогликопротеинов (см. с. 490).

Биоорганическая химия углеводов достигла значительного прогресса в синтезе, изучении структуры и выяснении биосинтеза углеводов и углеводсодержащих биополимеров. На повестке дня сегодня — познание роли углеводных цепей гликоконъюгатов в процессе жизнедеятельности растительных и животных организмов.



Лелуар [Leloir] Луис Федерико (р. 1906), аргентинский биохимик. Окончил университет в Буэнос-Айресе (1932), с 1962 г. — заведующий кафедрой биохимии этого университета. Основные работы — по изучению биосинтеза и обмена углеводов. Выделил глюкозодифосфат (1948) и уридиндифосфатглюкозу (1951). Лауреат Нобелевской премии по химии (1970).

Строение углеводов и углеводсодержащих биополимеров

Первичная структура и химические свойства углеводов и углеводсодержащих биополимеров

Все известные углеводы можно подразделить на три больших класса — моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Отдельную группу составляют углеводсодержащие смешанные биополимеры.

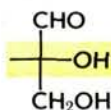
Моносахаридами являются полигидроксикарбонильные соединения общей формулы $C_n(H_2O)_n$; кроме гидроксильных и карбонильных групп, они могут содержать тиольные, карбоксильные и аминогруппы. К моносахаридам принято относить также продукты их окисления или восстановления, лишенные карбонильной группы.

Полисахариды представляют собой продукты поликонденсации моносахаридов. Это типичные полимеры, часто построенные из тысяч моносахаридных остатков, причем молекулярная масса отдельных молекул, входящих в состав образца, может существенно различаться.

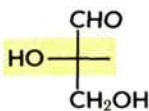
Олигосахариды составляют промежуточный класс между моносахаридами и полисахаридами и содержат от двух до десяти моносахаридных остатков.

Моносахариды

Моносахариды представляют собой полигидроксиальдегиды и полигидроксикетоны, которые называются соответственно *альдозами* и *кетозами*. В зависимости от числа углеродных атомов в цепи моносахариды делятся на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы и высшие сахара. Характерная особенность этих соединений состоит в наличии асимметрических атомов углерода, число которых растет по мере удлинения цепи. Простейшими альдегидоспиртами, имеющими один асимметрический атом углерода, являются триозы — стереоизомеры глицеринового альдегида, изображенные в проекциях Фишера.



D-Глицериновый альдегид

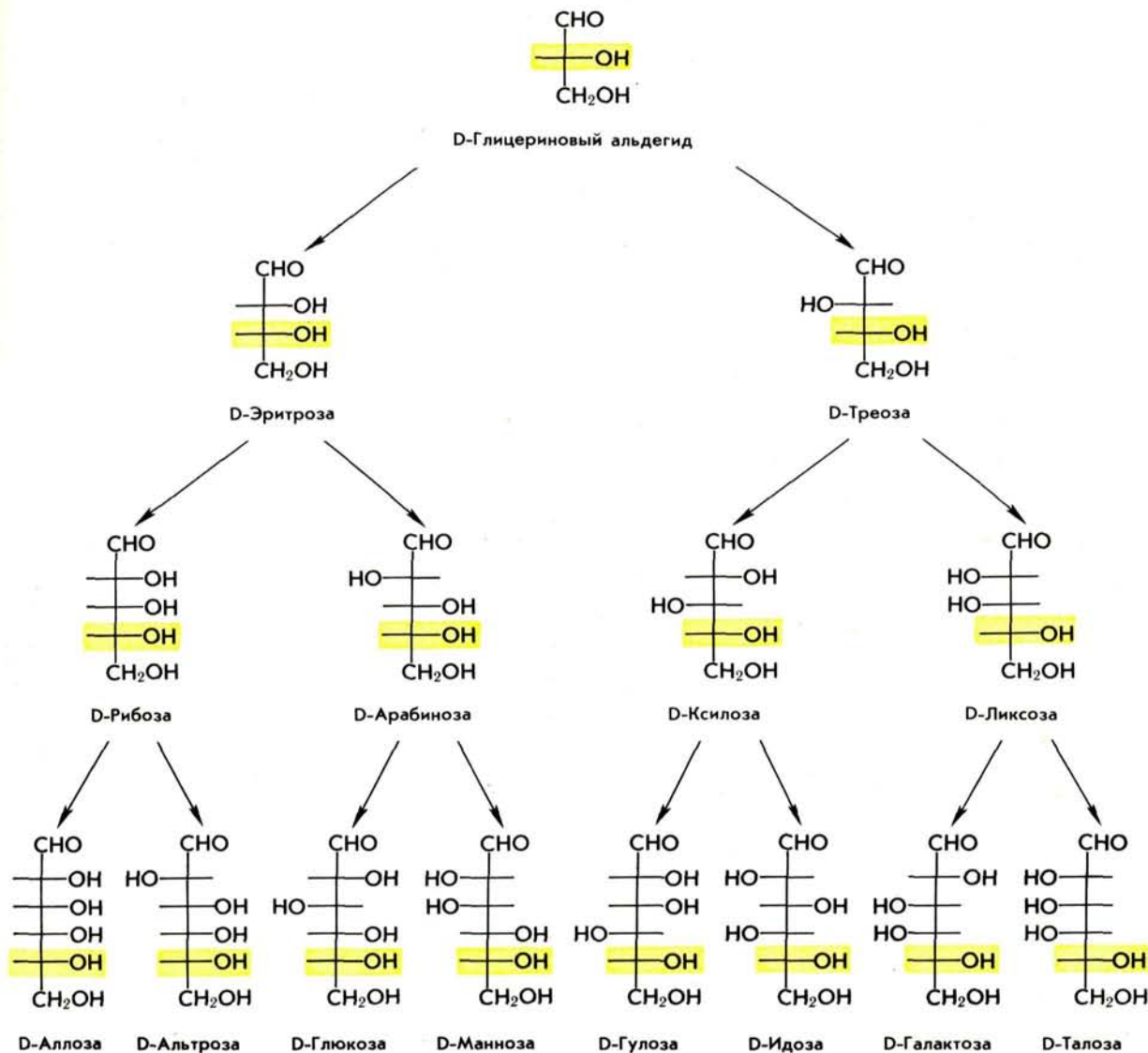


L-Глицериновый альдегид

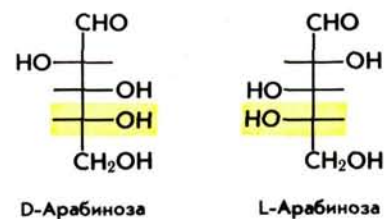
Построение фишеровских проекций предусматривает следующее: объемная модель соединения (в данном случае глицеринового альдегида) располагается над плоскостью чертежа так, чтобы угол, образуемый углерод-углеродными связями, был обращен к плоскости и при проецировании цепь углеродных атомов расположилась бы вертикально. При этом C-атом с наименьшим порядковым номером (у альдоз — альдегидный атом углерода) должен быть вверху, а два заместителя при асимметрическом атоме углерода (атом водорода и гидроксильная группа) окажутся справа и слева. Если OH-группа находится справа, такой изомер относится

к D-ряду, если слева — к L-ряду. При увеличении числа асимметрических атомов каждый из них рассматривается независимо от других и обладает D- или L-конфигурацией в соответствии с расположением связанной с ним гидроксильной группы. Моносахарид в целом относят к D-ряду, если наиболее удаленный от альдегидного асимметрический C-атом имеет D-конфигурацию.

Ниже изображены альдозы D-ряда, родоначальником которых является D-глицериновый альдегид



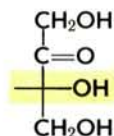
Для перехода от моносахарида D-ряда к L-ряду необходимо изменить на противоположную конфигурацию всех асимметрических углеродных атомов.



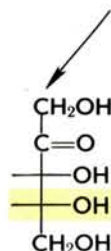
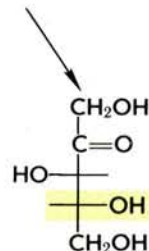
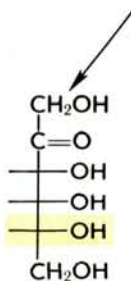
Простейшей кетозой, обладающей асимметрическим С-атомом, является тетроза — D-тетрулоза. Ниже изображены кетозы D-ряда:



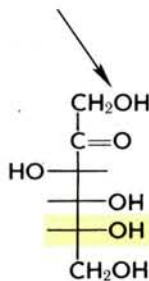
Хеурс [Haworth] Уолтер Норман (1883—1950), английский химик-органик. Образование получил в Манчестерском и Гёттингенском университетах, в 1912—1948 гг. — профессор Бирмингемского университета. Основные работы посвящены химии углеводов. Доказал, что глюкоза, галактоза и манноза содержат шестичленные циклы (формулы Хеурса). Изучал строение витамина С и впервые синтезировал его (1933, совместно с Т. Рейхштейном). Лауреат Нобелевской премии по химии (1937).



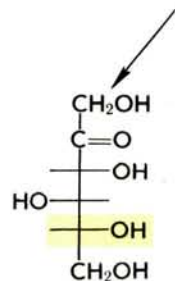
D-Тетрулоза (эритрулоза)

D-Рибулоза
(D-эритро-пентулоза)D-Ксилулоза
(D-трео-пентулоза)

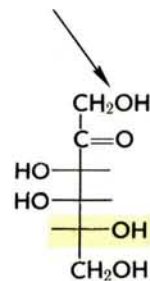
D-Псилоза



D-Фруктоза



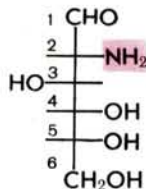
D-Сорбоза



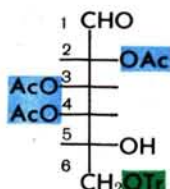
D-Тагатоза

Наличие в молекуле асимметрических атомов углерода делает моносахариды оптически активными соединениями, причем величина удельного вращения является характеристическим параметром моносахарида.

Номенклатура моносахаридов основывается на соединениях с неразветвленной цепью атомов углерода. Углеродные атомы нумеруют таким образом, чтобы карбонильный углерод имел наименьший номер. Заместители (атомы, функциональные группы) получают тот же номер, что и углеродный атом, с которым они соединены. Если в молекуле имеется более одной функциональной группы, они перечисляются в алфавитном порядке. Отсутствие ОН-группы отражается префиксом «дезокси».



2-Амино-2-дезоксид-
D-глюкоза
(D-глюкозамин)



2, 3, 4-три-О-ацетил-
6-О-тритил-D-глюкоза

Нередко при написании моносахаридных звеньев (прежде всего в олиго- и полисахаридах) используют буквенные обозначения:

Ara — Арабиноза	Gal — Галактоза
GalNAc — N-Ацетилгалактозамин	Glc — Глюкоза
GlcNAc — N-Ацетилглюкозамин	GlcA — Глюкуроновая кислота
ManNAc — N-Ацетилманнозамин	Xyl — Ксилоза
MurNAc — N-Ацетилмурамовая кислота	Man — Манноза
NeuNAc — N-Ацетилнейраминавая кислота	Rha — Рамноза
	Rib — Рибоза
	Fru — Фруктоза
	Fuc — Фукоза



Кёнигс [Koenigs] Вильгельм (1851—1906), немецкий химик-органик. Образование получил в Берлине; работал в лаборатории Ф. Кекуле, а затем А. Байера в Мюнхене. Известен работами по синтезу различных алифатических, ароматических и гетероциклических соединений. Впервые синтезировал хинолин (1879) и пиперидин (1881). Предложил (1901, совместно с Е. Кнорром) способ синтеза гликозидов сахаров.

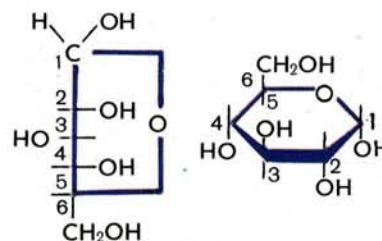
Циклические формы и таутомерия моносахаридов. Приведенные структуры являются ациклическими; в действительности, моносахариды находятся главным образом в полуацетальных циклических формах, которые возникают в результате взаимодействия карбонильной группы моносахарида с одной из его гидроксильных групп.

Впервые предположение о циклической форме сахаров было высказано А. А. Колли в 1870 г., однако лишь в 20-е годы нашего века У. Хеурсом был экспериментально определен размер лактольного цикла для некоторых моносахаридов. У. Хеурс предложил называть сахара с шестичленным циклом *пиранозами*, а с пятичленным — *фуранозами*. Большинство пентоз и гексоз образуют пиранозный цикл в результате взаимодействия карбонильной группы с гидроксильной группой при С-5. У альдоз фуранозный цикл образуется с участием гидроксильной группы при С-4.

Циклические формы моносахаридов принято изображать в перспективных формулах, предложенных У. Хеурсом. Например, пиранозная форма D-глюкозы в формулах Э. Фишера и У. Хеурса.

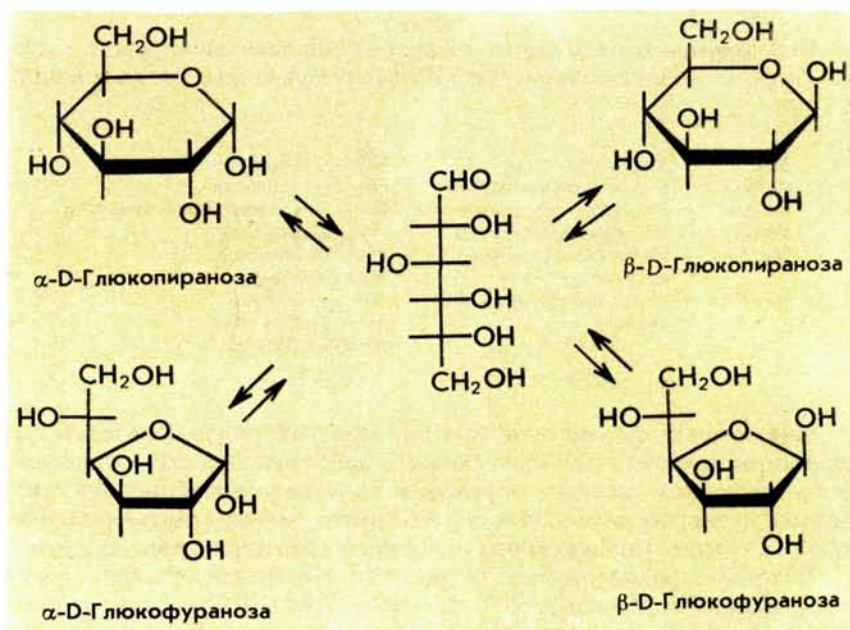
Для перехода от первых формул ко вторым необходимо придерживаться следующего правила: сверху от плоскости молекулы располагают группы, находящиеся при углеродных атомах с L-конфигурацией (кроме С-5 в пиранозах и С-4 в фуранозах), снизу — при углеродных атомах с D-конфигурацией; для боковой цепи, находящейся при С-5 в пиранозах и С-4 в фуранозах, правило обратное.

Легко видеть, что в результате взаимодействия карбонильной и гидроксильной групп альдозы образуются новые асимметрические центры при С-1, что влечет за собой появление еще одной пары стереомеров (аномеров) для каждого моносахарида. Стереомер, имеющий одинаковую конфигурацию при С-1 и последнем асимметрическом атоме (определяющем принадлежность моносахарида к D- или L-ряду), называется α -аномером, стереомер с противоположной конфигурацией при этих двух атомах называется β -аномером. В соответствии с данным правилом производные альдоз по С-1 относят к α - или β -аномерам.



D-Глюкопираноза

Обычно в растворах одновременно присутствуют различные таутомерные формы одного и того же моносахарида, находящиеся в динамическом равновесии друг с другом; при нарушении соотношения форм система возвращается в состояние равновесия (явление *мутаротации*), что можно заметить по изменению величины удельного вращения раствора. В обычных условиях равновесие существенно смещено в сторону α - и β -пираноз; относительное содержание α - и β -аномеров в значительной степени определяется конформацией пиранозного кольца.



Гидроксил, образующийся при C-1 в результате циклизации, называется полуацетальным, а углеродный атом (C-1) — аномерным. Полуацетальный гидроксил резко отличается по свойствам от других гидроксильных групп молекулы. Он легко может замещаться на другие нуклеофильные группировки, в результате чего образуются различные производные сахаров по C-1: гликозиды, гликозилгалогениды, 1-O-ацильные производные и т. д.

Углеводы — полифункциональные соединения: их химические свойства обусловлены как наличием карбонильной и гидроксильных групп, так и их взаимным расположением, т. е. стереохимическими особенностями данного моносахарида.

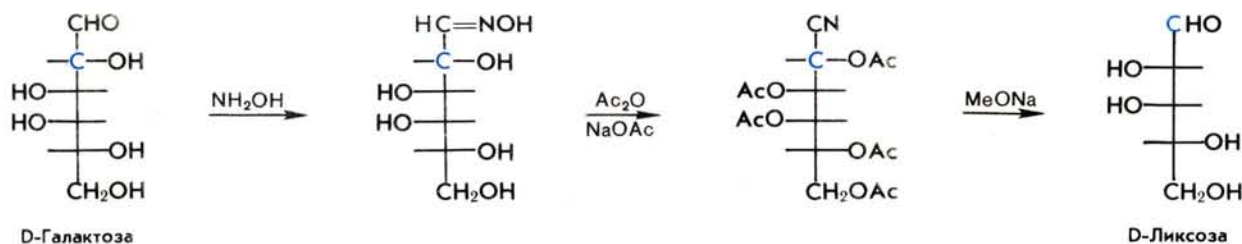
Строение большинства моносахаридов было установлено к концу XIX в. с использованием комплекса химических методов. В настоящее время при определении строения необычных моносахаридов, нередко встречающихся в составе антибиотиков и бактериальных полисахаридов, применяются, как правило, спектральные методы анализа, однако во многих случаях химические превращения остаются необходимым этапом исследования структуры.

Ниже рассмотрены превращения сахаров, которые могут быть использованы при установлении строения этого класса соединений.

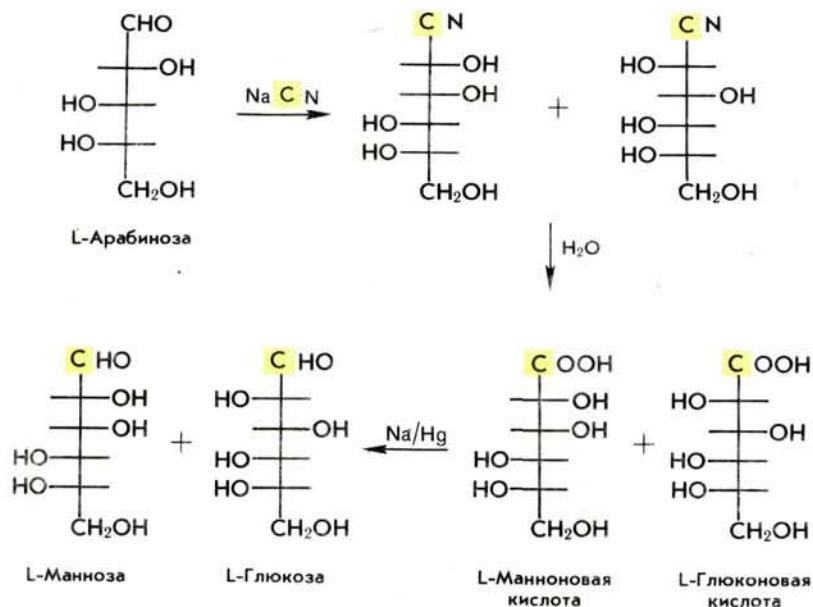
Реакции карбонильной группы. Несмотря на то, что в таутомерной смеси моносахаридов равновесие смещено в сторону циклических (полуацетальных и полукетальных) форм, некоторое коли-

чество ациклической формы присутствует в растворе, что позволяет сахарам вступать в реакции, характерные для альдегидов и кетонов.

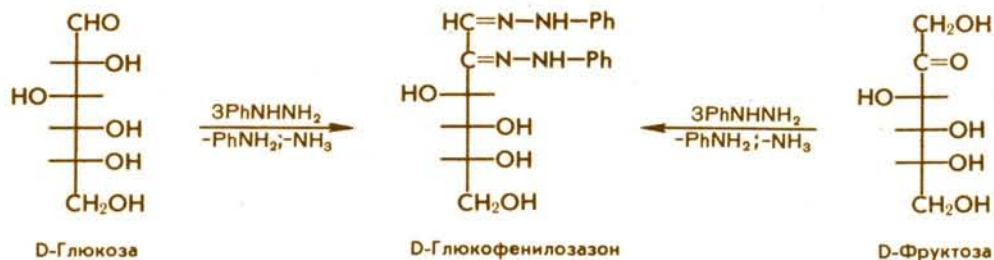
Так, при реакции моносахаридов с гидроксилмином получаются смеси оксимов циклических и ациклических форм. При действии на них уксусного ангидрида одновременно происходят ацетилирование и дегидратация с образованием нитрила альдоновой кислоты. Обработка полученного нитрила метилатом натрия приводит к деацетилированию и отщеплению молекулы синильной кислоты. Таким путем углеродная цепь альдозы укорачивается на один атом



Удлинение цепи может быть достигнуто циангидриновым методом. Взаимодействие альдозы с цианидом натрия приводит к смеси двух изомерных нитрилов альдоновых кислот, легко гидролизующихся в альдоновые кислоты (Г. Килиани). Последние при восстановлении амальгамой натрия дают альдозы (Э. Фишер)

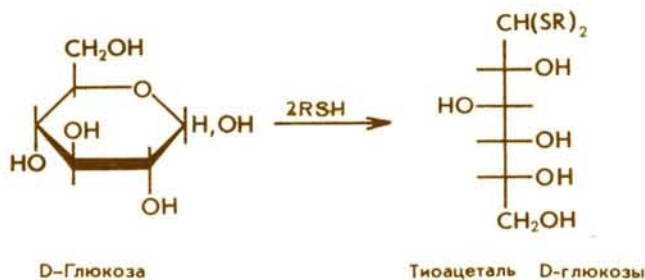


Реакции моносахаридов с гидразинами обычно приводят к смесям таутомерных гидразонов, поэтому их, как правило, не применяют для выделения и идентификации моносахаридов. Однако при использовании избытка арилгидразина образуются озоны, открытие которых Э. Фишером стимулировало быстрое развитие химии углеводов в конце прошлого века



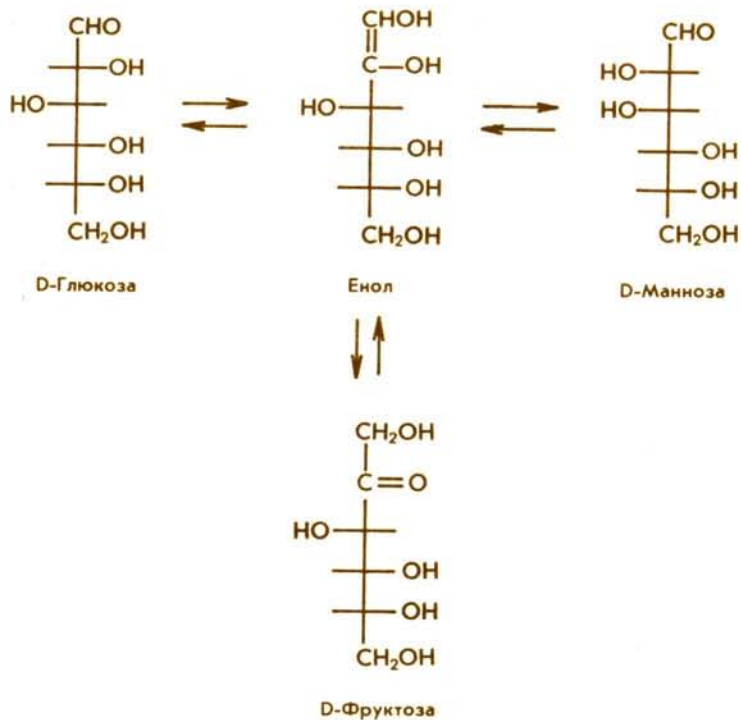
При образовании озона расходуется 3 моля фенолгидразина; полученный фенолгидразон окисляется второй молекулой фенолгидразина с превращением гидроксильной группы, находящейся рядом с альдегидной, в карбонильную. С последней взаимодействует третья молекула фенолгидразина, приводя к озону. Вследствие того что асимметрический центр при С-2 моносахарида исчезает, изомеры, отличающиеся лишь конфигурацией этого атома, образуют одни и те же озоны (например, D-глюкоза, D-манноза и D-фруктоза). Реакция позволяет определять родство различных моносахаридов.

При действии на моносахариды тиолов в кислой среде образуются тиоацетали, имеющие ациклическую структуру



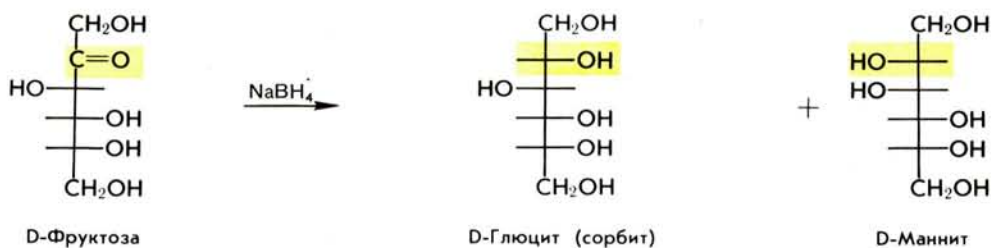
Тиоацетали устойчивы в щелочной, нейтральной и слабокислой средах, но легко регенерируют исходный моносахарид при обработке бромом в уксусной кислоте и представляют поэтому значительный интерес для синтетической химии углеводов.

Среди реакций, обусловленных наличием как карбонильной, так и гидроксильных групп, важную роль играет катализируемая кислотами и основаниями енолизация альдозы, ведущая к превращению ее в эпимер (стереоизомер, отличающийся конфигурацией при С-2) и соответствующую кетозу (реакция Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна)



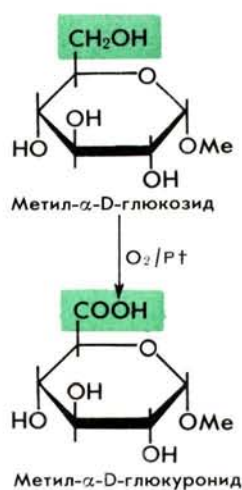
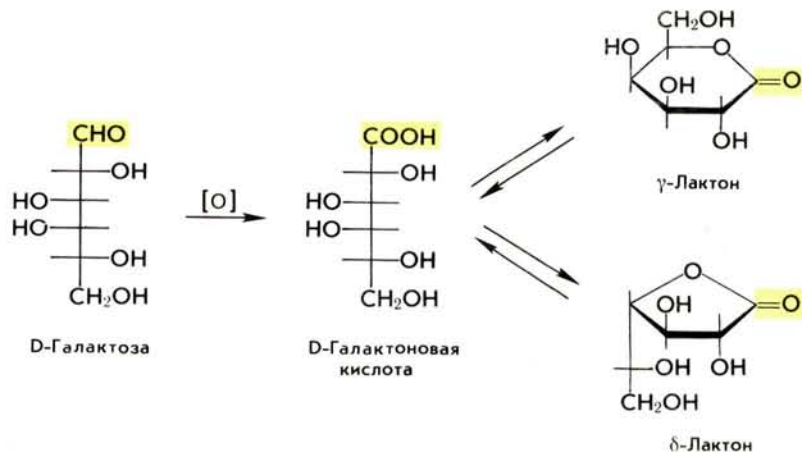
Поскольку реакция протекает легко, ее следует принимать во внимание при работе со свободными углеводами.

При восстановлении карбонильной группы моносахаридов получают полиолы (альдиты). Альдозы образуют лишь один полиол, кетозы дают смесь двух стереоизомеров; так, из D-фруктозы образуются D-глюцит и D-маннит



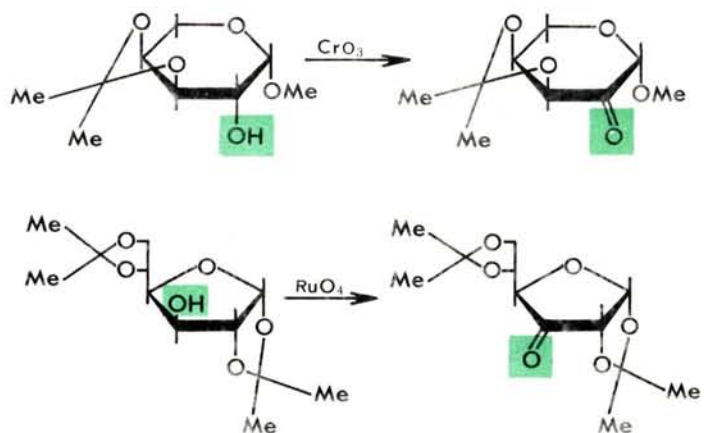
Восстановление обычно проводится боргидридом натрия в воде или спирте, реже амальгамой натрия.

При действии мягких окислителей, например брома, свободные моносахариды окисляются до альдоновых кислот, которые обычно выделяются в виде γ - и δ -лактонов:



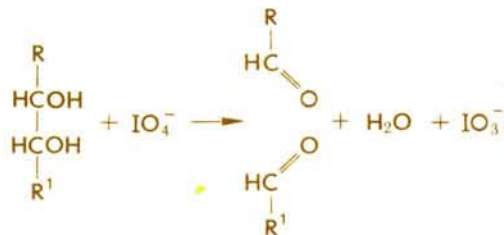
Окисление углеводов. Для окисления гидроксильных групп углеводов полуацетальная группа должна быть защищена; как правило, приходится также защищать и те гидроксильные группы, которые не должны быть окислены. Избирательное окисление первичных спиртовых групп в моносахаридах может быть достигнуто применением платиновых катализаторов, в результате образуются уронеовые кислоты.

Окисление вторичных спиртовых групп обычно проводится у избирательно защищенных производных; в качестве окислителей используются оксид хрома (VI) в пиридине, диметилсульфоксид в уксусном ангидриде или тетраоксид рутения



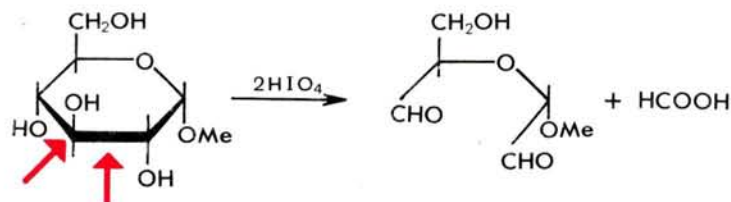
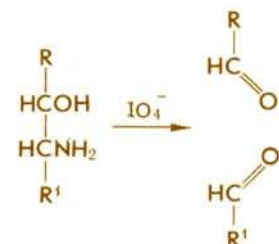
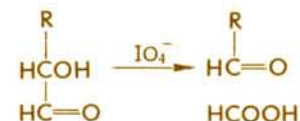
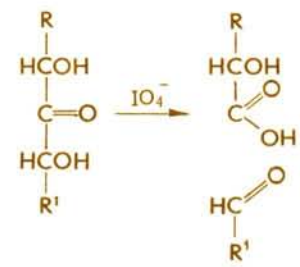
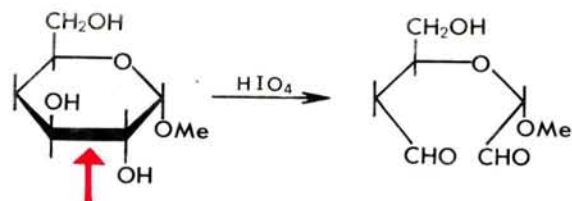
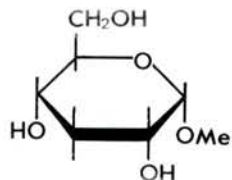
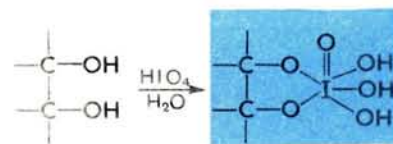
Важное значение для выяснения строения сахаров имеет реакция избирательного окисления α -гликольной группировки, которая протекает под действием иодной кислоты и периодатов.

Кроме α -гликолей, окислению периодатом подвергаются α -гидроксикарбонильные соединения, α -аминоспирты, α -кетональдегиды и α -дикетоны.



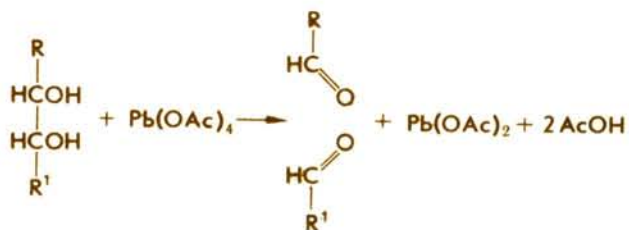
На окисление каждой α -гликольной группировки расходуется 1 моль HIO_4 ; при этом из первичной спиртовой группы образуется формальдегид, а из среднего звена 1, 2, 3-триольной группировки — муравьиная кислота. Реакция протекает через стадию образования пятичленного цикла, получающегося в результате присоединения к диольной группировке гидратированной формы иодной кислоты.

Поскольку реакция проходит количественно, она широко используется при анализе моно-, олиго- и полисахаридов. В зависимости от строения углевода окисление протекает по-разному. Так, например, окисление метил- α -D-глюкопиранозидов идет с выделением муравьиной кислоты и требует 2 моля иодной кислоты; при окислении 4-дезоксипроизводного α -D-метилглюкозида расходуется 1 моль иодной кислоты, а его 3-дезоксипроизводное не подвергается окислению

Метил- α -D-глюкопиранозидМетил-4-дезоксид- α -D-глюкопиранозидМетил-3-дезоксид- α -D-глюкопиранозид

В результате по расходу иодной кислоты и составу продуктов реакции можно судить о строении исходного сахара.

Подобно иодной кислоте и ее солям действует на α -гликольные группировки тетраацетат свинца:



Однако если окисление периодатом проводят в водной среде, то окисление тетраацетатом свинца — в уксусной кислоте, бензоле или хлороформе, что позволяет вводить в реакцию соединения, нерастворимые в воде.

Реакции гидроксильных групп. Моносахаридам свойственны все реакции, характерные для гидроксилсодержащих соединений: они образуют сложные и простые эфиры, ацетали и кетали, подвергаются реакциям замещения и элиминирования. Благодаря присутствию наряду с гидроксильными группами карбонильной функции некоторые из этих реакций протекают с большей легкостью, чем с обычными спиртами.

Сахара дают сложные эфиры как с органическими, так и с неорганическими кислотами (ацетаты, бензоаты, трифторацетаты, карбонаты). Сложноэфирные группировки легко вводятся и легко удаляются, что позволяет широко использовать их в качестве защитных группировок при синтезе углеводов.

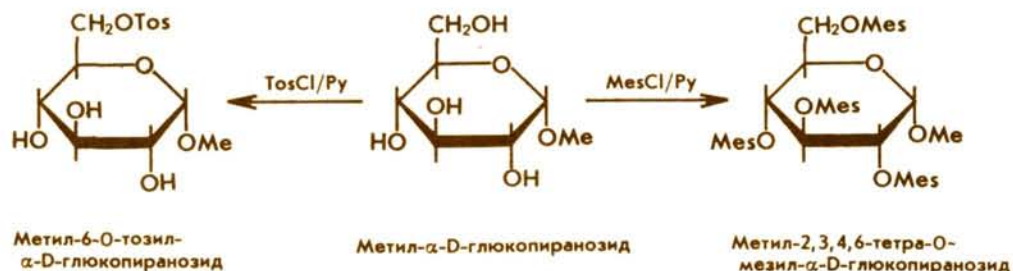
Широкое применение нашло ацетилирование. Его обычно проводят с помощью уксусного ангидрида в пиридине (при охлаждении) или в присутствии ацетата натрия (при нагревании). При избытке ангидрида образуются полные ацетаты. Если же берется рассчитанное количество ацилирующего агента, то при проведении реакции в пиридине можно получать производные, избирательно ацетилированные по отдельным гидроксилам. В первую очередь реагирует первичная спиртовая группа (при С-6 в гексахсахарах), затем гидроксилы при С-2, С-3 и наиболее трудно при С-4. Однако при избирательном ацилировании (особенно при ацетилировании) надо считаться с возможностью миграции ацильных группировок.

Удаление ацильных групп достигается обработкой сахара абсолютным метанолом в присутствии алкоголятов металлов или триэтиламина.

В последние годы применение в синтезе находят хлорацетильные производные, получающиеся при обработке сахаров ангидридом или хлорангидридом хлоруксусной кислоты в симметричном коллидине. Главное достоинство хлорацетильной защитной группировки — возможность ее количественного селективного удаления действием тиомочевины, т. е. в условиях, при которых не затрагиваются ацетильные группы.

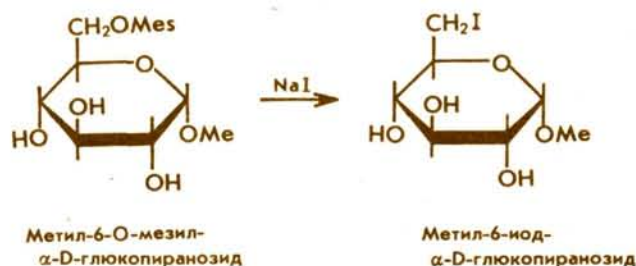
В химии углеводов широко используются также эфиры сульфокислот, в частности толуолсульфокислоты (тозилаты) и метансуль-

фонокислоты (мезилаты). Если мезилирование, как правило, может быть проведено по всем гидроксилам, то тозилрование в обычных условиях (т. е. в пиридине при охлаждении) идет лишь по гидроксилу при С-6

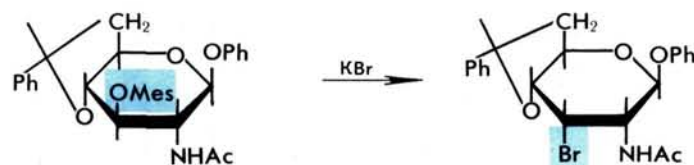


Регенерация исходных моносахаридов из их сульфонов может быть достигнута гидрированием над никелем Ренея, действием алюмогидрида лития и т. п., однако чаще эти сложные эфиры используются для дальнейших превращений.

Действительно, тозилокси- и мезилокси группы легко подвергаются нуклеофильному замещению, что дает возможность получать различные производные сахаров, например галогенпроизводные



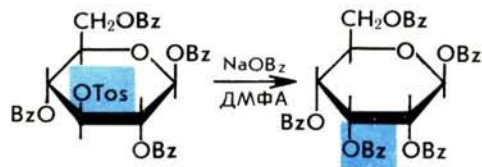
Замещение при вторичном гидроксиле протекает с большим трудом и сопровождается обращением конфигурации



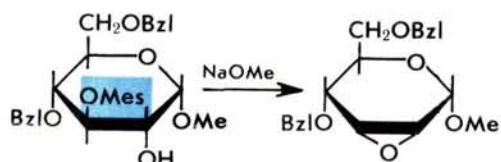


Кун (Kuhn) Рихард (1900—1967), немецкий химик и биохимик. Окончил Мюнхенский университет (1922); с 1929 г. — профессор Гейдельбергского университета и директор Института химии в Гейдельберге. Основные работы посвящены химии витаминов и каротиноидов. Установил строение α - и β -изомеров каротина (1933), разработал метод их синтеза. Выделил витамин B_2 (рибофлавин) и расшифровал структуру флавинадениндуклеотида. Выделил витамин B_{12} из дрожжей и установил его строение. Лауреат Нобелевской премии по химии (1938).

Если использовать в качестве атакующей бензилоксигруппу, можно перейти от одного моносахарида к другому



Реакция внутримолекулярного замещения позволяет перейти от сульфоноватов к ангидросахарам

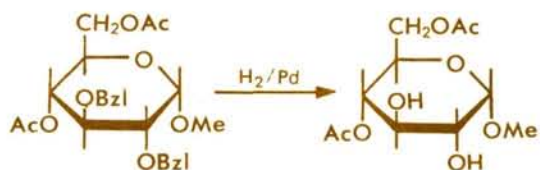


Из простых эфиров моносахаридов наиболее изучены метиловые, бензиловые и трифенилметиловые (тритиловые).

Метиловые эфиры сахаров широко используются для установления строения олиго- и полисахаридов. В качестве метилирующего агента применяются иодистый метил или диметилсульфат в присутствии основания. В последние годы широкое распространение получили методы Р. Куна (метилирование иодистым метилом в диметилформамиде в присутствии оксидов серебра или бария) и С.-И. Хакомори (метилирование в диметилсульфоксиде в присутствии диметилсульфенилнатрия). Последний метод дает практически количественное алкилирование всех гидроксильных групп, что особенно важно при метилировании олиго- и полисахаридов.

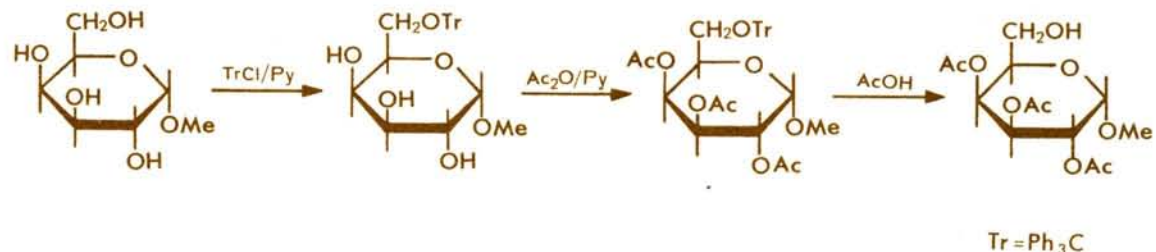
Деметилирование проходит с большим трудом; наилучшие результаты получаются при использовании треххлористого бора в дихлорметане. Легче всего деметируется полуацетальный гидроксил.

Бензиловые эфиры сахаров нашли применение как промежуточные продукты при синтезах: бензильная группа, устойчивая как в кислой, так и в щелочной средах, легко удаляется при каталитическом гидрировании над платиной или палладием



Бензилирование осуществляется действием на моносахарид бромистого бензила в диметилформамиде в присутствии оксидов серебра и бария, щелочей или гидроксида натрия.

Тритиловые эфиры широко используются в химии углеводов для защиты первичной спиртовой группы: из-за объемности

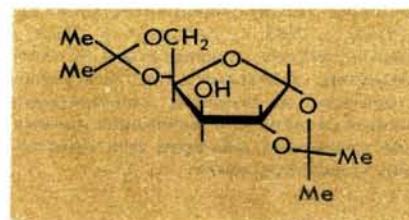


трифенилметильной группировки реакция с вторичными гидроксилами идет лишь в специально подобранных условиях. Тритиловые эфиры получают обработкой моносахаридов трифенилхлорметаном в пиридине. Удаление тритильной группировки может быть достигнуто действием кислот или каталитическим гидрированием над палладием. В качестве примера можно привести получение производного галактозы со свободной гидроксильной группой при С-6.

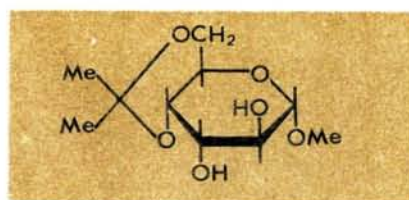
Для специфической защиты одновременно двух гидроксильных групп применяют алкилиденные производные моносахаридов, образующиеся при их реакции с альдегидами или кетонами под действием кислотных катализаторов. Чаще всего применяют ацетон или бензальдегид, реже ацетальдегид и циклогексанон.

При конденсации свободных моносахаридов с ацетоном в присутствии серной кислоты или хлорида цинка образуются изопропилиденные, или ацетоновые, производные. Эти соединения содержат пятичленный диоксолановый цикл, иногда — шестичленный 1,3-диоксановый.

Изопропилиденные производные хорошо известны как для циклических (пиранозных и фуранозных), так и для ациклических форм моносахаридов, причем в зависимости от условий могут образовываться различные изомеры. Так, при ацетонировании метил- α -D-галактозида в присутствии серной кислоты образуется только 3,4-О-изопропилиденное производное, а в присутствии хлорида цинка — также и 4,6-О-изопропилиденное производное



1,2,5,6-Ди-О-изопропилиден- α -D-глюкофураноза



Метил-4,6-О-изопропилиден- α -D-альтритропиранозид

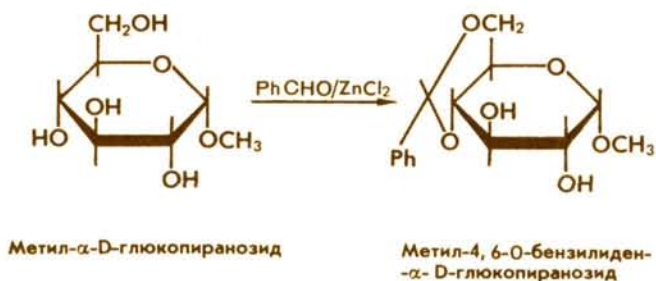




Хакомори [Nakomori] Сен-Итиро (р. 1929), американский биохимик. Окончил Тохоку университет в Сендае (1952), с 1963 г. работает в США в Вашингтонском университете (Сиэтл). Известен работами по выяснению структуры и функции гликолипидов животных клеток и изучению изменений клеточных мембран при онкогенной трансформации.

Изопропилиденные и другие алкилиденные защитные группировки легко удаляются в условиях мягкого кислотного гидролиза, например в разбавленной уксусной кислоте. Благодаря различной стабильности изопропилиденных циклов по отношению к гидролизу (что связано со стереохимическими особенностями молекулы) можно осуществлять избирательное отщепление одной из этих группировок.

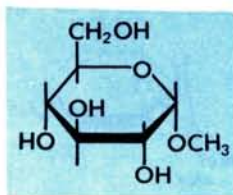
Конденсация моносахаридов с бензальдегидом в присутствии хлорида цинка приводит к бензилиденным производным в виде двух диастереомеров. Как правило, образуется шестичленный 1,3-диоксанный цикл (гликопиранозиды дают исключительно 4,6-О-бензилиденные производные)



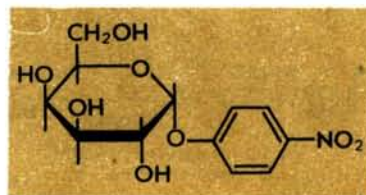
Бензилиденная защита может быть снята не только в кислых условиях (как изопропилиденная), но и с помощью каталитического гидрирования.

Гликозиды

Гликозиды образуют обширный класс соединений, а гликозидная связь — основной тип связи во всех важнейших природных углеводсодержащих соединениях. Наиболее распространена O-гликозидная связь, которая соединяет моносахаридные остатки друг с другом (в олиго- и полисахаридах) или с неуглеводными компонентами (в гликозидах и углеводсодержащих биополимерах). В природе существуют соединения и с N-, C- и S-гликозидными связями. Наиболее известными и широко распространенными представителями N-гликозидов являются нуклеозиды, C- и S-гликозиды встречаются редко.



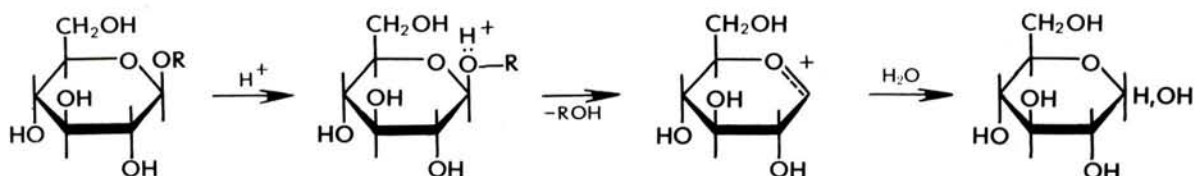
Метил- α -D-гликопиранозид



p-Нитрофенил- α -D-галактопиранозид

Согласно принятой номенклатуре в названии гликозидов на первом месте указывается наименование заместителя при аномерном центре (агликона), затем его конфигурация и, наконец, название углеводного остатка.

Химические свойства O-гликозидов, так же как и других гликозидов, определяются структурой моносахаридного остатка и природой агликона. Общим свойством их является сравнительная легкость протекания кислотного гидролиза, приводящего к исходному моносахариду



Большинство гликозидов (кроме гликозидов с электроотрицательными заместителями в β -положении к гликозидной связи) устойчиво в щелочной среде.

Для установления строения гликозида необходимо выяснить природу углеводного остатка и агликона, а также конфигурацию гликозидной связи. Наиболее мощным средством решения этих вопросов служат физико-химические методы анализа: ЯМР и масс-спектрометрия. Относительная простота спектров ЯМР гликозидов дает возможность определить не только основные структурные черты гликозидного остатка и агликона, но и конфигурацию гликозидной связи. Масс-спектрометрия позволяет провести дальнейшую детализацию структуры производных гликозидов.

Не потеряли своего значения и классические методы анализа, такие, как кислотный гидролиз, периодатное окисление, поляриметрия. Если гликозильный остаток представлен моносахаридом с обычной структурой, эти методы в сочетании с различными видами хроматографии (прежде всего с газожидкостной хроматографией) дают возможность его идентифицировать. В случае необычных по структуре сахаров, входящих, например, в состав некоторых антибиотиков, приходится использовать весь арсенал методов структурного анализа.

Классический метод выяснения конфигурации гликозидной связи основан на определении удельного вращения раствора: согласно правилу Кляйна, молекулярное вращение гликозида является алгебраической суммой молекулярных вращений

агликона и гликозильного остатка (молекулярное вращение $[M] = \frac{[\alpha] \cdot M}{100}$, где

α — удельное вращение, M — молекулярная масса). Молекулярное вращение гликозильного остатка определяется по удельному вращению соответствующего метилгликозида, т. е. гликозида с оптически неактивным агликоном. Таким образом, зная молекулярное вращение агликона и гликозильного остатка, имеющего α - или β -конфигурацию при C-1, можно по молекулярному вращению гликозида определить, относится ли он к α - или β -ряду.

Олигосахариды гидролизуются кислотами до моносахаридов по механизму, аналогичному механизму гидролиза О-гликозидов: реакция протекает через образование гликозил-катиона. Восстанавливающие олигосахариды дают реакции, характерные для карбонилсодержащих соединений, окисляются до альдоновых кислот, восстанавливаются до полиолов, образуют озоны. Как и в случае моносахаридов, в водных растворах восстанавливающих олигосахаридов наблюдается мутаротация.

Для гидроксильных и других функциональных групп олигосахаридов характерны те же реакции, что и для составляющих их моносахаридов.

Разделение смесей олигосахаридов проводится сочетанием хроматографических методов. Кислые олигосахариды отделяются от нейтральных ионообменной хроматографией или электрофорезом на бумаге. Разделение нейтральных олигосахаридов осуществляется с помощью хроматографии на бумаге и тонкослойной хроматографии на силикагеле. В последнее время для разделения олигосахаридов все чаще используется ВЭЖХ.

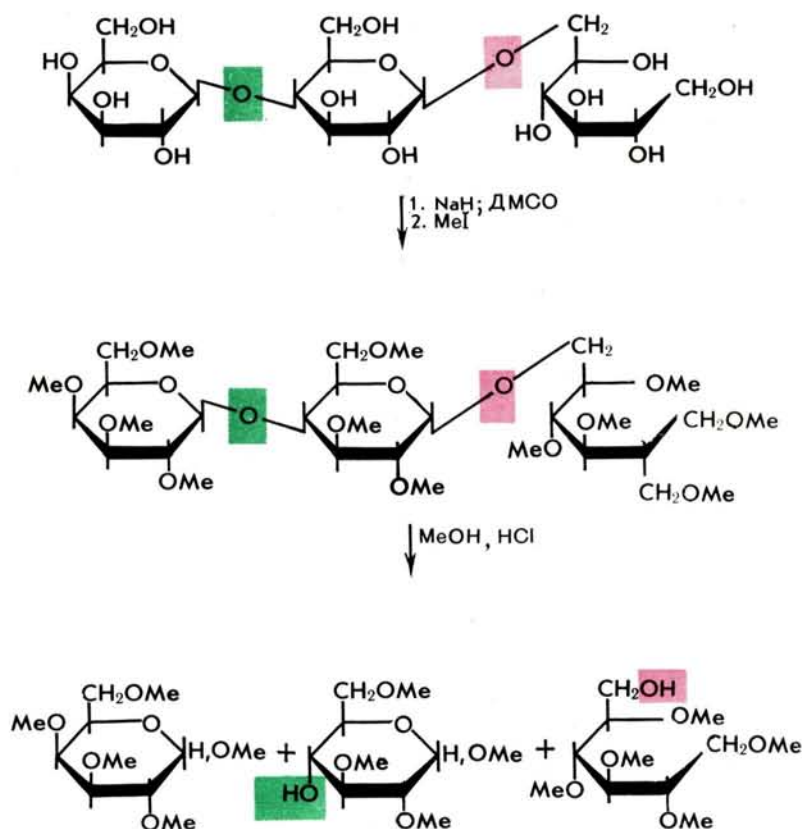
В отличие от химии белков и нуклеиновых кислот, где определение первичной структуры сводится к установлению последовательности аминокислот или нуклеиновых оснований в линейной цепи биополимера, в случае углеводов биополимеров задача существенно усложняется. Для выяснения строения олигосахаридов необходимо определить его моносахаридный состав, последовательность моносахаридных остатков и места разветвления олигосахаридной цепи, места присоединения моносахаридных остатков друг к другу, размеры циклов моносахаридных звеньев, конфигурацию гликозидных связей.

Определение моносахаридного состава проводится анализом продуктов кислотного гидролиза или, чаще, метанолиза сахара. Состав продуктов кислотного гидролизата анализируется с помощью хроматографии или электрофореза на бумаге. Нередко используется коммерческий углеводный анализатор, разделение осуществляется на ионообменных смолах методом распределительной хроматографии в водно-спиртовой смеси или в виде боратных комплексов сахаров. Скорость гидролиза гликозидных связей, образованных остатками нейтральных, amino- и дезокси-сахаров, различна. Легче всего отщепляются остатки сиаловых (N-ацетилнейраминовой, N-гликолилнейраминовой) кислот, труднее всего расщепляются связи, образованные остатками amino-сахаров и уроновых кислот. Фуранозиды гидролизуются значительно быстрее пиранозидов. В итоге при гидролизе олигосахаридов может иметь место неполное расщепление связей или кислотная деструкция образующихся моносахаридов, что искажает результаты анализа. Лучшие результаты дает метанолит в присутствии газообразного хлористого водорода (1,7 н. HCl, 80 °C, 18 ч) — в этом случае образуются метилгликозиды, устойчивые к кислотной деструкции. Качественный и количественный состав продуктов метанолиза определяется методом газожидкостной хроматографии в виде триметилсилильных или трифторацетильных производных.

Определение мест присоединения моносахаридных остатков друг к другу осуществляется исчерпывающим метилированием олигосахаридов с последующим гидролизом и анализом образующихся продуктов. Метилирование в большинстве случаев проводится по методу С.-И. Хакомори (см. с. 468), при этом наряду с гидроксильными группами модификации подвергается также ацетамидная группа N-ацетилгексозаминов. Полнота реакции контролируется ИК-спектроскопией по отсутствию полосы поглощения гидроксильных групп.

Олигосахарид подвергается далее кислотному гидролизу или, лучше, метанолизу, в результате получается набор метилированных моносахаридов со свободными гидроксильными группами, участвующими в образовании гликозидных связей.

По результатам анализа можно судить также о структуре олигосахаридного остова: обнаружение в метилированных продуктах после метанолиза моносахаридов с более чем одной свободной гидроксильной группой свидетельствует о наличии в цепи разветвлений. Одновременно этим путем можно определять концевые моносахаридные остатки. Остаток, локализованный на невосстанавливаемом конце олигосахаридной цепи, не содержит свободных гидроксильных групп, а моносахарид, находившийся на восстанавливаемом конце, легко идентифицировать в виде метилированного полиола в продуктах гидролиза метилированного восстановленного олигосахариды. Таким образом, для трисахаридов анализ метилированием сразу дает последовательность моносахаридных звеньев в молекуле.



Идентификация продуктов проводится методом ГЖХ путем сравнения со стандартными, частично метилированными метилглицозидами. Широкое применение нашел хромато-масс-спектрометрический метод анализа альдитацетатов, получающихся после восстановления боргидридом и ацетилирования продуктов гидролиза.

Кроме того, используется (О. С. Чижов и др.) масс-спектрометрический метод установления строения метилированных метил-

гликозидов, подвергнутых после гидролиза исчерпывающему дейтерометилированию. Расшифровка масс-спектров позволяет однозначно установить положение дейтерометильных групп, отвечающее локализации свободных гидроксильных групп в исходном частично метилированном метилгликозиде.

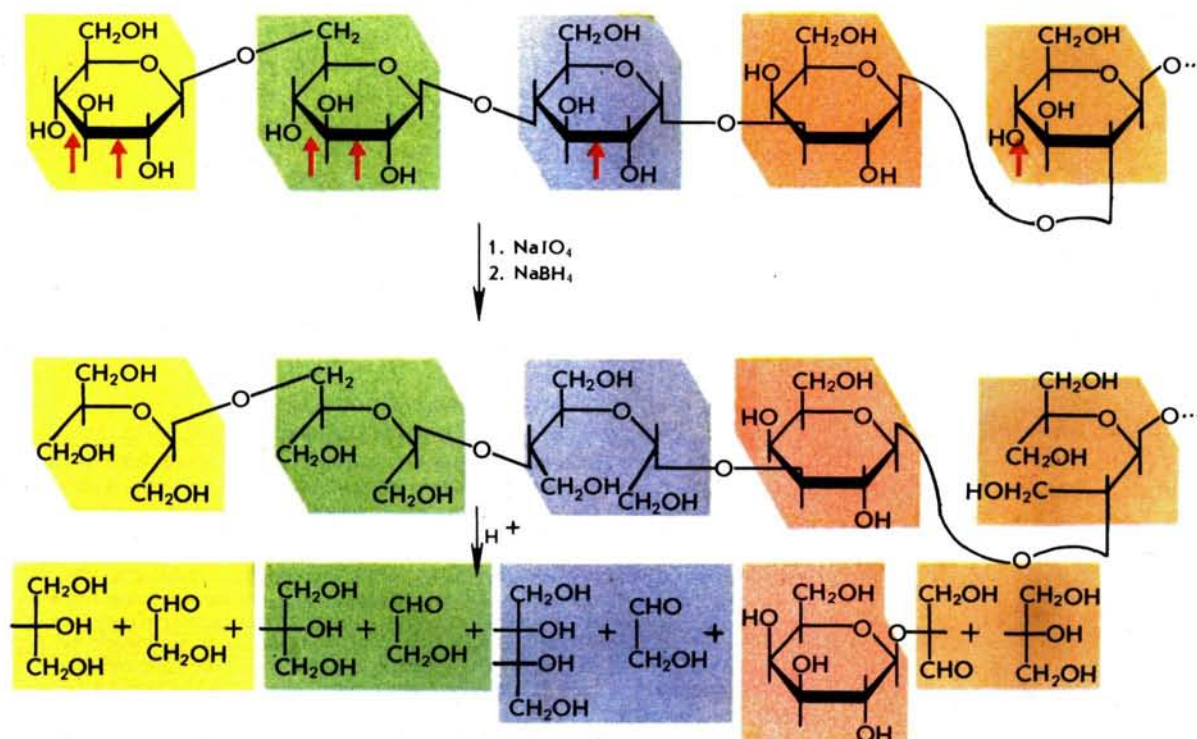
Последовательность звеньев в молекуле гетероолигосахарида определяется главным образом с помощью экзогликозидаз — ферментов, отщепляющих по одному моносахаридному остатку с невосстанавливающего конца молекулы. В таблице 16 приведены данные о специфичности и источниках ферментов, часто используемых для анализа структуры олигосахаридов, входящих в состав животных гликопротеинов.

Гликозидазное расщепление целесообразно проводить в сочетании с методом метилирования; с помощью метилирования определяется концевой невосстанавливающий моносахаридный остаток, далее он отщепляется соответствующей гликозидазой, а затем вновь образовавшийся невосстанавливающий концевой моносахарид идентифицируется с помощью метилирования.

Важным свойством гликозидаз является стереоспецифичность их действия: α -гликозидаза не расщепляет β -гликозидную связь. Это свойство позволяет однозначно установить конфигурацию гликозидной связи расщепляемого олигосахарида.

К классическим методам структурного анализа углеводсодержащих биополимеров относится периодатное окисление (см. с. 468).

Модификацией метода является деградация по Ф. Смиту, заключающаяся в последовательном окислении сахара периодатом, восстановлении боргидридом и последующем мягком кислотном гидролизе образующегося продукта; сохранившиеся гликозидные связи при этом не затрагиваются.



Углеводы

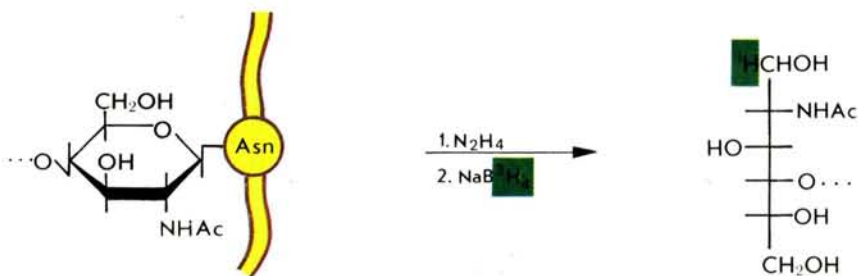
Гликозидазы, используемые в структурном анализе сахаров



Кобата [Kobata] Акира (р. 1933), японский биохимик. Окончил Токийский университет (1956), с 1982 г.— профессор этого университета. Известен трудами по изучению структуры углеводных детерминант гликопротеинов.

Гликозидазы	Источник	Специфичность
Нейраминидаза	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Vibrio cholerae</i>	α -NeuNAc-(2→6)-D-GalNAc α -NeuNAc-[2→3(6)]-D-Gal
β -Галактозидаза	<i>Clostridium perfringens</i>	β -D-Gal-[1→4(3)]-D-GlcNAc
β -Маннозидаза	Мука бобов канавалии Яйцевод кур Улитка	Не определена
α -Маннозидаза	Мука бобов канавалии <i>Aspergillus niger</i>	α -D-Man-[1→2(6,3)]-D-Man
α -Фукозидаза	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Aspergillus perfringens</i>	α -L-Fuc-(1→2)-D-Gal
β -N-Ацетилглюкозаминидаза	Эмульсин миндаля <i>Clostridium perfringens</i>	α -L-Fuc-[1→3(4)]-D-Gal Широкая
α -Галактозидаза	Мука бобов канавалии <i>Aspergillus niger</i>	Широкая
α -N-Ацетилгалактозаминидаза	<i>Aspergillus niger</i>	Широкая

Оригинальная методика анализа структуры олигосахаридов, входящих в состав животных гликопротеинов, разработана А. Кобатой. На первой стадии олигосахаридные цепи отщепляются от полипептидной части молекулы обработкой безводным гидразином, а затем восстанавливаются NaB^3H_4 , давая меченные тритием производные



Последующие этапы анализа проводятся следующим образом: после кислотного гидролиза в виде радиоактивно меченного полиола идентифицируется моносахарид, находившийся на восстанавливающем конце цепи. Далее путем восстановления моносахаридов NaB^3H_4 и анализа смеси образующихся радиоактивно меченных альдитов определяется моносахаридный состав. Последовательность моносахаридов устанавливается с помощью экзогликозидаз: уменьшение молекулярной массы радиоактивно меченного олигосахарид, о котором судят по данным гель-фильтрации на биогеле Р—4, свидетельствует об отщеплении соответствующего (отвечающего специфичности фермента) моносахарида. Число отщепившихся остатков удается определить, оценивая уменьшение молекулярной массы в условных «глюкозных единицах» (для этого используется колонка, калиброванная олигомерами глюкозы разной длины). Наконец, анализ положения гликозидных связей проводится обычным образом с помощью метилирования. На различных этапах анализа широко практикуется сравнение с заведомыми образцами олигосахаридов.

Полисахариды (гликаны) представляют собой высокомолекулярные соединения, образующиеся при поликонденсации моносахаридов. В состав гомополисахарида входит один, а гетерополисахарида — несколько типов моносахаридных остатков. Чаще всего в составе полисахаридов встречается D-глюкоза, но широко распространены также полисахариды, содержащие D-маннозу, D-галактозу, D-фруктозу, D-глюкозамин. Нередко полисахариды имеют заместители неуглеводной природы — остатки серной, фосфорной или органических кислот.

Большинство полисахаридов имеют тривиальные названия, часто в соответствии с источником, из которого они были выделены: целлюлоза, крахмал, хитин. Основой более строгой номенклатуры служит моносахаридный состав полисахарида: D-глюканом называется полисахарид, построенный из остатков D-глюкозы, а D-галакто-D-маннаном — из остатков D-галактозы и D-маннозы.

Молекулярная масса полисахаридов колеблется в широких пределах — от нескольких тысяч до нескольких миллионов. Любой образец полисахарида в строгом смысле слова не гомогенен, а представляет собой смесь полимергомологов. Для определения средних молекулярных масс полисахаридов используются в основном физические методы — осмометрия, светорассеяние и ультрацентрифугирование.

Широко варьируют и физические свойства полисахаридов. Большинство из них растворимы в воде, в то же время некоторые линейные полисахариды, являющиеся структурными компонентами клеточных стенок, в воде не растворяются и даже почти не набухают.

Полимерная природа полисахаридов определяет и их основные химические свойства. Вклад альдегидной группы незначителен, основную функциональную нагрузку несут гидроксильные группы. Как и в олигосахаридах, гликозидные связи в полисахаридах чувствительны к действию кислот.

Одна из сложностей работы с полисахаридами заключается в том, что не существует строгих критериев их гомогенности. Считается, что полисахарид индивидуален, если аналитические методы (хроматография, электрофорез, ультрацентрифугирование) не обнаруживают примесей, а различные способы очистки не меняют мономерный состав полисахарида и его физико-химические свойства.

Методы выделения полисахаридов весьма разнообразны. К ним относятся экстракция (водой, щелочами, разбавленными кислотами), осаждение (спиртом, сульфатом аммония, бромидом цетилтриметиламмония и цетилпиридиния), хроматография (ионообменная, гельфильтрация), ультрафильтрация и ультрацентрифугирование.

Для установления строения полисахаридов необходимо охарактеризовать полимерные молекулы в целом с учетом регулярности их построения и определить молекулярную массу. Основным способом выяснения структуры полисахарида является расщепление полимера на олигосахаридные фрагменты, установление строения каждого фрагмента и воссоздание на их основе структуры исходного полимера. Большинство полисахаридов построено из повторяющихся олигосахаридных блоков: в этом случае задача сводится к расщеплению полисахаридной цепи, выделению повторяющегося звена и анализу его структуры.

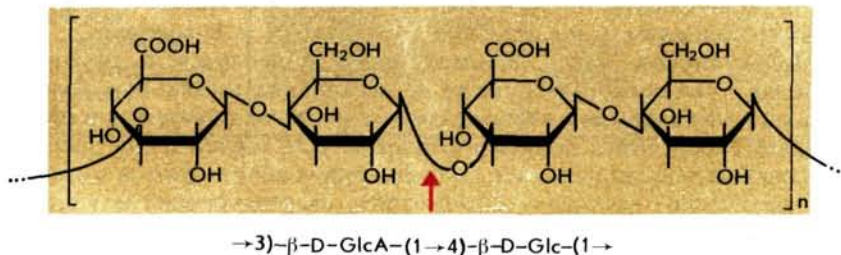
В структурном анализе полисахаридов широко используются *полный и частичный кислотный гидролиз*. В связи с различной устойчивостью гликозидных связей к кислотному гидролизу и с раз-



Кочетков Николай Константинович (р. 1915), советский химик-органик, академик АН СССР (1979). Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1939), с 1966 г. — директор Института органической химии АН СССР. Предложил ряд новых методов синтеза углеводов, осуществил направленный синтез сложных полисахаридов. Исследовал структуру полисахаридов микробного происхождения.

личной растворимостью полисахаридов условия гидролиза существенно варьируют. Для полного расщепления наиболее часто используется 2 — 4 н. соляная (100 °С, 3 — 4 ч) или 2 н. серная кислоты (100 °С, 2 — 4 ч).

При частичном гидролизе гомополисахаридов в зависимости от условий получается набор олигосахаридов различной длины. В случае гетерополисахаридов нередко удается подобрать условия, при которых наблюдается предпочтительный гидролиз определенного типа связи, что приводит к образованию характеристических олигосахаридных фрагментов; такие фрагменты получаются, в частности, при гидролизе полисахаридов, состоящих из чередующихся остатков нейтральных сахаров и уоновых кислот, например капсулярного полисахарида типа III пневмококков



Модификации кислотного гидролиза — ацетоллиз и метанолиз — имеют в ряде случаев преимущества перед обычным гидролизом. При ацетоллизе (обработка 2 — 4%-ным раствором серной кислоты в смеси уксусной кислоты и уксусного ангидрида) устойчивость некоторых гликозидных связей отличается от таковой при гидролизе, что позволяет получить разные структурные фрагменты. Хорошие результаты дает сольволиз жидким фторидом водорода, проведение которого в различных температурных режимах позволяет расщеплять полисахариды с различной степенью избирательности.

Важным методом частичного расщепления полисахаридов является ферментативный гидролиз; при этом используются эндоферменты, расщепляющие полисахариды в середине цепи. Наиболее известный из таких ферментов — лизоцим, расщепляющий β(1 → 4)-гликозидные связи между остатками N-ацетилмуравьей кислоты и N-ацетилглюкозамина в полисахариде (муреине) клеточной стенки бактерий (см. с. 190).

Основная сложность применения к полисахаридам метода метилирования заключается в трудности достижения полноты реакции; поэтому, как правило, используется многократная обработка полисахаридов метилирующими агентами. Наилучшие результаты дает метилирование по Хакомори. Часто используемым вариантом гидролиза метилированных полисахаридов, помимо метанолиза, является частичный гидролиз 90%-ной муравьиной кислотой с последующим гидролизом серной кислотой в более мягких условиях, чем это требовалось бы для расщепления интактного метилированного полисахарида.

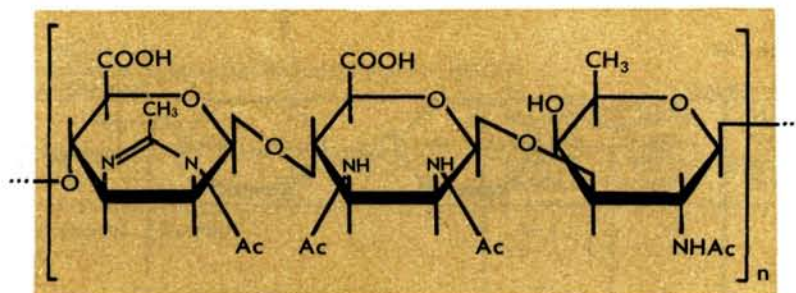
Периодатное окисление применяется практически во всех случаях установления строения полисахаридов. Наиболее часто используется расщепление по Смитту; во многих случаях оно помогает определить размер цикла и положение гликозидных связей. При окислении разветвленных полисахаридов по соотношению

образующихся глицерина (из концевых невосстанавливающих звеньев) и эритрита (из звеньев, находящихся в середине цепи) можно определить число разветвлений. Так, при расщеплении амилопектина глицерин и эритрит образуются в соотношении 1 : 15, что свидетельствует о том, что один концевой моносахарид (и следовательно, одно разветвление) приходится на каждые 15 звеньев полисахаридной цепи.

Классическая схема установления строения полисахаридов, включающая в качестве основных этапов определение моносахаридного состава, типов замещения, последовательности и аномерной конфигурации моносахаридных остатков, применима только к полисахаридам, которые количественно расщепляются в условиях кислотного гидролиза (ацетолиза, метанолиза) до соответствующих моносахаридных единиц.

При анализе полисахаридов необычного строения, состоящих из сахаров, разрушающихся в условиях деполимеризации, или из сахаров, гликозидные связи которых не поддаются кислотному расщеплению, классическая схема становится неэффективной из-за невозможности преодолеть даже первый ее этап, т. е. определить моносахаридный состав полимера.

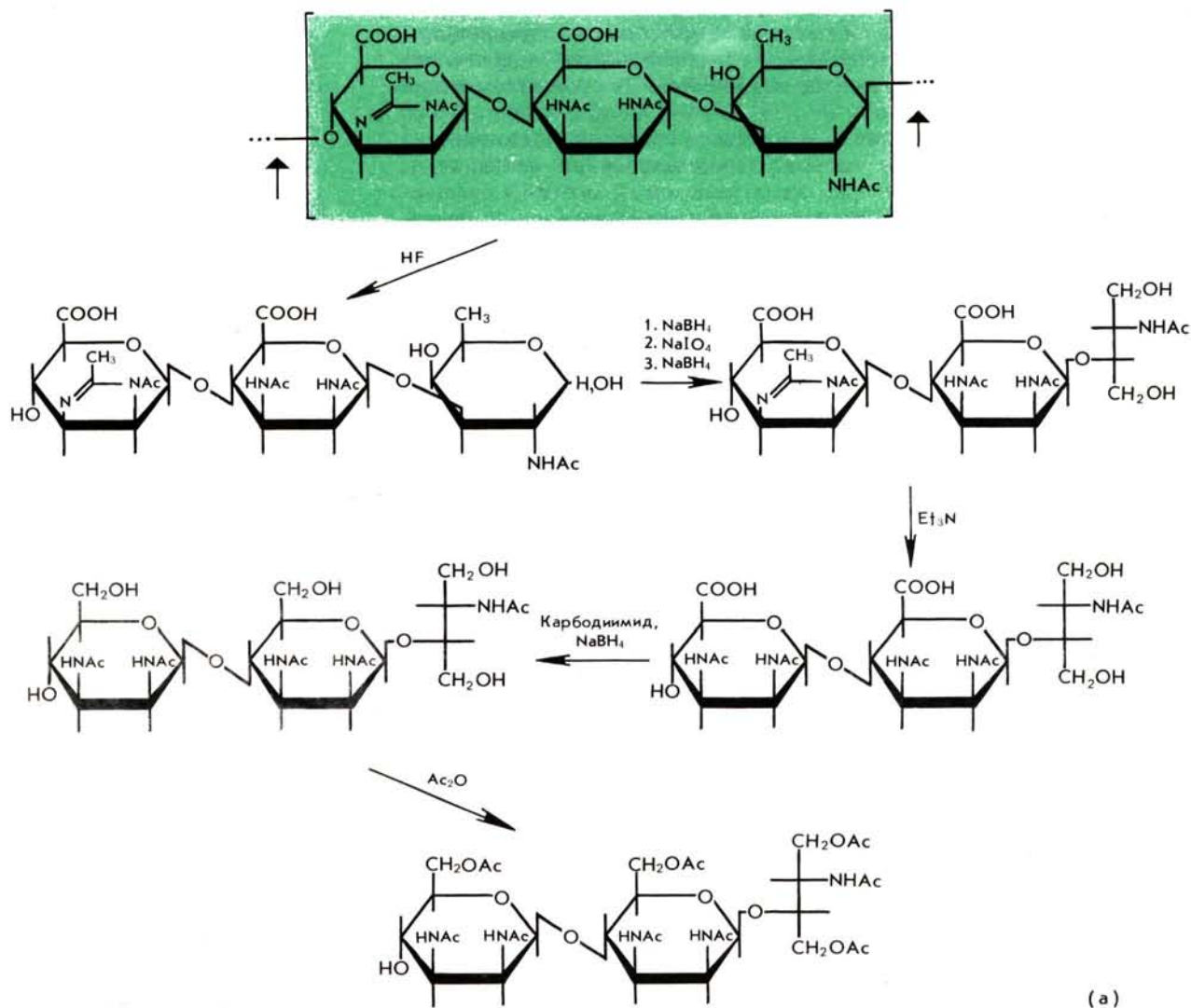
В качестве примера полисахаридов, структуры которых не смогли быть расшифрованы классическими методами, могут служить бактериальные полисахариды *Pseudomonas aeruginosa* групп 0:3 и 0:6. Такие полисахариды являются кислыми гексозаминогликанами, полностью построенными из различных аminosахаров (среди них присутствуют диаминоуроновые кислоты — ранее не встречавшиеся в природе сахара с необычными химическими свойствами). Ниже приведена структура одного из этих полисахаридов — полисахарида *P. aeruginosa* 0:3 *a*, *b*.



Необходимость структурного анализа подобного рода полисахаридов привела к созданию нового подхода, разработанного в СССР Б. А. Дмитриевым и Н. К. Кочетковым. В его основе лежит получение максимальной информации о структуре полисахарида методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, дальнейшее его расщепление на олигосахариды жидким фторидом водорода и определение структуры последних с помощью ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и химических превращений. При данном подходе моносахаридный состав полисахарида определяется как результат установления полной структуры, а не предшествует структурному анализу, как это имеет место в классической схеме. Таким путем и была установлена структура изображенного выше полисахарида. В результате расщепления молекулы и ряда химических превращений был получен сахарид, структуру которого удалось установить спектроскопическими методами. На основании его строения была реконструирована структура промежуточных продуктов превращений и нативного полисахарида.

Трисахарид, представляющий собой повторяющееся звено нативного полисахарида и полученный в результате обработки последнего жидким фторидом водорода, имел в своем составе, помимо N-ацетилфукозамина, два неизвестных кислых диаминосахара. После частичной деградации N-ацетилфукозамина периодатом, раскрытия 2-имидазолинового цикла триэтиламиноом, восстановления карбоксильных групп боргидридом натрия в присутствии карбодимида и ацелирования был получен сахарид (*a*), структуру которого удалось полностью расшифровать по данным ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Неизвестные сахара оказались производными 2,3-диамино-2,3-дидезокси-D-маннуровой кислоты.

Современная ЯМР-спектроскопия (^1H , ^{13}C , двумерная) является мощным инструментом анализа структуры полисахаридов и используется в подавляющем большинстве исследований. Этот метод позволяет определять как состав, места замещения и последовательность моносахаридных остатков биополимера, так и его пространственное строение.



Гликопротеины

Гликопротеинами называются смешанные биополимеры, в которых молекула белка содержит ковалентно присоединенные олигосахаридные цепи. Длина олигосахаридных цепей и их число в гликопротеинах варьируют в широких пределах. Молекула белка может содержать одну (интерлейкин 2 человека) или несколько сотен

(муцины подчелюстных желез животных) углеводных цепей. В свою очередь, в состав углеводной цепи входит от 2 до 20 моносахаридных звеньев. Характеристики некоторых природных гликопротеинов представлены в таблице 17.

Гликопротеины входят в состав всех органов, тканей и клеток организма человека и животных; они содержатся в секреторных жидкостях и плазме крови. Функции гликопротеинов чрезвычайно разнообразны. Среди них встречаются ферменты, гормоны, белки иммунной системы, компоненты плазмы крови, муцины, рецепторы клеточных мембран и т. д.

При выделении гликопротеинов из природных источников используется набор хроматографических и электрофоретических методов, характерных для химии белков. В процессе выделения необходимо учитывать возможную микрөгетерогенность гликопротеина по углеводному компоненту: во многих случаях часть молекул имеет олигосахаридные цепи, недостроенные по терминальным сахарам (в первую очередь по остаткам сиаловых кислот), что заметно сказывается на физико-химических свойствах, в частности на заряде молекул.

Широкое применение для очистки растворимых и мембранных гликопротеинов находит аффинная хроматография на иммобилизованных *лектинах*, таких как конканавалин А, агглютинины зародышей пшеницы и бобов клецвины, лектин чечевицы.

Лектинами (старое название — фитогемагглютинины) называют углеводсвязывающие белки (за исключением ферментов — глюкозидгидролаз, гликозилтрансфераз и др., также способных образовывать комплексы с углеводами). Лектины были впервые выделены в конце XIX в. из растительных источников (из бобовых культур) и обнаружены по способности агглютинировать эритроциты животных. Прошло более полувека, прежде чем было показано, что агглютинацию можно

Таблица 17.

Характеристика природных гликопротеинов

Гликопротеины	Представители	Молекулярная масса (тыс.)	Число полипептидных цепей	Число углеводных цепей	Содержание углеводов (%)	Типы углеводных цепей
Белки плазмы крови	Фетuin	48,4	1		22,6	N-гликозидные, O-гликозидные
	Трансферрин человека	77	1	1	5,9	N-гликозидная
Защитные белки	Иммуноглобулин М человека	180 (мономер)	4	10	10,3	N-гликозидные
	γ-Интерферон человека	25	1	2	30	N-гликозидные
	C1-компонент системы комплемента человека	393–410	6		8	N-гликозидные, O-гликозидные
Гормоны	Хорионический гонадотропин человека	38	2	7	30–33	N-гликозидные, O-гликозидные
	Тиростимулирующий гормон быка	28	2		23	N-гликозидные, O-гликозидные
Ферменты	Церулоплазмин человека	32	1	4	7–7,9	N-гликозидные
	Панкреатическая рибонуклеаза В быка	14,7	1	1	8,6	N-гликозидная
Муцины	Гликопротеин подчелюстной железы барана	1000	1	800	37–40	O-гликозидные
Рецепторы	Рецептор интерлейкина 2 человека	55	1		40	N-гликозидные, O-гликозидные

предотвратить добавлением определенного сахара. На этом основании был сделан вывод, что явление агглютинации обусловливается взаимодействием лектина с углеводными цепями гликоконъюгатов поверхности эритроцитов. Каждый лектин имеет сродство к определенному сахариду (или небольшому числу близких по структуре сахаров), при этом, как правило, очень важную роль играет конфигурация заместителя у гликозидного центра. Так, наиболее известный лектин конканавалин А имеет сродство к остаткам α -D-манно- и α -D-глюкопираноз, но не к их β -аналогам. Большинство лектинов способно взаимодействовать с соответствующим моносахаридным остатком, лишь если он находится на невосстанавливающем конце углеводной цепи. Обычно лектины имеют более одного углеводсвязывающего центра. В таблице 18 приведены данные о свойствах ряда лектинов.

Выделение лектинов чаще всего проводится методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда соответствующего сахара.

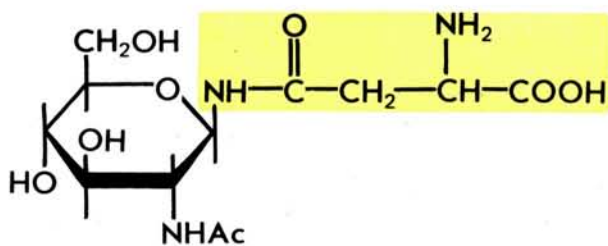
Наиболее изучен лектин из бобов *Canavalia ensiformis* — конканавалин А. Это белок с молекулярной массой 102 000, построенный из четырех идентичных субъединиц и имеющий четыре центра связывания углеводов. При понижении рН и температуры конканавалин А переходит в форму димера. Полипептидные цепи белка имеют не совсем обычную укладку, в которой отсутствуют α -спиральные участки, — более 50% цепи мономера образуют трехслойную β -структуру. Для связывания углеводов важны ионы металлов Ca^{2+} и Mn^{2+} ; пока не заняты два участка связывания металлов, присоединение углеводов не происходит.

Важное применение лектины находят в клеточной биологии и иммунологии, где используются как инструменты контроля за состоянием клеточной поверхности и как митогены, вызывающие бласт-трансформацию лимфоцитов. Отметим, что первые из обнаруженных лектинов — ризин из бобов клещевины *Ricinus communis* и абрин из бобов лакричника *Abrus precatorius* — были использованы П. Эрлихом в ставших классическими опытах по изучению антителообразования.

Лектины встречаются не только в растениях, они были обнаружены во многих животных клетках, в том числе в гепатоцитах, макрофагах, клетках легкого, сердца и т. д. Наиболее изученный из животных лектинов — лектин печени млекопитающих, специфичный к остаткам β -D-галактозы, ответствен за удаление из кровотока дезаилированных гликопротеинов. Аналогичную функцию выполняет млекопитающе-специфичный лектин поверхности макрофагов: он связывает и таким образом способствует уничтожению макрофагами комплексов антиген — антитело, образованных иммуноглобулинами класса М.

Функциональная роль лектинов не ясна. Высказывались предположения, что в растениях они выполняют функцию антител, необходимы для транспорта сахаров, служат связывающим звеном в превращениях ферментов-гликопротеинов в мультиферментные комплексы. Однако многочисленные данные указывают на то, что лектины являются компонентами систем, обеспечивающих узнавание и адгезию клеток.

Наиболее распространенным типом связи в животных гликопротеинах является *N*-гликозидная связь, образуемая остатками *N*-ацетилглюкозамина и β -амидной группой аспарагина



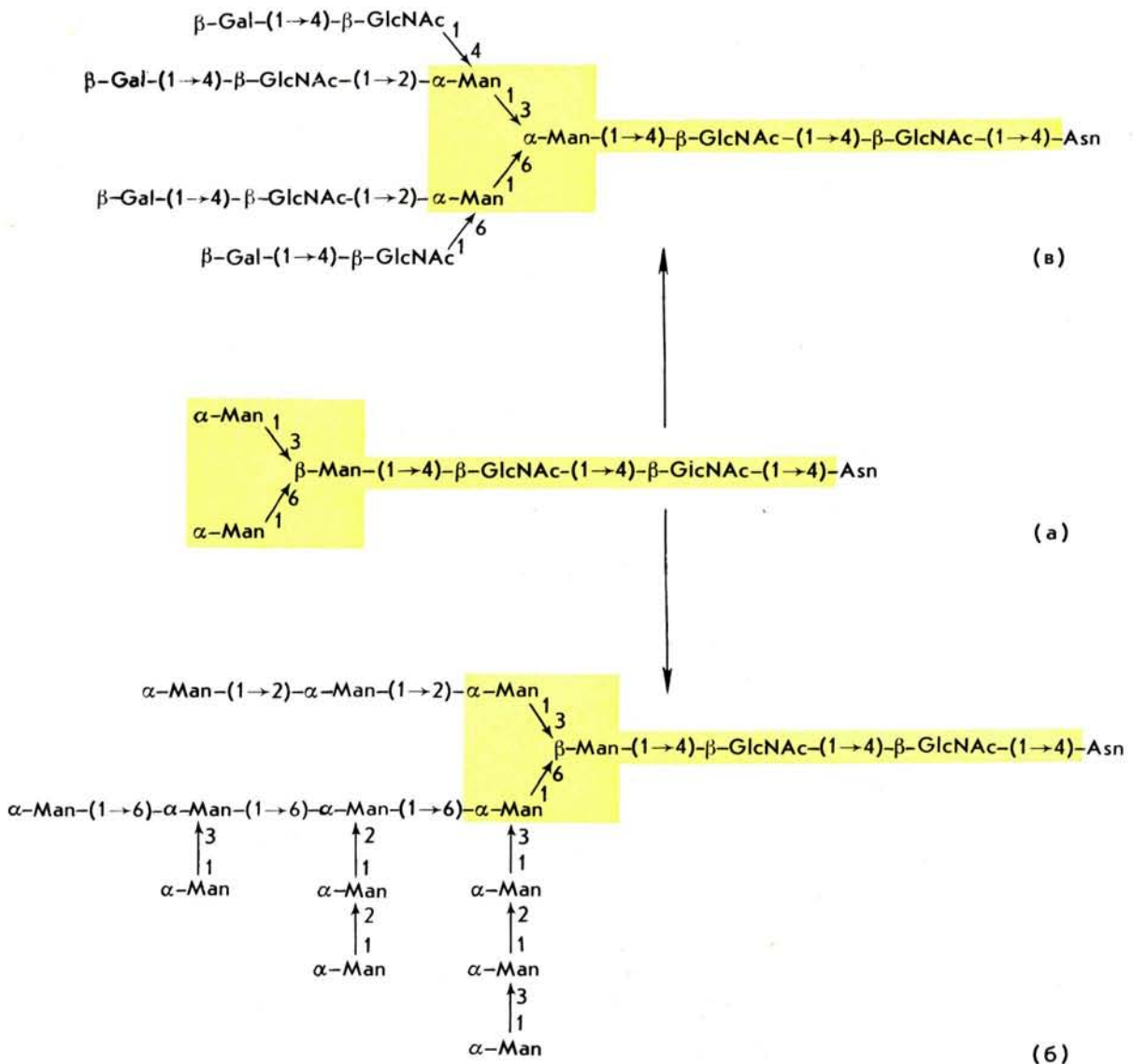
β -D-GlcNAc-Asn

Сигнальной последовательностью для присоединения олигосахарида служит триплет аминокислот Asn-X-Ser(Thr), где X — любая аминокислота, кроме пролина. *N*-Гликозидные олигосахаридные цепи обнаружены в таких гликопротеинах, как иммуноглобулины, фетуин, антигены тканевой совместимости и т. д. *N*-Гликозиламид-

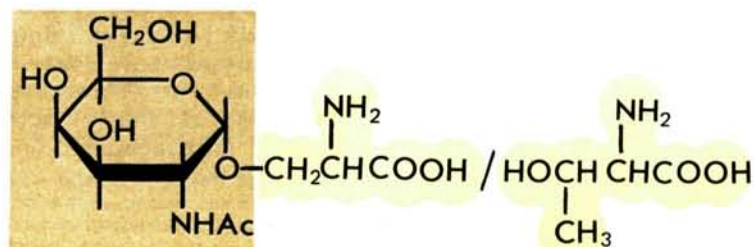
ная связь относительно устойчива в мягких щелочных и кислотных условиях, но расщепляется при более жестком гидролизе (2 н. HCl, 100 °C, 10 — 12 мин или 0,2 — 2 н. NaOH, 100 °C, 16 ч).

Среди N-гликозидных цепей гликопротеинов различают цепи, обогащенные остатками маннозы, и цепи сложного типа. К первым относятся олигосахариды, в состав которых входят лишь остатки N-ацетилглюкозамина и D-маннозы. Углеводные цепи сложного типа, помимо названных сахаров, содержат остатки D-галактозы, L-фукозы и N-ацетил- или N-гликолилнейраминовой кислот.

Базовой структурой всех N-гликозидных цепей является фрагмент (а). В олигосахаридах (б), обогащенных остатками маннозы, к нему присоединяются дополнительные остатки α -D-маннозы, а в гликозидных цепях сложного типа (в) — дисахариды β -D-Gal-(1→4)- β -D-GlcNAc и терминальные сахара — сиаловые кислоты и фукоза. В зависимости от числа дисахаридных блоков («антенн») цепи сложного типа называются биантенными, триантенными и т. д.



Другим типом связи в животных гликопротеинах является *O-гликозидная связь* между остатками *N-ацетилгалактозамина* и гидроксильной группой серина или треонина. Этот тип связи характерен для муцинов, групповых веществ крови, гликофорина мембран эритроцитов и т. д. *O-Гликозидная связь* может быть расщеплена в мягких щелочных условиях (0,1 н. NaOH, 37 °С).



α -D-GalNAc-Ser/Thr

Таблица 18.

Лектины

Название, источник	Сокращенное название	Углеводная специфичность	Число углеводсвязывающих центров	Молекулярная масса (тыс.)	Митогенная активность
Конканавалин А (Canavalia ensiformis)	Con A	α -D-Man (Glc)	4	102	+
Лектин чечевицы (Lens culinaris)		α -D-Man (Glc)	2	60	+
Лектин арахиса (Arachis hypogaea)	PNA	β -D-Gal		110	+
Лектин сои (Glycine max)	SBA	α, β -D-GalNAc (Gal)	2	120	+
Лектин проростков пшеницы (Triticum vulgare)		GlcNAc- β (1 \rightarrow 4)-GlcNAc	4	36	(в форме полимера) -
Лектин фасоли (Phaseolus vulgaris)	PHA	GalNAc		120	+
Лектин клещевины (Ricinus communis)	RCI	β -D-Gal	2	120	-
Лектин садовой улитки (Helix pomatia)		GalNAc	6	79	-
Лектин краба (Limulus polyphemus)		NeuNAc	18	335	

Во многих гликопротеинах, как сывороточных, так и мембранных, одновременно присутствуют и N- и O-гликозидные цепи. Гораздо реже встречаются другие типы углевод-белковых связей. В коллагенах, например, обнаружена связь, образованная остатками β -D-галактозы и гидроксипролина, в растительных гликопротеинах — остатками L-арабинозы и гидроксипролина, а в гликопротеинах дрожжей — D-маннозы и серина или треонина и т. д.

При анализе структуры углеводных цепей гликопротеинов важным этапом является определение моносахаридного состава. Здесь используются обычные методы структурного анализа углеводов, а именно: кислотный гидролиз или метанолиз с последующим хроматографическим разделением продуктов. По моносахаридному составу, как правило, можно судить и о типе *углевод-белковых связей*, в частности наличие N-ацетилгалактозамина говорит о присутствии O-гликозидных цепей.

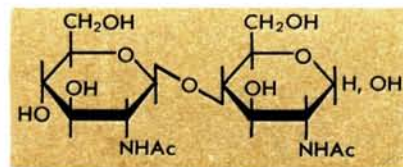
Тип углевод-белковой связи диктует тактику получения индивидуальных олигосахаридных цепей. O-Гликозидные цепи отщепляются в условиях мягкого щелочного гидролиза в присутствии 1 M боргидрида натрия для предотвращения деструкции олигосахарида, при этом терминальный восстанавливающий моносахарид превращается в полиол. Интактные N-гликозидсвязанные олигосахариды удается получать лишь нагреванием (100 °C, 5 ч) гликопротеина с безводным гидразином.

В последние годы широкое применение нашли эндогликозидазы, прежде всего эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы, гидролизующие гликозидную связь в хитобиозильном остатке, соединенном с аспарагином полипептидной цепи. Обнаружена и эндо- β -N-ацетилглюкозаминидаза, гидролизующая связь между терминальным N-ацетилглюкозаминим и аспарагином. Названные ферменты способны расщеплять гликозидные связи как в гликопептидах, так и в интактных гликопротеинах, что открывает возможность изучения биологической роли углеводных детерминант. Ферменты из разных источников отличаются по специфичности: возможность гидролиза определяется строением значительной части олигосахарида, а не только структурой моносахаридного звена, гликозидная связь при котором расщепляется.

В большинстве случаев N-гликозидные цепи получают не в виде олигосахаридов, а в виде гликопептидов. С этой целью проводится исчерпывающий протеолиз с использованием проназы. Двух-, трехкратная обработка гликопротеина проназой позволяет получать гликопептиды, содержащие минимальное число аминокислотных остатков, в предельном случае лишь один аспарагин, который может быть отщеплен от олигосахарида с помощью другого фермента — гликозиласпарагиназы.

Определение структуры олигосахаридных цепей проводится стандартными методами, описанными ранее. При исследовании гликопротеинов животного происхождения задача облегчается тем, что в их составе встречаются лишь семь моносахаридов: N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, нейраминная кислота, манноза, галактоза, фукоза и глюкоза. Более того, в большинстве случаев структуры углеводных цепей определенного типа, выделенных из разных гликопротеинов, оказываются построенными из одинаковых блоков.

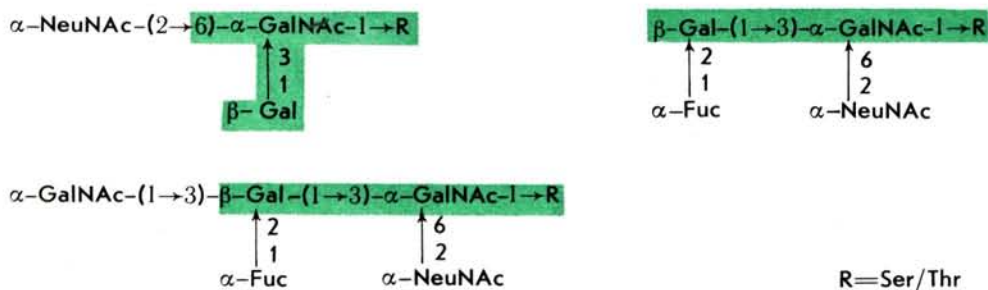
Общие черты обнаруживаются и в структуре O-гликозидных цепей. Как правило, базовую часть их составляет дисахарид β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GalNAc, присоединенный α -связью к серину или треонину полипептида. К базовому олигосахариду могут быть присоединены остатки терминальных сахаров — нейраминной кислоты и фукозы.



β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-GlcNAc
Хитобиоза

Ниже приведены структуры O-гликозидсвязанных олигосахаридов из муцинов подчелюстных желез.

Базовый фрагмент может быть также представлен дисахаридом β -D-GalNAc-(1→3)-GalNAc, в котором остаток N-ацетилглюкозамина служит отправной точкой для образования сложных цепей с терминальными последовательностями, характерными для групповых веществ крови.



Определение мест привязки олигосахаридных цепей в белках проводится путем подбора таких условий расщепления полипептидной цепи, которые позволили бы получить фрагменты, несущие лишь по одной углеводной цепочке. После определения последовательности аминокислот и положения углеводной цепи в гликопептиде локализуют его положение в исходной молекуле.

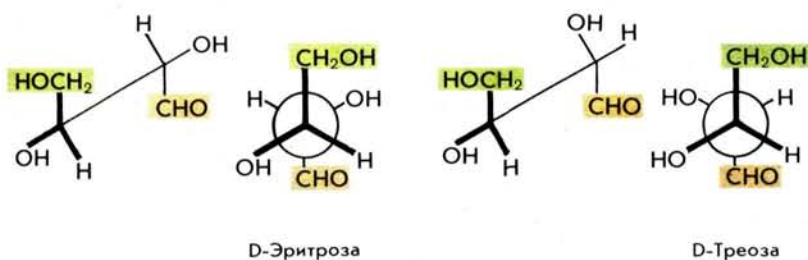
Анализ первичной структуры углеводных биополимеров — гораздо более сложная задача, чем структурный анализ белков и нуклеиновых кислот. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы, универсальная схема исследования структуры олиго- и полисахаридов отсутствует. Как следствие, автоматизация определения первичной структуры таких биополимеров на сегодня невозможна.

Пространственное строение углеводов

Конформации моносахаридов и их производных. Циклические формулы Хеурса не вполне точно отражают действительную структуру молекул моносахаридов. Благодаря свободному вращению групп вокруг ординарных связей они могут принимать различные конформации.

Конформации ациклических и циклических форм моносахаридов наглядно изображаются перспективными, или проекционными, формулами (формулами Ньюмена). Ниже представлены наиболее стабильные конформации D-эритрозы и D-треозы.

Стабильность этих конформаций, называемых трансoidными, обусловлена наибольшей удаленностью друг от друга объемистых заместителей (CH_2OH и CHO). В соединениях с длинной цепью углеродных атомов наиболее выгодной оказывается конформация, при которой цепь имеет зигзагообразный характер.



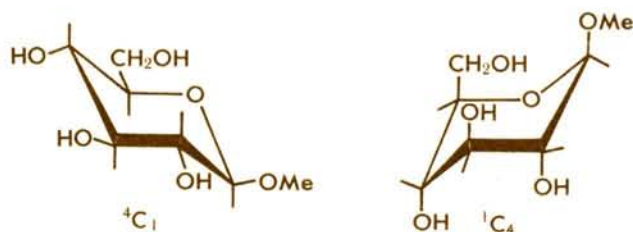
D-Эритроза

D-Треоза

Конформации пираноз и их производных сходны с конформациями циклогексана, однако наличие кислородного атома в цикле увеличивает их возможное число. В подавляющем большинстве случаев реализуется одна из изображенных ниже конформаций типа «кресло» (${}^4\text{C}_1$ или ${}^1\text{C}_4$), конформации типа «ванна» практически не встречаются.

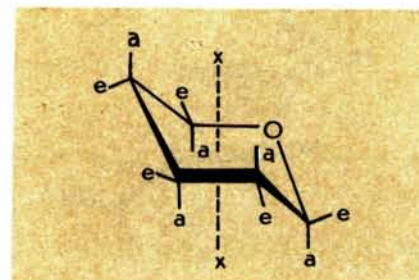
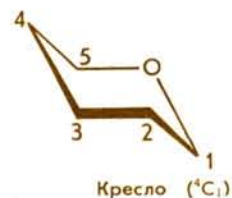
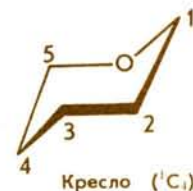
Какая из них окажется более выгодной — зависит от размера и расположения соответствующих группировок в конкретном моносахариде. Заместители со связями, параллельными оси $\text{X} - \text{X}$, называют аксиальными (а). Если же связь заместителя с кольцом образует с осью $\text{X} - \text{X}$ тетраэдрический угол, такой заместитель называют экваториальным (е).

Конформация с наименьшим числом объемистых аксиальных группировок (в частности, CH_2OH -, NHAc -, OH -групп) наиболее стабильна, поэтому из двух конформаций, приведенных для метил- β -D-глюкопиранозида, безусловно, предпочтительной окажется конформация ${}^4\text{C}_1$, в которой все гидроксильные, а также объемистая метилольная группировки расположены экваториально.



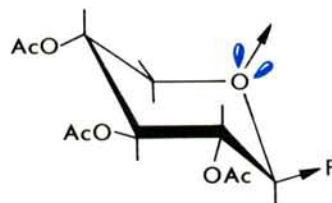
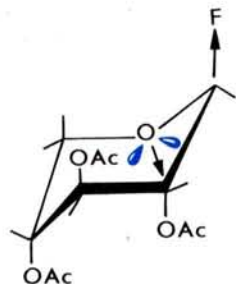
Конформация ${}^4\text{C}_1$ является предпочтительной для большинства альдогексоз D-ряда, хотя, например, в случае D-идозы преимущественной оказывается конформация типа ${}^1\text{C}_4$.

Существенный вклад в стабильность конформаций пираноз вносит так называемый *аномерный эффект* — диполь-дипольное взаимодействие электроотрицательного заместителя при C-1 с неподеленной парой электронов атома кислорода цикла, в результате которого заместитель при C-1 стремится принять аксиальное положение. Для галогенпроизводных этот эффект настолько значителен, что, например, 2,3,4-три-O-ацетил- β -D-ксилопиранозилфторид в растворе имеет конформацию ${}^1\text{C}_4$ с тремя аксиальными ацетильными группами.

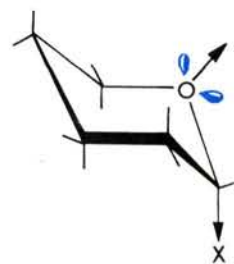
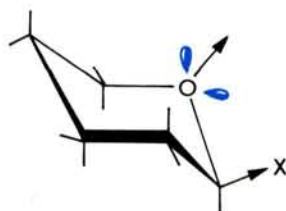




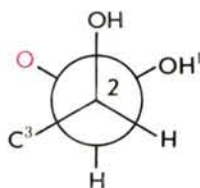
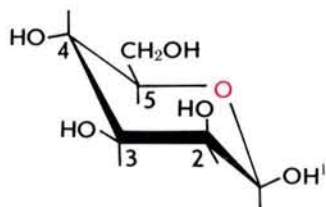
Лемье [Lemieux] Раймонд Ургель (р. 1920), канадский химик-органик. Окончил университет Альберта в Эдмонтоне (1943), с 1961 г. — профессор этого университета. Основные работы — в области химии углеводов. Осуществил химический синтез многих сложных сахаридов. Внес значительный вклад в конформационный анализ углеводов с помощью метода ЯМР.



Другим следствием эффекта является то, что незамещенные альдозы D-ряда в водном растворе имеют преимущественно α -конфигурацию гидроксильной группы при С-1.



Еще один фактор, заметно влияющий на стабильность конформаций, — так называемый Δ^2 -эффект: при аксиальном расположении гидроксильной группы при С-2 и экваториальном расположении заместителя при С-1 кислородные атомы двух таких группировок, а также кислорода цикла оказываются сближенными, что приводит к их сильному отталкиванию.

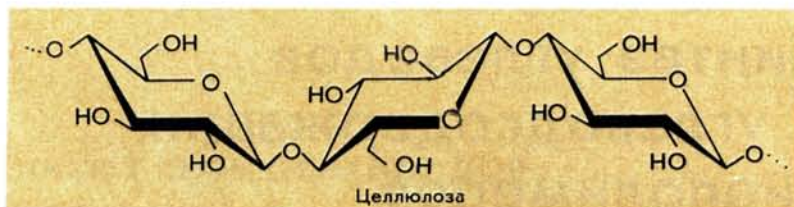


С. Энджиэлом и Р. Лемье был определен вклад рассмотренных «факторов неустойчивости», а также взаимодействий других атомов пираноз в конформационную стабильность моносахаридов и на этой основе разработана система оценки выгодности той или иной конформации, позволяющая предсказывать предпочтительную конформацию моносахарида. Рассчитанные конформации в большинстве случаев хорошо согласуются с экспериментальными данными, однако встречаются и исключения. В частности, аксиальное расположение объемистого заместителя может оказаться более выгодным за счет образования водородной или ионной связи, диполь-дипольного взаимодействия и т. д.

Основным физико-химическим методом изучения конформаций сахаров в растворе служит протонный магнитный резонанс. По величине химического сдвига протонов и константам их спин-спинового взаимодействия можно судить о том, занимают ли они аксиальное или экваториальное положение. Для оценки конформаций сахаров в кристаллах применяется рентгеноструктурный анализ.

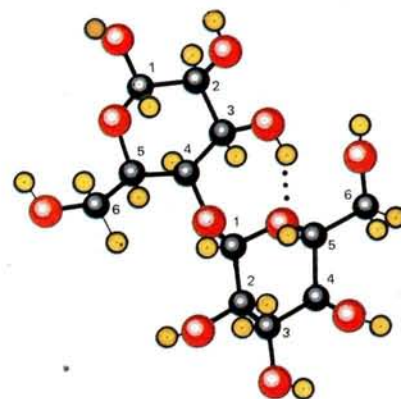
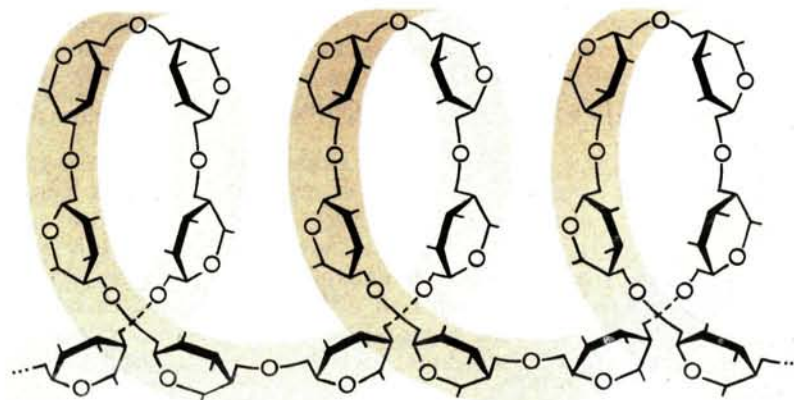
Пространственная структура олиго- и полисахаридов. Пространственное строение полисахаридов определяется прежде всего первичной структурой макромолекулы. Неразветвленные полисахариды с $\beta(1 \rightarrow 4)$ -гликозидными связями, такие как целлюлоза и хитин, образуют фибриллярные структуры, для которых характерна линейная конформация молекул, закрепленная водородными связями. Подобные макромолекулы, располагаясь приблизительно парал-

тельными пучками, образуют структуры, регулярные в трех измерениях, что характерно для кристаллов. Наиболее мощным инструментом изучения пространственного строения подобных полисахаридов оказался рентгеноструктурный анализ. Изучение рентгенограмм позволило определить тип и рассчитать параметры элементарной кристаллической ячейки целлюлозы (а также хитина и ряда других линейных полисахаридов), определить конформацию моносахаридных остатков. Так, для целлюлозы и хитина было показано, что их мономерные звенья имеют конформацию 4C_1



Конформация молекулы целлобиозы — дисахаридного фрагмента целлюлозы (в кристалле) — стабилизируется внутримолекулярной водородной связью кислорода цикла с водородным атомом при С-3 соседнего остатка глюкопиранозы.

В отличие от целлюлозы, линейные молекулы амилозы имеют спиральную конформацию, причем каждый виток спирали состоит из шести α -D-глюкопиранозильных остатков:



Целлобиоза

Данные о конформации этих остатков достаточно разноречивы.

Как показывают результаты рентгеноструктурного анализа, в молекулах разветвленных полисахаридов — амилопектина, гликогена, декстранов — также могут встречаться кристаллические участки, если расстояние между разветвлениями цепи достаточно для образования структуры, регулярной в трех измерениях. На этих участках макромолекулы имеют линейную конформацию. Однако, как правило, для макромолекул разветвленных полисахаридов характерна сферическая форма и отсутствие квазикристаллической струк-

туры. Так, расчет пространственной структуры полисахаридных цепей гликогена показывает, что молекула имеет спиральную конформацию, причем каждый виток спирали состоит из 5,82 глюкозных остатков, а расстояние между витками спирали составляет 2,07 нм.

С отсутствием кристаллической структуры связаны такие свойства разветвленных полисахаридов, как легкая растворимость в воде при молекулярной массе порядка нескольких миллионов.

Синтез углеводов и углеводовсодержащих биополимеров

Синтез углеводов, как правило, проводится на основе доступных природных моносахаридов. Это обусловливается широкой распространенностью в природе многих сахаров. Полный синтез углеводов, начиная с простых химических соединений (например, глицеринового альдегида), вполне осуществим, но практического применения не находит.

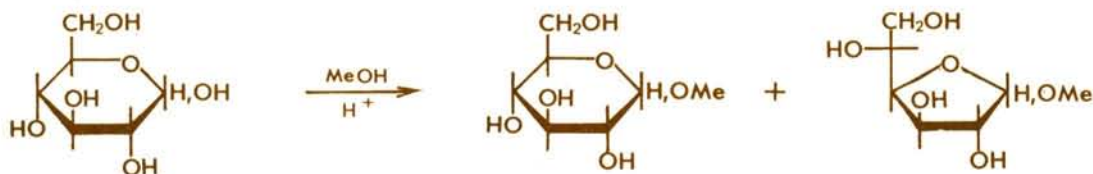
Гликозидный полуацетальный гидроксил в циклических формах моносахаридов резко отличается по свойствам от остальных гидроксильных. Индукционный эффект кислорода цикла облегчает легкий разрыв связи между С-1 и кислородным атомом группировки, находящейся при аномерном центре, и делает возможным протекание многочисленных нуклеофильных реакций при гликозидном атоме, в том числе образование новых гликозидных связей. Реакции, приводящие к созданию гликозидной связи, называются гликозилированием. Гликозилированию могут подвергаться спирты, тиолы, амины: соответственно будут образовываться О-, S- или N-гликозидные связи.

Наиболее актуальной проблемой является стереонаправленное создание О-гликозидной связи, т. е. гликозилирование гидроксилсодержащих соединений, поскольку именно этот тип связи наиболее распространен в природе. Сложность таких синтезов — следствие полифункциональности сахаров, обуславливающей необходимость защиты всех ОН-, SH- и NH-групп в молекуле гликозилирующего агента, а также возможность образования смеси α - и β -аномеров, во многих случаях (особенно для олигосахаридов) трудноразделимой.

Синтез гликозидов

Гликозиды простейших спиртов можно получить по реакции Фишера, обрабатывая моносахариды соответствующими спиртами в присутствии кислых катализаторов. Реакция приводит к образованию смеси фуранозидов и пиранозидов, соотношение между которыми определяется условиями синтеза.

Для получения более сложных соединений используют направленные методы создания гликозидной связи, позволяющие не только гликозировать любой агликон, но и задать необходимую конфигурацию связи.



Синтез олигосахаридов

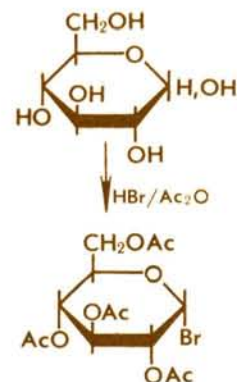
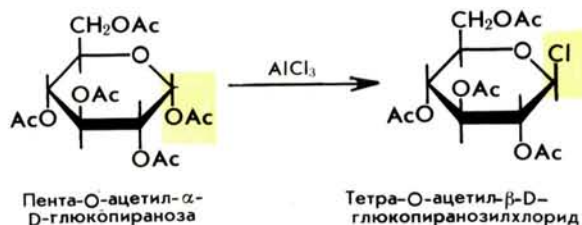
В большинстве случаев синтез олигосахаридов осуществляется на основе входящих в их состав моносахаридов путем создания новых гликозидных связей. В отдельных случаях удается получить менее доступный олигосахарид из более доступного обращением конфигурации гидроксильных групп при определенных атомах или заменой гидроксила на другую функциональную группу.

В основном в качестве гликозилирующих агентов в синтезе олигосахаридов используются гликозилгалогениды.

Гликозилгалогениды не встречаются в природе. В свободном состоянии они нестабильны, поэтому их получают в виде производных, чаще всего в виде ацетатов (ацилгалогенозов).

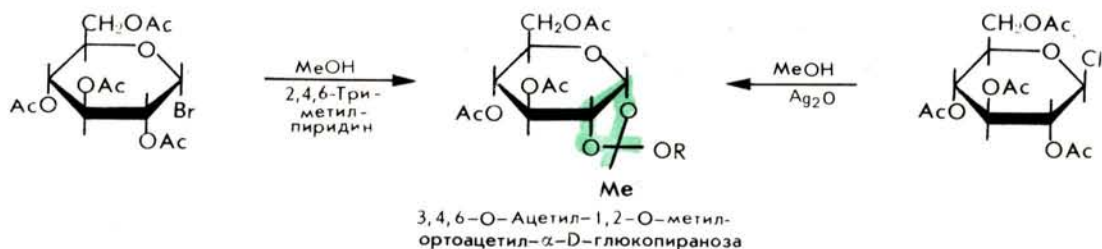
Ацилгалогенозы образуются при действии на моносахарид галогеноводорода в уксусной кислоте, уксусном ангидриде или ацетилхлориде. В этих условиях получается наиболее стабильный аномер, например 2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- α -*D*-глюкопиранозилбромид. Стабильность в данном случае определяется аномерным эффектом: для гексоз *D*-ряда предпочтительным является α -аномер.

Для синтеза нестабильных 1,2-*транс*-ацилгалогенозов сложный эфир моносахарида (например, полный ацетат или бензоат) обрабатывают хлоридом алюминия или четыреххлористым титаном в неполярных растворителях (бензоле, четыреххлористом углеводе)



Реакции ацилгалогенозов (рис. 258), основанные на нуклеофильном замещении атома галогена, чрезвычайно многочисленны и позволяют перейти к различным производным сахаров: алкил- и арилгликозидам, *N*- и *C*-гликозидам, гликалям и т. д. Реакции протекают стереонаправленно, с образованием главным образом 1,2-*транс*-гликозидов, однако всегда получается некоторое количество *цис*-изомера. В определенных условиях конденсация 1,2-*транс*-ацилгалогенозов со спиртами (в присутствии акцептора протонов — оксида серебра, третичных аминов) или 1,2-*цис*-

ацилгалогеноз (в нитрометане в присутствии 2,4,6-триметилпиридина) приводит к ортоэфирам сахаров. Ортоэфиры сахаров также широко используются как промежуточные соединения в синтезе 1,2-транс-гликозидов и олигосахаридов. Они устойчивы к действию оснований, но чрезвычайно лабильны в присутствии кислотных агентов.



Наиболее старым, но до настоящего времени находящим применение методом гликозилирования является метод Кёнигса — Кнорра, в котором гликозилирующим агентом служит ацилиро-

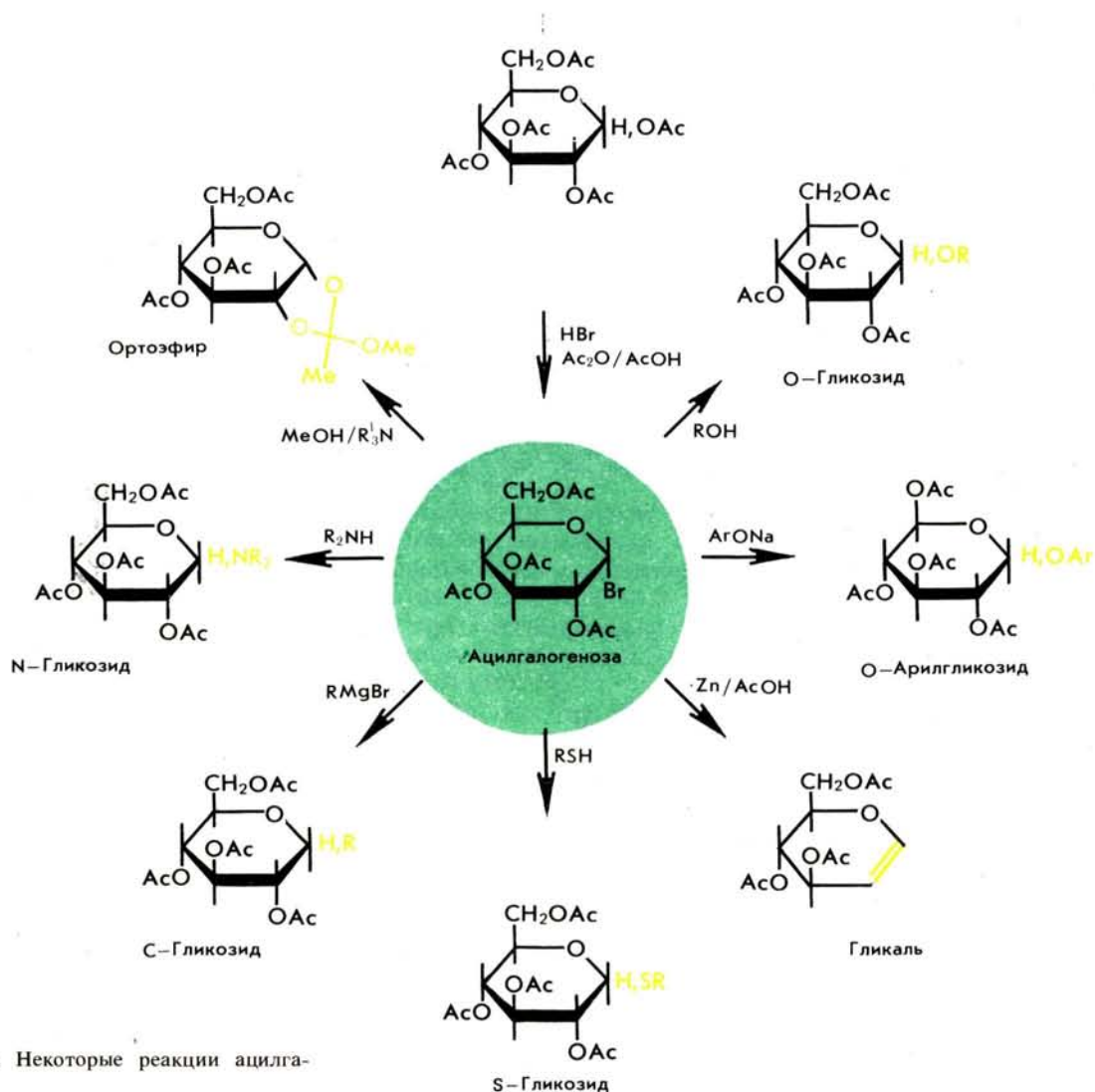
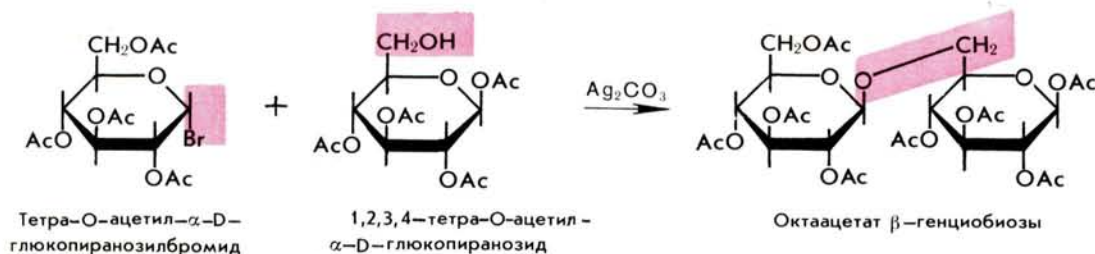


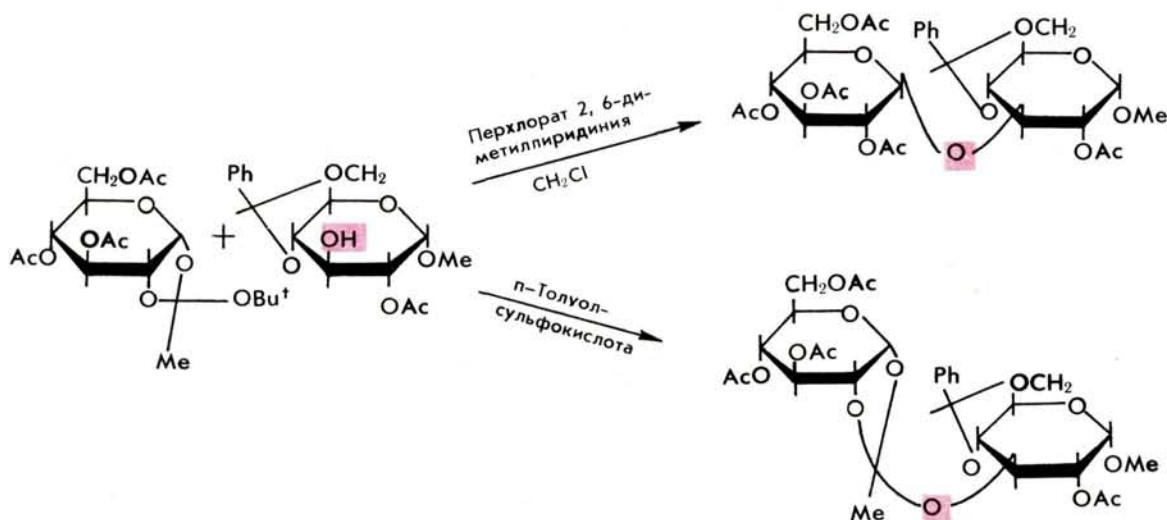
Рис. 258. Некоторые реакции ацилгалогеноза.

ванный α -D-гликозилгалогенид. Реакция с гидроксилсодержащим компонентом в присутствии оксида или карбоната серебра приводит к образованию 1,2-*транс*-гликозидной связи. Оксид и карбонат серебра играют двойную роль: с одной стороны, они облегчают диссоциацию связи C-1 — галоген, являясь таким образом катализатором реакции, с другой стороны, служат акцептором протонов, образующихся в ходе превращения



Недостатками метода являются образование в ходе реакции воды, разлагающей ацилгалогенозу, и гетерогенность реакционной смеси. Лучшие результаты дает применение в качестве катализатора и акцептора протонов растворимого цианида ртути — модификация Б. Хельфериха, широко используемая в настоящее время. Даже в случае гликозилирования малореакционноспособных вторичных гидроксильных групп сахаров выходы достигают 80%, однако по сравнению с оригинальным вариантом метода Кёнигса — Кнорра модификация Хельфериха обладает пониженной стереоспецифичностью. Катализаторами реакции могут также быть перхлорат или трифторметансульфонат (трифлат) серебра.

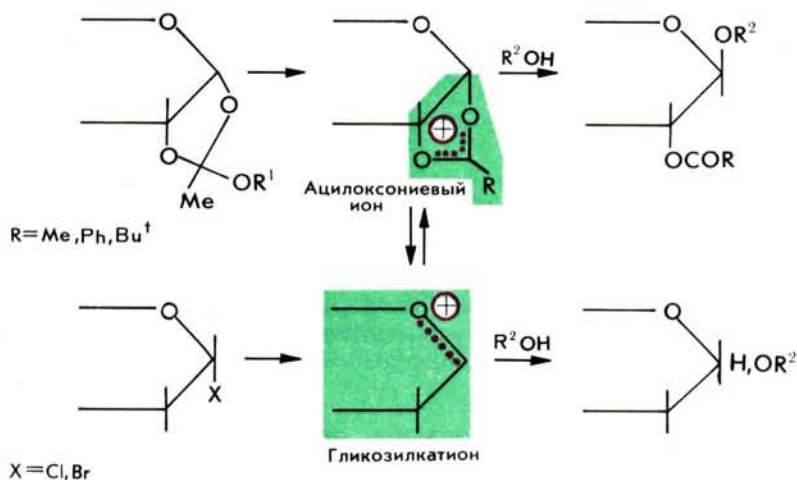
Н. К. Кочетковым предложено использовать в роли гликозилирующих агентов в синтезе 1,2-*транс*-гликозидов 1,2-ортоэфир сахара с применением в качестве катализатора перхлората 2,6-диметилпиридиния. При замене катализатора (например, на *n*-толуолсульфокислоту) и растворителя реакция протекает по другому направлению, в сторону переэтерификации. Ортоэфирным методом удается гликозировать сахара с малореакционноспособными гидроксильными группами.



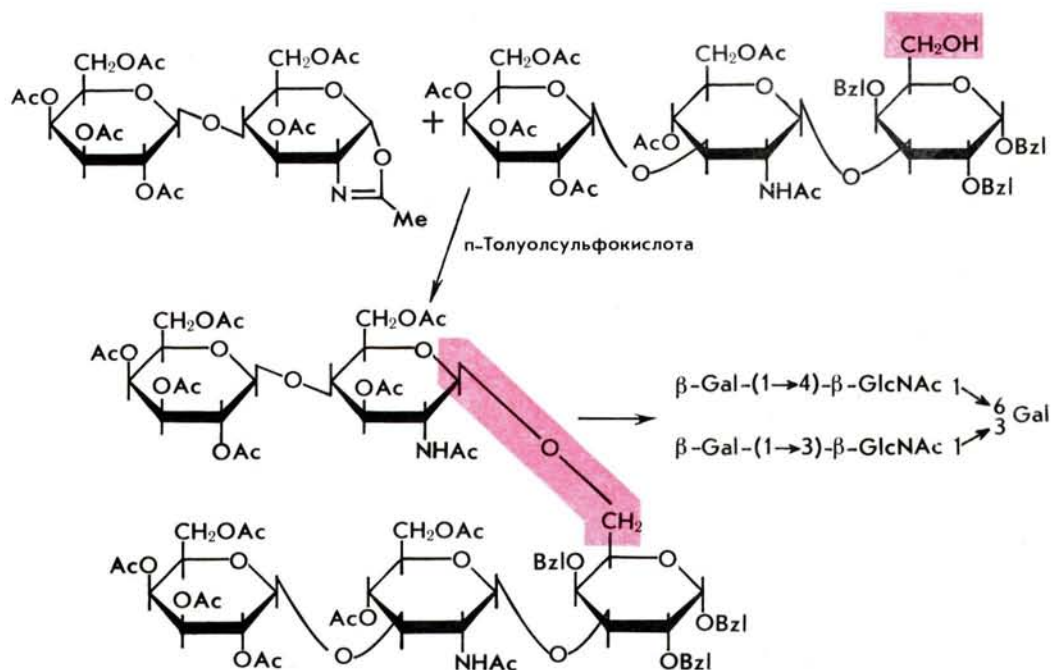


Хорлин Анатолий Яковлевич (р. 1930), советский химик-органик. Окончил Московский государственный университет (1954), работает в Институте биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Исследовал химическое строение действующих начал растений дальневосточной флоры (лимонник китайский, растения семейства аралиевых), а также гликозидов три-терпенового ряда. Автор трудов по синтезу олигосахаридов, выяснению механизма действия и специфичности гликозидаз.

И в случае гликозилгалогенидов, и в случае ортоэфиров сахаров истинными гликозилирующими агентами являются образующиеся на промежуточной стадии гликозил-катион или ацилоксониевый ион

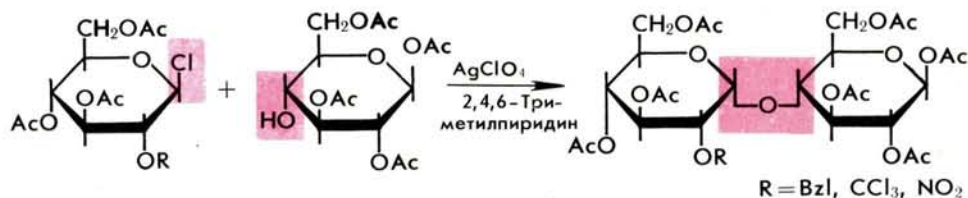


Гликозилгалогениды ацилированных 2-амино-2-дезоксахаров чрезвычайно неустойчивы и легко превращаются в соответствующие 1,3-оксазолиновые производные. Последние в присутствии кислых катализаторов легко реагируют с гидроксилсодержащими соединениями с образованием 1,2-*транс*-гликозидной связи. Оксазолиновый метод был разработан А. Я. Хорлиным в конце 60-х годов на примере многих сахаров. Возможности метода можно продемонстрировать синтезом тетрасахарида, входящего в состав групповых веществ крови II

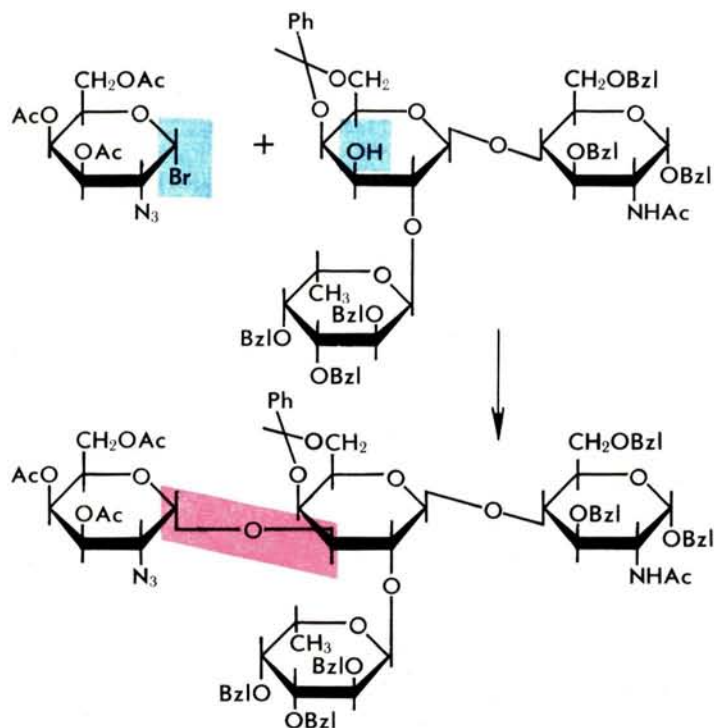


Такие реакции приводят к 1,2-*транс*-гликозидам из-за «соучастия» ацильной группы при С-2 (взаимодействия кислородного атома карбоксила ацильной группы с углеродным атомом аномерного центра), благодаря которой реакция протекает через стадию образования оксазолиниевого иона: последний вследствие стерических затруднений подвергается атаке с противоположной от ацил-оксониевого цикла стороны.

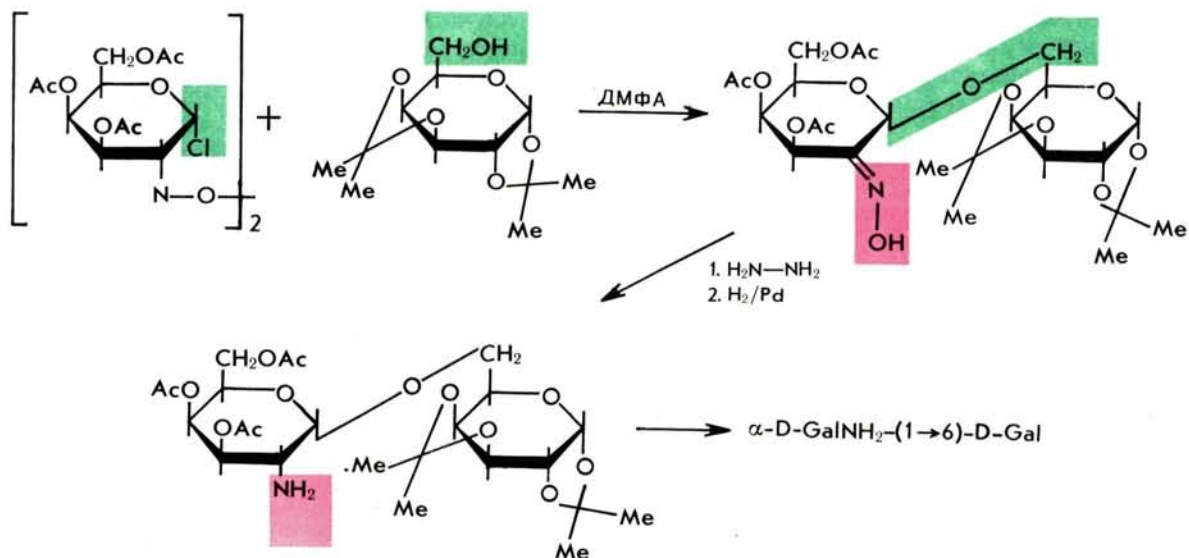
Значительно большие затруднения вызывает синтез 1,2-*цис*-гликозидов, и их удается получить лишь с использованием производных сахаров, имеющих при С-2 заместитель, не способный к «эффекту соучастия». В качестве гликозилирующих агентов часто используют нестабильные β -гликозилгалогениды; в малополярных растворителях в присутствии активных катализаторов (солей серебра) реакция протекает с обращением конфигурации при С-1.



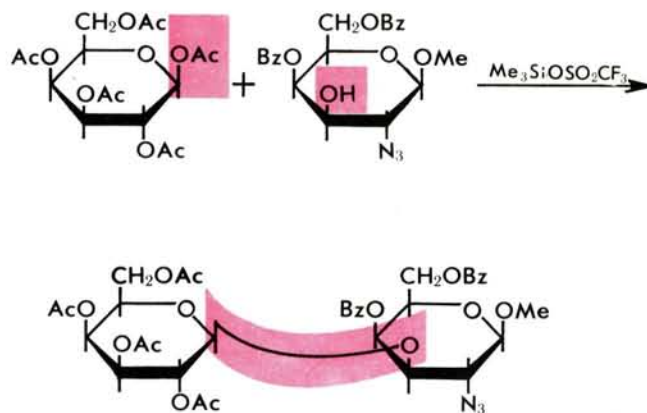
Синтез 1,2-*цис*-гликозидов 2-амино-2-дезоксахаров вызывает еще большие затруднения из-за сложности получения гликозилгалогенидов с иным, нежели ацильная группа, заместителем при С-2. Таким заместителем может служить, например, азидная группа, которая по окончании гликозилирования легко восстанавливается.



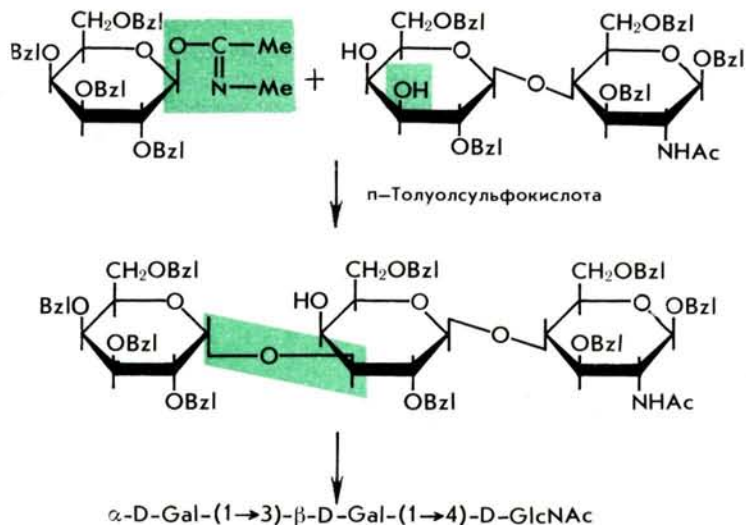
ся в аминогруппу; азидным методом были получены многие олигосахариды, содержащие остатки аминокислот, в частности детерминантный тетрасахарид группы крови А. Недостаток метода заключается в труднодоступности 2-азидогликозилгалогенидов. Поэтому Р. Лемье с соавторами в качестве гликозилирующих агентов были предложены 2-нитрозогликозилгалогениды, образующиеся из доступных гликалей при действии нитрозохлорида



Перечисленные выше методы требуют получения на промежуточной стадии гликозилгалогенидов, что в ряде случаев (особенно для олигосахаридов) оказывается затруднительным. Предложены перспективные методы, позволяющие использовать в качестве гликозилирующих агентов легкодоступные, устойчивые ацетаты сахаров. Таким путем Г. Паульсен из пентаацетата галактозы и частично защищенного сахара в присутствии катализатора триметилсилитрифлата был получен дисахарид:



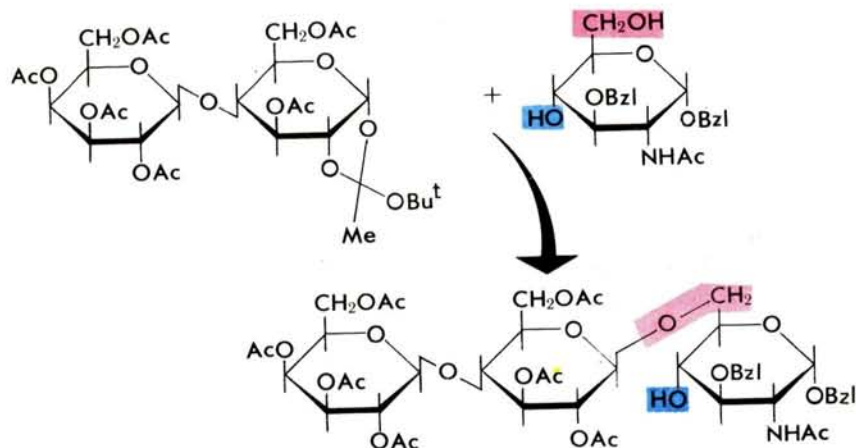
П. Синаи с соавторами предложили применять вместо гликозилгалогенидов в синтезе олигосахаридов с 1,2-*цис*-связями имидаты сахаров, что иллюстрируется синтезом олигосахаридов группы крови В



Метод применим лишь для введения остатков глюкозы, галактозы и фукозы.

Дополнительные сложности в олигосахаридном синтезе вызывают получение защищенного агликонового (спиртового) компонента с единственной свободной гидроксильной группой — той, которая должна быть гликозилирована, а также низкая реакционная способность вторичных гидроксильных групп сахаров. Наиболее активной у гексопираноз является первичная спиртовая группа, далее идут гидроксильные группы при С-2, С-3 и С-4. Поэтому синтез олигосахаридов с (1 → 4)-гликозидными связями вызывает наибольшие затруднения. Предложен ряд методов активации гидроксила при С-4, в том числе специальный подбор заместителей при остальных гидроксильных группах, использование в качестве агликонового компонента ациклических производных сахаров, гликозилирование соединений, несущих при С-4 активирующую группировку (например, 2,3-дифенил-2-циклопропенильную).

В некоторых случаях различная активность гидроксильных групп сахаров позволяет упростить синтез целевого продукта. Так, благодаря различной реакционной способности удалось селективно гликозилировать ОН-6, не защищая ОН-4 в приведенном синтезе олигосахарида



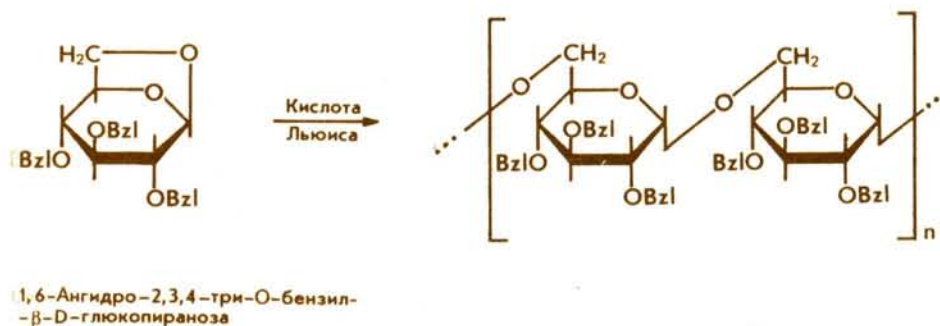
В каждом случае задача выбора защитных групп решается индивидуально. Чаще всего используются тритильные (защита первичного гидроксила), алкилиденные, ацетильные и бензильные группы. При работе с ацетильными защитами всегда приходится учитывать возможность их миграции.

В подавляющем большинстве случаев гликозилирование протекает нестереоселективно, т. е. практически всегда образуется смесь α - и β -аномеров. Такая неоднозначность реакции, а также тот факт, что выходы целевых продуктов, особенно при гликозилировании вторичных гидроксильных групп сахаров, редко превышают 70%, делает пока малоперспективным синтез олигосахаридов на твердом носителе.

Синтез полисахаридов

Химический синтез полисахаридов является одной из малоразработанных пока областей химии углеводов. Причина, очевидно, заключается не только в сложности решения задачи, но и в отсутствии заметной потребности в синтетических полисахаридах: громадное разнообразие природных полисахаридов и их доступность делают существенно более актуальным изучение их строения и свойств.

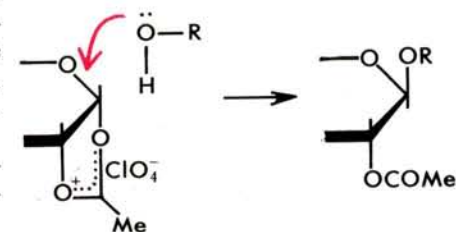
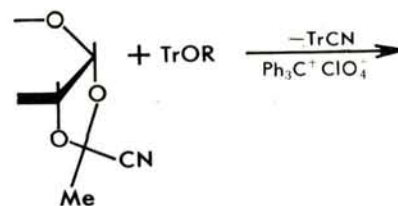
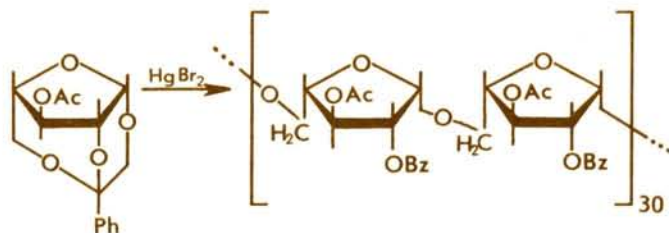
Первые попытки направленного синтеза полисахаридов заключались в полимеризации 1,6-ангидрогексоз, в частности левоглюкозана



В присутствии кислот Льюиса наблюдалось образование высокомолекулярных продуктов с регулярными α (1 \rightarrow 6)-связями. Впоследствии этот подход — использование соответствующих ангидросахаров — был применен для синтеза гомополисахаридов с (1 \rightarrow 2)- и (1 \rightarrow 3)-гликозидными связями.

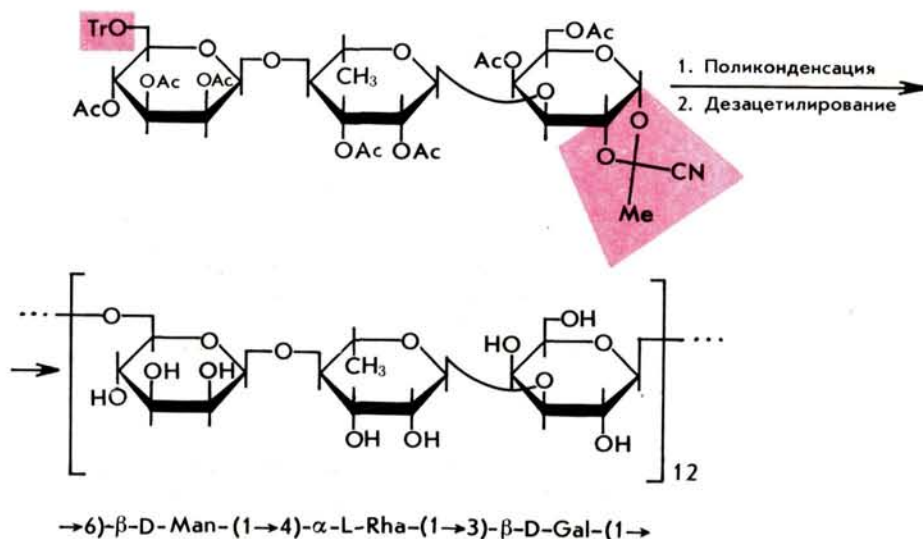
Очевидно, что таким путем может быть получен лишь ограниченный круг гомополимеров. В случае гетерополисахаридов единственный возможный путь синтеза состоит в поликонденсации или полимеризации производных олигосахаридов с единственной свободной (или активированной) гидроксильной группой.

Работы в этом направлении в течение ряда лет проводятся в СССР (Н. К. Кочетков). В качестве гликозилирующих агентов первоначально были использованы ортоэфиры сахаров. Например, из трициклического ортоэфира был получен линейный $\alpha(1 \rightarrow 5)$ -связанный арабинан со степенью полимеризации, приблизительно равной 60.



Ортоэфиры как исходные соединения для синтеза полисахаридов имеют ряд недостатков, приводящих к образованию побочных продуктов, в частности изомеров с «неправильной» конфигурацией при аномерных центрах, ангидросахаров и т. д. Более перспективными оказались 1,2-О-цианалкилиденные производные, которыми удалось гликозировать тритиловые эфиры сахаров. Катализатор реакции — перхлорат трифенилметания.

С их помощью был осуществлен синтез сложного гетерополисахарида, структура которого соответствовала О-антигенному полисахариду бактерии *Salmonella newington*.

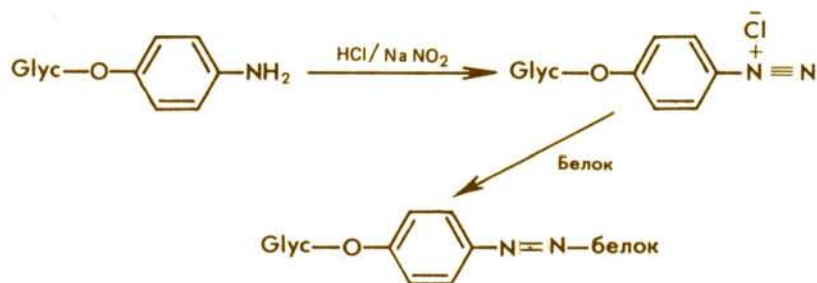


Несмотря на достигнутые успехи, направленный синтез сложных гетерополисахаридов остается трудной задачей, поскольку во многих случаях образуется смесь продуктов с α - и β -гликозидными связями, низкой остается степень полимеризации. Решение проблемы, по всей видимости, станет возможным лишь в результате более широкого развития методов гликозилирования.

Синтез неогликопротеинов

Неогликопротеинами называются гликопротеины, полученные химическим синтезом, а именно ковалентным присоединением моно- или олигосахаридов к белкам. Такие искусственные биополимеры могут использоваться для выяснения роли углеводных цепей гликопротеинов, получения антител к углеводным детерминантам заданной структуры, выделения и изучения специфичности лектинов.

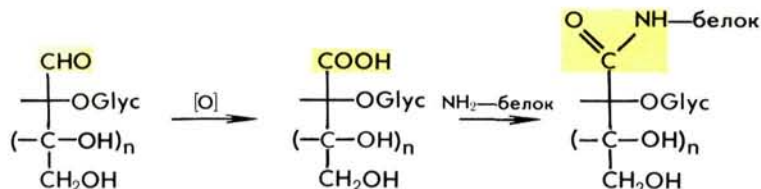
Предложено множество методов присоединения углеводных цепей к белкам. Самый старый из них, разработанный в 1929 г., основан на использовании диазопроизводных



Glyc — гликозильный остаток

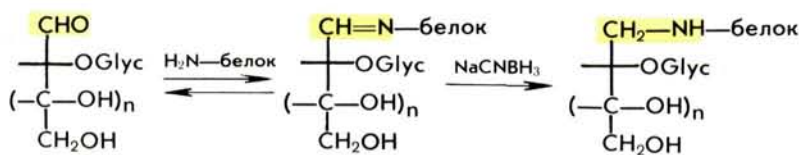
Реакция идет главным образом по остаткам тирозина, гистидина, лизина. Таким путем удастся достичь высокой степени модификации белка, однако применение метода осложняется труднодоступностью многих *p*-аминофенилгликозидов. Недостатком является также то, что в белок вводятся объемистые, гидрофобные фенильные группировки, которые могут существенно влиять на третичную структуру молекулы.

Широко применяется для введения углеводных цепей в белки реакция амидирования. В этом случае терминальный восстанавливающий остаток олигосахарида окисляется до альдоновой кислоты, которая и служит в дальнейшем мостиком между сахаридом и аминогруппами белка. Присоединение проводится методами, используемыми в синтезе пептидов: с помощью водорастворимого карбодиимида, методом смешанных ангидридов или активированных эфиров



Glyc—гликозильный остаток

Простой метод иммобилизации олигосахаридных цепей на белковом коре основан на реакции альдегидной группы углевода с аминогруппами белка и последующем восстановлении образовавшегося основания Шиффа цианоборгидридом натрия

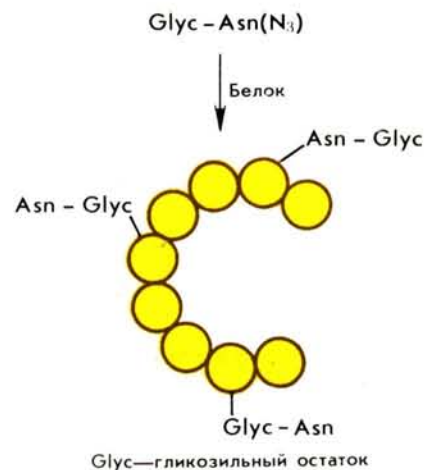


Glyc—гликозильный остаток

Как и при амидировании, этот метод присоединения олигосахарида приводит к раскрытию цикла терминального восстанавливающего моносахаридного остатка. Недостаток метода состоит в малой скорости протекания реакции, видимо, в результате низкого содержания ациклической формы сахара в растворе.

Для создания связи углевод — белок применяются и бифункциональные реагенты (в частности, симметричный трихлортриазин), однако основные усилия направлены на развитие методов, при которых образующийся узел связи в минимальной степени отличается от природного. Например, предложено первоначально получать олигосахарид с присоединенным N-гликозидной связью L-аспарагином, а затем вводить его в белок в виде ацилазида. Таким путем удается синтезировать полимер олигосахарид — N-аспарагин — белок, однако по сравнению с природными гликопротеинами полученный негликопротеин содержит «лишний» аспарагин.

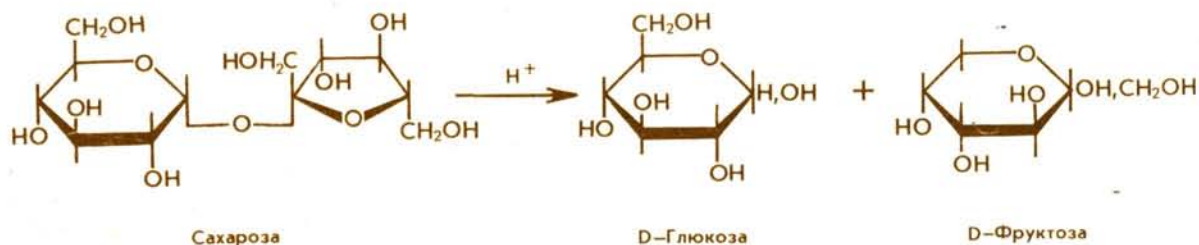
Направленное гликозилирование белков, например, рекомбинантных, полученных в бактериях с целью создания точных копий природных белков, пока неосуществимо ни химическим, ни ферментативным способом. Причина заключается в сложности процесса биосинтеза углеводных цепей: его осуществляет сложный комплекс ферментов — гликозилтрансфераз, каждый из которых присоединяет определенный углеводный остаток. Кроме того, присоединение углеводов начинается уже в процессе биосинтеза полипептидной цепи гликопротеина, поэтому место будущей углеводной цепи оказывается помеченным еще до того, как произойдет формирование третичной структуры белка. В сформировавшейся глобуле места потенциального гликозилирования могут быть недоступными для действия соответствующих ферментов.



Отдельные представители углеводов и углеводсодержащих биополимеров

Моносахариды

Среди моносахаридов ранее других стали известны и были изучены *D*-глюкоза и *D*-фруктоза, образующиеся при кислотном гидролизе сахарозы (тростникового сахара):



D-Глюкоза (декстроза, виноградный сахар) — самый распространенный моносахарид; в свободном виде она встречается в растениях, особенно плодах, в крови и лимфе человека и животных. Особенно велико содержание *D*-глюкозы в многочисленных олиго- и полисахаридах.

D-Фруктоза (плодовый сахар), подобно *D*-глюкозе, содержится в плодах растений, в меде.

D-Манноза и *D*-галактоза реже встречаются в свободном состоянии, но широко распространены в виде гликозидов, а также входят в состав полисахаридов (маннано- и галактано-гликопротеинов).

Среди пентоз наиболее известны *D*- и *L*-арабинозы, которые обнаружены в природе в некоторых полисахаридах, например в гуммиарабике, а также *D*-ксилоза, содержащаяся в полисахариде ксилане, и *D*-рибоза — компонент нуклеиновых кислот.

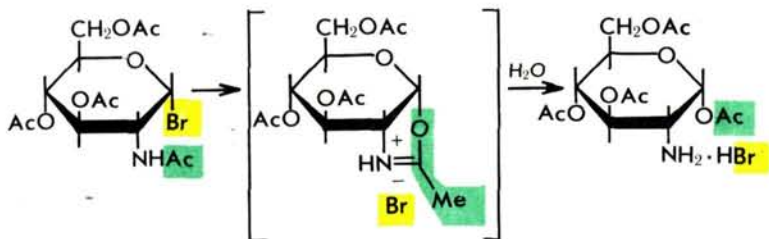
Широко распространены в природе *аминосахара* — моносахариды, в которых одна или несколько гидроксильных групп заменены на аминогруппы. Некоторые из них являются компонентами смешанных биополимеров, другие встречаются в качестве структурных единиц в антибиотиках.

Наиболее распространены производные 2-амино-2-дезоксисахаров: N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилмурамовая кислота.

N-Ацетилглюкозамин в виде гомополимера хитина формирует скелет насекомых и ракообразных; у бактерий, наряду с N-ацетилмурамовой кислотой, является компонентом клеточной стенки. В животном мире N-ацетилглюкозамин входит в состав мукополисахаридов соединительной ткани (гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов, гепарина), групповых веществ крови и других гликопротеинов. Остаток N-ацетилглюкозамина обычно находится на восстанавливающем конце N-гликозидных углеводных цепей животных гликопротеинов, образуя связь углевод — белок. Аналогичную роль, но в O-гликозидных цепях, выполняет N-ацетилгалактозамин, входящий в состав как гликопротеинов, так и гликолипидов. N-Ацетилгалактозамин является детерминантным сахаром групповых веществ крови, определяющим их специфичность.

Свойства аминсахаров со свободной аминогруппой аналогичны свойствам аминов: они легко ацилируются и алкилируются по аминогруппе, дают с ароматическими альдегидами основания Шиффа. Ацилирование аминогруппы можно осуществить избирательно, не затрагивая гидроксильных групп.

Аминсахара проявляют большинство обычных свойств моносахаридов, образуя производные по альдегидной и гидроксильным группам. Однако в ряде случаев их химические свойства оказываются специфичными в силу влияния аминогруппы. Так, 2-амино-

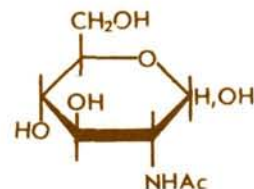


2-дезоксисахара не образуют гликозидов в условиях реакции Фишера. Гликозилгалогениды N-ациламинсахаров неустойчивы: например, 2-ацетидамо-3,4,6-три-O-ацетил-2-дезоксид-α-D-глюкопиранозилбромид легко изомеризуется в соответствующий гидробромид.

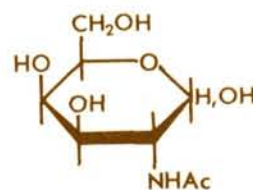
Отдельного упоминания заслуживают N-ацетилнейраминавая кислота и ее производные (сиаловые кислоты), являющиеся компонентами ганглиозидов, олигосахаридов молока, многих животных гликопротеинов и т. д.

Сиаловые кислоты играют важную роль, поскольку они терминируют олигосахаридные цепи смешанных биополимеров. Находясь на невозстанавливающем конце олигосахаридных цепей гликолипидов и гликопротеинов, сиаловые кислоты маскируют антигенные детерминанты биополимера и придают ему отрицательный заряд. Наличие сиаловых кислот на концах олигосахаридных цепей животных гликопротеинов обеспечивает возможность циркуляции последних в кровотоке, предотвращая захват их клетками печени. Входя в состав биополимеров животных клеток, сиаловые кислоты во многом определяют свойства клеточной поверхности. Изменение содержания сиаловых кислот на клеточной поверхности сопровождается такими процессами, как дифференцировка клеток и зло-

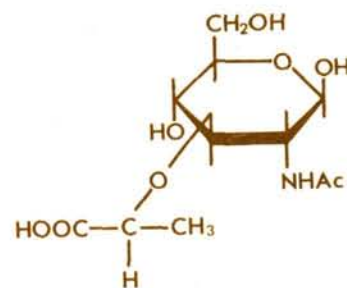
Отдельные представители углеводов и углеводсодержащих биополимеров



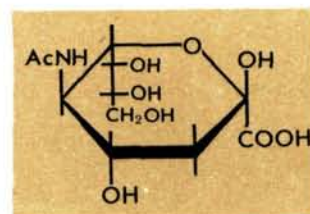
N-Ацетилглюкозамин



N-Ацетилгалактозамин



N-Ацетилмурамовая кислота



N-Ацетилнейраминавая кислота

качественное перерождение. Наличием избыточного количества сиаловых кислот на поверхности объясняют многие свойства опухолевых клеток.

Дезоксисахара представляют собой моносахариды, в которых одна или несколько гидроксильных групп заменены атомами водорода. Эти производные моносахаридов, подобно аминсахарам, широко распространены в природе, являясь компонентами гликозидов, олиго- и полисахаридов. Важнейшим представителем дезоксисахаров является 2-дезоксидеокси-D-рибоза, которая входит в фуранозной форме в состав дезоксирибонуклеиновых кислот. Весьма распространены и различные 6-дезоксигексозы, которые встречаются в животных и растительных гликозидах и полисахаридах, гликолипидах и антибиотиках. К этим соединениям относятся хиновоза (6-дезоксиглюкоза), рамноза (6-дезоксиманноза), фукоза (6-дезоксигалактоза). В ряде сердечных гликозидов содержатся 2,6-дидезоксигексозы и их 3-О-метилвые эфиры.

Дезоксисахара по своим химическим свойствам в целом сходны с обычными углеводами. Некоторые особенности характерны лишь для 2-дезоксисахаров, например они чрезвычайно легко дают О-гликозиды.

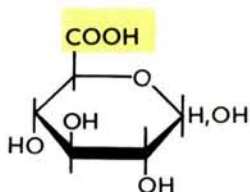
Альдиты (полиолы), образующиеся при восстановлении карбонильной группы углеводов, найдены и в природе. Рибит входит в состав теяхойевой кислоты, сорбит обнаружен в ягодах рябины, а маннит — в водорослях. Большое значение имеет ксилит — один из сладчайших полиолов, применяемый в пищевой промышленности в качестве заменителя сахара для больных диабетом.

Уроновые кислоты — сахара, в которых первичная спиртовая группа заменена на карбоксильную. Их названия образуют из названия соответствующего моносахарида с прибавлением окончания «уроновая кислота».

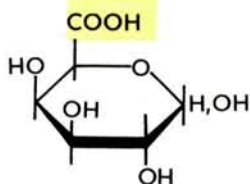
Уроновые кислоты находятся в различных природных источниках, главным образом в связанном виде. Так, D-глюкуроновая кислота входит в состав многочисленных растительных гликозидов (глюкуронидов), например тритерпеновых сапонинов, а также встречается в ряде растительных и бактериальных полисахаридов и в таких мукополисахаридах, как гиалуроновая кислота, гепарин, хондроитинсульфаты.

D-Галактуроновая кислота входит в состав растительных полиуронидов (пектиновые вещества), а D-маннуриновая и D-гулуриновая содержатся в альгиновой кислоте (полисахарид бурых водорослей).

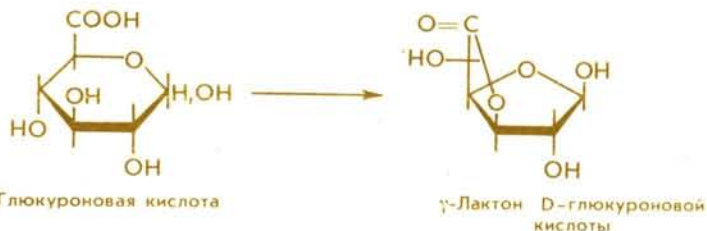
Характерное свойство уроновых кислот заключается в способности образовывать лактоны



D-Глюкуроновая кислота



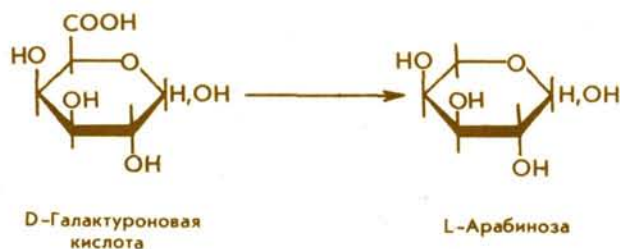
D-Галактуроновая кислота



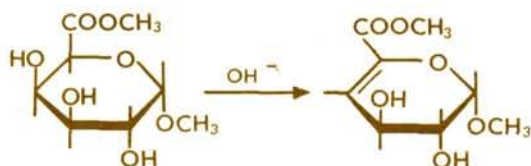
D-Глюкуроновая кислота

γ-Лактон D-глюкуроновой кислоты

Декарбосилирование, происходящее при нагревании солей уроновых кислот с такими металлами, как никель, магний, свинец, ведет к образованию соответствующих пентоз



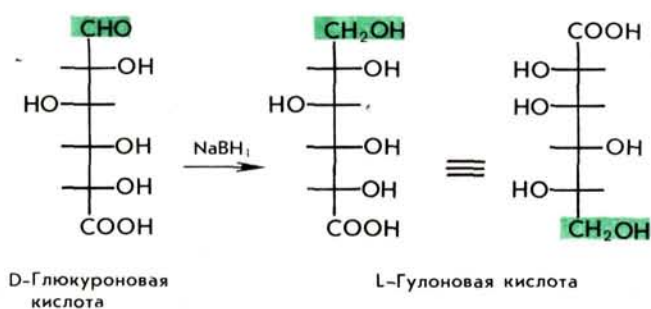
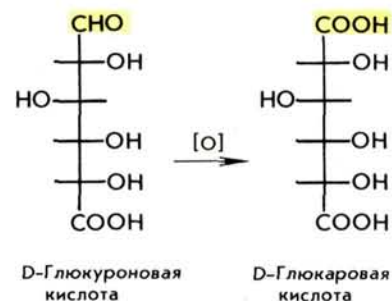
Важной реакцией некоторых уроновых кислот и их производных является отщепление заместителя у С-4 в присутствии оснований, протекающее по принципу β -элиминирования



Глюкурониды в этих условиях достаточно устойчивы.

Окисление уроновых кислот проходит легко и приводит к так называемым *сахарным кислотам*, содержащим две карбоксильные группы. Так, из D-глюкуроновой получается D-глюкарвая кислота (название образуется из названия соответствующего моносахарида с прибавлением окончания «аровая»).

При восстановлении уроновых кислот боргидридом натрия альдегидная группа превращается в первичную спиртовую, в результате чего образуется альдоновая кислота



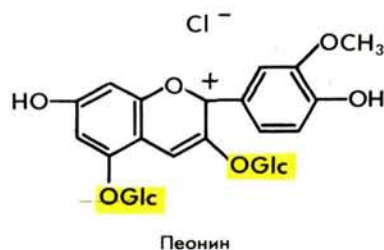
Высшие сахара — моносахариды, содержащие более шести углеродных атомов в цепи. В свободном виде встречаются лишь высшие кетозы (и соответствующие им полиолы), а высшие альдозы входят только в состав липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Их свойства не отличаются от свойств обычных моносахаридов; следует лишь отметить их склонность к легкому образованию ангидропроизводных.

Гликозиды

Гликозиды занимают заметное место как в растительном, так и в животном мире.

Особенно широко гликозиды представлены в растениях: в их число входят пигменты цветов, ароматические вещества, многие природные красители, стимуляторы сердечной деятельности и т. д.

Пигменты цветов, как правило, представляют собой D-гликозиды, у которых агликоном являются флавоны, флавононы, флавонолы или изофлавоны. Примером может служить пигмент темно-красных пионов «пеонин».



Широкую известность получили так называемые сердечные гликозиды — соединения, способные стимулировать сердечную деятельность и тем самым представляющие интерес для медицины. Они встречаются в ряде видов растений, наиболее важными из которых являются *Strophanthus* и *Digitalis*. Типичным для сердечных гликозидов является присутствие дезоксисахара, который чаще всего присоединен к агликону. Структуры агликонов большинства сердечных гликозидов весьма сходны — они представляют собой сложные лактоны стероидной природы.

Хорошо известны и другие природные гликозиды: сапонины, алкалоиды салонин и томатин, цианогенные гликозиды (например, амигдалин, придающий горький вкус миндалю) и т. д. В роли агликонов могут выступать фенолы, енолы, циангидрины, изотиоцианаты, кумарины, стероиды. Углеводная часть чаще всего представлена D-глюкозой, реже D- и L-галактозой, D-маннозой, D-фруктозой, L-рамнозой. Роль растительных гликозидов далеко не всегда ясна. Они могут служить резервными углеводами, стабилизировать лабильные агликоны, регулировать метаболизм растений, удалять продукты метаболизма.

Широко представлены среди бактерий гликозиды-антибиотики. Наиболее хорошо известен стрептомицин, впервые выделенный З. А. Ваксманом из культуры *Streptomyces griseus*. Различными видами актиномицетов продуцируются антибиотики широкого спектра действия — стрептотрицины, в состав которых входит аминоксахар 2-амино-2-дезоксид-D-гулопираноза.

Гликозиды встречаются и в животном мире. Наиболее известными и распространенными гликозидами являются гликолипиды — ганглиозиды и цереброзиды. В виде гликозидов (глюкуроидов) выделяются из организма в мочу токсические вещества.

Олигосахариды

Олигосахариды достаточно широко распространены в природе. В растительном мире они играют роль резервных углеводов. Наиболее часто встречаются олигосахариды группы сахарозы. Сахароза (см. с. 462) α -D-Glc-(1 → 2)- β -D-Fruf присутствует практически во всех растениях (семенах, листьях, плодах, корнях и т. д.). Содержание сахарозы в сахарной свекле составляет 17 — 19%.

При производстве сахара свекла измельчается, обрабатывается горячей водой и полученный сок подвергается очистке многократной обработкой известковым молоком, углекислым и сернистым газами. Очищенный сок упаривается, в результате чего получается густой сироп, содержащий 60 — 65% сухих веществ. Сироп вновь обрабатывается сернистым газом, сгущается в вакуум-аппаратах до образования уфеля — смеси кристаллов сахарозы и патоки, после чего сахароза отде-

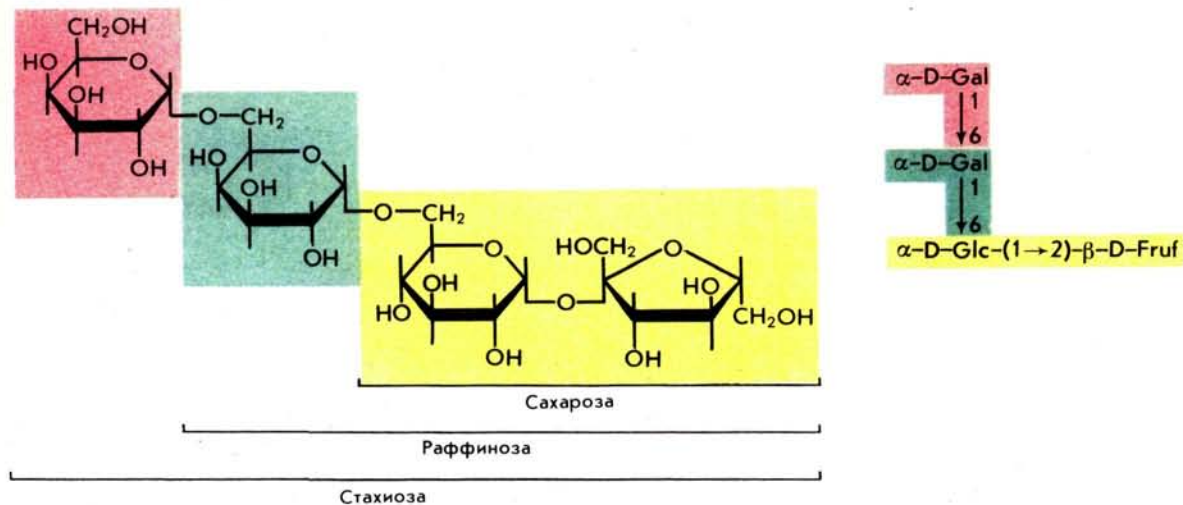
Отдельные представители
углеводов
и углеводсодержащих
биополимеров

ляется центрифугированием. Патока подвергается дальнейшей очистке для выделения дополнительного количества сахарозы.

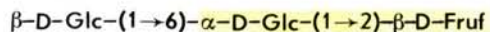
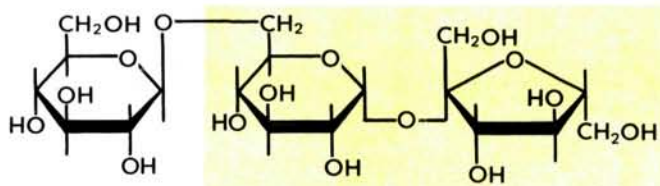
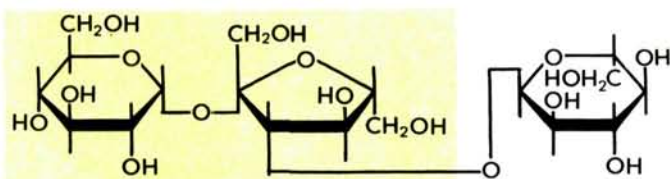
Производство сахара из сахарного тростника, содержащего 13 — 15% сахарозы, начинается с получения сока, который очищается известью и упаривается. Кристаллизующийся сахар-сырец отделяется центрифугированием. При переработке на белый сахар раствор сырца очищается известью и углекислым газом, а затем сгущается до кристаллизации сахарозы.

Потребительский белый сахар-песок содержит не менее 99,75% сахарозы.

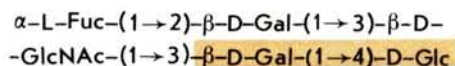
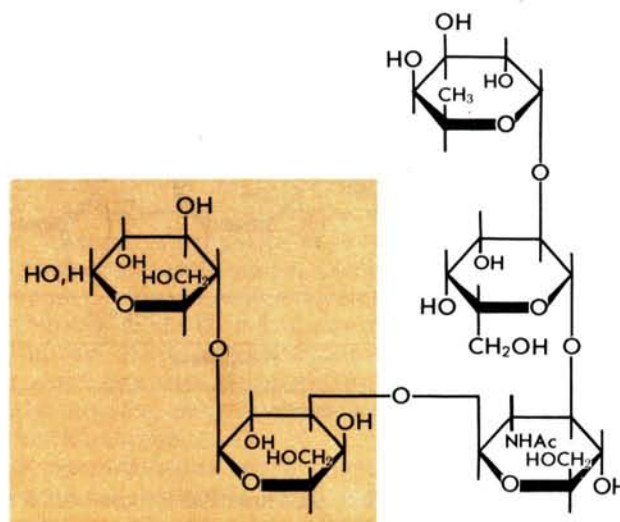
Почти так же широко, как сахароза, в растениях распространены раффиноза и стахиоза



К этой же группе относятся мелецитоза — компонент сладких выделений многих деревьев, в частности лип и тополей, и генцианоза, встречающаяся в корнях растений вида *Gentian*



Второй большой группой природных олигосахаридов являются олигосахариды молока, которые играют важную роль в формировании кишечной флоры новорожденных, необходимой для нормального пищеварения. Они способствуют развитию в пищеварительном тракте микроорганизма *Lactobacillus bifidus*, расщепляющего основной олигосахарид молока — лактозу (см. с. 462) с образованием молочной и уксусной кислот, которые препятствуют размножению патогенных бактерий, в частности тифозной палочки. Структура ряда олигосахаридов женского молока была установлена в 50-е годы работами Р. Куна с соавторами. В их состав входят D-глюкоза, D-галактоза, L-фукоза и N-ацетилглюкозамин, а характеристическим фрагментом является остаток лактозы. Один из наиболее крупных олигосахаридов молока — лакто-N-фукопентаоза



Лакто-N-фукопентаоза

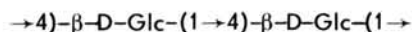
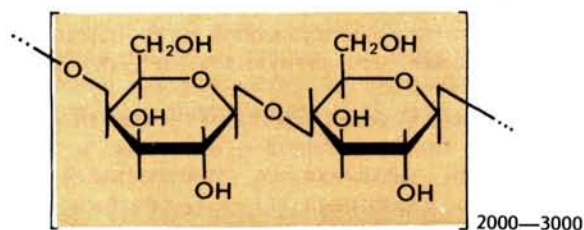
В 1 л женского молока находится около 70 г лактозы и 3 г аминоксодержащих олигосахаридов. В коровьем молоке количество олигосахаридов, содержащих аминоксара, приблизительно в 100 раз меньше.

Наиболее пристальное внимание исследователей в настоящее время привлекают олигосахариды, входящие в состав гликопротеинов.

Полисахариды

Полисахариды составляют основную массу органического вещества на нашей планете. Достаточно упомянуть тот факт, что из них состоит основная часть растительного мира, где полисахариды выполняют скелетные функции, а также служат резервными углеводами.

Наиболее распространенным полисахаридом является *целлюлоза*, линейный β (1 → 4)-глюкан со степенью полимеризации 2000 — 3000



Обычный ее источник — древесина — содержит около 50% целлюлозы, а хлопок представляет собой почти чистую целлюлозу. Согласно рентгеноструктурным данным, молекулы целлюлозы соединены в пучки, состоящие из параллельных цепей, связанных межмолекулярными водородными связями. Такая конфигурация молекул определяет механические, физические и химические свойства целлюлозы (высокую механическую прочность, нерастворимость в воде, трудность химической модификации).

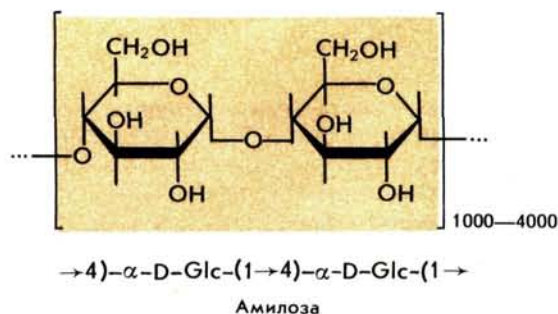
Целлюлозу удается растворить лишь в медноаммиачном растворе или растворе гидроксида натрия. Последний процесс используется для получения целлюлозных нитей и целлофана. Целлюлоза в форме алкоксида обрабатывается сероуглеродом, полученный раствор ксантогената целлюлозы продавливается через фильтры или тонкую щель в раствор кислоты. Целлюлоза и ее производные имеют большое практическое значение: на ее основе производятся пластмассы, взрывчатые вещества, эмульгаторы и т. д.

Гемицеллюлозы — смеси полисахаридов клеточной стенки растений, состав которых зависит от вида растения. В зависимости от моносахаридного состава основной цепи гемицеллюлозы делятся на ксиланы, глюкоманнаны и галактаны. Ксиланы, главным источником которых являются древесина лиственных пород и злаки, построены преимущественно из (1 → 4)-связанных остатков β -ксилопиранозы. В основном они содержат остатки L-арабинозы, 4-O-метил-D-глюкуроновой кислоты. Глюкоманнаны, встречающиеся чаще всего в хвойных растениях, имеют главным образом линейную структуру с β (1 → 4)-связями. В некоторых случаях к главной цепи присоединены (1 → 6)-связями остатки D-галактозы.

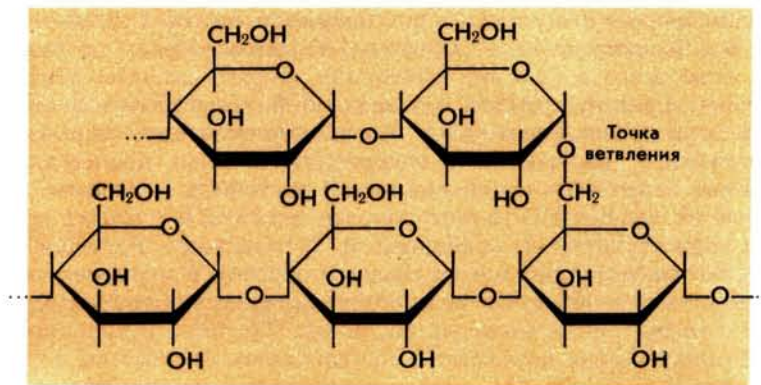
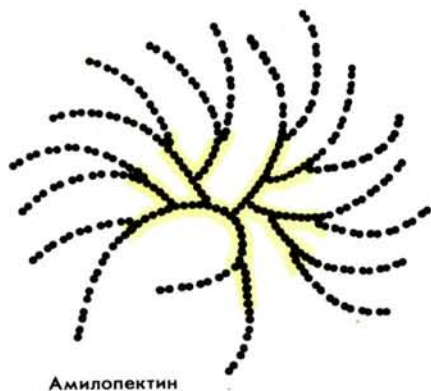
В наземных растениях и водорослях широко представлены *пектиновые вещества* — полиурониды. В растениях основным компонентом их является D-галактуроновая кислота, а в малых количествах присутствуют L-арабиноза и D-галактоза. Растворимые пектиновые вещества находятся главным образом в соках растений, нерастворимые — образуют межклеточные вещества и составляют большую часть стенки молодых растений. Частично этерифицированные полиурониды называются пектиновыми кислотами, а сами полиурониды — пектовыми кислотами. Пектиновые вещества способны образовывать в растворах прочные гели и студни, что обусловлено межмолекулярной ассоциацией. Это находит практическое применение в кондитерской и фармацевтической промышленности.

Камедями называются полисахариды, которые при повреждении коры растений выделяются в виде вязких растворов и превращаются в стеклообразную массу. *Слизь* — родственные камедям полисахариды, присутствующие в неповрежденных растениях. Источником слизей служат кора, листья, корни и т. д. Слизь является продуктом метаболизма растений. Камеди образуются в результате патологических процессов — механических или бактериальных повреждений. Оба типа образований представляют гетерополисахариды сложного состава и строения, что затрудняет их структурные исследования.

Главный резервный углевод растений — *крахмал*, представляющий собой смесь полисахаридов — амилозы и амилопектина. *Амилоза* — линейный полисахарид, построенный из остатков α -D-глюкопиранозы, связанных (1 → 4)-связями. Длина цепей 1000 — 4000 звеньев



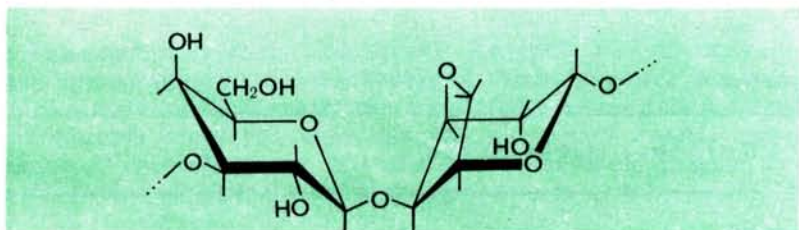
Спиральная конформация молекулы обуславливает возможность комплексообразования с небольшими молекулами, располагающимися вдоль оси спирали. Наиболее известным комплексом такого типа является комплекс с иодом. *Амилопектин* также построен из остатков α -D-глюкозы, но, в отличие от амилозы, обладает сильно разветвленным строением. Линейные участки состоят из α (1 → 4)-D-глюкопиранозильных цепей, а в точках ветвления имеются α (1 → 6)-связи



Крахмал и его производные находят широкое применение в различных областях промышленности.

В ряде высших растений обнаружены фруктаны — полисахариды, состоящие из остатков D-фруктозы, которые выполняют роль пищевого резерва. Один из фруктанов — *инулин* — содержит остатки D-фруктопиранозы, соединенные $\beta(2 \rightarrow 1)$ -связью.

Богатейший источник полисахаридов — морские водоросли, в которых содержание полисахаридов достигает 80% их сухого веса. Из многих видов красных водорослей в промышленном масштабе получают *агар*, представляющий собой смесь сульфатированных полисахаридов — агарозы и агаропектина. *Агароза* построена из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидро-L-лактозы, связанных попеременно $\beta(1 \rightarrow 4)$ - и $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -связями



В настоящее время агар и агароза находят широкое применение в биохимических исследованиях. Очищенная от заряженных примесей агароза в водной среде образует гель с большими порами, размер которых определяется ее концентрацией. Следует подчеркнуть, что цепи агарозы в геле связаны не ковалентно, а лишь водородными связями.

Агарозные гели используются для фракционирования белков и нуклеиновых кислот (гель-фильтрация, электрофорез) и их характеристики (иммунодиффузия, иммуноэлектрофорез). В агаровых гелях иммобилизуют бактерии и лимфоидные клетки в молекулярно-биологических и иммунологических исследованиях.

Бурые водоросли содержат смесь линейных полисахаридов — *альгиновых кислот*, в которых мономерными звеньями являются D-маннуроновая и D-гулууроновая кислоты, соединенные $(1 \rightarrow 4)$ -связями.

Резервным полисахаридом всех животных организмов и некоторых бактерий и дрожжей является *гликоген* — $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -D-глюкан с α -D-глюкозильными разветвлениями в положении 6 основной цепи. Будучи родственным амилопектину, гликоген отличается от него большей разветвленностью и более плотной упаковкой молекулы.

В последнее время появились данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере в ряде тканей (мышцах кролика, сетчатке глаз быка) полисахаридные цепи гликогена ковалентно соединены с белком, т. е. гликоген является протеогликаном. Например, очищенный гликоген из сетчатки глаза быка содержит 1,5 — 2,0 мг белка на 100 мг глюкозы, причем отделить белковый компонент от полисахаридного не удается даже в сильно диссоциирующих условиях. Исчерпывающий протеолиз приводит к пептидогликану, содержащему лишь одну аминокислоту — тирозин. Следовательно, связь углевод — белок осуществляется через остаток тирозина, причем устойчивость этой связи в щелочной среде свидетельствует о том, что гликан присоединен к гидроксильной группе тирозина, а не к карбоксилу. Ранее такой тип углевод-белковой связи описан не был.

Аналогом целлюлозы как по физико-химическим, так и по биологическим свойствам является *хитин* — основной компонент скелета членистоногих и других беспозвоночных. Линейная полимерная молекула хитина состоит из остатков N-ацетилглюкозамина, соеди-



Агароза

ненных $\beta(1 \rightarrow 4)$ -связями, и имеет высокоупорядоченную структуру.

Полисахариды (а точнее, протеоглики) соединительной ткани животных имеют общий принцип строения: линейные полимеры содержат чередующиеся остатки аминсахаридов и уроновых кислот. Широко распространена в тканях животных организмов гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, гепарин и др.

Множество полисахаридов различного строения выделено из самых разнообразных классов микроорганизмов. По локализации в клетке их можно разделить на резервные внутриклеточные, внеклеточные и полисахариды клеточной стенки. Из внутриклеточных

Таблица 19.

Строение специфических полисахаридов *Sh. dysenteriae*

Серо-тип	Повторяющееся звено
1	$\rightarrow 2) - \alpha - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - L - \text{Rha} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - L - \text{Rha} (1 \rightarrow$
2	$\rightarrow 4) - \alpha - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - D - \text{Glc} - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha - D - 3(4) \text{Ac} - \text{GlcNAc} \end{array}$
3	$\rightarrow 3) - \beta - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \beta - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta - D - \text{GlcLA} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{Glc} \end{array}$
4	$\rightarrow 3) - \alpha - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - D - \text{GlcA} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - L - \text{Fuc} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha - L - \text{Ac} - \text{Fuc} \end{array}$
5	$\rightarrow 4) - \alpha - D - \text{Man} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - D - \text{Man} - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 3 \\ \uparrow \\ 1 \\ \alpha - D - \text{RhaLA} \end{array} \quad \begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$
6	$\rightarrow 3) - \beta - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{Glc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ \text{X} \end{array}$
8	$\rightarrow 3) - \beta - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - \text{GlcA} - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 4 \\ \uparrow \\ 1 \\ \beta - D - \text{Glc} (4 \leftarrow 1) - \beta - D - \text{GlcNAc} \end{array}$
9	$\rightarrow 3) - \beta - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 4) - \beta - D - \text{Man} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - D - \text{Gal} - (1 \rightarrow 3) - \beta - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow$ $\begin{array}{c} 4/6 \\ \swarrow \searrow \\ \text{CH}_2, \text{CCOOH} \end{array} \quad \begin{array}{c} 2 \\ \uparrow \\ \text{Ac} \end{array}$
10	$\rightarrow 3) - \alpha - D - \text{ManNAc} - (1 \rightarrow 3) - \beta - L - \text{Rha} - (1 \rightarrow 4) - \alpha - D - \text{GlcNAc} - (1 \rightarrow 2) - \beta - D - \text{Man} - (1 \rightarrow$

X — неидентифицированный кислый аминсахар

GlcLA — лактозилглюкоза

RhaLA — лактозилрамноза

полисахаридов отметим *декстраны*, продуцируемые некоторыми бактериями родов *Leuconostus* и *Streptococcus*. Они представляют собой глюканы с преобладанием $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -гликозидных связей и могут быть как линейными, так и разветвленными по положениям 4 или 3 в зависимости от штамма бактерий. Декстраны обладают антигенными свойствами.

Частично деполимеризованные декстраны нашли широкое применение в производстве молекулярных сит — сефадексов. Для получения жесткой структуры цепи декстрана «сшивают» эпихлоргидрином; степень «сшивки» определяет размер пор и соответственно размер фракционируемых молекул. Большое число гидроксильных групп придает гелю ярко выраженный гидрофильный характер, что обуславливает низкий уровень неспецифической сорбции и, как следствие, малые потери биополимеров в процессе разделения. Сефадексы нерастворимы ни в каких растворителях и обладают высокой устойчивостью к действию различных химических агентов: органических растворителей, солевых растворов, слабых кислот и щелочей.

Полисахариды клеточной стенки бактерий, как правило, обладают чрезвычайно сложной структурой, что затрудняет их изучение. Лишь в последнее десятилетие в этой области наметился прогресс. Установлена структура полисахарида клеточной стенки стрептококков, O-специфических полисахаридов бактерий *Shigella dysenteriae* (табл. 19), *Pseudomonas aeruginosa* и т. д.



Ландштейнер [Landsteiner] Карл (1868—1943), австрийский иммунолог и патолог, основоположник иммуногенетики. Окончил медицинский факультет Венского университета (1891); работал в лабораториях Вюрцбурга, Мюнхена, Цюриха, Вены, с 1922 г. — профессор Рокфеллеровского института. Открыл группы крови А, В, О(Н) у человека, а также (совместно с А. Винером) резус-фактор крови (1940). Впервые получил искусственные полусинтетические антигены и ввел термин «гаптен». Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1930).

Гликопротеины

Иммуноглобулины. Все 5 классов иммуноглобулинов человека содержат углеводы, причем IgG, IgM и IgE несут только N-гликозидные цепи, а IgA и IgD также и O-гликозидные. N-Гликозид-связанные олигосахариды расположены в Fc-области тяжелых цепей (см. с. 215). В таблице 20 приведены некоторые структуры углеводных цепей разных классов иммуноглобулинов, определенные для миеломных белков в начале 70-х годов С. Корнфельдом с сотрудниками. Как уже упоминалось выше, олигосахаридные цепи IgM и IgG обеспечивают рецепцию комплексов антиген — антитело соответственно макрофагами и клетками печени.

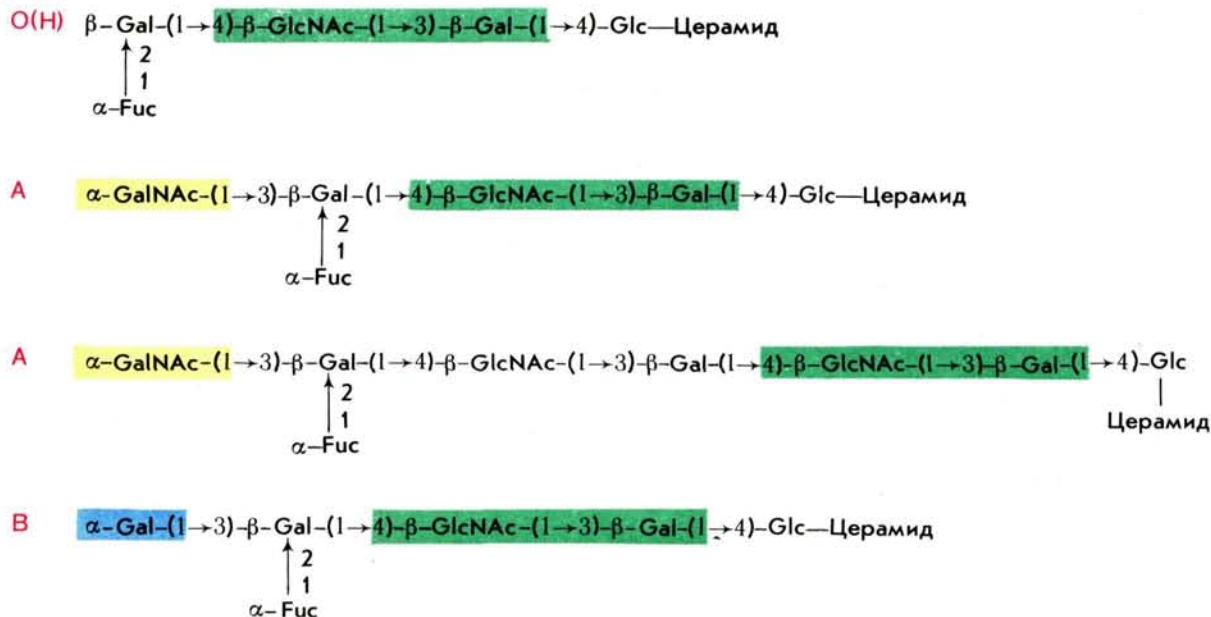
Групповые вещества крови. В строгом смысле слова групповыми веществами крови называют серологически различающиеся антигенные детерминанты поверхности эритроцитов человека. Главной системой групповых веществ крови человека является система АВО(Н). Впервые обнаруженные К. Ландштейнером в начале XX века групповые вещества крови привлекли внимание из-за необходимости типирования эритроцитов при переливании крови, что обусловлено наличием в крови человека антител против «чужих» групповых веществ крови. Так, у индивидуумов с группой крови А обнаруживаются антитела против В-детерминант и наоборот, а у людей с группой крови О — и против А-, и против В-детерминант. Работами многих ученых (У. Морган, В. Уоткинс, А. Кобата, С.-И. Хакомори и др.) было показано, что АВО(Н)-антигены имеют углеводную природу и расположены на гликозидных цепях гликоконъюгатов. Ниже приведены структуры антигенных детерминант системы АВО(Н).

Детерминантными сахарами являются α -L-фукоза для группы крови О(Н), α -N-ацетилгалактозамин для А и α -D-галактоза для В.

В мембране эритроцитов антигенные детерминанты групповых веществ крови находятся как на гликолипидах, так и на гликопро-

теинах. В случае гликолипидов детерминантные группировки присоединены к повторяющемуся фрагменту β -D-GlcNAc-(1→3)-D-Gal.

Для гликопротеинов мембран эритроцитов структура цепей, несущих детерминантные группы, еще окончательно не установлена.



Помимо системы АВО (Н), существует еще ряд систем групповых веществ крови — системы Т. Льюиса (Le^a , Le^b), Ii и т. д., специфичность которых определяется сахарами. Гликопротеины с А-, В- и Н-специфичностью обнаружены и у многих видов животных.

Муцины — гликопротеины, секретируемые различными тканями организма и образующие вязкие растворы. Примерами могут служить слюна, секреты кишечника и бронхов. Ими выстланы полости дыхательного и пищеварительного трактов. Муцины выполняют роль смазки, а также защищают ткани от повреждений.

Строение муцинов изучалось многими исследователями, в частности А. Готтшалком, работы которого по структуре углеводных цепей гликопротеинов были выполнены на муцине подчелюстных

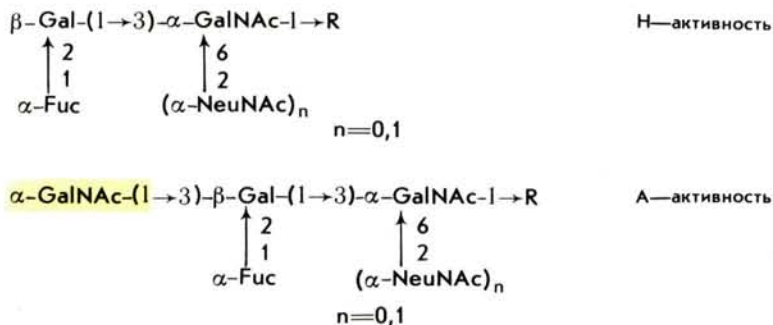


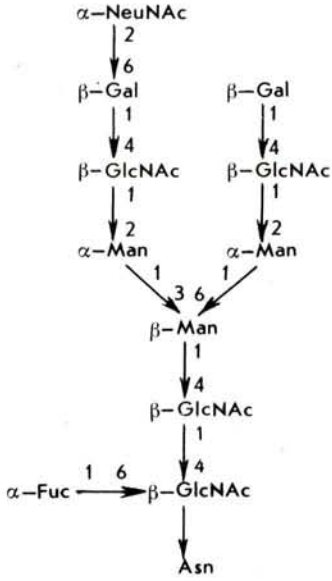
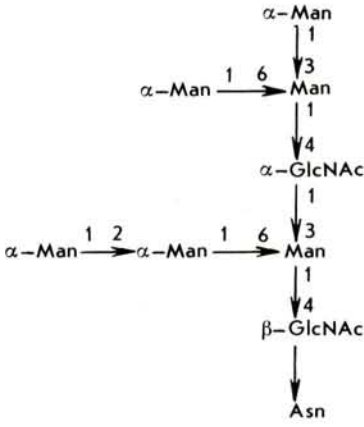
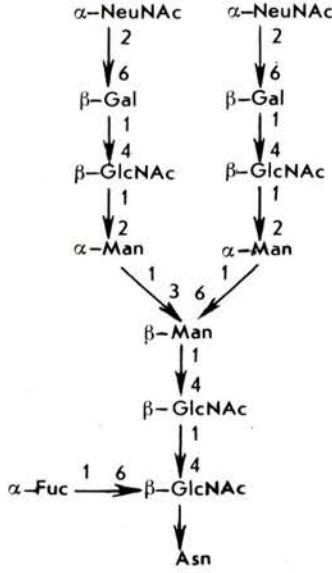
Рис. 259. Олигосахариды муцина подчелюстной железы барана.

желез барана. Для муцинов подчелюстных желез характерно наличие большого числа О-гликозидных цепей, содержащих остатки галактозы, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилнейраминовой кислоты и фукозы. Некоторые О-цепи обладают активностью антигенов групп крови (рис. 259).

Таблица 20

Некоторые структуры углеводных цепей миеломных иммуноглобулинов

Иммуноглобулин	N-Гликозидные цепи		O-Гликозидные цепи
	сложного типа	маннозобогатого типа	
IgG		Отсутствуют	Отсутствуют
IgM			Отсутствуют

Иммуноглобулин	N-Гликозидные цепи		O-Гликозидные цепи
	сложного типа	маннозобогатого типа	
IgE			Отсутствуют
IgA		Отсутствуют	$\beta\text{-Gal-(1}\rightarrow\text{3)-GalNAc-O-Ser}$

В муцинах желудка и кишечника встречаются значительно более сложные структуры, причем некоторые также несут детерминанты групп крови системы ABO(H) (рис. 260).

В растворе молекула муцина представляет собой довольно жесткий клубок, состоящий из гибкой, беспорядочно свернутой полипептидной цепи с заключенными внутрь молекулами воды. Такая моле-

кула ведет себя как сферическое тело, что определяет гидродинамические свойства растворов муцинов.

Многие функционально важные белки синтезируются в виде неактивных предшественников, от которых затем отщепляются биологически активные продукты. Зачастую правильное направление фрагментации диктуется олигосахаридными цепями. Например, ряд гормонов гипофиза образуется в результате направленного протеолиза единого предшественника, несущего углеводные цепи, — препроопиомеланокортина (см. с. 271).

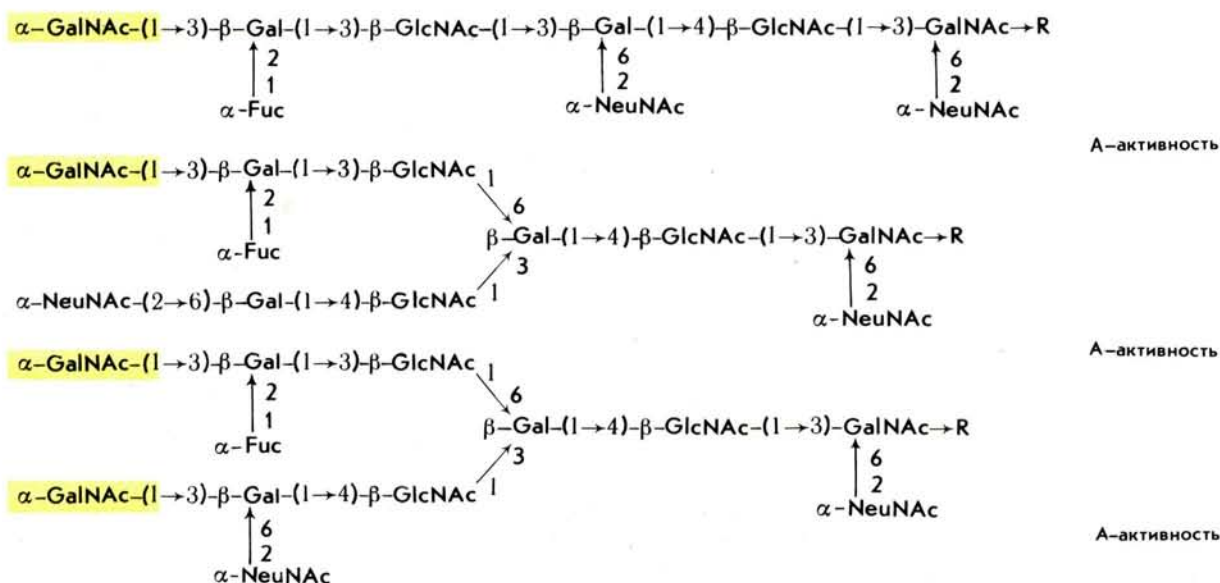
Находящиеся на концах активных фрагментов пары основных аминокислот, очевидно, служат сигнальной последовательностью для трипсиноподобных пептидаз гипофиза, а олигосахаридные цепи контролируют доступность этих участков, влияя на пространственную структуру белка. Если клетки гипофиза инкубировать с туникамицином — антибиотиком, блокирующим биосинтез липидного предшественника N-гликозидсвязанных олигосахаридов и таким образом вызывающим образование белков без N-гликозидных цепей, то образуются лишь незначительные количества названных выше гормонов.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что углеводные цепи участвуют в регуляции *катаболизма гликопротеинов*. Так, десиазированные гликопротеины быстро исчезают из кровотока животных, аккумулируясь в клетках печени. Ответственным за процесс рецепции асиалогликопротеинов является находящийся в плазматической мембране гепатоцитов лектин, специфичный к терминальным остаткам D-галактозы и N-ацетилгалактозамина.

Другим типом клеток животных организмов, участвующих в удалении из кровотока гликопротеинов, являются купферовы клетки (макрофаги печени). В них обнаружен лектин, специфичный по отношению к остаткам D-маннозы и N-ацетилглюкозамина, т. е. к N-гликозидным цепям, обогащенным маннозой.

Таким образом, функция названных лектинов, очевидно, заключается в удалении частично деградированных гликопротеинов и лизосомальных гидролаз (последние несут экспонированные наружу остатки маннозы). В последние годы обнаружено, что

Рис. 260. Олигосахариды муцинов желудка и кишечника.





Готтшалк [Gottschalk] Альфред (1894—1973), немецкий химик и биохимик. Образование получил в Бонне (1920), с 1963 г. работал в Институте биохимии Общества М. Планка в Тюбингене. Ему принадлежат широко известные работы по изучению структуры углеводных цепей гликопротеинов.

лектины клеток печени и макрофагов участвуют в утилизации комплексов антиген — антитело.

Углеводные цепи гликопротеинов играют важную роль в процессах межклеточного узнавания.

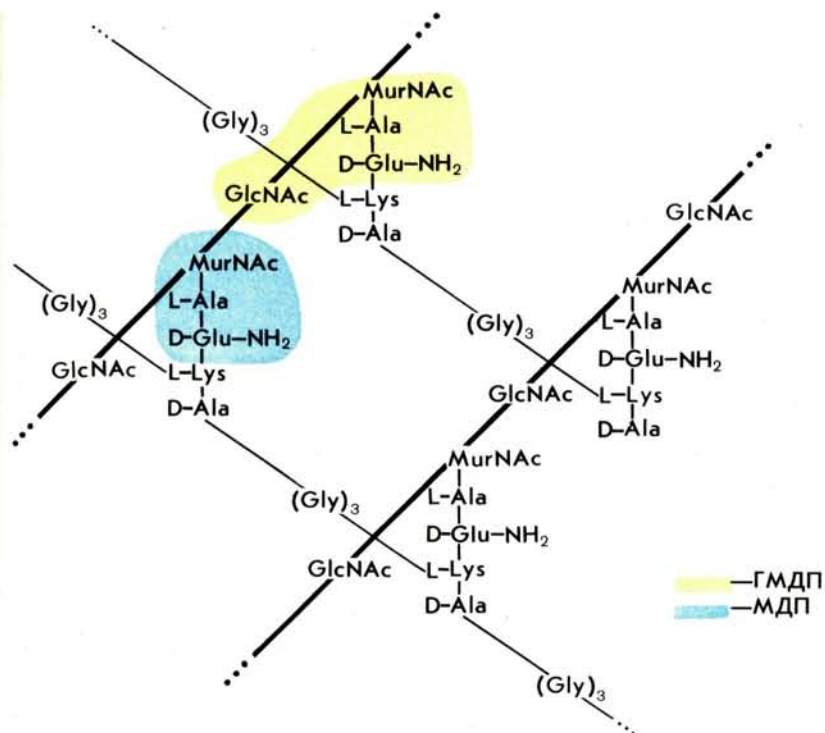
Убедительные данные были получены для слизевика *Dictyostelium discoideum*. Этот миксомицет может существовать в виде одноклеточного или многоклеточного организма, причем переход от первого ко второму сопровождается экспрессией на клеточной поверхности двух лектинов, специфичных к углеводам галакто-ряда, а также лиганда с соответствующим углеводным компонентом. Эти лектины — дискоидины I и II — обладают достаточно высокой углеводной специфичностью, позволяя клеткам *Dictyostelium discoideum* отличать собственные клетки от клеток других видов слизевиков, также несущих галактозо-специфичные лектины. Таким образом, наличие экспонированных остатков углеводов галакто-ряда является необходимым, но не достаточным условием образования межклеточного контакта; достаточным условием служит наличие уникальной сети углеводных детерминант определенной структуры. Названные лектины не являются интегральными мембранными белками, а связаны с гликопротеиновыми рецепторами поверхности клеток.

Углеводные детерминанты используются бактериями для адгезии на животных тканях. Примером могут служить грамотрицательные бактерии, в частности *E. coli*, имеющие на поверхности маннозо-специфичные лектины, а также бактерии *Streptococcus sanguis*, связывающие гликопротеины с α -NeuNAc-(2→3)- β -D-Gal-(1→3)-D-GalNAc-звеном. Бактерии *S. sanguis* ответственны за развитие перидонтита, а приведенный выше структурный фрагмент характерен для муцинов слюны.

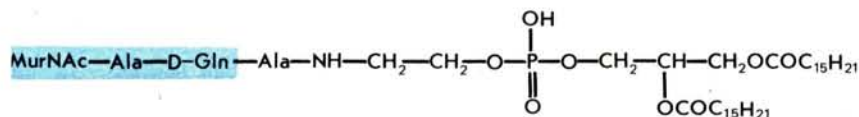
Углеводсодержащие смешанные биополимеры

Углевод-белковые биополимеры чрезвычайно широко распространены в природе: большинство природных полипептидов несет ковалентно связанные углеводы. Помимо уже рассмотренных гликопротеинов, к таким биополимерам относятся пептидогликаны и протеогликаны.

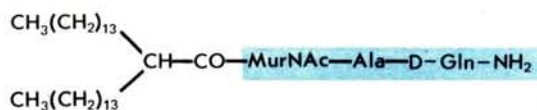
Пептидогликаны представляют собой макромолекулы, у которых сравнительно короткие олигопептидные фрагменты присоединены к полисахаридной цепи. Эти фрагменты могут связывать между собой полисахаридные цепи, в результате чего образуется жесткий каркас. Примером служит пептидогликан клеточной стенки бактерий, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных $\beta(1 \rightarrow 4)$ -связями (см. с. 728). Линейный полисахарид связан с полипептидными цепями через лактильные остатки мурамовой кислоты, образуя прочную двумерную решетку. Это — каркас, окружающий бактериальную клетку и обеспечивающий ей защиту от физических воздействий, в том числе шока при попадании в гипотоническую среду. Расщепление протеогликана приводит к смеси гликопептидов, обладающих адьювантной (усиливающей образование антител) и противоопухолевой активностями. Наименьшей структурной единицей, проявляющей такого рода активности, является мурамилдипептид (МДП) — MurNAc-L-Ala-D-GluNH₂.



Благодаря этим свойствам гликопептиды клеточной стенки бактерий привлекают пристальное внимание исследователей как потенциальные компоненты синтетических вакцин и противоопухолевые средства. Нежелательное свойство гликопептидов клеточной стенки, ограничивающее их применение в медицине, — пирогенность: попадание их в кровотоки вызывает заметное повышение температуры тела. В связи с этим в ряде стран мира, прежде всего во Франции, Японии и СССР, ведутся работы по синтезу апиrogenных гликопептидов, а также аналогов МДП с ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами. Французскими учеными Э. Ледерером, Л. Шедидом получен апиrogenный аналог МДП — его бутиловый эфир, мурабутид, который в настоящее время применяется как компонент синтетической вакцины против стрептококковых инфекций. Не менее известны МТП-кефалин (фирма «CIBA — GEIGY», Швейцария) и препарат В-30 (Т. Шива, Япония).



МТП — кефалин



В-30



Ряд гликопептидов синтезирован в СССР (В. Т. Иванов). Среди них ГМДП — β -D-GlcNAc-(1 → 4)-MurNAc-L-Ala-D-GluNH₂ — аналог МДП с более выраженными адьювантными и противоопухолевыми свойствами, промышленный синтез которого налажен в СССР. Молекулярный механизм действия подобных гликопептидов пока не ясен. В 1984 г. Э. Ледерером высказано предположение, что гликопептиды клеточных стенок являются незаменимыми веществами типа витаминов, которые попадают в организм из пищи или кишечной флоры и поддерживают необходимый иммунный статус; в следовых количествах они найдены в мозге и моче здоровых людей.

Протеогликианы, в отличие от гликопротеинов, несут на полипептидном коре не олигосахаридные, а полисахаридные цепи. Связь между углеводным и белковым компонентами может быть как O-, так и N-гликозидной, причем наряду с рассмотренными фрагментами GlcNAc-GlcNAc-Asn и GalNAc-Ser/Thr в протеогликанах часто встречается фрагмент Gal-Gal-Xyl-Ser.

Свойства протеогликанов в большой степени определяются углеводным компонентом. Как и полисахариды, они полидисперсны. Молекулярная масса протеогликанов колеблется в широких пределах: так, низкомолекулярная форма гепарина имеет молекулярную массу 10 000 — 15 000, а протеогликан хряща — 4 000 000. Для них характерно образование крупных межмолекулярных агрегатов. Молекула протеогликана содержит от одной (как в низкомолекулярном гепарине) до нескольких десятков полисахаридных цепей, причем к полипептидному кору могут быть присоединены полисахаридные цепи как одного, так и разных типов. Например, молекула протеогликана хряща напоминает ершик для мытья бутылок: полисахаридные цепочки в нем представлены молекулами хондроитин- и кератансульфата (табл. 21).

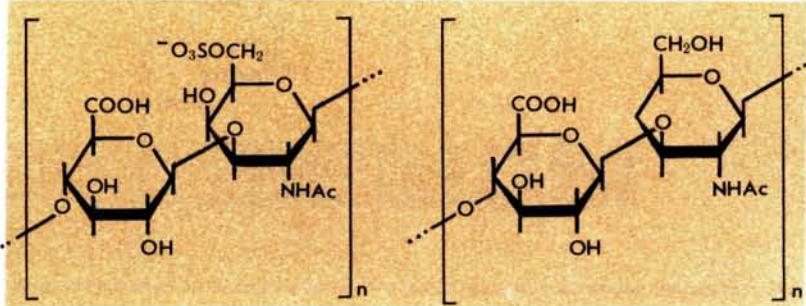
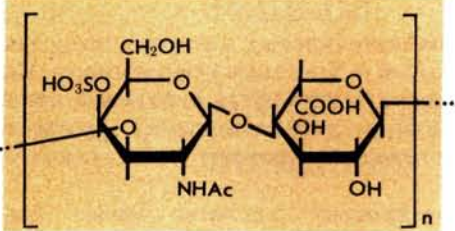
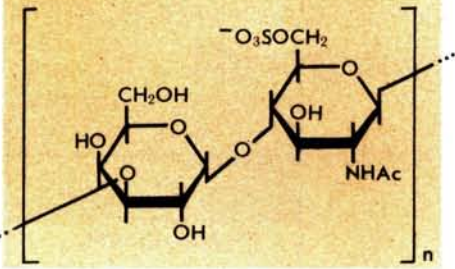
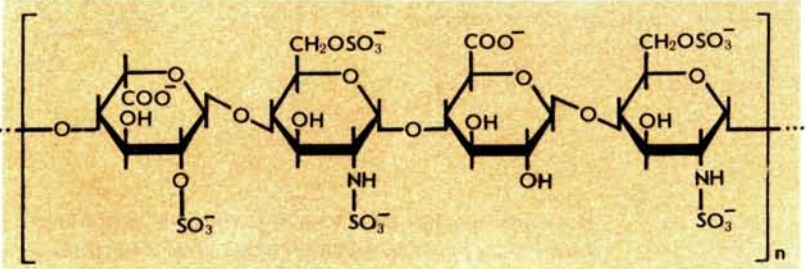
При установлении строения углеводных цепей протеогликанов используются методы, характерные для химии полисахаридов: после выделения индивидуальной полисахаридной цепи устанавливается структура повторяющегося звена и степень полимеризации. Для определения типа связи углевод — белок и структуры фрагмента, участвующего в образовании этой связи, как и при исследовании гликопротеинов, используется щелочной гидролиз в присутствии боргидрида натрия или деградация полипептидной цепи протеиназами.

Наиболее хорошо изучены протеогликианы соединительной ткани: гепарины, хондроитинсульфаты, дерматансульфат, кератансульфат. Эти соединения встречаются прежде всего в межклеточном пространстве соединительной ткани, однако их обнаруживают и внутри клеток. Так, гепарин находится во внутриклеточных гранулах тучных клеток, при получении клеткой определенного сигнала содержимое гранул выбрасывается в межклеточное пространство. Углеводная составляющая протеогликанов соединительной ткани представляет собой гликозаминогликан, построенный из повторяющихся блоков, чаще всего дисахаридных, в состав которых входят остатки уроновых кислот и аминсахаров (табл. 21).

Важная структурная особенность, существенно влияющая на свойства протеогликанов соединительной ткани, — наличие в полисахаридной цепи сульфатных групп, придающих молекуле характер полианиона. Локализуясь на внешней поверхности клеток и образуя таким образом дополнительную оболочку, эти биополимеры заметно влияют на транспорт ионов и белков в клетки.

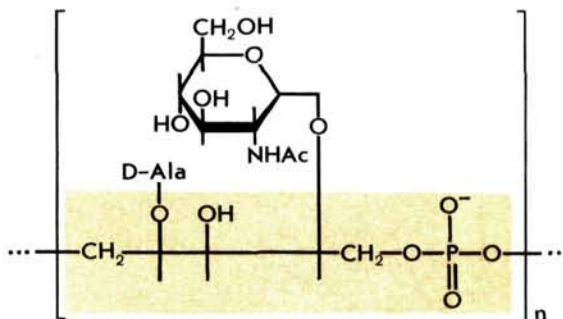
Помимо пептидогликана, основу клеточной стенки грамположительных бактерий составляют *теиховые кислоты*. Они представляют собой биополимеры с молекулярной массой около 2 000 000, построенные из остатков сахаров, D-аланина, многоатомных спиртов и фосфорной кислоты. В клеточной стенке грамотрицательных

Структура полисахаридных фрагментов протеогликанов соединительной ткани

Полисахарид протеогликана	Повторяющийся фрагмент	Число повторяющихся блоков
Хондроитин-сульфаты		10—100
Дерматансульфат		30—80
Кератансульфат		8—40
Гепарин		

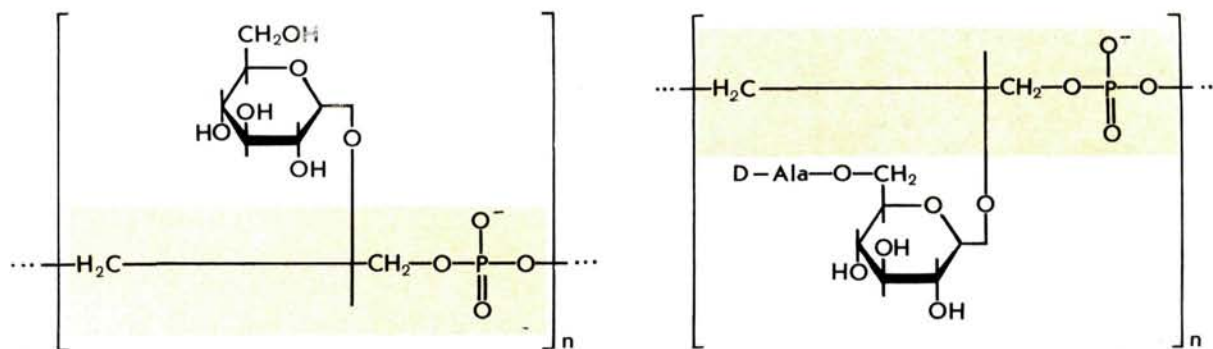
бактерий тейхоевые кислоты ковалентно связаны фосфодиэфирной связью с остатками муравовой кислоты протеогликана. Они являются антигенами, обладающими групповой и видовой специфичностью.

По типу многоатомного спирта различают рибит- и глицеринтейхоевые кислоты. Основа рибиттейхоевой кислоты — полирибит-1,5-дифосфатная цепь



Углеводы в рибиттейхоевых кислотах представлены α - и β -связанными D-глюкозой и N-ацетилглюкозаминном. Как правило, это моносахариды, однако встречаются тейхоевые кислоты с олигосахаридными (в основном дисахаридными) фрагментами, построенными только из остатков D-глюкозы или L-глюкозы и N-ацетилглюкозамина.

Глицеринтейхоевые кислоты имеют аналогичное строение



В одних из них заместителями при вторичных гидроксильных группах глицерина выступают остатки D-аланина, в других — чередующиеся остатки D-аланина, D-глюкозы или N-ацетилглюкозамина.

Клеточные стенки грамотрицательных бактерий тейхоевых кислот не содержат.

ЛИПИДЫ

Липиды

Общие принципы построения
липидных молекул

Отдельные классы липидов

Пространственная структура липидов

Химический синтез липидов



Шееле [Scheele] Карл Вильгельм (1742—1786), шведский химик, один из основателей современной химии. Образование получил самостоятельно, работал аптекарем в Гетеборге, Мальме, Стокгольме, Упсале. Впервые выделил и описал большое число органических соединений, в том числе щавелевую, мочевую, бензойную, лимонную и яблочную кислоты. Открыл фторид водорода (1768); получил в чистом виде хлор, марганец, сероводород, перманганат калия; в продуктах гидролиза оливкового масла обнаружил глицерин (1779).



Бертло [Berthelot] Пьер Эжен Марселен (1827—1907), французский химик, иностранный член Петербургской АН (1876). Окончил Парижский университет (1849). С 1895 г. — министр иностранных дел Франции. Основные направления научных исследований — органическая и аналитическая химия. Впервые синтезировал нафталин (1851), бензол, фенол, ряд жиров, этиловый спирт (1854), муравьиную кислоту (1862).

Липиды (от греческого слова «липос» — жир) — низкомолекулярные органические вещества, которые извлекаются из клеток животных, растений и микроорганизмов неполярными растворителями, такими, как хлороформ, эфир, бензол. Долгое время считалось, что липидам принадлежит довольно скромная роль в жизнедеятельности клеток — служить формой депонирования запасов метаболического топлива, принимать участие в некоторых защитных реакциях и т. п. Но в последние годы выявилось кардинальное значение липидов как активных компонентов биологических мембран.

Исторический очерк. С липидами в форме животных жиров и растительных масел человек имел дело с незапамятных времен. В Древнем Египте уже умели получать масло из коровьего молока, а в Ассирии масла выделяли путем обработки измельченных семян кипящей водой. Жиры издавна использовались народами многих стран не только в качестве продуктов питания, но и для освещения, приготовления лечебных и косметических средств. Основным источником жиров для жителей Средиземноморья служило оливковое масло, в странах Северной Европы более распространенными были льняное масло и молоко.

Техническая переработка жиров началась в XVIII в. прежде всего в связи с развитием мыловаренного производства. В течение последних столетий жиры все шире применялись для получения моющих средств, пищевых эмульгаторов, смазочных материалов, лакокрасочных покрытий и т. п. В частности, использование жиров для приготовления высыхающих масляных красок сыграло важную роль в истории живописи, позволив сохранить для грядущих поколений шедевры мирового искусства.

Первый элементный анализ жиров был выполнен А. Лавуазье, показавшим, что жиры и масла состоят в основном из углерода и водорода. Он полагал, что сахара и крахмал являются «окислами жиров», а в растениях углекислый газ соединяется с водой с образованием жиров и выделением кислорода. Первые работы по химии липидов были выполнены К. Шееле, который открыл глицерин и установил, что это вещество содержится в животных жирах и растительных маслах. М. Шеврёль в 1811 г. при кислотной обработке мыла, полученного из свиного жира, выделил кристаллическую жирную кислоту, а затем охарактеризовал большое число разнообразных жирных кислот — от масляной до стеариновой. В 1812 г. он открыл холестерин (в желчных камнях) и разделил все жиры на два класса — омыляемые и неомыляемые, доказав, что омыляемые жиры представляют собой сложные эфиры жирных кислот и глицерина. М. Шеврёль ввел в практику метод разделения жирных кислот на основе их различной растворимости в органических растворителях. Итоги этих исследований были опубликованы им в 1823 г. в книге под названием «Химическое изучение жировых тел».

Продолжая исследования М. Шеврёля, П. Бертло впервые осуществил синтез жира из глицерина и жирной кислоты (1854). Он показал, что холестерин является спиртом; необходимо отметить, что к этому периоду немецкий врач Ю. Фогель уже обнаружил холестерин в атероматозных бляшках артерий человека. Синтетические жиры были получены в скором времени и Ш. Вюрцем (1859) путем нагревания трибромпропана с серебряными солями жирных кислот.

Примерно в этот же период были получены из природных источников первые фосфолипиды и гликолипиды. Вначале М. Гобли (1847), а затем Ф. А. Хоппе-Зайлер (1877) выделили из желтка куриных яиц и мозга липид, который был назван лецитином (от греческого «лекитос» — яичный желток). В 1884 г. английский врач

Дж. Тудикум в своей книге «Руководство по химическому составу мозга» развивает представления об универсальном биологическом значении фосфолипидов. В частности, он писал, что «фосфатиды составляют химическую душу любой биоплазмы, животной или растительной. Они способны выполнять разнообразнейшие функции в результате того, что объединяют в себе сильно контрастирующие свойства. Среди их физических свойств наиболее достойна дальнейших исследований способность к образованию коллоидов. Без этой способности мозг не мог бы существовать, да и всякая биоплазма зависит от коллоидного состояния». Из мозга Дж. Тудикум выделил липидную фракцию, содержащую азот и фосфор, которую он назвал кефалином, и обнаружил в продуктах его гидролиза этаноламин. Им же впервые описаны два сфинголипида — сфингомиелин и цереброзид.

В дальнейшем химия липидов развивалась медленно, что было связано с трудностями выделения и очистки индивидуальных липидов; не случайно наука о липидах получила в это время название *Schmierchemie* («грязная химия»). Лишь начиная с 50-х годов нашего века, после появления методов хроматографии, липидная химия сумела перейти к идентификации и выяснению строения многочисленных липидных веществ. В частности, в 1960—1964 гг. в лабораториях Р. Куна и Э. Кленка была полностью установлена структура четырех основных ганглиозидов мозга G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b} (открыты ганглиозиды были еще в конце 30-х годов Э. Кленком при изучении мозга больных сфинголипидозами). Новейший период химии липидов связан с исследованием биологических мембран.



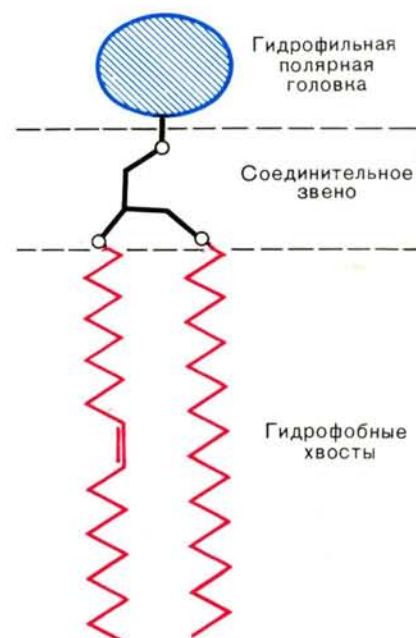
Шеврёль [Chevreul] Мишель Эжен (1786—1889), французский химик-органик, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1865). Окончил Коллеж де Франс (1806), с 1830 г. — профессор Музея естественной истории. Основные работы посвящены химии жиров. Выделил стеариновую, пальмитиновую и олеиновую кислоты, а также холестерин. Обнаружил в жирах глицерин (1813), открытый ранее К. Шееле.

Общие принципы построения липидных молекул

По химическому строению липиды весьма разнообразны. В их состав могут входить спирты, жирные кислоты, азотистые основания, фосфорная кислота, углеводы и т. п.; нередко к классу липидов относят терпены, стерины и т. п.

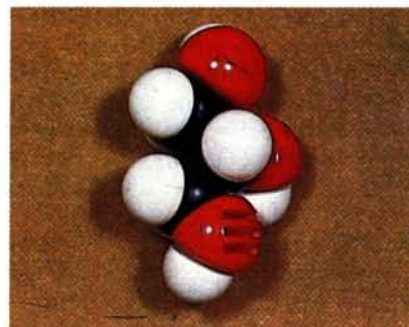
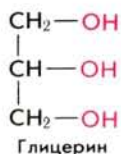
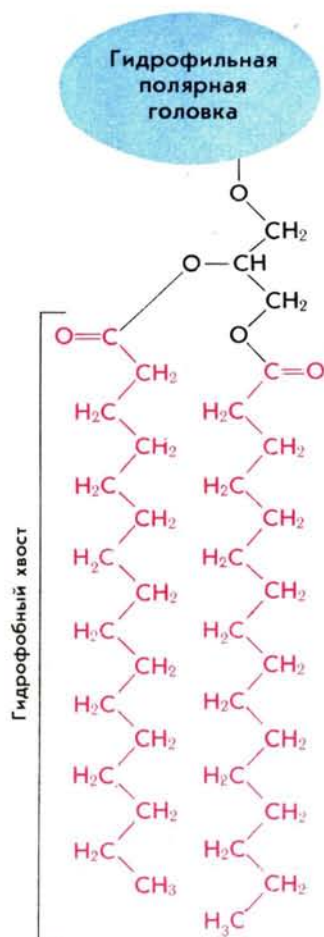
Однако, несмотря на это структурное многообразие, липиды биологических мембран построены по единому принципу. В состав липидных молекул входят, с одной стороны, длинные углеводородные остатки, отличающиеся низким сродством к воде, т. е. гидрофобные (липофильные) радикалы, а с другой — более компактные гидрофильные группы, получившие название полярных головок. Подобные амфифильные (обладающие двойным сродством) молекулы проявляют значительную тенденцию к агрегации. При этом липофильные участки молекул, стремясь попасть в гидрофобную фазу, образуют сплошные неполярные области, а полярные группы формируют границу раздела между гидрофобной фазой и водой. Структура образующихся липидных агрегатов сильно зависит от природы входящих в их состав компонентов.

В качестве определяющего признака для первичной классификации липидов часто используется природа связующего звена, соединяющего между собой гидрофильный и гидрофобный участки



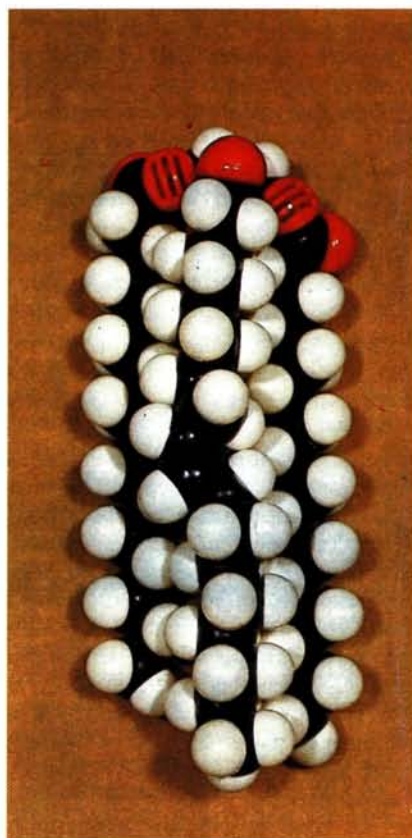
молекулы. Таким звеном обычно являются многоатомные алифатические спирты, содержащие две или три гидроксильные группы.

Липиды, построенные на основе глицерина. Более половины липидов, встречающихся в природе, относятся к классу глицеролипидов, или глицеридов, все они являются производными трехатомного спирта — глицерина (1,2,3-пропантриола)

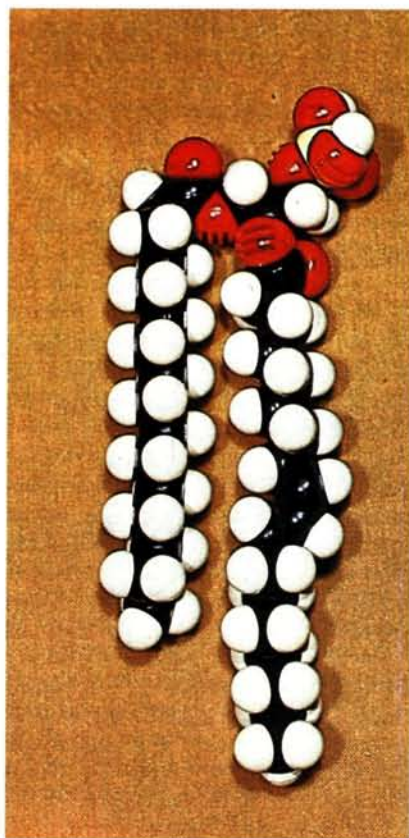


В глицеролипидах гидрофобную часть молекулы образуют высшие жирные кислоты, соединенные сложными эфирами с двумя гидроксильными группами глицерина. В полярных глицеролипидах третья гидроксильная группа связана с гидрофильной головкой (рис. 261, 262).

Рис. 261. Общая структура полярных липидов на основе глицерина.



Триацилглицерин



Фосфатидовая кислота

Рис. 262. Структуры некоторых глицеролипидов.

Положения при первом и третьем атомах углерода в замещенных глицеринах неидентичны, поскольку при введении даже одного заместителя в группу $-\text{CH}_2\text{OH}$ центральный атом углерода становится асимметрическим, а вся молекула приобретает хиральность (рис. 263). Конфигурация заместителей при асимметрическом атоме (D или L, R или S) определяется на основании принадлеж-

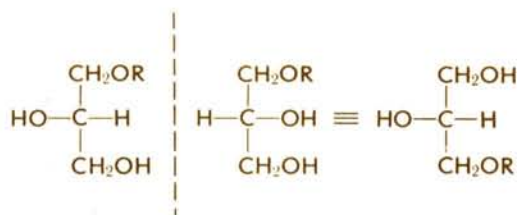


Рис. 263. Энантиомерные формы монозамещенных глицеринов.

ности к ряду глицеринового альдегида. Положения заместителей в молекуле глицерина при первом, втором или третьем атоме углерода различаются согласно системе стереоспецифической нумерации (stereospecific numbering, обозначается символом *sn*): если в фише-ровской проекции гидроксильная группа при атоме C-2 расположена слева, то углеродному атому, находящемуся над атомом C-2, присваивается номер 1, а нижнему атому — номер 3 (рис. 264).

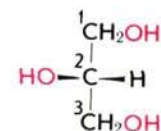
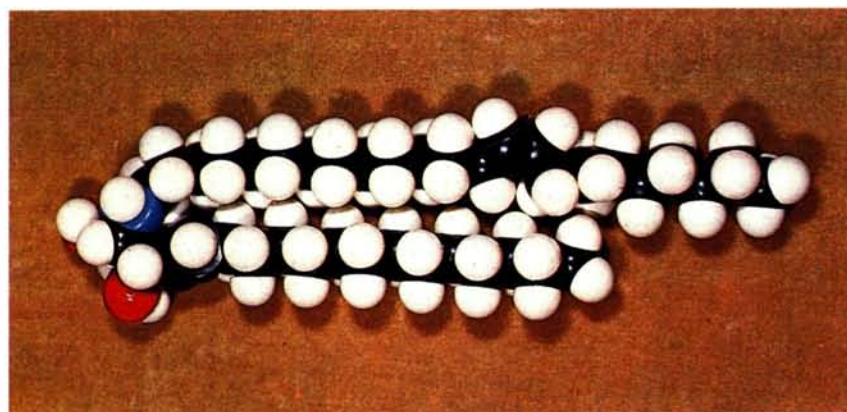
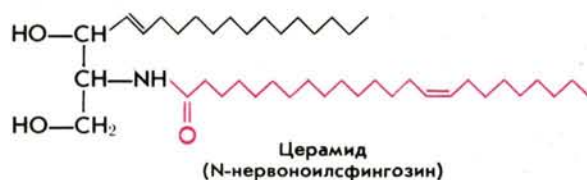


Рис. 264. Стереоспецифическая нумерация атомов углерода в производных глицерина.

Наряду с глицеролипидами в клетках обнаружены также так называемые диольные липиды, в которых роль спиртового компонента выполняют этиленгликоль, пропандиолы-1,2 и -1,3, бутандиолы и т. п. (Л. Д. Бергельсон).

Липиды, построенные на основе сфингозина. Другая группа широко распространенных липидов мембранного происхождения



У млекопитающих и ряда бактерий пальмитиновая и стеариновая кислоты служат предшественниками двух широко распространенных моноеновых (мононенасыщенных) жирных кислот — пальмитолеиновой и олеиновой. Практически все природные моноеновые кислоты являются *цис*-изомерами.



В жирах млекопитающих и в липидах растений содержатся заметные количества полиеновых жирных кислот. Все природные полиеновые кислоты являются несопряженными: *цис*-двойные связи

Т а б л и ц а 22.

Наиболее распространенные природные жирные кислоты

Кодовое обозначение*	Структура	Систематическое название	Тривиальное название
Н а с ы щ е н н ы е			
C _{12:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	н-Додекановая	Лауриновая
C _{14:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	н-Тетрадекановая	Миристиновая
C _{16:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	н-Гексадекановая	Пальмитиновая
C _{18:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	н-Октадекановая	Стеариновая
C _{20:0}	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	н-Эйкозановая	Арахидиновая
C _{22:0}	CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COOH	н-Докозановая	Бегеновая
C _{24:0}	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	н-Тетракозановая	Лигноцериновая
М о н о е н о в ы е			
C _{14:1}	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	<i>цис</i> -Тетрадецен-9-овая	Миристолеиновая
C _{16:1}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	<i>цис</i> -Гексадецен-9-овая	Пальмитолеиновая
C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	<i>цис</i> -Октадецен-9-овая	Олеиновая
C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	<i>цис</i> -Октадецен-11-овая	Вакценовая
C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₉ COOH	<i>транс</i> -Октадецен-11-овая	<i>транс</i> -Вакценовая
C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH=CH(CH ₂) ₄ COOH	<i>цис</i> -Октадецен-6-овая	Петроселиновая
C _{22:1}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₁₁ COOH	<i>цис</i> -Докозен-13-овая	Эруковая
П о л и е н о в ы е			
C _{18:2}	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COOH	<i>цис, цис</i> -Октадекадиен-9, 12-овая	Линолевая
C _{18:3}	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COOH	<i>цис, цис, цис</i> -Октадекатриен-9, 12, 15-овая	Линоленовая
C _{20:3}	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₅ COOH	<i>цис, цис, цис</i> -Эйкозатриен-8, 11, 14-овая	Дигомо-γ-линоленовая
C _{20:4}	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COOH	<i>цис, цис, цис, цис</i> -Эйкозатетраен-5, 8, 11, 14-овая	Арахидоновая

*Цифры обозначают число атомов углерода и двойных связей в цепи.

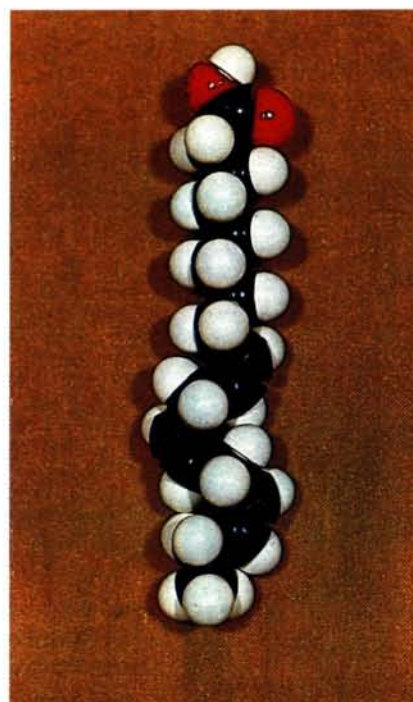
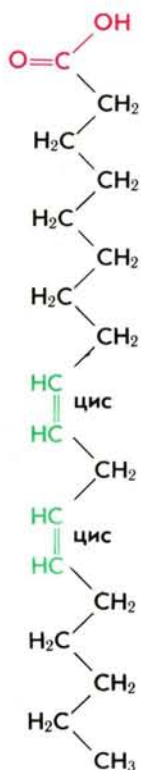
в их углеводородных цепях разделены, как правило, одной метиленовой группой. В результате в молекулах кислот образуются одна или несколько повторяющихся группировок $-\text{CH}=\text{CH}-$ $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, поэтому они называются кислотами дивинилметанового ряда. Все они могут быть изображены общей формулой



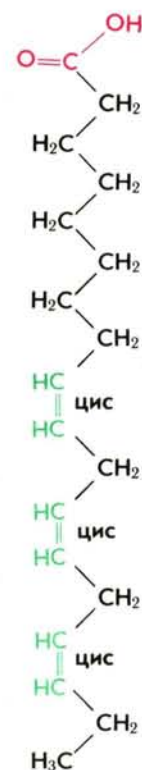
Рис. 266. Полиеновые жирные кислоты.



Линолевая
(цис, цис-октадекадиен-9, 12-овая)
кислота



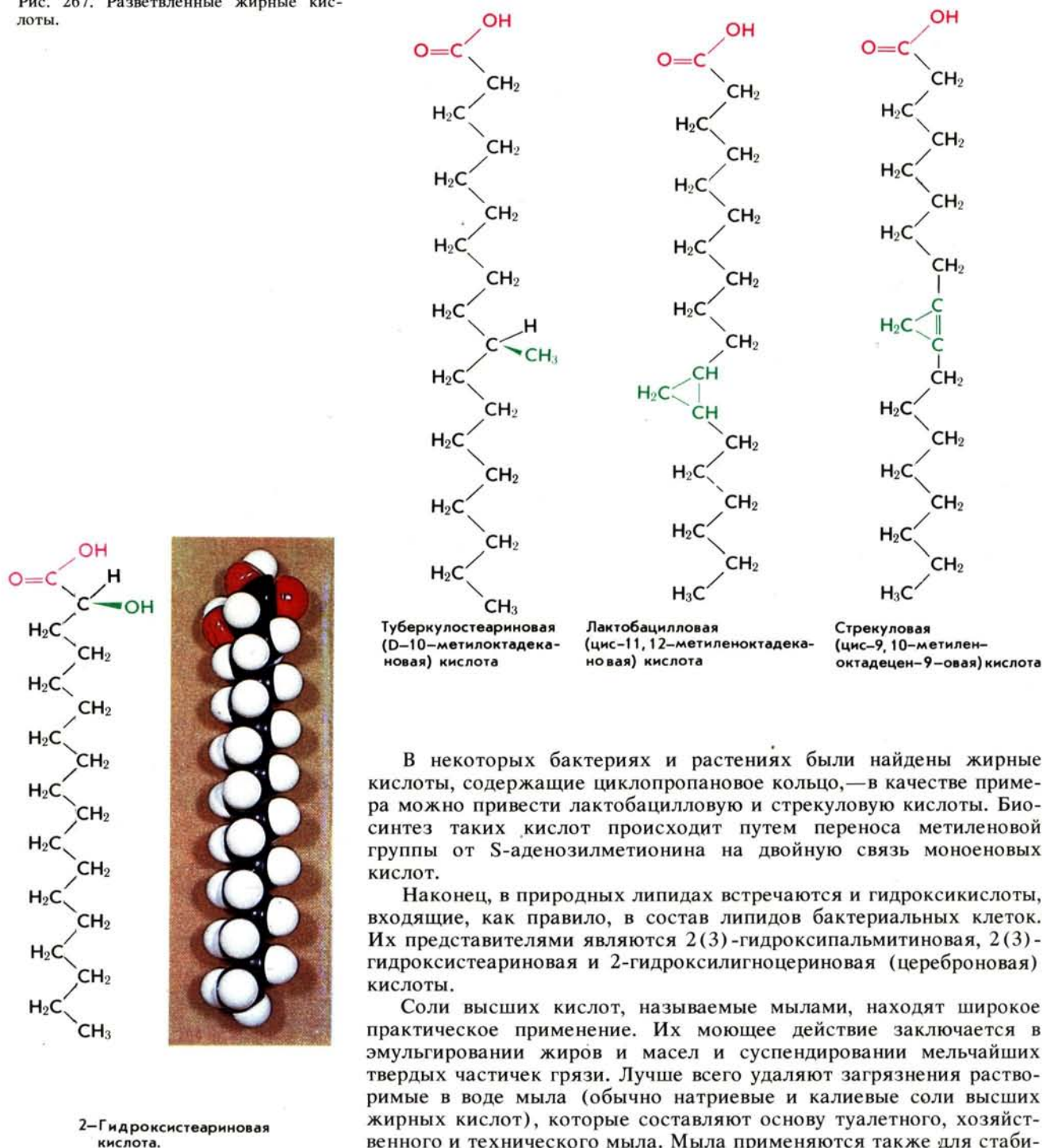
Линоленовая
(цис, цис, цис-октадекатриен-9, 12, 15-овая)
кислота



Линолевая и линоленовая кислоты (рис. 266) не синтезируются в организме высших животных и человека, а поступают с пищей. В связи с тем, что эти кислоты необходимы для нормального жирового обмена, их часто называют незаменимыми жирными кислотами. Арахидоновая и дигомо- γ -линоленовая кислоты являются предшественниками в биосинтезе простагландинов и лейкотриенов.

Наряду с насыщенными и ненасыщенными кислотами с прямой цепью углеродных атомов в природе встречаются жирные кислоты с разветвленной цепью. В частности, к ним относится наиболее широко распространенная природная туберкулостеариновая кислота, впервые выделенная из туберкулезной палочки (рис. 267).

Рис. 267. Разветвленные жирные кислоты.



В некоторых бактериях и растениях были найдены жирные кислоты, содержащие циклопропановое кольцо,—в качестве примера можно привести лактобацилловую и стрекуловую кислоты. Биосинтез таких кислот происходит путем переноса метиленовой группы от S-аденозилметионина на двойную связь моноеновых кислот.

Наконец, в природных липидах встречаются и гидроксикислоты, входящие, как правило, в состав липидов бактериальных клеток. Их представителями являются 2(3)-гидроксипальмитиновая, 2(3)-гидроксистеариновая и 2-гидроксилигноцерина (цереброновая) кислоты.

Соли высших кислот, называемые мылами, находят широкое практическое применение. Их моющее действие заключается в эмульгировании жиров и масел и суспендировании мельчайших твердых частичек грязи. Лучше всего удаляют загрязнения растворимые в воде мыла (обычно натриевые и калиевые соли высших жирных кислот), которые составляют основу туалетного, хозяйственного и технического мыла. Мыла применяются также для стаби-

лизации эмульсий, синтетических латексов, пен, в качестве присадок, структурирующих добавок и т. п.

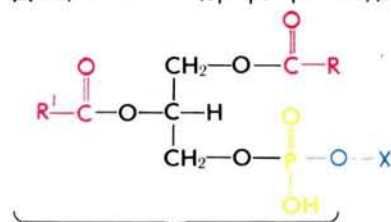
Фосфолипиды. Фосфолипиды являются главными компонентами биологических мембран. По своему строению они представляют собой эфиры фосфорной кислоты и двух многоатомных спиртов — глицерина и сфингозина.

В глицерофосфолипидах (или фосфоглицеридах) остаток фосфорной кислоты замещает одну из первичных гидроксильных групп глицерина. Общим структурным фрагментом всех фосфоглицеридов является глицерофосфат, содержащий один асимметрический атом углерода. Поэтому он может быть D-глицеро-1-фосфатом или L-глицеро-3-фосфатом. Изомер глицерофосфорной кислоты, присутствующий в природных фосфоглицеридах, относится к L-ряду и называется *sn*-глицеро-3-фосфорной кислотой.

Две оставшиеся гидроксильные группы в глицерофосфате обычно замещены углеводородными радикалами, связанными с глицерином сложноэфирной или простой эфирной связью

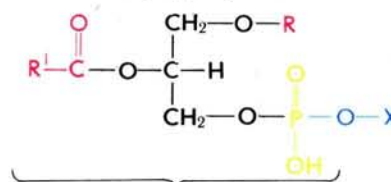


Диацильные глицерофосфолипиды



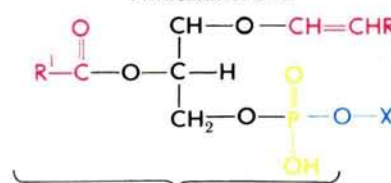
Фосфатидил-

Алкилацильные
глицерофосфолипиды



Плазманил-

Плазмалогены



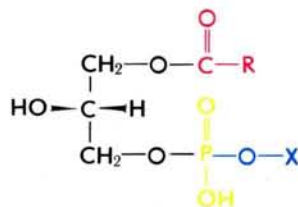
Плазменил-

R и R¹ — углеводородные радикалы
X = H, остатки холина, этаноламина,
серина, инозита и др.

Наиболее распространены в природе диацильные формы глицерофосфолипидов (R—остатки жирных кислот). Они являются обязательными компонентами большинства мембран животных, растительных и бактериальных клеток. Фосфолипиды алкильного типа (R—остатки высших спиртов) обнаружены также в составе разнообразных органов и тканей животных организмов, в том числе в различных видах моллюсков, морской улитке, осьминоге и т. д. Относительно высокое содержание алкоксифосфолипидов характерно для ряда опухолей. Глицерофосфолипиды, имеющие алкен-1-ильноэфирную группировку и являющиеся производными высших жирных альдегидов, часто называемые плазмалогенами (рис. 268), обнаружены в тканях и органах всех животных, независимо от уровня их организации. В достаточно высокой концентрации плазмалогены присутствуют также в организме человека, где они составляют около 22% от общего количества фосфолипидов. Особенно велико содержание плазмалогенов в нервной ткани, головном мозге (белое вещество, мозговая оболочка), сердечной мышце, надпочечниках и сперме. В меньшей степени плазмалогены представлены в микроорганизмах и растениях.

Рис. 268. Родовые термины для обозначения замещенных различным образом глицерофосфолипидов.

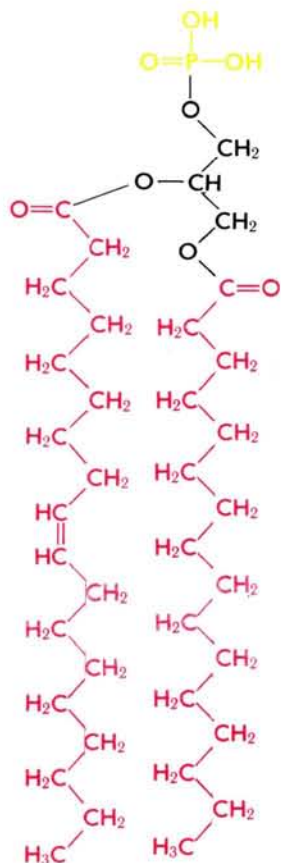
Помимо фосфолипидов с двумя углеводородными цепями, во многих природных объектах в небольших количествах содержатся также производные глицерофосфата, имеющие всего лишь один гидрофобный остаток. Они образуются в клетке под действием эндогенных фосфолипаз A_1 и A_2 и носят общее название лизофосфолипиды



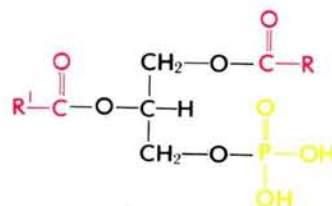
2-Лизофосфолипиды

X=H, остатки холина, этаноламина, серина, инозита и др.

Простейший представитель глицерофосфолипидов — фосфатидовая кислота, в которой фосфатная группа этерифицирована только остатком глицерина



Фосфатидовая кислота
(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицерофосфорная кислота)

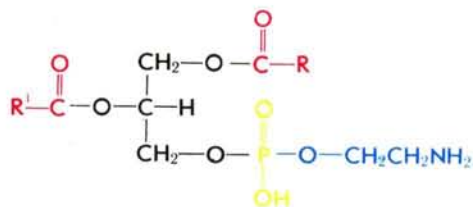


Фосфатидовая кислота
(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфорная кислота)

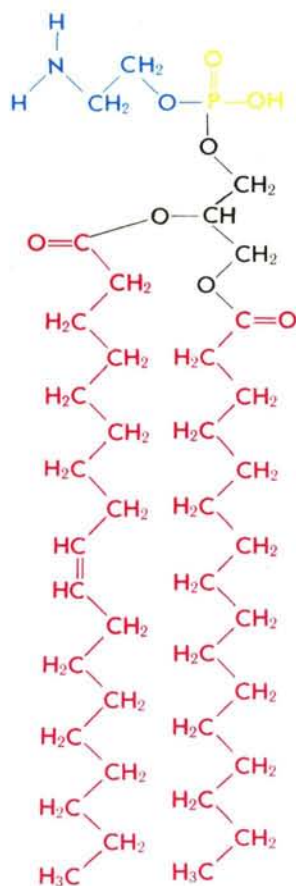
Фосфатидовая кислота найдена во многих природных источниках — тканях животных, растениях и микроорганизмах. Хотя ее содержание, как правило, невелико (1—5% от общего количества фосфолипидов), она играет существенную роль как предшественник биосинтеза других фосфолипидов. В то же время фосфатидовая кислота служит исходным веществом для химического синтеза фосфолипидов; для ее получения используется расщепление природных фосфолипидов фосфолипазой D (из капусты).

Один из важнейших представителей глицерофосфолипидов — фосфатидилхолин. Он широко распространен в тканях высших животных и растений, где его содержание достигает 50% от суммы фосфолипидов. Интересно, что в бактериальных клетках фосфатидилхолин не содержится

К важнейшим фосфолипидным компонентам клеточных мембран относится также *фосфатидилэтаноламин*



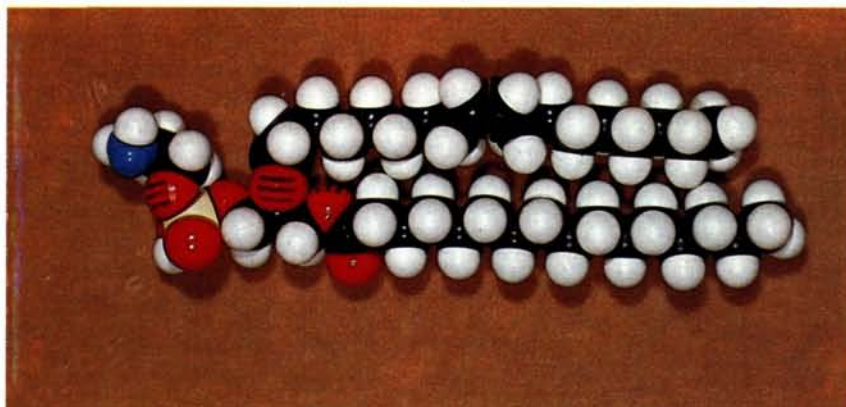
Фосфатидилэтаноламин
(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфоэтаноламин)



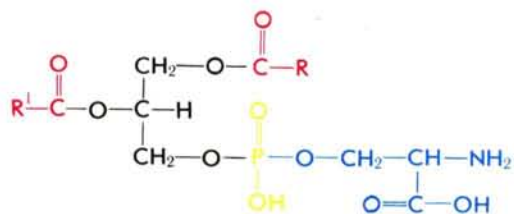
Фосфатидилэтаноламин
(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицерофосфоэтаноламин)

Он содержится в тканях животных и растений в несколько меньших количествах, чем фосфатидилхолин (15—30% от общего количества фосфолипидов), но является одним из основных компонентов многих бактериальных клеток. В состав фосфатидилэтаноламина животного происхождения обычно входят жирные кислоты той же длины, что и в фосфатидилхолине.

Бактериальный фосфатидилэтаноламин характеризуется высоким содержанием насыщенных и разветвленных жирных кислот и поэтому более устойчив. 1-Алкильные и 1-алкенильные формы фосфатидилэтаноламина также широко распространены в природе и содержатся, например, в головном и костном мозге, сердечной мышце, тканях моллюсков и других морских организмов, а также в некоторых простейших.



Среди природных фосфолипидов, содержащих в качестве структурного компонента аминокислоты, наиболее распространенным является фосфатидилсерин

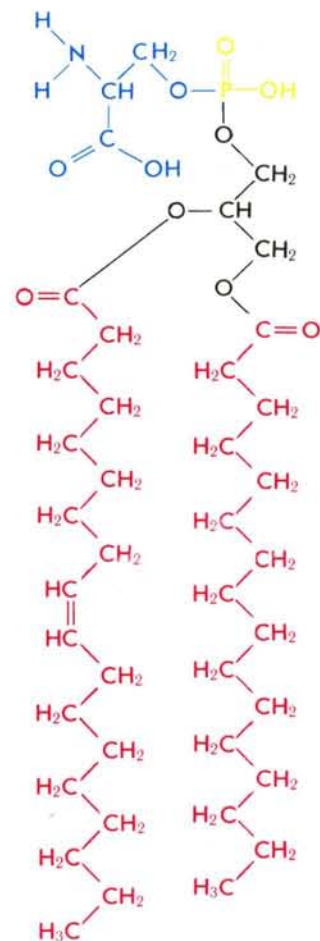


Фосфатидилсерин
(1,2-диацил-*sn*-глицерофосфо-L-серин)

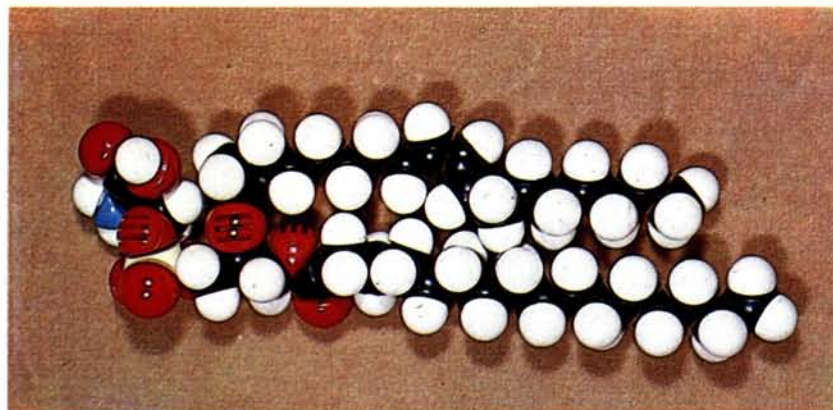
Наличие двух кислотных и одной основной групп в молекуле фосфатидилсерина придает ему кислые свойства.

Хотя фосфатидилсерин входит в состав мембран практически всех прокариотических и эукариотических клеток, однако, как правило, он является минорным мембранным компонентом. Больше всего фосфатидилсерина в мозге млекопитающих (около 15% от общего количества фосфолипидов), в тканях других органов, таких как сердце, печень, почки, селезенка и легкие, содержание его составляет менее 10%.

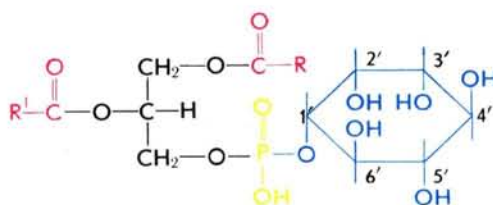
Фосфатидилсерин играет важную роль в жизнедеятельности клеток, являясь регулятором активности целого ряда мембраносвязанных ферментов. Во многих клетках фосфатидилсерин может выступать в качестве предшественника при биосинтезе фосфатидилэтаноламина, превращаясь в последний под действием мембранного фермента — фосфатидилсериндекарбоксилазы.



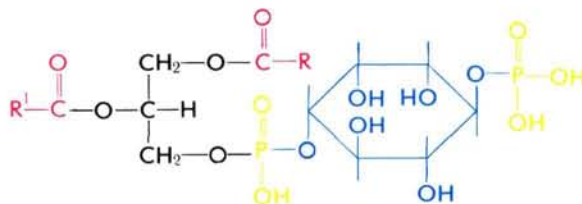
СЕРИН
Фосфатидилсерин
(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-
3-фосфо-4'-миоинозит)
L-серин



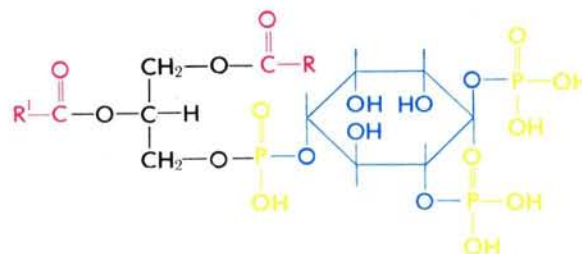
Важной группой кислых глицерофосфолипидов являются фосфоинозитиды: фосфатидилинозит, фосфатидилинозитфосфат и фосфатидилинозитдифосфат



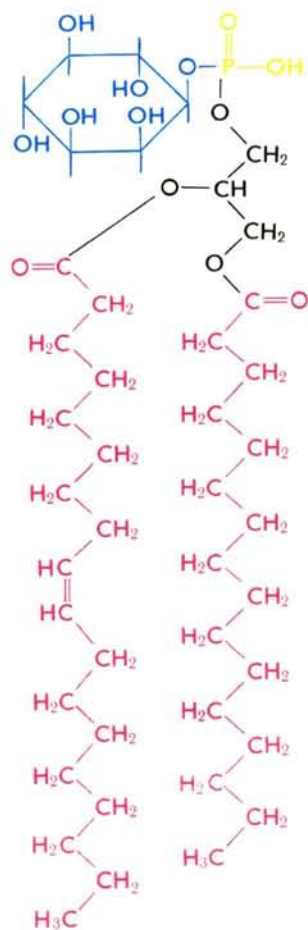
Фосфатидилинозит
(3-*sn*-фосфатидил-*sn*-1'-миоинозит)



Фосфатидилинозитфосфат
(3-*sn*-фосфатидил-*sn*-1'-миоинозит-4'-фосфат)

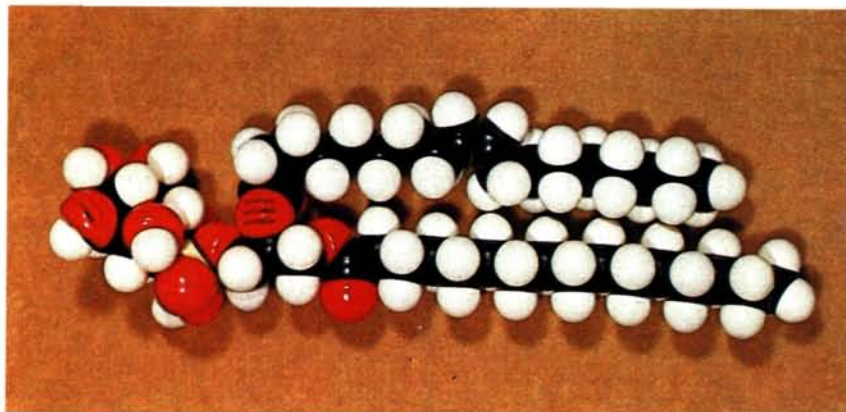


Фосфатидилинозитдифосфат
(3-*sn*-фосфатидил-*sn*-1'-миоинозит-4',5'-дифосфат)



инозит
Фосфатидилэтерин
(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицерофосфо-*L*-этерин)

1' миоинозит



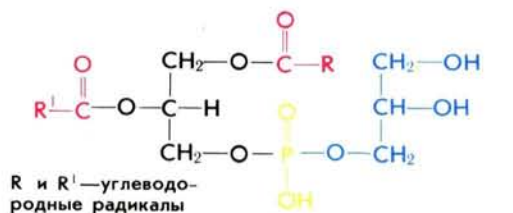
Все фосфоинозитиды содержат в составе полярной группы один и тот же циклитол — миоинозит, гидроксигруппа которого при атоме C-1 соединена с остатком фосфатидовой кислоты. Фосфо-

рирование фосфатидинозита протекает по гидроксильным группам при атомах С-4 и С-5 миоинозита и приводит к 4'-монофосфату и 4',5'-дифосфату.

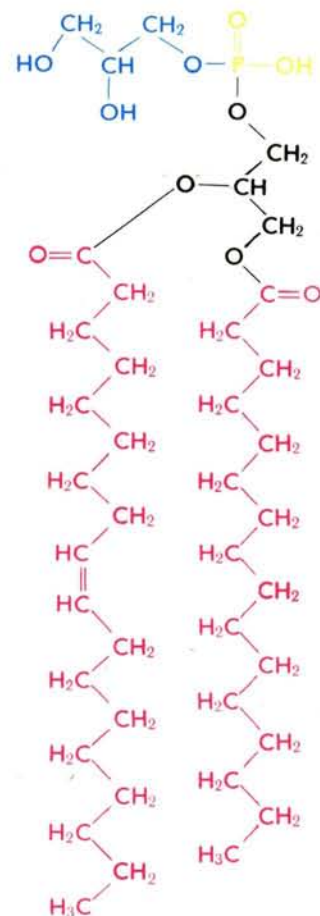
Фосфатидинозит присутствует почти во всех животных тканях (5—10% липидного фосфора), многих растительных тканях и в ряде микроорганизмов. Больше всего полифосфоинозитидов содержится в нервных тканях. В мозге млекопитающих они составляют около половины фракции инозитсодержащих фосфолипидов. Богаты полифосфоинозитидами синапсомы и миелиновая оболочка нервных клеток.

Фосфатидилглицерин представляет собой производное фосфатидовой кислоты, у которого в состав полярной группы входит еще один остаток глицерина.

Характерно, что глицерофосфатный остаток, несущий жирные кислоты, имеет обычную для фосфолипидов L-конфигурацию, тогда как у неацелированного остатка глицерина конфигурация противоположная

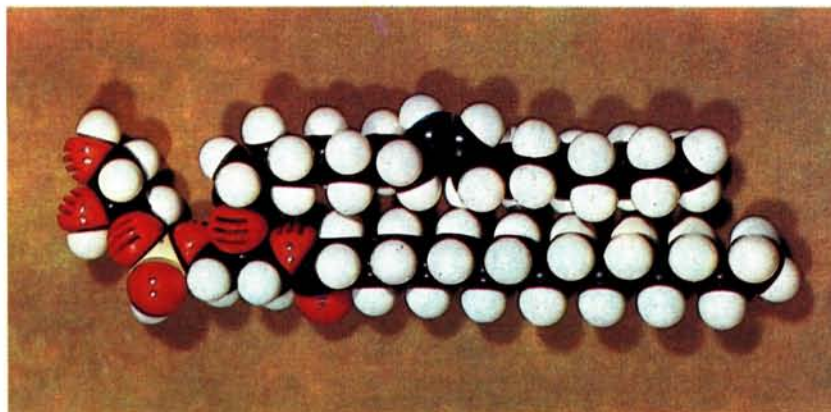


Фосфатидилглицерин
(1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*sn*-глицерин)

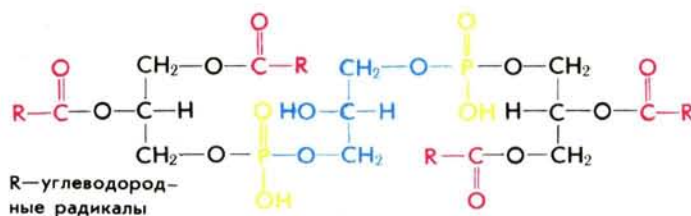


Фосфатидилглицерин
(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-1'-*sn*-глицерин)

Фосфатидилглицерин — один из наиболее распространенных фосфолипидов бактерий (70% от общего количества фосфолипидов). Много фосфатидилглицерина (20—30%) содержится также в растениях (40—60% в хлоропластах), в животных тканях он присутствует в минорных количествах (преимущественно в митохондриях).

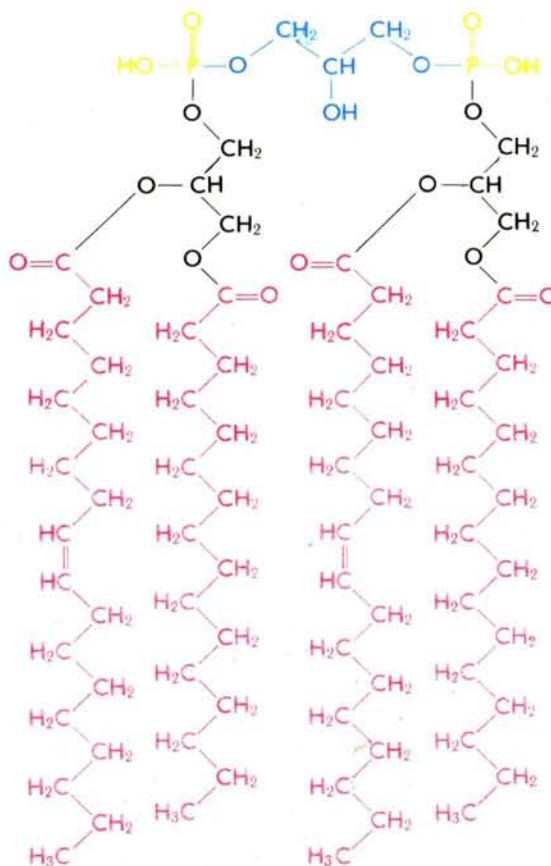
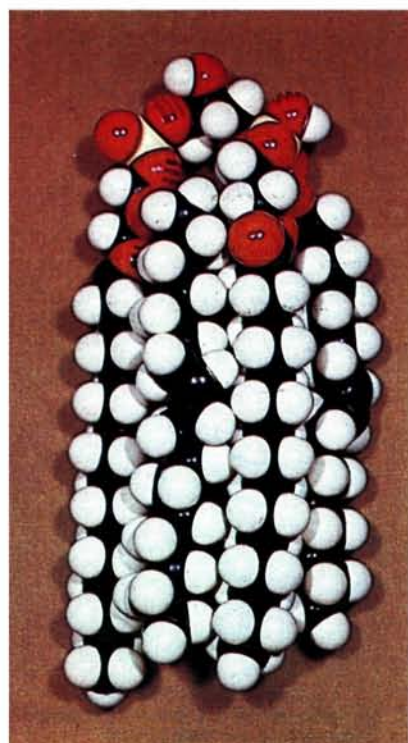


Дифосфатидилглицерин, называемый также кардиолипином, имеет в своем составе три остатка глицерина, четыре остатка жирных кислот и две фосфатные группы



Дифосфатидилглицерин
[бис-(1, 2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-1', 3'-глицерин]

В значительных количествах он содержится в большинстве животных тканей (преимущественно в митохондриях). Наибольшее содержание дифосфатидилглицерина (около 10% от суммы фосфолипидов) найдено в сердечной мышце млекопитающих. Кардиолипин также распространен в растениях и некоторых бактериях



Дифосфатидилглицерин
[бис-(1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо)-1', 3'-глицерин]

Один из основных классов фосфолипидов представлен в биологических мембранах фосфорсодержащими сфинголипидами, являющимися производными церамида, у которого водород первичной гидроксильной группы замещен остатком фосфорной кислоты.

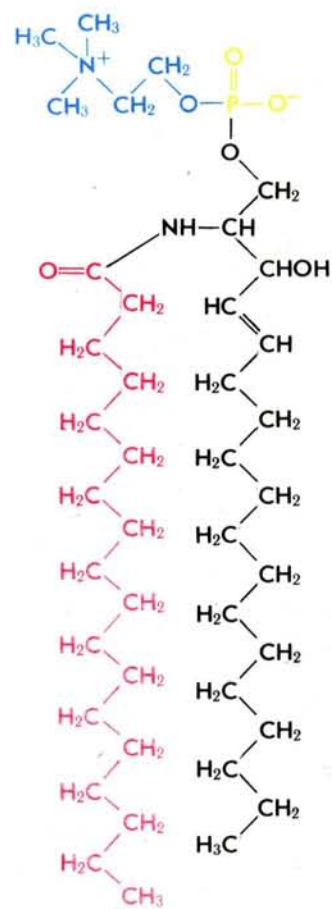
Гидрофобная часть фосфорсодержащих сфинголипидов состоит из длинной алифатической цепи аминокспирта сфингозина (и его аналогов), а также остатка жирной кислоты, соединенного со сфингозиновым основанием амидной связью. Наиболее широко распространенным представителем этой группы фосфолипидов является сфингомиелин, в состав полярной группы которого входит холин



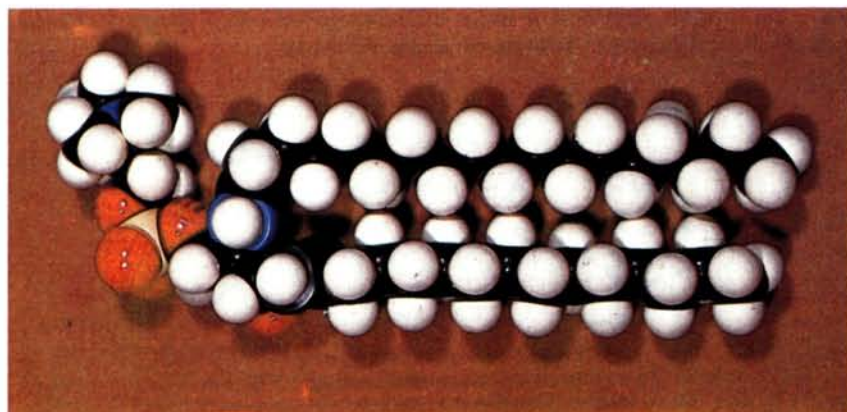
Как и фосфатидилхолин, сфингомиелин существует обычно в виде цвиттер-иона.

Он содержит преимущественно насыщенные и моноеновые кислоты, имеющие 18—24 атомов углерода. В состав жирных кислот входит значительное количество лигноцериновой (24:0) и нервоновой (24:1) кислот. Главным основанием сфингомиелинов является C₁₈-сфингозин, реже встречаются дигидросфингозин и сфингозины, содержащие иное число атомов углерода.

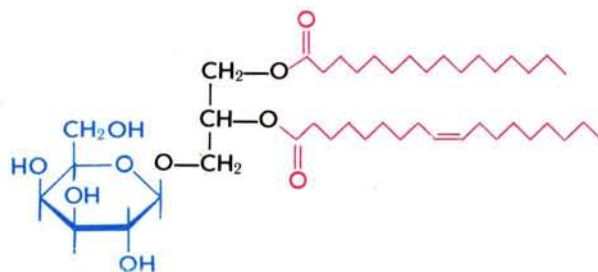
Сфингомиелин встречается прежде всего в животных тканях: в значительных количествах в миелине, эритроцитах и почках, в других тканях — в меньших количествах (4—10% от общего количества фосфолипидов). В клетке сфингомиелин локализован преимущественно в плазматической мембране. Некоторые патологические состояния организма связаны с изменением содержания сфингомиелина. Так, увеличение содержания сфингомиелина в стенках аорты отмечено при атеросклерозе.



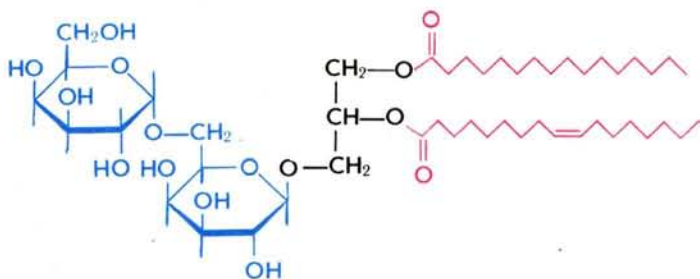
Сфингомиелин
(N-стеароил-4-сфингенил-1-фосфохолин)



Гликолипиды. Этот термин относится к обширной и разнообразной группе липидов, у которых гидрофильная полярная головка состоящая из одного или нескольких углеводных остатков, соединена гликозидной связью с гидрофобной частью липидной молекулы. В качестве основных углеводных компонентов в составе гликолипидов чаще всего встречаются глюкоза и галактоза, их сульфатированные производные (обычно галактозилсульфат), аминоксахара (галактозамин и глюкозамин и их N-ацетильные производные) и сиаловые кислоты (N-ацетилнейраминовые кислоты).



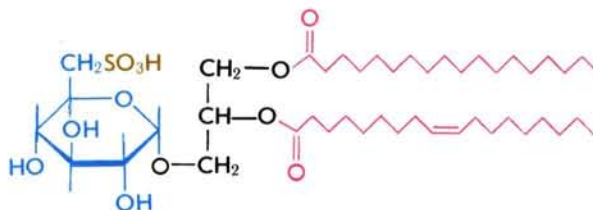
Моногалактозилдиацилглицерин
[3-О-β-D-галактопиранозил-1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин]



Дигалактозилдиацилглицерин
[3-О-α-D-галактопиранозил-(1'→6')-О-β-D-галактопиранозил-1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерин]

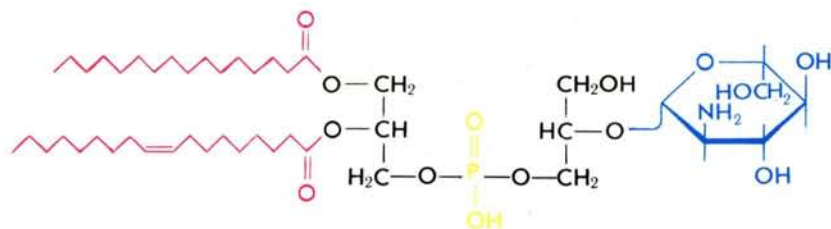


Глицерогликолипиды представлены в природе главным образом гликозилдиацилглицеринами (гликозилдиглицеридами), у которых моно-, ди- и трисахариды связаны гликозидной связью с гидроксильной группой диацилглицеринов. Моногалактозилдиацилглицерин, дигалактозилдиацилглицерин и сульфохиновозилдиацилглицерин с полярной группой в виде сульфатированного дезоксисахара являются основными липидами хлоропластов



Сульфохиновозилдиацилглицерин
[6-сульфо-α-D-хиновопиранозил-(1'→3')-1'-стеароил-2'-олеоил-sn-глицерин]

Среди гликоглицеролипидов обнаружена также небольшая группа фосфорсодержащих гликолипидов, найденных в основном в бактериальных клетках. В качестве примера можно привести фосфатидилглюкозаминилглицерин, содержащийся в клетках *Bacillus megaterium*

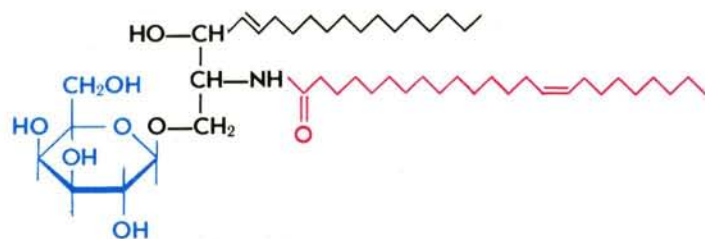


Фосфатидилглюкозаминилглицерин
[3-*sn*-фосфатидил-1'-(2'-D-глюкозаминил)-*sn*-глицерин]

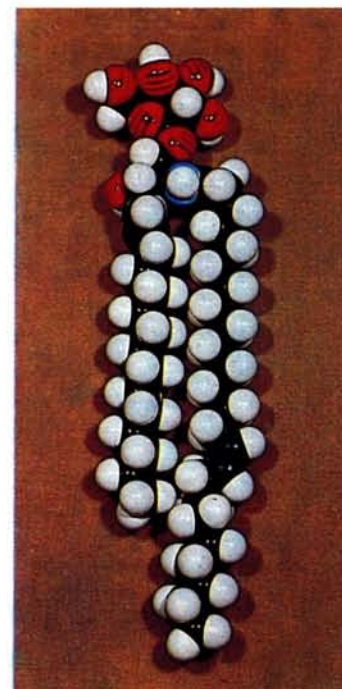
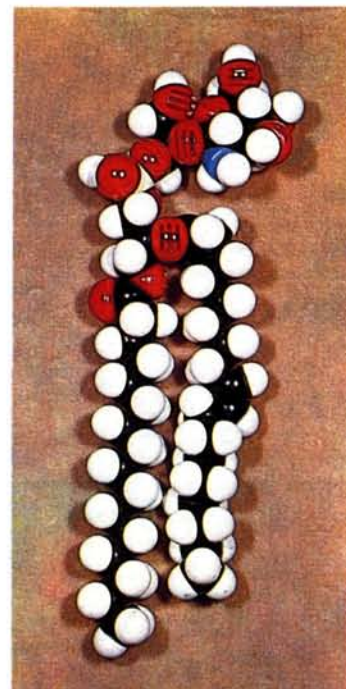
В гликофинголипидах углеводсодержащая гидрофильная полярная головка соединена гликозидной связью с концевой гидроксиметиленовой группой церамида и образующиеся соединения могут рассматриваться как гликозилцерамиды. Такие липиды встречаются в мозге, селезенке, эритроцитах, почках и печени, где они локализируются преимущественно в плазматических мембранах. Гликозильный фрагмент может быть представлен одним моносахаридным остатком (галактозы или глюкозы) или сложной олигосахаридной цепью, содержащей D-галактозу, D-глюкозу, D-галактозамин, D-глюкозамин, L-фукозу (6-дезоксид-L-галактозу) и сиаловую кислоту.

Простейшим типом гликофинголипидов являются моногексозилцерамиды, часто называемые *цереброзидами*. Наиболее распространенные представители этого класса липидов — галакто- и глюкоцереброзиды.

Цереброзиды содержатся в тканях животных, растений и в микроорганизмах. Одним из основных гликолипидов мозга является галактоцереброзид.



Галактоцереброзид (нервон)
(1-β-D-галактопиранозил-N-нервоноилсфингозин)

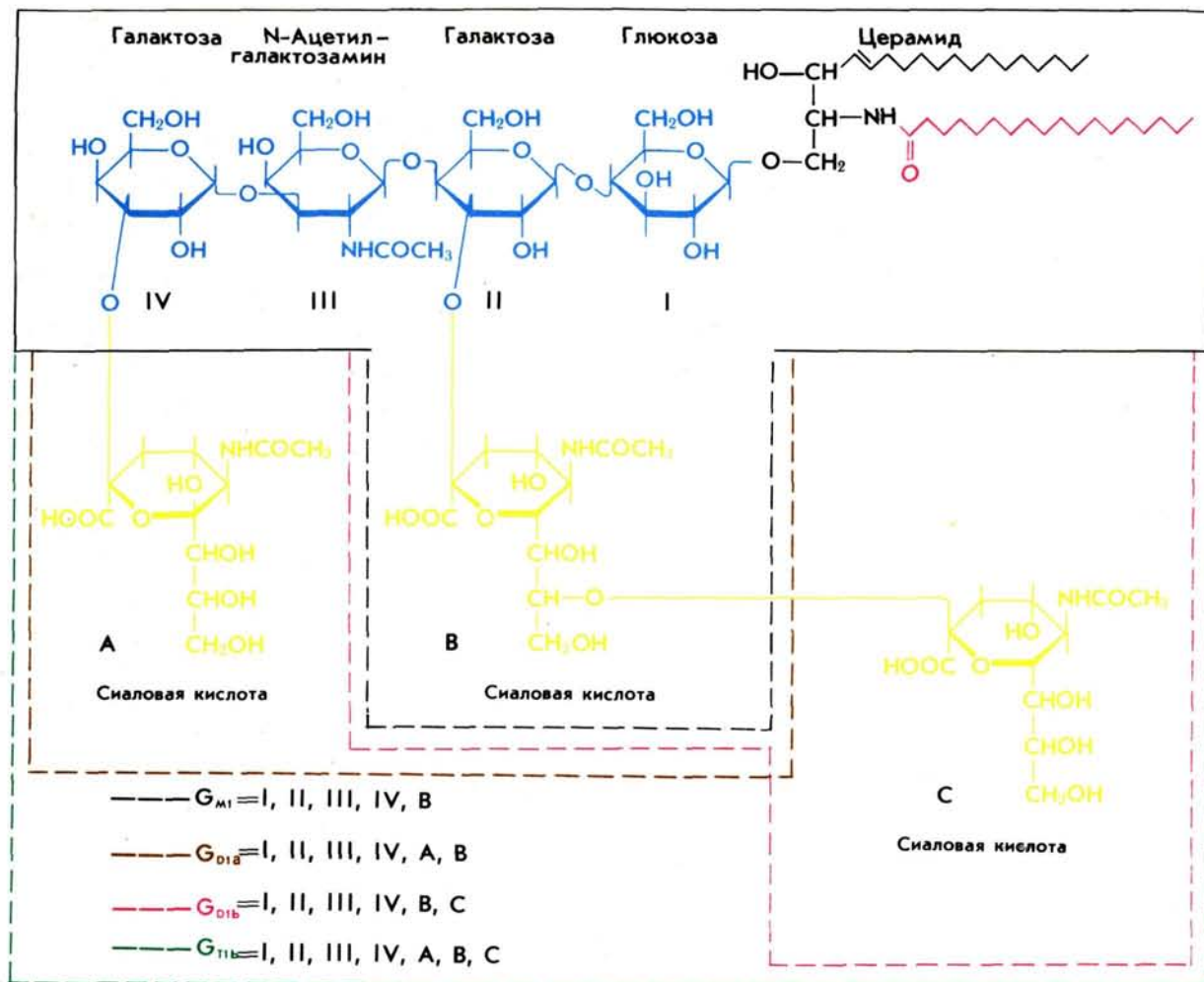


К ганглиозидам относятся гликоосфинголипиды, содержащие один или несколько остатков сиаловой кислоты в олигосахаридной цепи. Сиаловыми кислотами называют N-ацетильные производные нейраминной кислоты, которая представляет собой продукт конденсации маннозамина и пировиноградной кислоты. Наиболее часто встречается в ганглиозидах N-ацетилнейраминная кислота (NeuNAc). Кроме сиаловых кислот, в состав ганглиозидов входят жирные кислоты (преимущественно насыщенные с 16—22 углеродными атомами), сфингозиновые основания (чаще всего C₁₈- и C₂₀-сфингозины), гексозы (глюкоза и галактоза) и гексозамины (обычно N-ацетилгалактозамин). Олигосахаридная цепь ганглиозидов может содержать от 2 до 10 и более углеводных остатков.

В качестве примера на рисунке 269 показана полная химическая структура четырех основных ганглиозидов мозга млекопитающих, принадлежащих к церамидолигосахаридам.

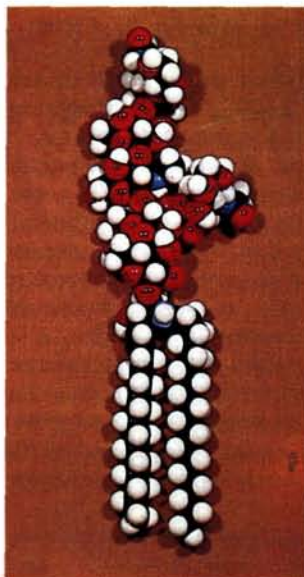
Все они построены на основе моносиалоганглиозида G_{M1}, содержащего один остаток N-ацетилнейраминной кислоты. Присоединение дополнительных остатков сиаловых кислот приводит к дисиало-

Рис. 269. Основные ганглиозиды мозга млекопитающих.



ганглиозидам G_{D1a} и G_{D1b} , а также к трисиалоганглиозиду G_{T1b} . В отличие от других липидов, ганглиозиды способны растворяться не только в органических растворителях, но и в воде, где они образуют мицеллы.

Впервые ганглиозиды были обнаружены в ганглиях, откуда и произошло их название. Наиболее богат ганглиозидами мозг, особенно его серое вещество. Позднее они были обнаружены и в других тканях (почка, селезенка, печень, легкие и т. д.). Несмотря на многочисленные исследования, биологическое значение ганглиозидов до настоящего времени установлено далеко не полностью. Однако известно, что ганглиозиды локализуются преимущественно в плазматических мембранах и, видимо, в значительной степени определяют контактное торможение, адгезию и электрофоретическую подвижность клеток. Исследованиями, проведенными в последние годы, показано, что ганглиозиды специфично связывают токсины ботулизма, столбняка, холеры, дифтерийной палочки, а также стрихнин, бруцин, тебаин, вероятно, серотонин и, возможно, играют определенную роль в их рецепции. Существует мнение,

Ганглиозид G_{M1} Ганглиозид G_{D1a} Ганглиозид G_{D1b} Ганглиозид G_{T1b}

что ганглиозиды принимают деятельное участие в транспорте ионов через мембрану нервных клеток. Следует отметить, что малигнизация клетки, т. е. трансформация нормальной клетки в злокачественную, сопровождается изменением состава ганглиозидов. В клетках, трансформированных вирусами, и в клетках опухолей значительно увеличивается количество ганглиозидов с укороченной олигосахаридной цепью, что, видимо, тесно связано с изменением свойств клеточной поверхности.

Пространственная структура липидов

По данным рентгеноструктурного анализа монокристаллов высших жирных кислот, насыщенные углеводородные цепи представляют собой зигзагообразные структуры, в которых атомы углерода находятся на равных расстояниях друг от друга и укладываются

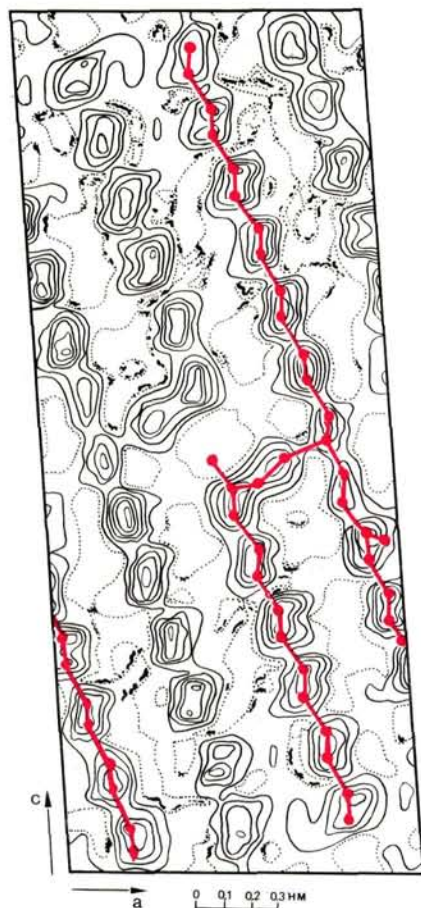
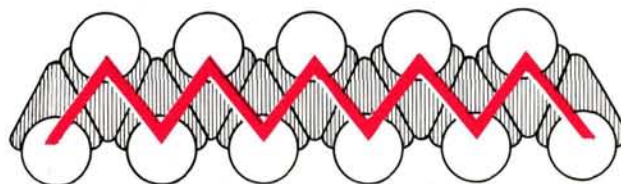


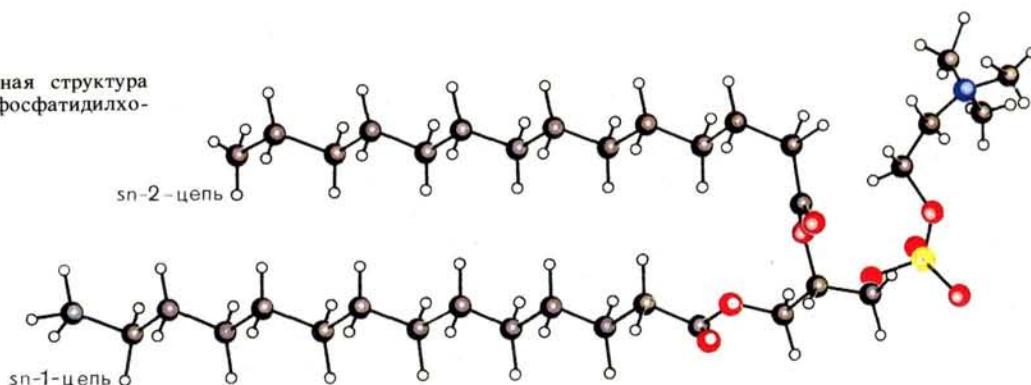
Рис. 270. Рентгенограмма β_L -полиморфной формы триолеина.



ся в два параллельных ряда. Угол между С—С-связями превышает тетраэдрический ($109^\circ 28'$) и лежит в пределах 110 — 114° . При увеличении цепи на одно метиленовое звено ее общая длина возрастает на $0,127$ нм. Жирнокислотные цепи в молекулах триацилглицеринов, образующих монокристалл, также находятся в тетраэдрической зигзагообразной конформации. При этом в целом молекула имеет форму стержня, в котором две жирнокислотные цепи лежат на одной линии, а начальный участок третьей цепи отходит от нее под прямым углом и затем также располагается параллельно основной осевой линии (рис. 270).

В настоящее время пространственная структура фосфолипидов в различном агрегатном состоянии хорошо изучена с помощью таких методов, как рентгеноструктурный анализ, дифракция нейтронов и ЯМР на ядрах ^1H , ^2H и ^{13}C . Теоретический анализ показал, что число возможных конформаций для фосфолипидных

Рис. 271. Пространственная структура молекулы димиристоилфосфатидилхолина.



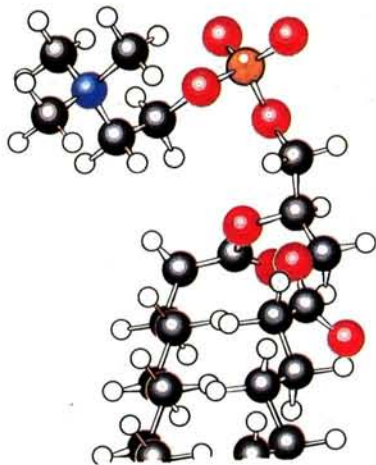


Рис. 272. Конформация глицерофосфохолиновой группировки фосфатидилхолина.

молекул, удовлетворяющих их оптимальной упаковке в мембране, весьма ограниченно, относительное расположение жирнокислотных цепей в молекуле определяется прежде всего конформацией глицеринового остатка. В диацилглицерофосфолипидах его конформация должна быть такой, чтобы было возможно параллельное расположение углеводородных цепей и оптимальные гидрофобные взаимодействия между ними.

Данные рентгеноструктурного анализа дилауроилфосфатидилэтанолamina (Дж. Шипли с сотр., 1974) и димиристоилфосфатидилхолина (Р. Пирсон и И. Пашер, 1979) показали, что диацилглицериновая часть их молекул в монокристаллах имеет в целом одинаковую конформацию. В этих липидах атомы углерода глицеринового остатка, а также *sn*-1-ацильной цепи, включая и сложноэфирную группу, лежат на одной прямой, образуя зигзагообразную конформацию. Ацильная *sn*-2-цепь сначала отходит от глицеринового остова под прямым углом, а затем в районе второго углеродного атома резко изгибается и становится параллельной *sn*-1-ацильному остатку (рис. 271). Вследствие этого *sn*-2-цепь как бы укорачивается и ее концевая метильная группа смещается на расстояние $\sim 0,37$ нм, соответствующее трем метиленовым звеньям, относительно концевой метильной группы *sn*-1-цепи.

Другая характерная особенность пространственной структуры состоит в том, что фрагмент O—C—C—N полярной головки находится в *gosh*-конформации, при которой положительно заряженная аммониевая группа и анионный фосфатный атом кислорода ориентированы в одну сторону (рис. 272). Наконец, фосфодиэфирная связь имеет *gosh*, *gosh*-конформацию, благодаря чему фосфохолиновая группа расположена перпендикулярно к глицерinovому остатку, а общая пространственная структура молекул фосфатидилэтанолamina и фосфатидилхолина как бы напоминает курительную трубку (рис. 273).

Такая конформация, по-видимому, является универсальной для большинства природных фосфолипидов в агрегированных системах (природные мембраны, кристаллы, мультислой, мицеллы и даже смешанные мицеллы с детергентами). Так, например, аналогичный тип конформации был приписан фосфатидилсерину, фосфатидилглицерину и фосфатидилинозиту на основании данных спектров ЯМР.



Рис. 273. Наиболее вероятная пространственная структура фосфолипидов.

В случае липидов с небольшим размером полярной головки жирнокислотные цепи могут иметь иную конформацию. Так, например, в молекуле димиристоилфосфатидовой кислоты остаток глицерина ориентирован параллельно поверхности раздела, причем *sn*-2-цепь является прямой, а изгибу у второго углеродного атома подвергается цепь *sn*-1 (рис. 274).

Характерно, что сходная взаимная ориентация жирнокислотных цепей и глицеринового остатка наблюдается и для дилауроилглицерина, также имеющего полярную головку небольшого размера.

Рис. 274. Конформации фосфатидовой кислоты (а) и фосфатидилэтаноламина (б).

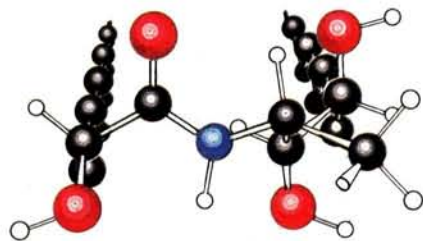
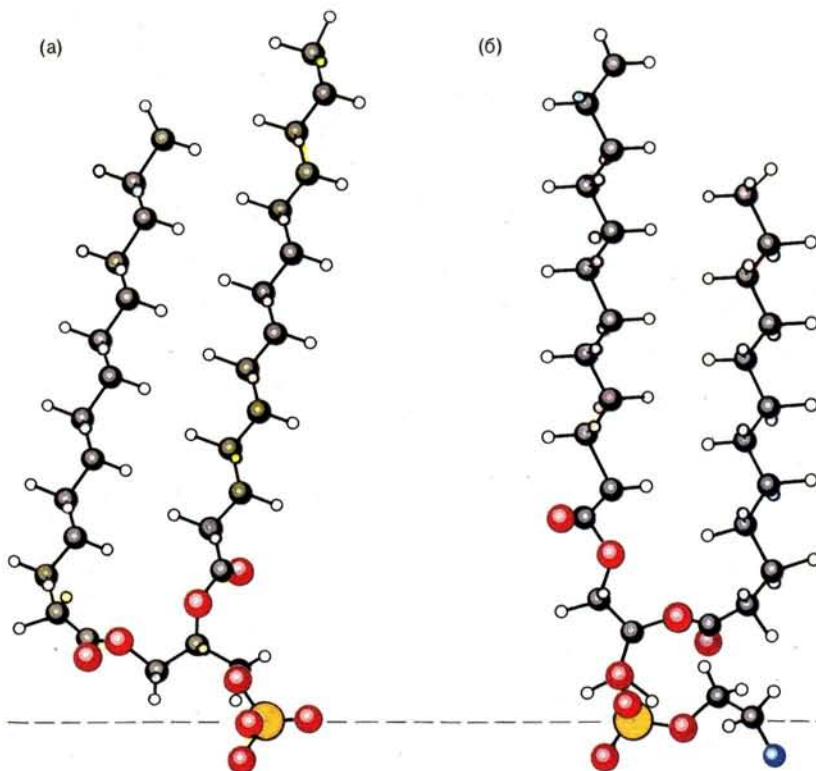


Рис. 275. Наиболее вероятная конформация молекулы церамида.

Детально изучена пространственная структура и простейших сфинголипидов; в частности, на рисунке показана предпочтительная конформация церамида (рис. 275). Жесткая амидная группа, служащая соединительным звеном между двумя углеводородными цепями, расположена перпендикулярно к оси углеводородной цепи сфингозина. Вследствие этого атом водорода при атоме С-2 сфингозинового основания лежит в плоскости амидной связи. Близкий контакт двух углеводородных цепей молекулы возможен только из-за резкого изгиба одной из них. Это требование выполняется за счет двойной *gosh, gosh*-конформации при α -углеродном атоме жирнокислотной цепи.

Среди гликосфинголипидов пространственная структура установлена только для β -D-галактозил-N-(2-D-гидроксиоктадеканоил)-D-дигидросфингозина (цереброзида) методом рентгеноструктурного анализа его монокристалла. В этом случае (рис. 276) параллельное расположение углеводородных цепей обеспечивается

за счет резкого изгиба цепи сфингозинового основания в районе шестого атома углерода. Благодаря еще одному изгибу при атоме С-1 сфингозиновой цепи кольцо галактозы имеет почти перпендикулярную ориентацию относительно осей углеводородных цепей, так что вся молекула принимает форму «совковой лопаты».

Предпринимаются попытки исследования пространственной структуры более сложных гликолипидов. Так, например, на основании анализа изменений химических сдвигов в спектрах ^{13}C -ЯМР ганглиозида G_{M1} в присутствии Eu^{3+} была предложена структура катионсвязывающего участка в его молекуле (рис. 277).

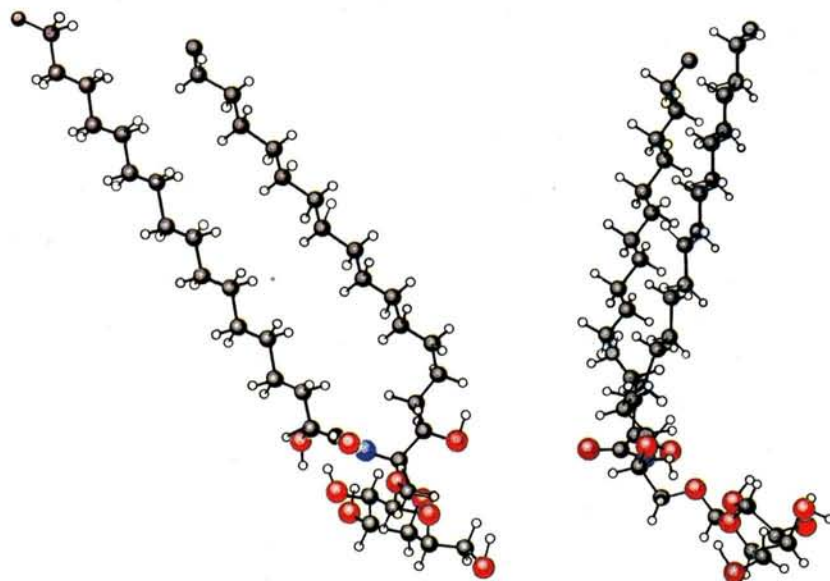


Рис. 276. Пространственная структура β -D-галактозил-N-(2-D-гидроксиоктадеканойл)-D-дигидросфингозина.

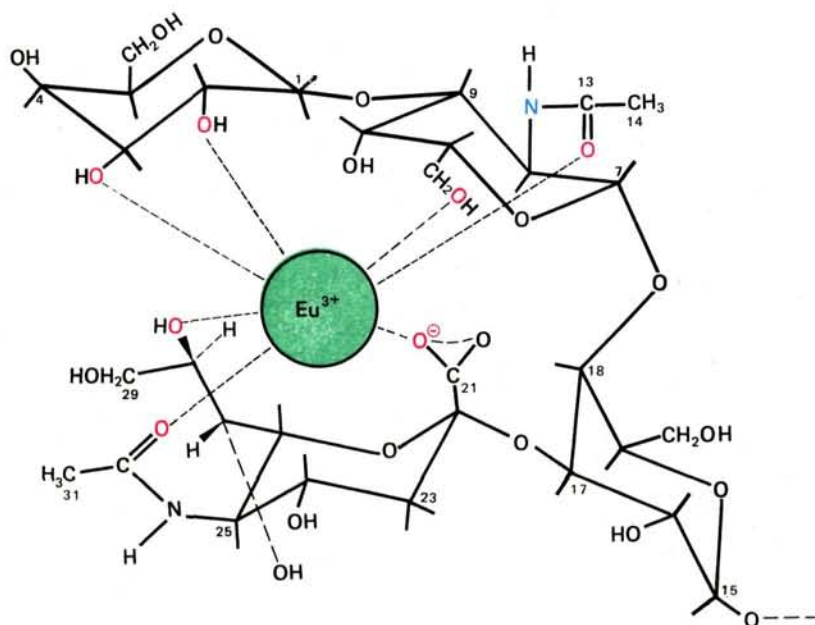


Рис. 277. Пространственная организация катионсвязывающего участка ганглиозида G_{M1} .

Химический синтез липидов



Бергельсон Лев Давыдович (р. 1918), советский химик-органик и биохимик, член-корреспондент АН СССР (1968). Окончил Московский университет (1941), с 1958 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы — в области синтеза липидов, антибиотиков, стероидов. Совместно с М. М. Шемякиным исследовал стереохимию и механизм реакции Виттига, осуществил стереоселективный синтез ряда ненасыщенных высших жирных кислот. Известен работами в области диольных липидов и простагландинов. Лауреат Государственной премии СССР (1985).

Для исследовательских и практических целей липиды обычно получают путем выделения из доступных природных источников. Однако во многих случаях целесообразным или необходимым оказывается химический синтез. Прежде всего, именно синтез обеспечивает окончательное доказательство строения новых типов липидных веществ, изолируемых из животных, растительных или микробных организмов. Далее, развитие мембранных исследований, и в особенности физико-химии мембран, поставило на повестку дня проблемы препаративного получения многих мембранных липидов с заранее заданной структурой полярных и неполярных участков молекулы. И наконец, для изучения тонких механизмов функционирования мембранных систем с помощью молекулярных зондов понадобились разнообразно модифицированные липиды, содержащие изотопные, спиновые и флуоресцентные метки, а также различные фотоактивируемые группировки. Все это привело к тому, что в настоящее время химический синтез липидов является хорошо разработанной областью биоорганической химии.

Сложность химического строения липидов и большое разнообразие их структур требуют использования широкого набора методов тонкого органического синтеза. Если не касаться приемов получения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а обсуждать проблему конструирования непосредственно липидных молекул, то наиболее важными оказываются стандартные процедуры, общие для всех типов липидов.

Ацилирование гидроксильных групп глицерина или аминогруппы сфингозина является наиболее распространенным методом введения ацильных остатков. В качестве ацилирующих агентов используются сами жирные кислоты, их галогенангидриды, ангидриды, эфиры, имидазолиды или соли.

Алкилирование применяется при синтезе липидов с простой эфирной связью. Для введения алкильного остатка в молекулу глицерина используются алкилгалогениды или алкиловые эфиры *p*-толуол- или метансульфокислот. При синтезе плазмалогенов в качестве алкилирующих реагентов применяются *cis*-алкенилметансульфонаты, *cis*-алкенилбромиды, диалкилацетали высших жирных альдегидов, а также 1,2-эпоксиды. Высокая активность *cis*-алкенильной группировки в реакциях присоединения, исключительная лабильность к действию кислотных агентов и необходимость избирательного введения ее в молекулу полиола (что обуславливает применение специфических защитных групп) крайне затрудняют синтез плазмалогенов.

Фосфорилирование является обязательным этапом при синтезе фосфолипидов и приводит к образованию эфиров фосфорной кислоты с участием гидроксильных групп глицерина, миоинозита, этаноламина, холина, серина и других производных. Отличительной особенностью образования фосфоэфирных связей в фосфолипидах является предварительная активация взаимодействующих

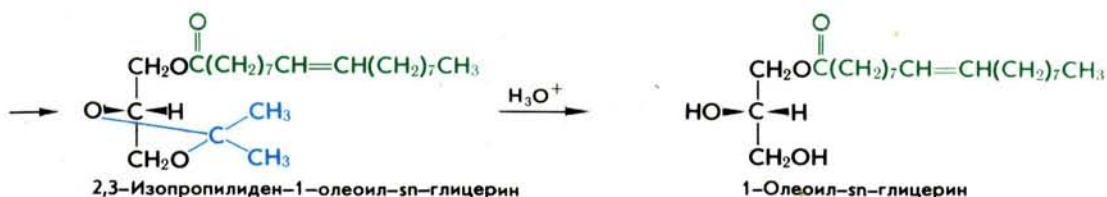
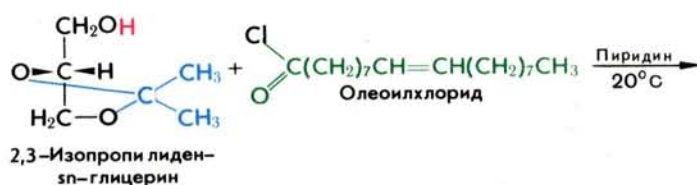
фосфатных и гидроксилсодержащих компонентов: первых в виде хлорфосфатов, ангидридов фосфорных кислот, серебряных солей замещенных фосфорных кислот и т. д., вторых, как правило, в виде соответствующих галогенпроизводных. При проведении реакции фосфорилирования должна быть предусмотрена защита всех не подлежащих фосфорилированию функциональных групп и возможность последующего деблокирования их на заключительных стадиях синтеза в условиях сохранения всех элементов структуры синтезированного фосфолипида. Сложность синтеза увеличивается и такими характерными свойствами фосфолипидов, как склонность к гидролизу и легкая окисляемость. В настоящее время синтетическая химия фосфолипидов располагает разнообразными методами фосфорилирования, большим набором блокирующих группировок для временной и селективной защиты функциональных групп, что позволяет получать в препаративных количествах фосфолипиды практически любой структуры.

Гликозилирование широко применяется при синтезе гликолипидов. Методы гликозилирования обычно те же, что и в химии углеводов. В ряду гликофинголипидов специфическим катализатором гликозилирования, как правило, является цианид ртути, так как при использовании обычных катализаторов реакции Кёнигса — Кнорра (карбонат серебра или оксид серебра) во всех случаях выделяемые вещества оказываются смесью α - и β -аномеров.

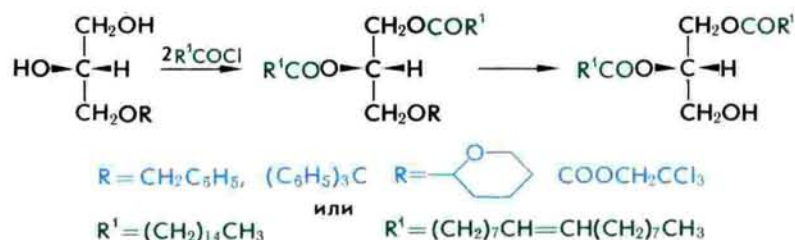
Защитные группировки, используемые при синтезе липидов (прежде всего для блокирования H_2N -, $HOOC$ - и HO -групп), обычно мало отличаются от применяемых в химии пептидов или углеводов.

В качестве примера рассматриваются синтезы отдельных представителей липидов различных классов.

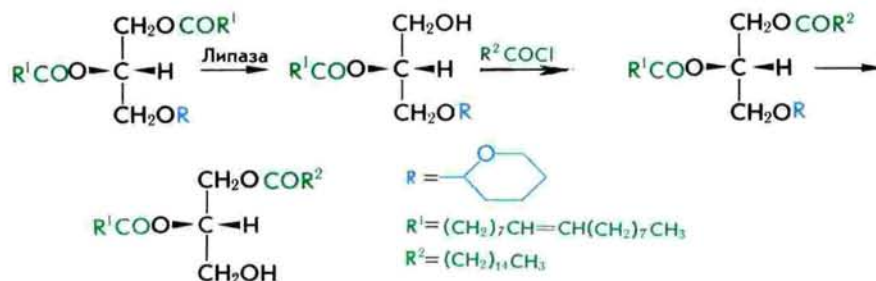
Моноацилглицерины получают обычно ацилированием бензиденовых или изопропилиденовых производных:



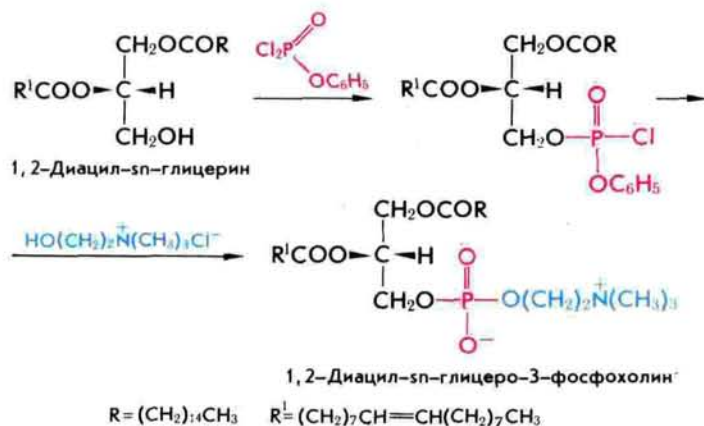
1,2-Диацил-*sn*-глицерины — ключевые соединения в синтезе многих природных фосфолипидов. Их получение нередко осложняется за счет ацильной миграции, приводящей к 1,3-диацилпроизводным. Для предотвращения такой миграции первичный гидроксил глицерина защищается подходящей группой



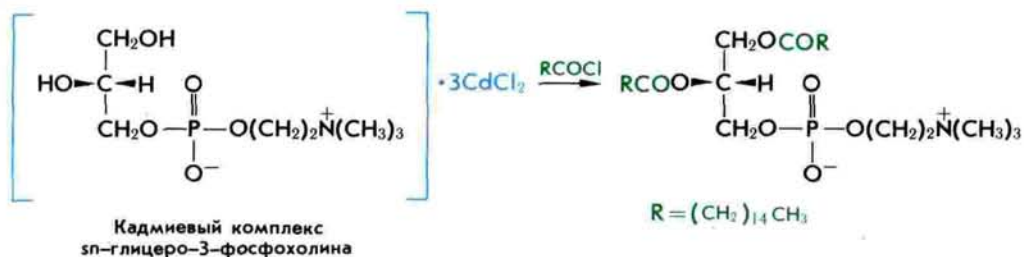
Получение насыщенных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов не представляет трудностей и осуществляется на основе 3-О-бензил- и 3-О-трил-*sn*-глицеринов с последующим удалением защитных групп каталитическим гидрированием. В случае ненасыщенных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов обычно используются 3-О-тетрагидропиранил-*sn*-глицерин и 3-О-β,β,β-трихлорэтилкарбонат *sn*-глицерина, так как в условиях удаления этих защитных групп (соответственно мягкий кислотный гидролиз и действие цинка в уксусной кислоте или метаноле) сохраняются двойные связи и их конфигурация. Для получения смешанных 1,2-диацилглицеринов часто применяются методы, сочетающие химические и ферментативные превращения. Так, при обработке 1,2-ди-О-ацил-3-О-(тетрагидро-2-пиранил)-глицеринов панкреатической липазой, которая избирательно расщепляет первичную сложноэфирную группу, образуется 2-О-ацил-3-О-(тетрагидро-2-пиранил)-глицерин, который далее подвергается последовательно ацилированию и кислотному гидролизу



Фосфолипиды могут синтезироваться с помощью приемов, которые иллюстрируются на примере получения фосфатидилхолина. Известный вариант синтеза 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина по методу активированных фосфатов включает фосфорилирование 1,2-диацил-*sn*-глицерина фенолдихлорфосфатом с последующим взаимодействием с холинхлоридом

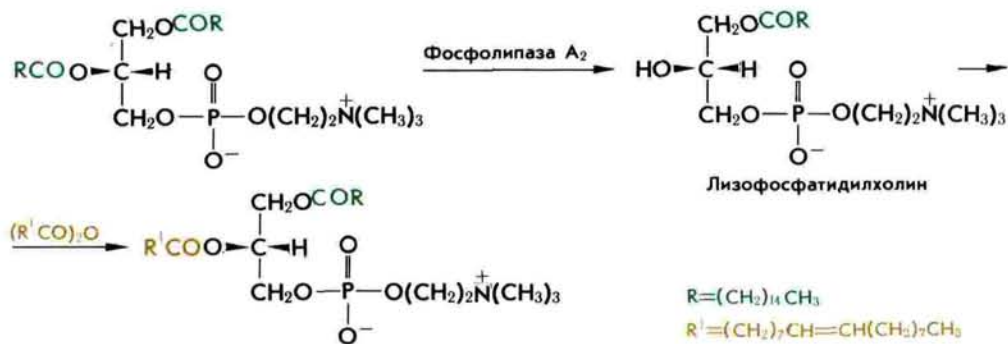


Для синтеза фосфатидилхолинов используют также ацилирование глицерофосфохолина, получаемого либо из 1,2-изопропилиден-*sn*-глицерина, либо щелочным или ферментативным деацилированием смеси природных фосфатидилхолинов с различными жирнокислотными остатками. Ацилирование проводится действием хлорангидридов или ангидридов высших жирных кислот на комплекс *sn*-глицеро-3-фосфохолина с хлоридом кадмия

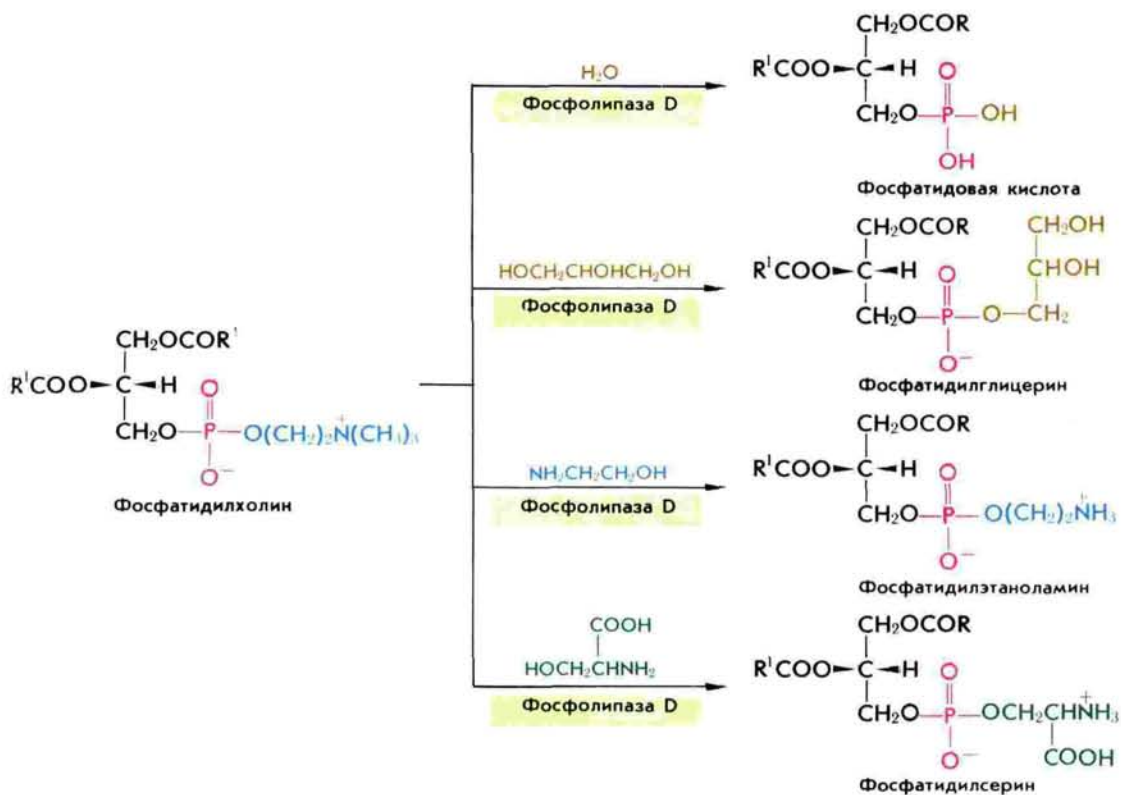


Для перехода от фосфатидилхолинов, содержащих остатки одинаковых жирных кислот, к фосфатидилхолинам смешанного типа используется деацилирование их с помощью фосфолипазы A₂ и последующее ацилирование образующегося при этом лизофос-

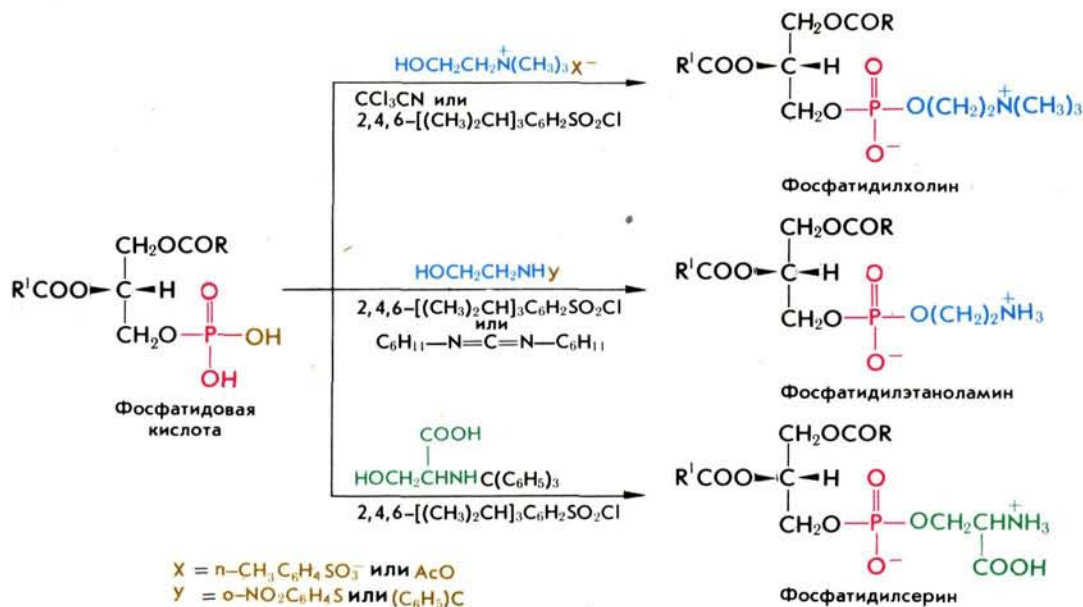
фатидилхолина ангидридами жирных кислот с использованием диметиламинопиридина или пирролидинопиридина в качестве катализаторов



Синтез различных фосфолипидов может быть осуществлен и путем реакции трансфосфатидилирования, т. е. действия фосфолипазы D, с помощью которой проводится обмен, например, остатка холина, связанного с диацилглицерофосфатом, на другой спирт, имеющий первичную гидроксильную группу.

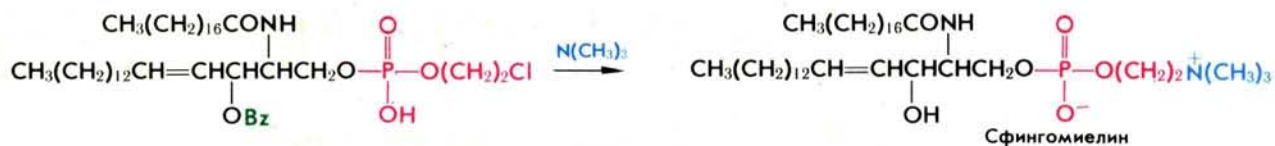
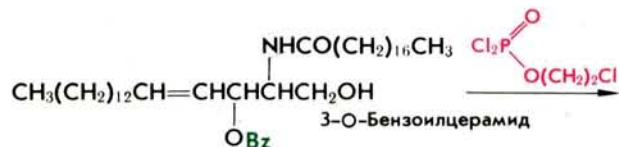


Фосфолипиды различного типа могут быть получены и непосредственно из фосфатидовой кислоты путем ее этерификации соответствующим аминспиртом в присутствии подходящих конденсирующих агентов. В частности, фосфатидовые кислоты могут быть превращены в фосфатидилхолины взаимодействием с тозилатом или ацетатом холина в присутствии трихлорацетонитрила или 2,4,6-триизопропилбензолсульфохлорида. Присоединение этаноламина к фосфатидовой кислоте осуществляется действием тритиламиноэтанола и триизопропилбензолсульфохлорида или *o*-нитрофенилсульфенилэтанолamina в присутствии дидциклогексилкарбодимида. Фосфатидилсерины могут быть получены из фосфатидовой кислоты конденсацией с тритилсерином с использованием триизопропилбензолсульфохлорида.

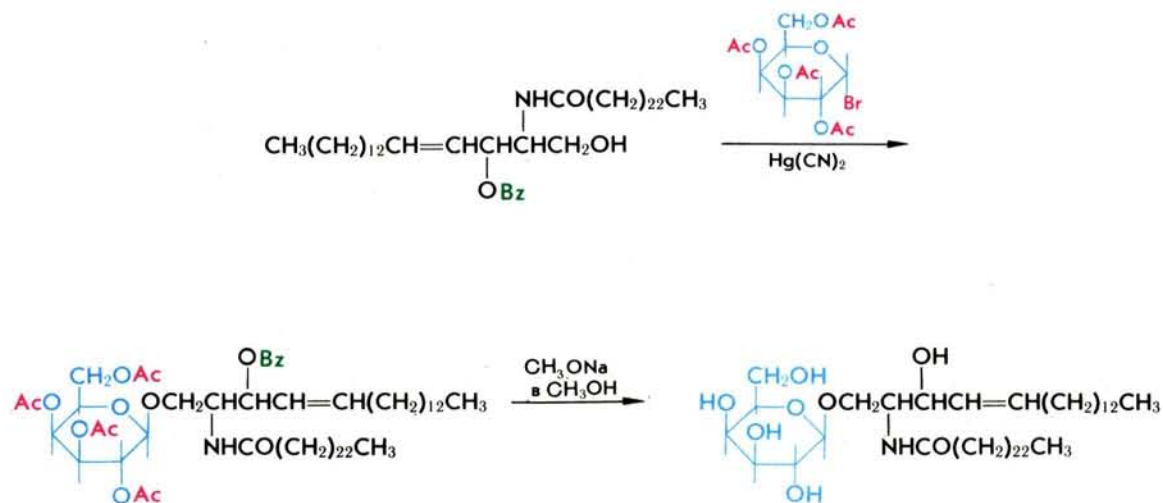


Сфинголипиды синтезируются, как правило, из 3-О-бензоилцерамидов, которые получают из соответствующих оксазолинов или церамидов. Использование церамидов в качестве исходных соединений имеет свои преимущества, поскольку синтез нужного сфингозинового основания может быть осуществлен любым способом. Церамиды природной *D-эритро*-конфигурации можно получать из доступных природных источников путем омыления фракций сфинголипидов.

В качестве примера можно привести синтез сфингомиелина: сначала проводится фосфорилирование исходных 3-О-бензоилцерамидов β -хлорэтилдихлорфосфатом и затем обработка выделенных диэфиров фосфорной кислоты с помощью триметиламина.



При получении гликоэфинголипидов в качестве исходных соединений также используются 3-О-бензоилцерамиды, которые вводят в реакцию с ацетобромсахарами. Специфической особенностью реакции гликозилирования в этом ряду является стереонаправленное образование β-аномеров в присутствии цианида ртути. На схеме приведен синтез N-ацил-1-(β-D-галактозил)-4-сфингенинов: после проведения гликозилирования исходного 3-О-бензоилцерамида образуется защищенный церебросид, ацетильные и бензильные группировки в котором удаляются в один прием метилатом натрия в метаноле.



В настоящее время методы химического синтеза позволяют получать нейтральные гликоэфинголипиды довольно сложного строения, содержащие несколько сахарных остатков. Однако химический синтез ганглиозидов до сих пор представляет собой трудную задачу в связи со сложностью введения в молекулу остатков сиаловой кислоты.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

Основные принципы построения
мембранных липидных структур

Модельные мембраны

Молекулярная организация
биологических мембран

Биогенез мембран

Транспорт через мембраны

Характеристика отдельных
биологических мембранных систем

Каждая живая клетка окружена мембраной, которая обеспечивает внутри клетки необходимый «микроклимат», играет активную роль в поддержании ее жизнедеятельности, контролирует потоки веществ и ионов в клетку и из нее. Клеточная мембрана — сложная высокоорганизованная двумерная система, состоящая главным образом из липидов и белков.

Мембраны — важнейшая составная часть и клеточных компонентов — ядра, митохондрий, хлоропластов, лизосом и т. п. Как видно на рисунке 278, клетка (животная) весьма насыщена мембранными структурами, образующими, в сущности, разветвленную, четко организованную сеть. Отсюда понятна ключевая роль клеточных мембран в процессах биологической регуляции.

Исторический очерк. В 1665 г. изобретатель микроскопа англичанин Роберт Гук, изучая строение тонких срезов коркового дерева, назвал увиденные им замкнутые ячейки *клетками* (cellulae). Двенадцать лет спустя голландский ученый, основатель научной микроскопии А. Левенгук описал общие черты строения клеток бактерий, сперматозоидов и эритроцитов. Однако прошло более 150 лет, прежде чем немецкий анатом Т. Шванн сформулировал в 1839 г. клеточную теорию.

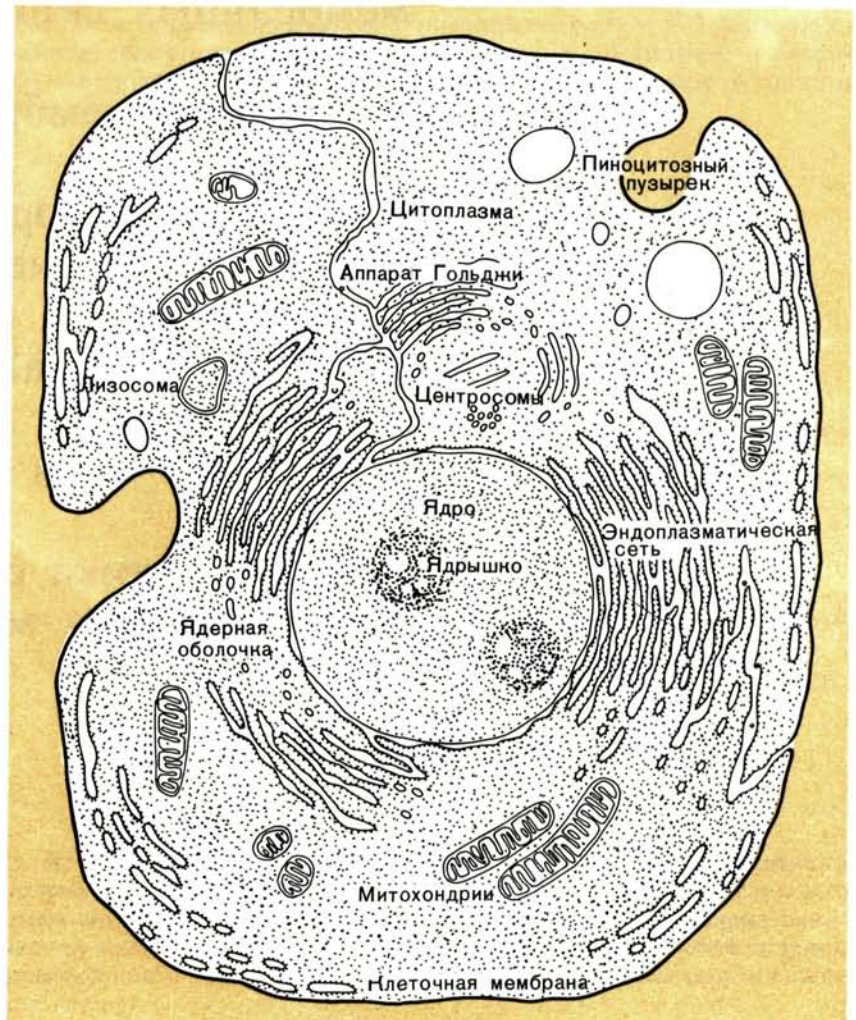


Рис. 278. Схема строения клетки.

Термин «мембрана» используется вот уже более 100 лет для обозначения клеточной границы, служащей, с одной стороны, барьером между содержимым клетки и внешней средой, а с другой — полупроницаемой перегородкой, через которую могут проходить вода и некоторые из растворенных в ней веществ. В 1851 г. немецкий физиолог Х. фон Моль описал плазмолиз клеток растений, предположив, что клеточные стенки функционируют как мембраны. В 1855 г. ботаник К. фон Негели наблюдал различия в проникновении пигментов в поврежденные и неповрежденные растительные клетки и исследовал клеточную границу, которой он дал название *плазматическая мембрана*. Он предположил, что клеточная граница ответственна за осмотические свойства клеток. В 1877 г. немецкий ботаник В. Пфеффер опубликовал свой труд «Исследование осмоса», где постулировал существование клеточных мембран, основываясь на сходстве между клетками и осмометрами, имеющими искусственные полупроницаемые мембраны. В 80-х годах прошлого столетия датский ботаник Х. де Фриз продолжил осмометрические исследования растительных клеток, предположив, что неповрежденный слой протоплазмы между плазмалеммой и тонопластом функционирует как мембрана. Его исследования послужили фундаментом при создании физико-химических теорий осмотического давления и электролитической диссоциации голландцем Я. Вант-Гоффом и шведским ученым С. Аррениусом. В 1890 г. немецкий физикохимик и философ В. Оствальд обратил внимание на возможную роль мембран в биоэлектрических процессах. Между 1895 и 1902 годами Э. Овертон измерил проницаемость клеточной мембраны для большого числа соединений и наглядно показал зависимость между растворимостью этих соединений в липидах и способностью их проникать через мембраны. Он предположил, что мембрана имеет липидную природу и содержит холестерин и другие липиды. Современные представления о строении мембран как подвижных липопротеиновых ансамблей были сформулированы в начале 70-х годов нашего столетия.

Быстрое развитие биоорганической химии мембран и, прежде всего, широкое исследование структуры мембранных белков и липидов во многом обусловили прогресс в познании важнейших функций биомембран, таких, как транспорт различных метаболитов, генерация энергии, взаимодействие клеток и их деление, передача нервного возбуждения, рецепция сигналов внешней среды и т. п.

Основные принципы построения мембранных липидных структур

Основу мембран клетки составляет липидный матрикс, образуемый высокоорганизованными ансамблями липидов. Большинство же функций мембран связано с белками, встроенными в липидную фазу или локализованными на ее поверхности. Кроме того, в состав многих мембран могут входить углеводы, а также соединения другой природы (каротиноиды, порфирины и т. п.).

В водных растворах и на границе раздела вода — воздух липиды, в силу их специфической природы, образуют за счет невалентных взаимодействий гигантские агрегаты, которые в известном смысле можно считать липидными «биополимерами». Это в существенной степени объясняет тот факт, что липиды, наряду с белками, нуклеиновыми кислотами и углеводами, обычно рассматриваются в разделах, посвященных биологическим макромолекулам и им отводится заслуженное место в «большой четверке» биополимеров.

Среди ассоциатов, образующихся при самосборке липидов, наиболее известны мономолекулярные липидные пленки (монослои), мицеллы и бимолекулярные липидные слои (бислои).

Монослои

Монослои липидных молекул формируются на границе раздела между водой и воздухом или водой и маслом. Обычно их получают, помещая на поверхность воды каплю раствора липидов в летучем растворителе. После испарения растворителя образуется пленка толщиной в один слой молекул, в котором полярные (гидрофильные) группировки молекул направлены в сторону воды, а углеводородные цепи (гидрофобные группы) — в сторону воздуха (рис. 279).

При отсутствии ограничений пленка липида на границе раздела вода—воздух стремится занять максимально возможную площадь и представляет систему, аналогичную так называемому «двумерному» газу (рис. 279, *а*). В этом состоянии монослоя молекулы липида свободно перемещаются вдоль поверхности воды, практически не взаимодействуя друг с другом. При постепенном сжатии монослоя, приводящем к увеличению плотности упаковки, молекулы начинают взаимодействовать между собой, и на поверхности воды образуется сплошная пленка липида, отвечающая жидкорастянутому состоянию монослоя, другими словами, состоянию «двумерной жидкости» (рис. 279, *б*). При дальнейшем увеличении сжатия молекулы будут стремиться к максимально плотной упаковке. При этом они упорядочивают свою ориентацию в монослое так, что их полярные головки обращаются в сторону водной фазы, а углеводородные цепи выступают в воздух в виде своеобразного «частокола» (рис. 279, *в*). Такая плотно упакованная пленка, в которой углеводородные цепи липидных молекул сохраняют определенную подвижность, называется конденсированным монослоем. Если давление увеличивать и дальше, образуется твердый, практически несжимаемый конденсированный монослой, в котором площадь, приходящаяся на одну молекулу, минимальна. Когда же давление превысит некоторую предельную величину, называемую давлением коллапса, произойдет разрушение пленки, при котором монослои молекул надвигаются один на другой.

Изменения состояния монослоя по мере сжатия могут быть обнаружены путем измерения зависимости между поверхностным давлением (π) и площадью (A), приходящейся на одну молекулу липида. Типичная диаграмма зависимости поверхностного давления — площадь представлена на рисунке 280. Как видно из этой диаграммы, на кривых наблюдаются точки перегиба, которые соответствуют переходу монослоя из одного состояния в другое. Экстраполяция кривых сжатия к нулевому давлению позволяет рассчитать площадь, занимаемую молекулами различных липидов на границе раздела фаз.

Изотермы площадь — давление могут быть измерены с помощью специального устройства, называемого пленочными весами Лэнгмюра, как показано на схеме, приведенной на рисунке 281. В этом устройстве монослой ограничивают с одной стороны подвижным барьером (*B*), с помощью которого можно увеличивать или уменьшать площадь пленки. С другой стороны монослоя находится легкий плавающий барьер *A*, связанный с прибором, измеряющим усилия, которые воздействуют на поплавок при сжатии пленки. Поверхностное давление определяется как разность между поверхностным натяжением чистой воды (σ_0) и поверхностным натяжением в присутствии монослоя (σ):

$$\pi = \sigma_0 - \sigma$$

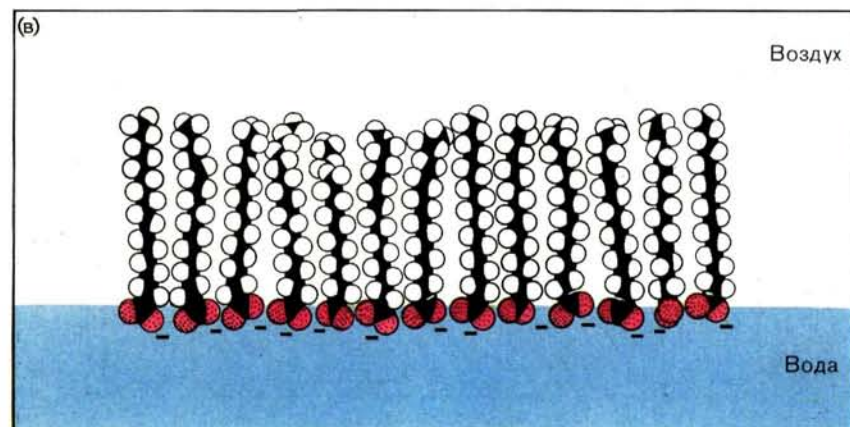
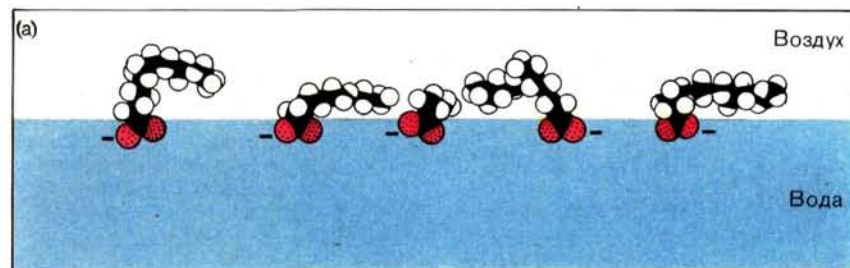


Рис. 279. Липидные молекулы на границе вода/воздух:
(*a*) — «газообразное» состояние монослоя; (*б*) — состояние «двумерной» жидкости; (*в*) — «твердый» конденсированный монослой.

Другой способ измерения поверхностного давления, известный как метод Вильгельми, основан на взвешивании тонкой пластинки из инертного материала, приведенной в соприкосновение с поверхностью монослоя.

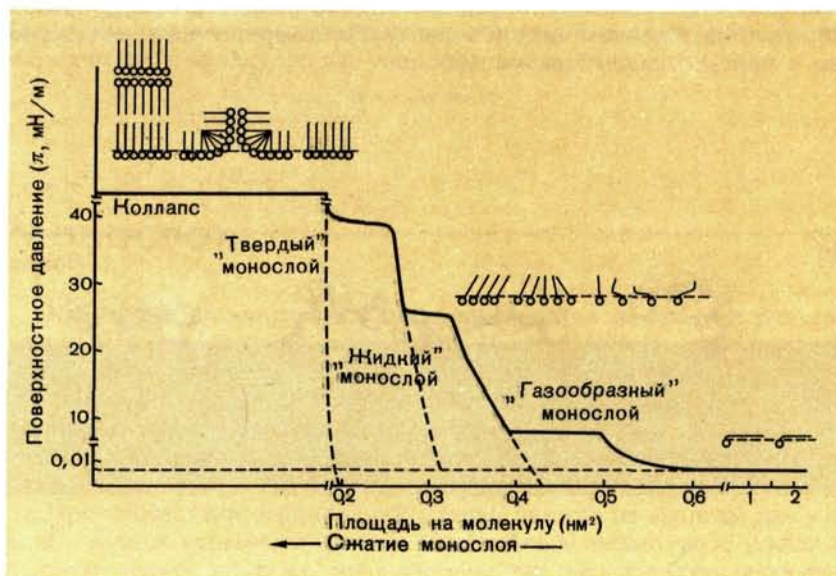


Рис. 280. Общий вид диаграммы зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу липида.

Важную информацию о свойствах монослоя несет поверхностный потенциал, зависящий от природы и взаимного расположения полярных групп на границе раздела фаз. Зная величину скачка потенциала (ΔV), можно вычислить величины дипольных моментов и получить данные об ориентации поверхностно-активных молекул на поверхности монослоя, а также определить характер их взаимодействия с липидами и структуру образующихся при этом комплексов. Измерения поверхностной вязкости также могут быть полезны для характеристики реологических свойств мембранных компонентов, особенно при изучении процессов, сопровождающихся изменениями фазового состояния монослоя. И наконец, путем измерения поверхностной радиоактивности монослоя можно изучать процессы адсорбции меченых мембранных агентов на границе раздела воз-

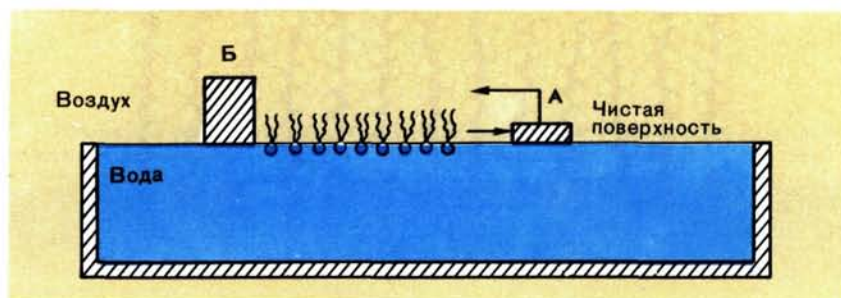


Рис. 281. Схема измерения поверхностного давления по методу Лэнгмюра.

дух—вода. Конструкция комплексной установки, позволяющей для одного и того же монослоя измерять поверхностное давление, поверхностный потенциал и поверхностную радиоактивность, показана на рисунке 282.

Липидные монослои издавна рассматривались исследователями как простейшие модели биологических мембран. Физико-химические параметры подобных монослоев интенсивно исследовались уже в начале XX в., т. е. гораздо раньше, чем началось экспериментальное изучение других мембранных моделей. Значительный вклад в исследования монослоев внесли Б. Франклин, лорд Релей (Дж. В. Стратт) и И. Лэнгмюр. Как модельная система липидные монослои и сегодня не утратили своего значения, позволяя оценивать поверхностную активность отдельных мембранных компонентов и изучать взаимодействие других мембранных молекул в ориентированных мономолекулярных структурах, хорошо имитирующих поверхность раздела мембрана—вода.

Поведение липидных молекул в монослое существенно зависит от их строения. Насыщенные жирные кислоты, их метиловые эфиры и триацилглицерины (например, пальмитиновая кислота, метилпальмитат и трипальмитоилглицерин) образуют конденсированные монослои при поверхностном давлении 10^{-4} Н/см. Конденсированная пленка ведет себя при этом как несжимаемое твердое тело. Площадь, приходящаяся на одну молекулу в монослое, для гомологичного ряда кислот не зависит от длины углеводородной цепи и при максимально плотной упаковке монослоя, отвечающей давлению коллапса, составляет $0,19—0,2$ нм². Введение одной двойной связи в жирнокислотную цепь существенно увеличивает площадь, приходящуюся на молекулу. Так, например, для олеиновой кислоты предельная площадь возрастает до $0,26—0,27$ нм². Однако введение дополнительных двойных связей уже мало влияет на площадь, приходящуюся на одну молекулу жирной кислоты. Монослои, образуемые ненасыщенными жирными кислотами, проявляют свойства менее упорядоченных жидкорастянутых пленок.

Жидкорастянутые монослои образуют также моноацилглицерины вследствие присутствия двух свободных гидроксильных групп в молекуле. Предельная площадь для моноацилглицеринов составляет около $0,25$ нм² на молекулу. Диацилглицерины дают более конденсированные монослои. Площадь, приходящаяся на молекулу, растет пропорционально числу имеющихся жирнокислотных остатков. Так, в случае насыщенных триацилглицеринов предельная площадь составляет около $0,6$ нм² на молекулу.

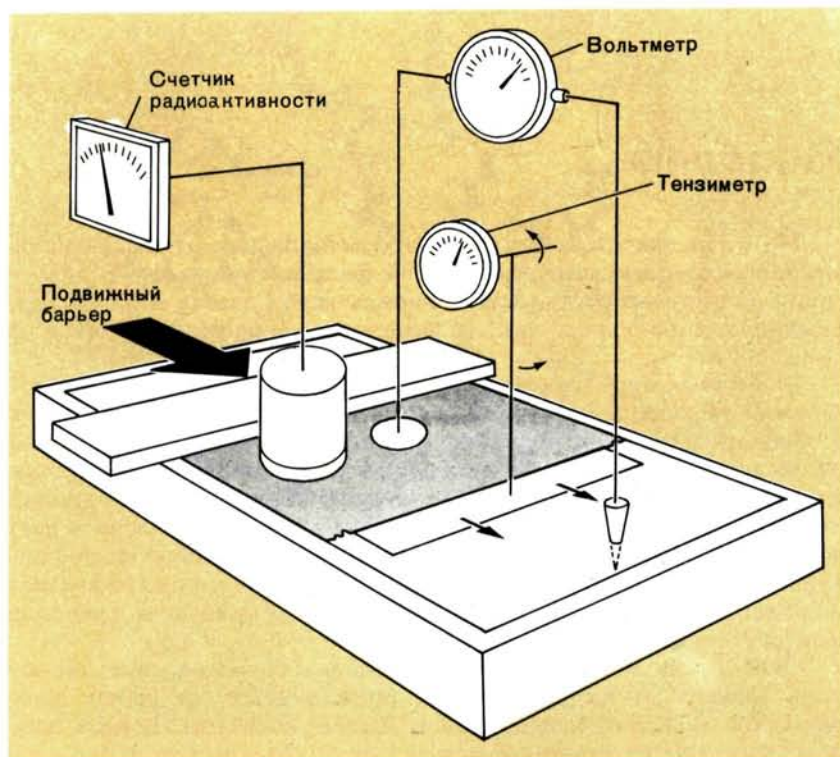


Рис. 282. Схема прибора, позволяющего определять поверхностное давление, поверхностный потенциал и поверхностную радиоактивность монослоя.



Рис. 283. Липидные мицеллы в воде и неполярных растворителях.

Характер упаковки фосфолипидных молекул в монослой зависит как от строения их углеводородных цепей, так и от природы гидрофильных полярных головок. Фосфолипиды с остатками насыщенных кислот дают конденсированные монослои при поверхностном давлении 10^{-4} Н/см. Как и в случае свободных жирных кислот, площадь, приходящаяся на фосфолипидную молекулу, значительно возрастает при введении одной двойной связи в жирнокислотную цепь. Дальнейшее увеличение степени ненасыщенности в той же жирнокислотной цепи слабо сказывается на величине площади, занимаемой молекулой. Однако если вторая двойная связь вводится в другую ацильную цепь, то площадь заметно возрастает. Так, в ряду дипальмитоилфосфатидилхолин, яичный фосфатидилхолин и диолеилфосфатидилхолин предельная площадь на молекулу составляет 0,44, 0,62 и 0,72 nm^2 соответственно.

Фосфатидилэтаноламин образует более конденсированные монослои по сравнению с фосфатидилхолином. Средняя площадь на молекулу фосфатидилэтанолamines, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, существенно меньше, чем для соответствующих фосфатидилхолинов. Возрастание рН или концентрации электролитов в водной фазе приводит к расширению монослоя фосфатидилэтаноламина. В еще большей степени влияние рН и неорганических солей сказывается на свойствах монослоев, образуемых кислыми фосфолипидами, такими, как фосфатидилсерин, фосфатидилинозит, дифосфатидилглицерин, фосфатидовая кислота и др. В общем виде ионизация полярных групп липидов при увеличении рН приводит к более разреженному монослою вследствие электростатического отталкивания отрицательно заряженных группировок. Присутствие катионов в водной фазе оказывает обратное действие за счет экранирования заряда фосфатных групп. Многовалентные катионы, особенно Ca^{2+} , оказывают сильное влияние на монослои отрицательно заряженных фосфолипидов, приводя к значительному уменьшению средней площади, приходящейся на молекулу.

Значительное влияние на свойства липидного монослоя могут оказывать также макромолекулы, присутствующие в водной фазе. Взаимодействие этих веществ, в частности белков, с липидным монослоем сопровождается их адсорбцией на поверхности монослоя и проникновением в монослой. По изменениям поверхностного давления и потенциала, а также площади, приходящейся на молекулу, могут быть изучены факторы, влияющие на белково-липидные взаимодействия в монослое.

Мицеллы

Мицеллы представляют собой простейшие агрегаты, образуемые липидными молекулами в объемной фазе растворителя. В зависимости от природы растворителя липиды могут давать либо мицеллы обычного типа, либо так называемые «обращенные» мицеллы (рис. 283).

В обычных мицеллах гидрофильные полярные головки липидных молекул обращены в сторону водной фазы, тогда как неполярные углеводородные цепи образуют гидрофобное ядро, изолированное от водного окружения. В обращенных мицеллах, существующих в таких растворителях, как бензол, гексан и др., молекулы липидов имеют иную ориентацию: их гидрофобные цепи направлены в растворитель, а полярные головки формируют центральную гидрофильную область мицеллы. Образование обращенных мицелл значительно облегчается при добавлении следовых количеств воды в неполярный растворитель.

Склонность липидов к формированию ассоциатов мицеллярного типа зависит от их строения и, прежде всего, от соотношения размеров полярной и неполярной частей молекулы. В воде легко дают мицеллы те липиды, которые имеют объемистую и/или заря-

женную полярную головку и сравнительно небольшие углеводородные цепи (рис. 284).

К мицеллообразующим липидам относятся соли высших жирных кислот и лизоформы фосфолипидов, у которых на молекулу приходится всего лишь одна углеводородная цепь, а также фосфолипиды, имеющие две углеводородные цепи, но небольшой длины, такие, как дигексаноил- и диоктаноилфосфатидилхолины. Наличие в молекуле непомерно большой полярной головки, как, например, в ганглиозидах, даже при нормальной длине углеводородных цепей способствует мицеллообразованию в воде.

Для вышеперечисленных веществ характерны довольно высокие по сравнению с другими липидами значения критической концентрации мицеллообразования порядка $10^{-3} - 10^{-5}$ М. Образуемые ими мицеллы обладают диаметром от 3 до 6 нм, имеют сферическую или эллипсоидальную форму и содержат от нескольких десятков до сотен липидных молекул на мицеллу. С ростом концентрации липида происходит укрупнение мицелл и превращение их в длинные стержнеобразные частицы, содержащие более 1000 молекул на мицеллу (рис. 285).

Иные соотношения размеров полярных групп и углеводородных цепей типичны для липидов, способных образовывать обращенные мицеллы в неполярных растворителях. Формированию таких мицелл

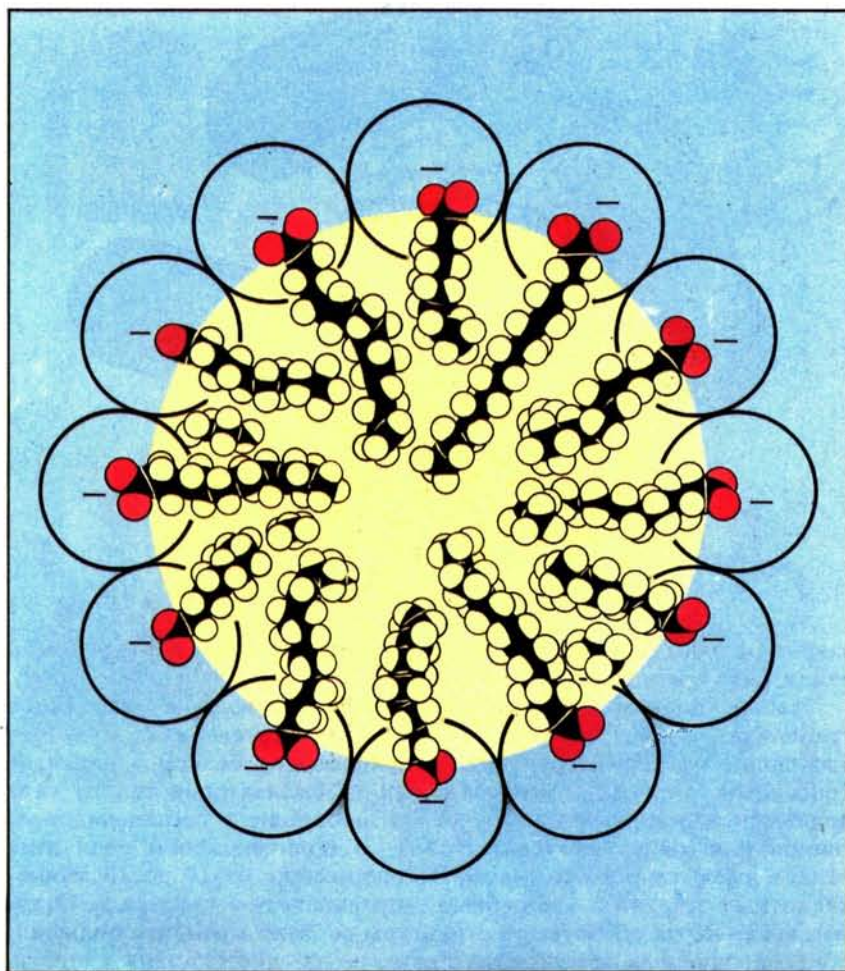


Рис. 284. Упаковка молекул в мицелле соли жирной кислоты.

благоприятствуют малый объем полярных головок, нейтрализация их заряда, а также наличие в молекуле массивных углеводородных цепей. Так, например, яичный фосфатидилхолин легко образует в бензоле обращенные мицеллы, тогда как в водной среде его молекулы не в состоянии упаковаться в компактные мицеллярные агрегаты. Тем не менее даже такие липиды могут быть переведены в мицеллярное состояние в водной среде, если они находятся в смеси с другими поверхностно-активными веществами. В частности, образование смешанных липидных мицелл легко происходит в присутствии детергентов.

Обычно смешанные детергент-липидные мицеллы имеют такую структуру, как показано на рисунке 285. Однако особый интерес представляет молекулярная организация мицелл, образуемых смесями солей желчных кислот с фосфолипидами. Эти мицеллы имеют форму диска, в центральной части которого находятся фосфолипидные молекулы, а по периферии расположены молекулы желчной кислоты (рис. 286). Толщина диска (4—5 нм) в точности соответствует удвоенной длине фосфолипидной молекулы, а его диаметр

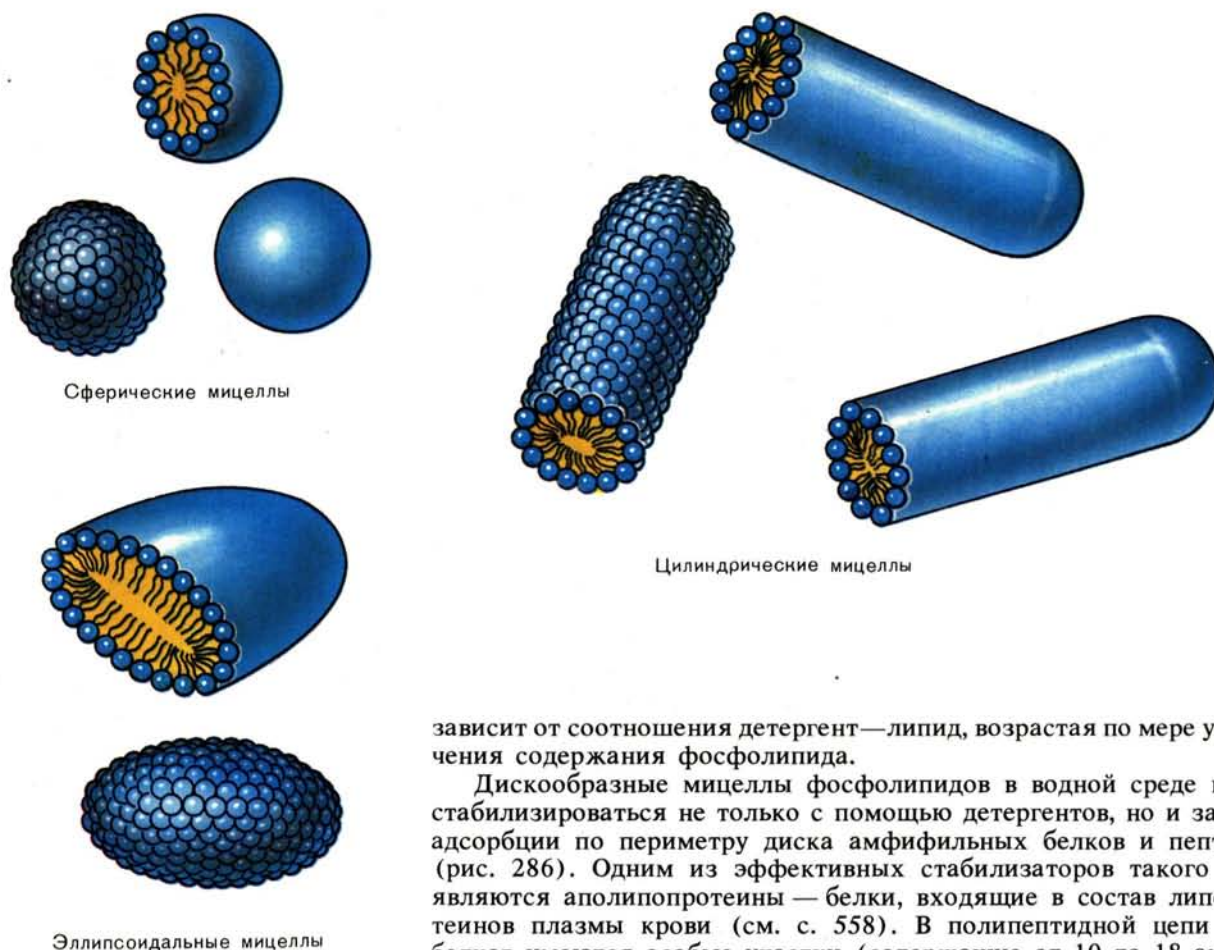


Рис. 285. Различные типы мицелл, образуемых липидами в воде.

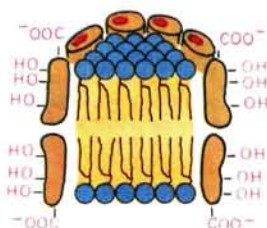
зависит от соотношения детергент—липид, возрастающая по мере увеличения содержания фосфолипида.

Дискообразные мицеллы фосфолипидов в водной среде могут стабилизироваться не только с помощью детергентов, но и за счет адсорбции по периметру диска амфифильных белков и пептидов (рис. 286). Одним из эффективных стабилизаторов такого типа являются аполипопротеины — белки, входящие в состав липопротеинов плазмы крови (см. с. 558). В полипептидной цепи этих белков имеются особые участки (содержащие от 10 до 18 аминокислотных остатков), способные сворачиваться в α -спираль. Отличительная черта образуемой структуры состоит в том, что большинство гидрофобных остатков расположено на одной стороне спирали,

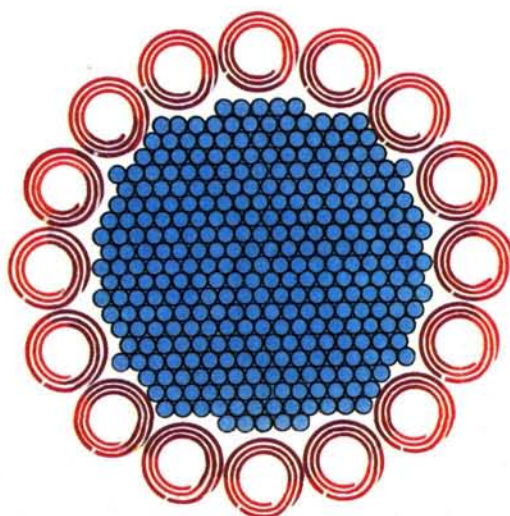
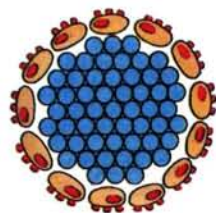
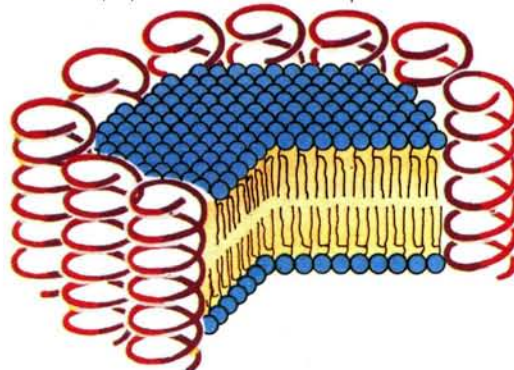
тогда как заряженные и сильно полярные аминокислотные остатки находятся на ее противоположной стороне (рис. 287). Таким образом, в смешанных белково-липидных мицеллах гидрофобные области α -спиральных участков полипептидной цепи должны находиться в контакте с углеводородными цепями фосфолипидов, а гидрофильные области спиралей будут обращены в водную среду.

Важным свойством липидных мицелл является их способность солюбилизовать, т. е. растворять в себе, те вещества, которые в отсутствие мицелл в среде нерастворимы. Так, обращенные мицеллы могут включать значительное количество воды во внутренний объем, ограниченный полярными головками липидных молекул. Вместе с водой внутрь обращенных мицелл захватываются растворенные в ней неорганические соли, свободные сахара и даже молекулы биополимеров (рис. 288). Например, в обращенные мицеллы фосфолипидов в углеводородных растворителях легко включаются такие белки, как цитохром с, фосфолипаза А₂, родопсин и реакционные центры *Rhodospseudomonas sphaeroides*, которые в этих условиях сохраняют свою пространственную структуру и функциональную

Смешанные мицеллы
фосфолипидов и солей
желчных кислот



Диски, образуемые фосфолипидами и
амфифильными аполипопротеинами



← 5 нм →

← 15 нм →

Рис. 286. Дискообразные мицеллярные агрегаты.

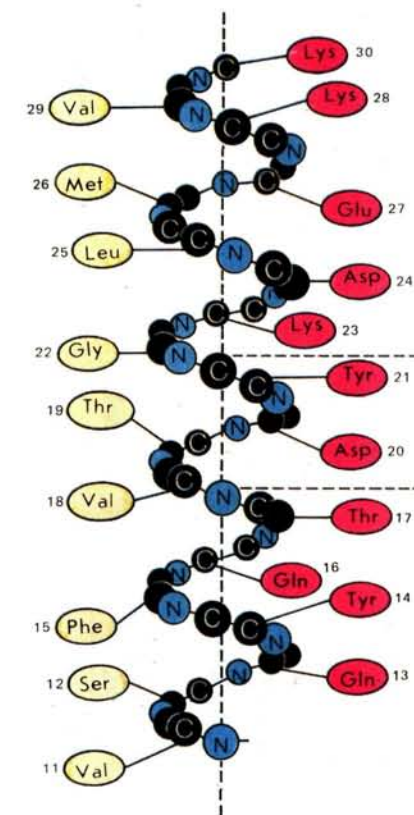


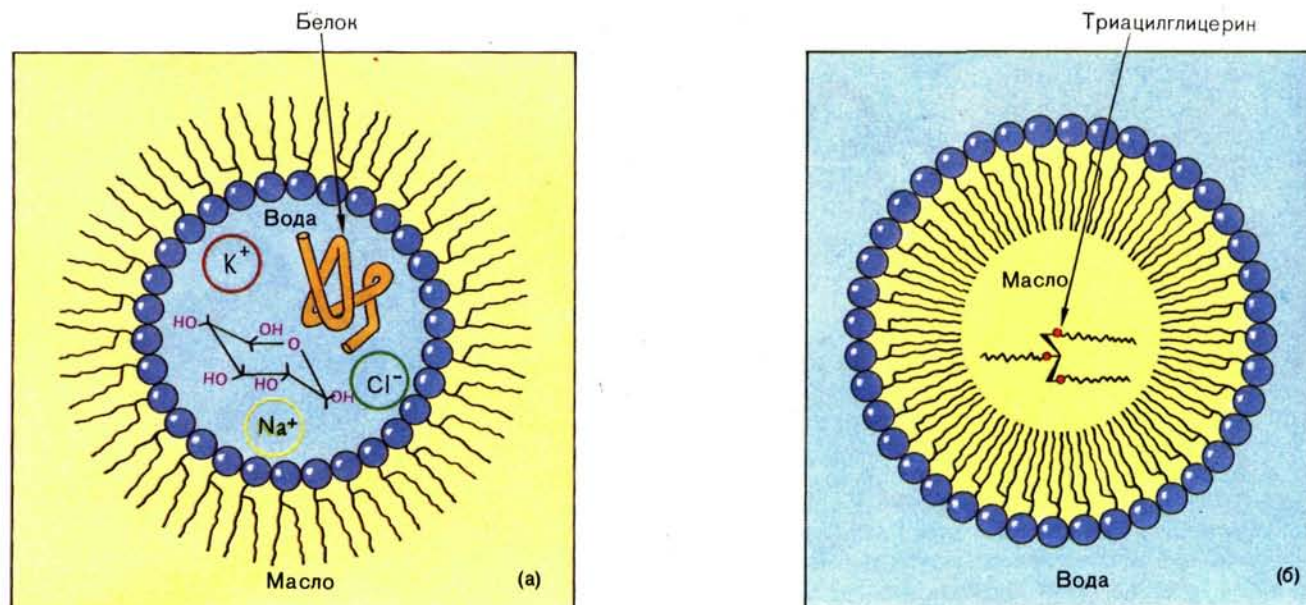
Рис. 287. α -Спираль отдельного участка полипептидной цепи аполипопротеина А-II.

активность. Фактически при большом содержании воды обращенные мицеллы можно рассматривать как капельки микроэмульсии типа «вода в масле», стабилизированной липидным монослоем на границе раздела вода—неполярный растворитель.

Иной тип микроэмульсии, а именно «масло в воде», образуется при солюбилизации в нормальных липидных мицеллах неполярных и малополярных веществ, плохо растворимых в воде. В этом случае монослой липидных молекул формируется на поверхности микрокапелек солюбилируемого вещества, стабилизирует их и поддерживает во взвешенном состоянии (рис. 288). Таким путем в водной среде удастся легко эмульгировать неполярные органические растворители, а также жиры и масла. Размер частиц микроэмульсий варьирует в широких пределах, от 5 до 100 нм и больше. Например, средний диаметр частиц микроэмульсии, приготовленной обработкой ультразвуком из смесей фосфатидилхолина и триолеилглицерина в соотношении 1:1, составляет ~ 27 нм, а при соотношении 1:10 он возрастает до ~ 230 нм.

Классическим примером липидных эмульсий природного происхождения являются липопротеины плазмы крови, основная функция которых состоит в транспорте фосфолипидов, триацилглицеринов, холестерина и его эфиров в организме теплокровных животных. В плазме найдены четыре основных класса липопротеинов. В порядке возрастания удельной плотности они располагаются в следующий ряд: хиломикроны, липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП), липопротеины низкой плотности (ЛНП) и липопротеины высокой плотности (ЛВП). Содержание различных классов липопротеинов у человека зависит от возраста, пола, условий жизни и т. д. и изменяется при некоторых патологических состояниях организма (инфаркт миокарда, атеросклероз и другие сосудистые заболевания). Морфологически липопротеины представляют собой сферические частицы мицеллоподобного типа (рис. 289). Несмотря на различия в относительном содержании основных компонентов, входящих в состав липопротеинов, все они устроены по одинаковому принципу (рис. 290): внутреннее ядро липопротеиновых частиц состоит из неполярных нейтральных липидов (триацилглицеринов и эфиров холестерина), а на поверхности находится монослой, образуемый фосфолипидами, холестерином и амфифильными апопротеинами.

Рис. 288. Способы солюбилизации различных веществ в липидных мицеллах: (а) — микроэмульсия типа «вода в масле»; (б) — микроэмульсия типа «масло в воде».



Следует отметить, что мицеллообразование играет также очень важную роль в процессах пищеварения. Благодаря присутствию солей желчных кислот, поступающих из желчного пузыря в двенадцатиперстную кишку, нерастворимые в воде пищевые жиры превращаются в тонкодисперсную эмульсию, что делает их доступными для расщепления липолитическими ферментами и облегчает всасывание продуктов гидролиза в тонком кишечнике.

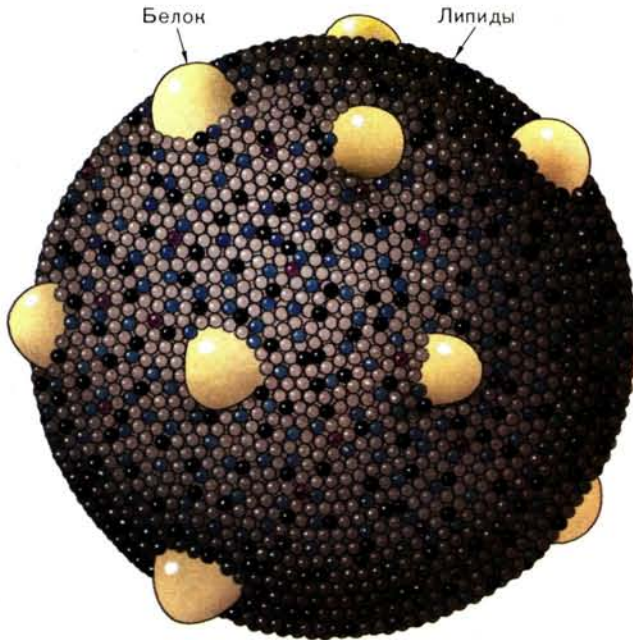
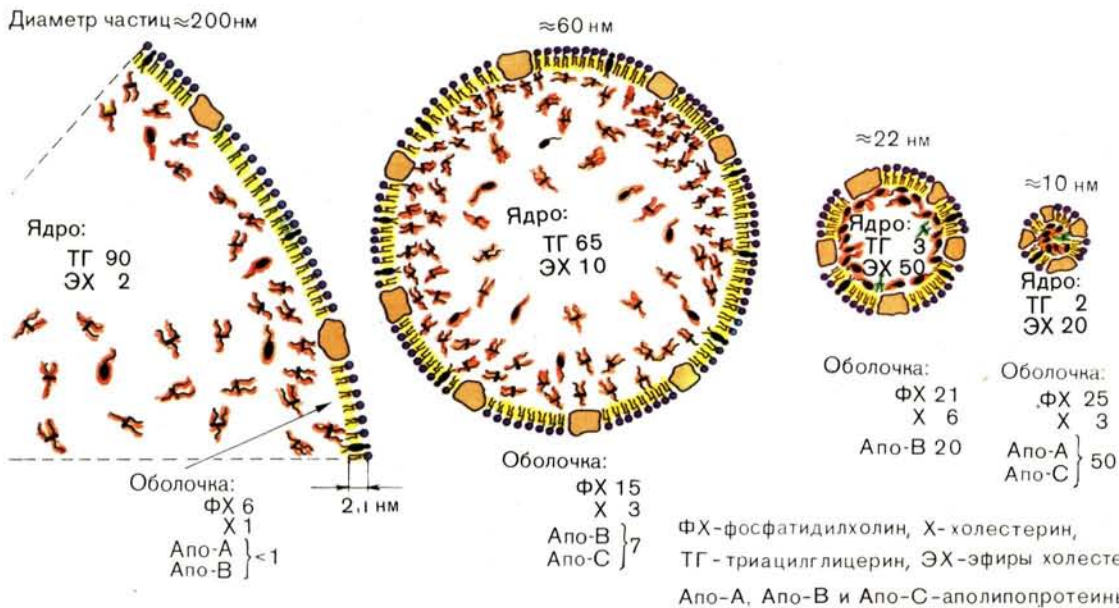


Рис. 289. Модель частицы липопротеина плазмы крови.

Рис. 290. Примерный состав (в %) и размеры липопротеинов плазмы крови человека. Толщина поверхностного монослоя (2,1 нм) дана в том же масштабе, что и диаметр ядра.



Необходимо упомянуть также еще об одной области, где практическое знание закономерностей образования и поведения мицеллярных структур имеет прямое отношение к исследованиям биологических мембран. Речь идет о проблемах разборки мембран на составные компоненты с выделением из них отдельных мембранных белков и последующей реконструкции функционально активных комплексов в модельных системах. В настоящее время наиболее предпочтительным подходом к решению этих проблем является использование детергентов. При действии детергентов на выделенные препараты клеточных мембран происходит солюбилизация белков и липидов с образованием смешанных мицелл (рис. 291).

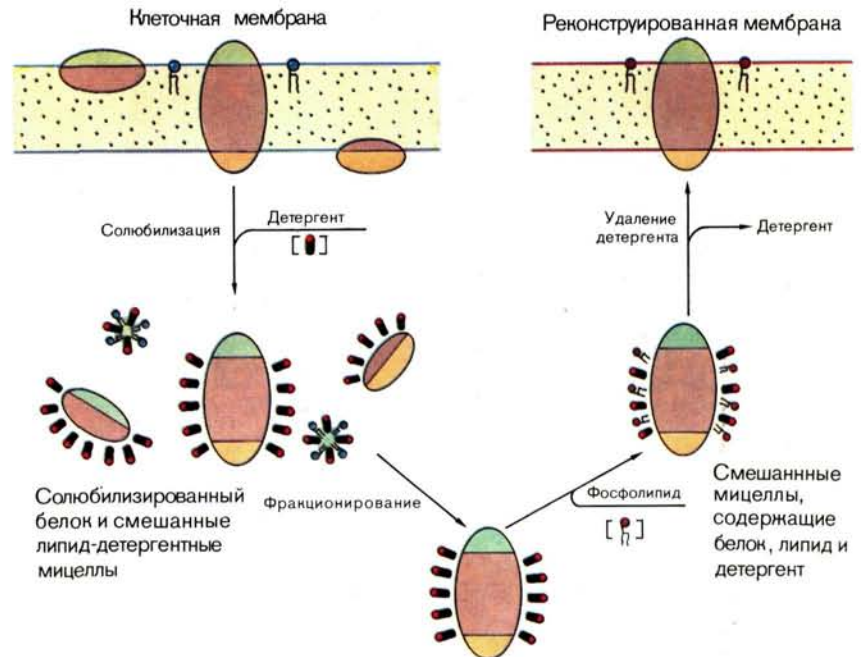
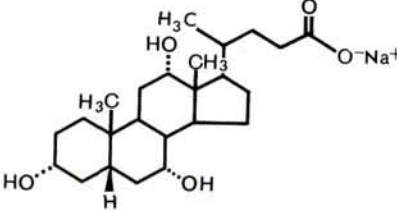
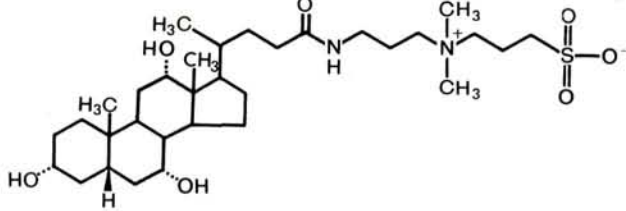
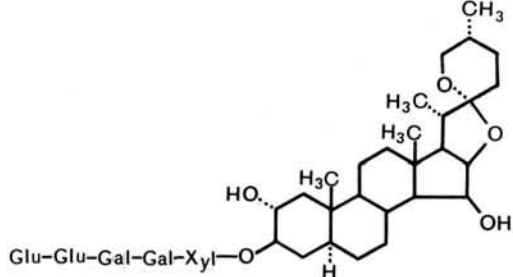
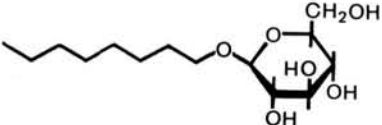
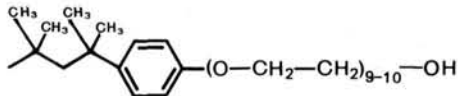



Рис. 291. Разборка и сборка мембраны с помощью детергентов.

С помощью разнообразных методов фракционирования мембранные белки в солюбилизированной форме могут быть разделены и очищены до индивидуального состояния. Последующее удаление детергента в присутствии подходящих фосфолипидов позволяет реконструировать в искусственной мембране ту или иную функцию изучаемого белка. В таблице 23 приведены структурные формулы и названия детергентов, наиболее часто используемых для солюбилизации и реконструкции мембран.

В настоящее время выявился еще один аспект перспективного применения мицеллярных систем в мембранных исследованиях: с помощью детергентов оказалось возможным достаточно хорошо моделировать липидное окружение мембранных пептидов и белков. Поскольку мицеллы занимают промежуточное положение между растворами и истинно мембранными системами, то это значительно расширяет возможности получения тонкой структурной информации о таких белках с помощью современных спектральных методов.

Детергенты, наиболее часто используемые для солюбилизации и реконструкции мембран

Структурная формула	Название
	<p>Холат натрия (3α, 7α, 12α-тригидрокси-5β-холанат натрия)</p>
	<p>ЧАПС (3-[(3-холамидопропил)-диметиламмонно]-пропансульфонат)</p>
 <p>Glu-Glu-Gal-Gal-Xyl-O-</p>	<p>Дигитонин</p>
	<p>Октилглюкозид (октил-β-D-глюкопиранозид)</p>
	<p>Тритон X-100 п- (трет-октил)-фениловый эфир полиэтиленгликоля</p>
	<p>Луброл РХ (додecilовый эфир полиэтиленгликоля)</p>

Бислой

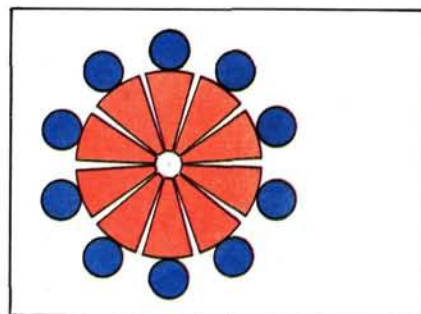
Бислой, или бимолекулярный липидный слой, представляет собой термодинамически наиболее выгодную форму ассоциации тех липидов, молекулы которых не способны образовывать в воде небольшие агрегаты мицеллярного типа. Возможность упаковки молекул в бислой, как и в случае мицелл, определяется прежде всего соотношением размеров полярной и неполярной частей молекулы (рис. 292).



Луццати [Luzzati] Витторио (р. 1923), французский биофизик. Окончил университет в Буэнос-Айресе (1947); с 1947 г. работает в Национальном центре научных исследований (Франция), в настоящее время — в Институте молекулярной генетики. Основные работы связаны с исследованием структуры и полиморфизма липидов, липопротеинов и биологических мембран.



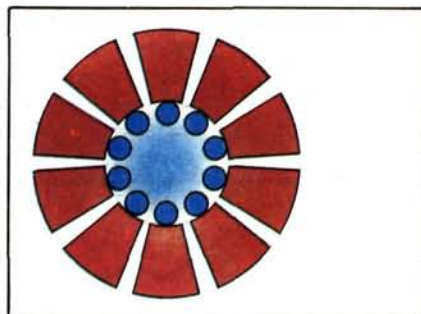
Конус



Нормальные мицеллы



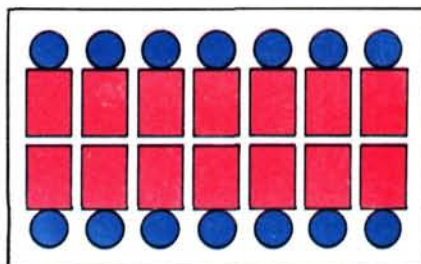
Обратный конус



Обращенные мицеллы



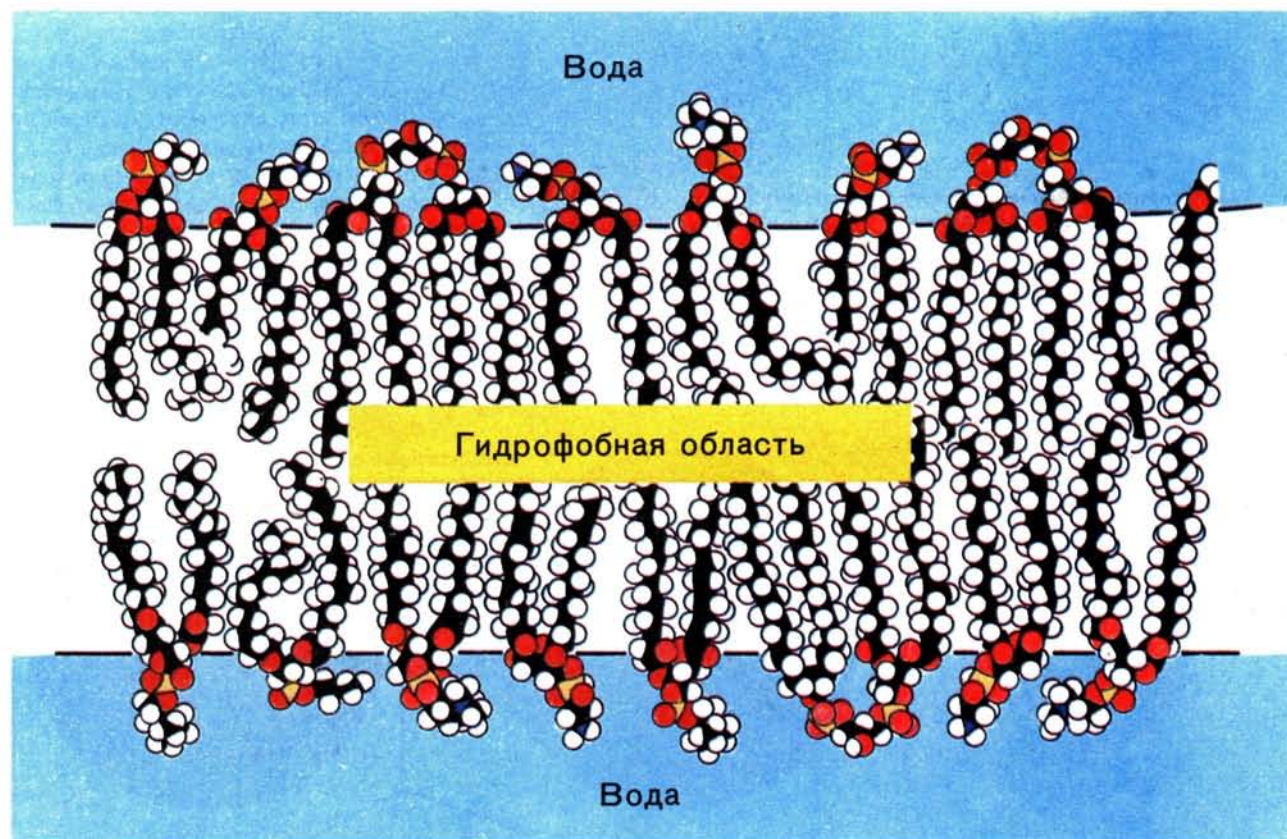
Цилиндр



Липидный бислой

Рис. 292. Схематическое изображение формы липидных молекул, наиболее склонных к образованию нормальных мицелл, обращенных мицелл и бимолекулярного слоя.

Как правило, бислоем легко формируется липидами, у которых невелики различия между площадью, занимаемой полярной головкой, и поперечным сечением углеводородных цепей. Именно такое соотношение размеров характерно для большинства фосфолипидов, являющихся основными компонентами биологических мембран. В бислое агрегированные молекулы липидов уложены в виде двух параллельных монослоев, обращенных друг к другу своими гидрофобными сторонами. Полярные группы липидных молекул образуют соответственно две гидрофильные поверхности, отделяющие внутреннюю углеводородную фазу бислоя от водной среды.



Характерным признаком липидов, образующих бислои, является исключительно низкая величина критической концентрации мицеллообразования ($\sim 10^{-10}$ М). Это означает, что доля неассоциированных липидных молекул, находящихся в равновесии с бислоем, исключительно мала и практически весь липид находится в составе крупных надмолекулярных образований. Их структура и морфология зависят от соотношения липид—вода. Значительный вклад в исследование такого рода водно-липидных систем внес В. Луццати.

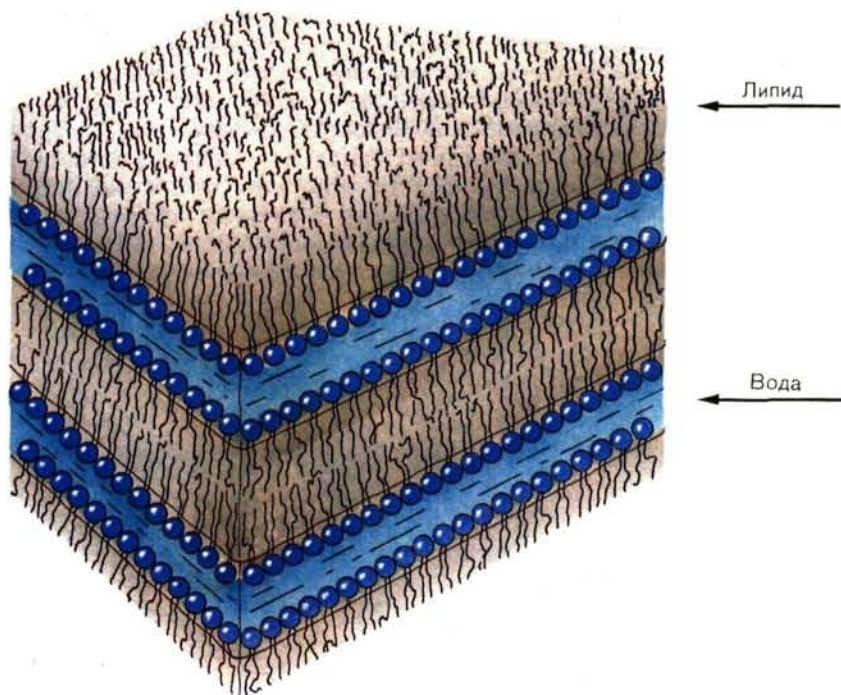


Рис. 293. Мультиламеллярное строение водно-липидных систем, образуемых протяженными бислоями.

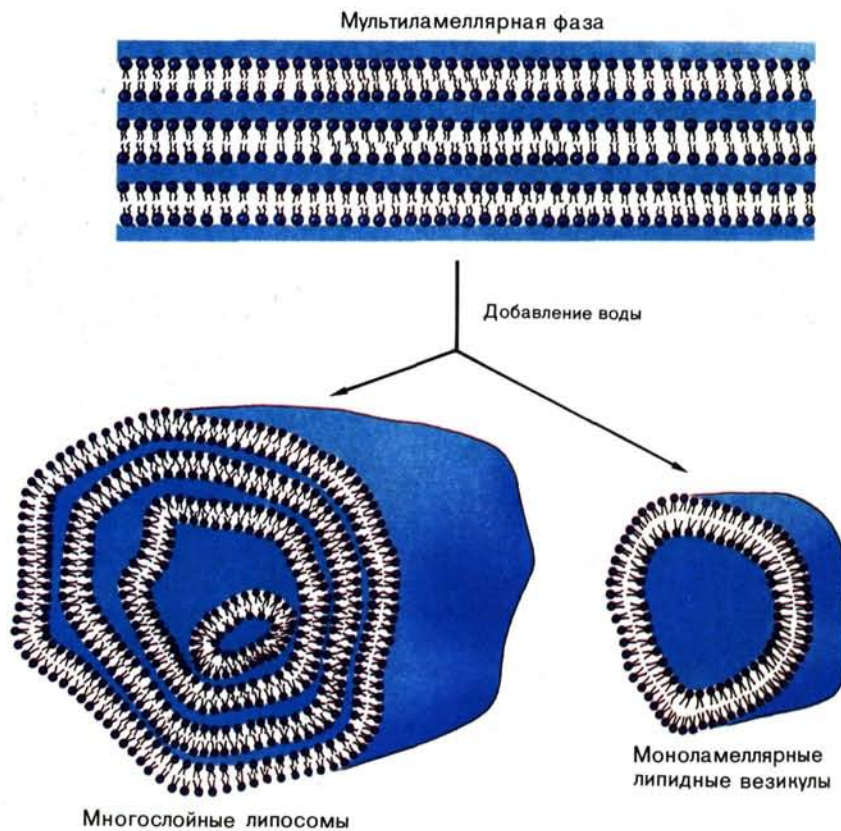
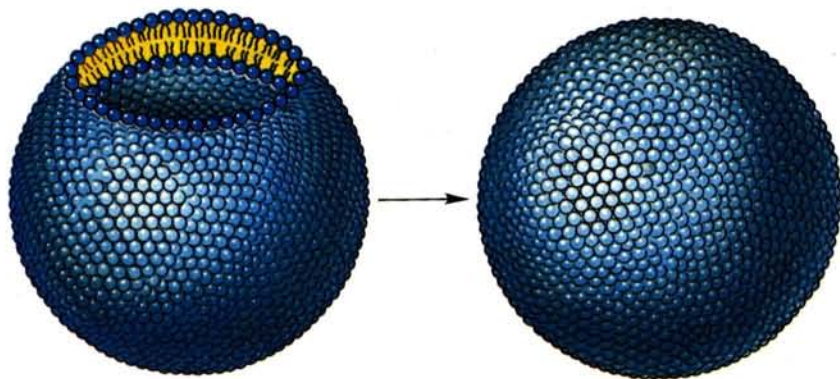


Рис. 294. Структуры, образуемые липидными бислоями в избытке воды.

При низком содержании воды (в случае фосфатидилхолина до 40% воды по массе) водно-липидная система существует в виде гомогенной фазы, имеющей ламеллярное (слоистое) строение. Она образована параллельно расположенными протяженными бислоями, отделенными друг от друга водными прослойками (рис. 293). При дальнейшем увеличении содержания воды система становится двухфазной, состоящей из фрагментов максимально гидратированной ламеллярной фазы в избытке воды. Эти фрагменты, получившие название липосомы (см. далее), представляют собой замкнутые многослойные макроструктуры, которые состоят из концентрических липидных бислоев, разделенных изолированными водными промежутками (рис. 294). В определенных условиях могут быть получены также монослойные липидные пузырьки (или везикулы); в них только один липидный бислой отделяет внутреннее водное содержимое от окружающей среды. Возможность замыкания бислоя самого на себя с образованием однослойных или многослойных везикулярных структур обеспечивается его эластичностью и гибкостью, а движущей силой этого процесса является стремление устранить энергетически невыгодный контакт воды с гидрофобными областями на краях незамкнутого бислоя.

Толщина липидного бислоя определяется прежде всего длиной углеводородных цепей и обычно варьирует в пределах 4—5 нм. Она зависит также от наличия двойных связей и боковых заместителей в цепи, т. е. в конечном счете от плотности упаковки липидных молекул в бислой. Присутствие в углеводородных цепях двойных связей в *цис*-конфигурации, боковых метильных групп и других



заместителей нарушает плотность упаковки молекул и приводит к уменьшению толщины бислоя. Внешним фактором, сильно влияющим на степень упорядоченности липидного бислоя, является температура.

В зависимости от температуры липидный бислой может находиться в двух основных фазовых состояниях — кристаллическом (или гелевом) и жидкокристаллическом. Нередко эти состояния называют «твердым» и «жидким», имея в виду, что физический смысл перехода между ними заключается в плавлении или замораживании углеводородных цепей липидных молекул. Переход бислоя из кристаллического в жидкокристаллическое состояние (и обратно) происходит при строго определенной температуре, характерной для



Чепмен [Chapman] Деннис (р. 1926), английский биофизик, работающий в области биофизической химии, член Лондонского Королевского общества. Известен работами по исследованию биофизических мембран, в частности по выяснению природы липид-липидных и липид-белковых взаимодействий.

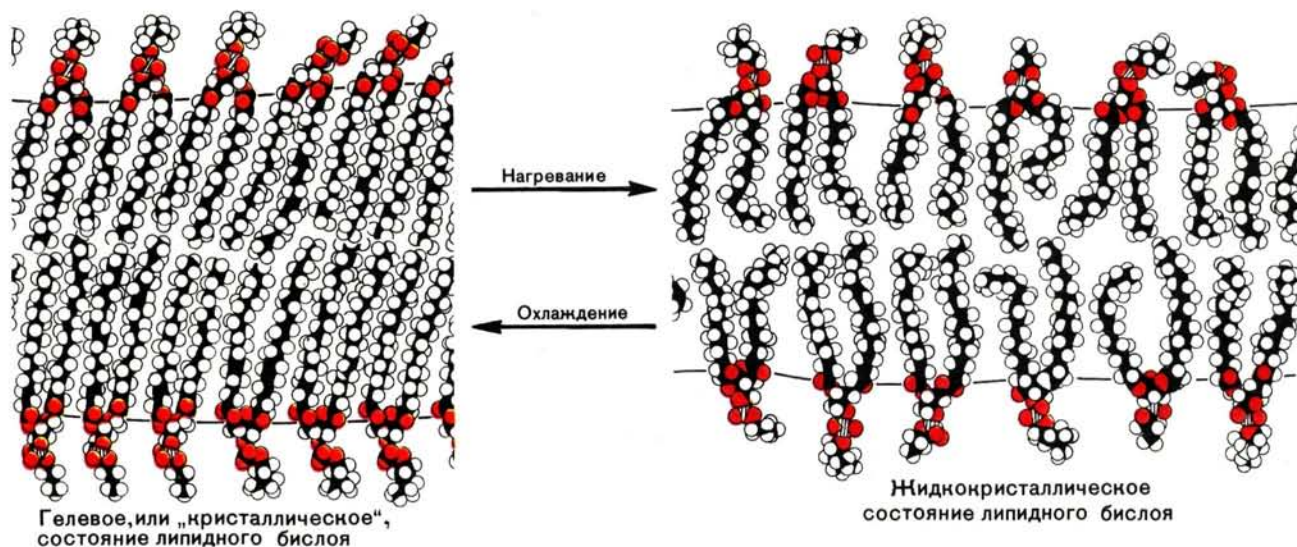
данного липида и называемой температурой фазового перехода гель—жидкий кристалл ($t_{п}$). Важную роль в изучении фазовых переходов в липидном бислое сыграл Д. Чепмен.

Таблица 24

Температура фазового перехода ($t_{п}$) для некоторых фосфолипидов

Длина ацильной цепи	Название фосфолипида	$t_{п}$ (°C)
12	Дилауроилфосфатидилхолин	0
14	Димиристоилфосфатидилхолин	23
16	Дипальмитоилфосфатидилхолин	41
18	Дистеароилфосфатидилхолин	58
18	1-Стеароил-2-олеоилфосфатидилхолин	2
18	Диолеоилфосфатидилхолин	-22
14	Димиристоилфосфатидилэтанолламин	51
16	Дипальмитоилфосфатидилэтанолламин	63
16	Дипальмитоилфосфатидилсерин	51

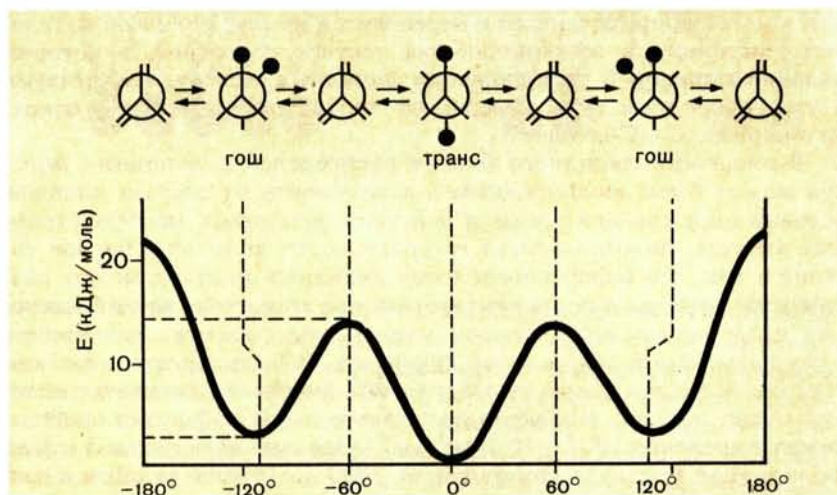
Температура фазового перехода зависит как от строения углеводородных цепей липидных молекул, так и от природы их полярных головок. Как правило, чем длиннее углеводородные цепи в молекуле, тем выше температура фазового перехода (табл. 24). В гомологичном ряду липидов $t_{п}$ обычно возрастает на 15—20 °C при увеличении длины насыщенной цепи на 2 метиленовых звена. Введение *цис*-этиленовой связи даже в одну углеводородную цепь липидной молекулы резко понижает температуру фазового перехода. Еще большее снижение $t_{п}$ происходит при введении *цис*-двойной связи в другую углеводородную цепь. При этом степень снижения $t_{п}$ зависит от положения двойной связи в цепи: наибольший эффект наблюдается, когда двойная связь занимает положение у девятого или десятого атома углеводородной цепи. Аналогичным образом влияет введение метильной группы в углеводородные цепи липидных молекул: $t_{п}$ сильнее всего снижается, если метильная группа находится в середине



цепи, но практически не меняется, когда разветвление происходит на ее конечном участке.

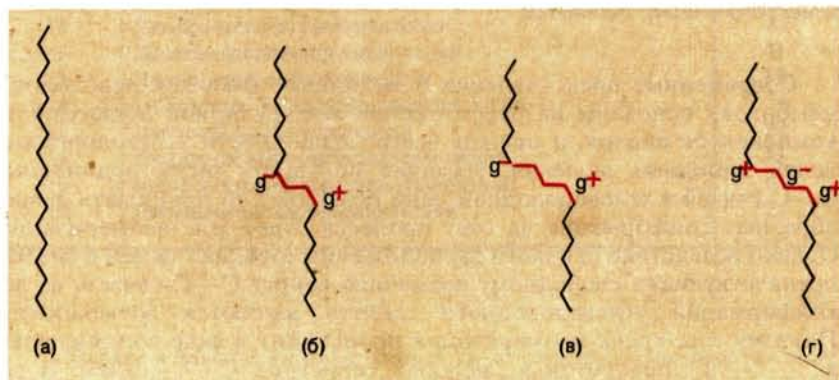
Различия в строении полярных головок липидных молекул также существенно сказываются на температуре фазового перехода. Например, при одних и тех же углеводородных цепях $t_{\text{п}}$ для фосфатидилхолина на 20°C ниже, чем для фосфатидилэтаноламина. В случае отрицательно заряженных фосфолипидов температура фазового перехода зависит от степени ионизации полярных групп (обычно $t_{\text{п}}$ падает по мере увеличения степени ионизации) и присутствия двухвалентных катионов (особенно Ca^{2+}) в водной среде (как правило, связывание Ca^{2+} повышает $t_{\text{п}}$). Изменения $t_{\text{п}}$ в зависимости от условий среды показывают, что температура не является единственным фактором, определяющим фазовое состояние липидного бислоя. Во многих случаях фазовые изменения могут происходить и при постоянной температуре за счет изменений pH, ионного состава среды, присутствия мембранотропных веществ, а также изменений липидного состава бислоя. О важности фазового состояния липидов для функционирования мембран свидетельствуют, например, многочисленные факты корреляции между $t_{\text{п}}$ мембранных липидов и активностью ряда мембраносвязанных ферментов.

Современные представления о механизме фазовых переходов в мембранах основаны на рассмотрении молекулярной подвижности компонентов бислоя, и прежде всего подвижности углеводородных цепей липидных молекул. Наличие большого числа ординарных C—C-связей в углеводородной цепи позволяет ей принимать разнообразные конформации за счет процесса *гош-транс*-изомеризации. Однако вследствие близкого расположения соседних цепей в бислое, препятствующих свободному вращению вокруг C—C-связей, не все конформации углеводородного скелета являются возможными. Поэтому *гош-транс*-изомеризация происходит в виде сопряженных $g^+ - t - g^-$ -поворотов в смежных сегментах C—C-связей. В результате на углеводородной цепи появляется ряд изгибов или изломов (кинков), в которых два *гош*-ротамера разделены одним, двумя, тремя и т. д. *транс*-сегментами (рис. 295). Углеводородная цепь средней длины (16—18 углеродных атомов) может содержать до 5 *гош*-ротамеров. Возникающие при этом кинки постоянно мигрируют вдоль цепи, что приводит к появлению в бислое дефектов упаковки липидных молекул. Аналогичное влияние на упаковку оказывают *цис*-этиленовые связи, присутствие которых приводит к образованию постоянного кинка в углеводородной цепи.



При температуре ниже t_n углеводородные цепи липидных молекул имеют максимально вытянутую трансoidную конформацию и находятся в состоянии наиболее плотной упаковки. Подвижность цепей в гелевой фазе бислоя очень ограничена, и они претерпевают лишь слабые торсионные колебания. Плавление углеводородных цепей во время фазового перехода сопровождается резким усилением их вращательной и колебательной подвижности за счет повышения вероятности *гош-транс*-изомеризации и, как следствие этого, возникновения кинков в цепях. Такие кинки воздействуют на

Рис. 295. Формирование кинков на углеводородной цепи вследствие сопряженных *гош/транс*-изомеризаций: (а) — полностью трансoidная конформация цепи; (б) — 2g1-кинк; (в) — 2g2-кинк; (г) — 3g2-кинк.



структуру бислоя, вызывая укорочение цепей и увеличение расстояния между отдельными липидными молекулами. Результатом этого является уменьшение толщины бислоя, сопровождающееся его латеральным растяжением (рис. 296). Например, появление 2 кинков в каждой ацильной цепи фосфолипидной молекулы уменьшает толщину бислоя на 0,7 нм и увеличивает площадь, приходящуюся на одну молекулу, примерно на 0,22 нм². Таким образом, вследствие возрастания подвижности углеводородных цепей при температурах выше температуры фазового перехода липидный бислой становится менее упорядоченным и переводится из твердообразного гелевого состояния в жидкоподобное, текучее состояние, в котором дальний порядок в расположении липидных молекул отсутствует, а углеводородные цепи совершают хаотические движения вокруг ординарных С—С-связей.

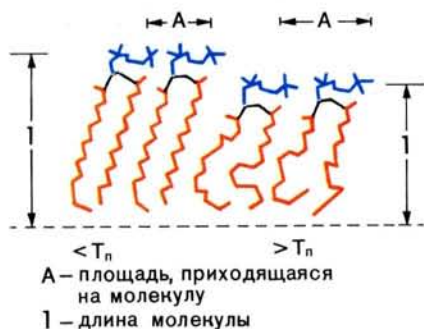


Рис. 296. Влияние фазового перехода на упаковку молекул в бислой.

В плоскости липидного бислоя распределение липидных молекул может быть неоднородным в зависимости от состава липидов, условий окружающей среды и действия различных мембранотропных агентов. Важный аспект гетерогенности липидов в бислое состоит в том, что перераспределение липидных молекул между различными доменами подразумевает их способность к легкой миграции вдоль поверхности бислоя или, иными словами, способность к так называемой латеральной диффузии. В жидкокристаллическом состоянии бислоя скорость латеральной диффузии липидных молекул очень высока. Коэффициент латеральной диффузии липидов лежит в пределах 10^{-9} — 10^{-7} см² · с⁻¹. Это означает, что за 1 с фосфолипидная молекула совершает от 1000 до 100 000 скачков с размером шага, равным ее поперечнику (~ 1 нм). Скорость латераль-

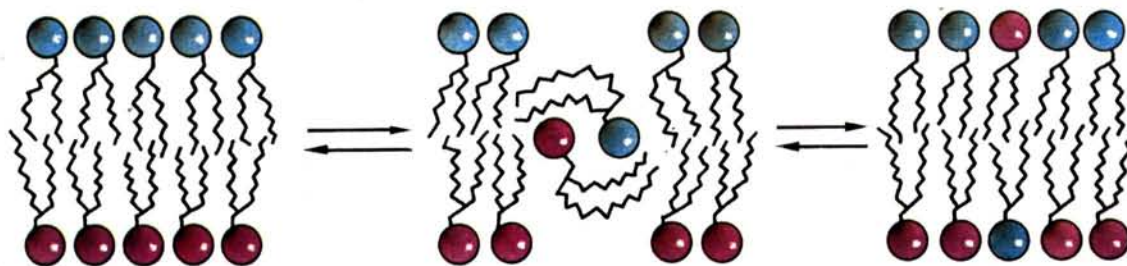
ной диффузии липидных молекул резко падает при переходе бислоя из жидкокристаллического в гелевое состояние.

В отличие от латеральной диффузии, миграция липидов с одной стороны бислоя на другую обычно происходит чрезвычайно медленно. Этот процесс получил в литературе название «флип-флоп» (рис. 297). Скорость латеральной диффузии и флип-флопа липидов была впервые измерена Р. Д. Корнбергом и Г. М. Мак-Коннелом в 1971 г. Полупериод флип-флопа составляет величины порядка нескольких часов или даже дней, т. е. фосфолипидной молекуле для пересечения бислоя толщиной в 4—5 нм понадобится целый день, тогда как в ходе латеральной диффузии она преодолевает это расстояние за $\sim 2,5$ мкс. Причина исключительно медленного флип-флопа заключается в его энергетической невыгодности, так как требуется перенести полярную головку фосфолипидной молекулы через гидрофобную область бислоя. Однако в ряде случаев скорость флип-флопа может значительно возрасти под действием ряда факторов, таких, как необычная структура липида, неустойчивое фазовое состояние бислоя или присутствие в нем молекул, облегчающих перенос полярной головки липидной молекулы через гидрофобную среду.

С трансмембранной миграцией липидов тесно связан вопрос об их распределении между двумя сторонами бислоя. В результате замыкания бислоя в везикулярные структуры обе его поверхности становятся топологически неэквивалентными: наружная поверхность бислоя в таких структурах контактирует с окружающим водным раствором, а внутренняя ограничивает собственный водный объем везикул. Более того, обе поверхности отличаются по своей кривизне — наружная является выпуклой, а внутренняя — вогнутой. Все это приводит к тому, что условия, в которых находятся липидные молекулы на разных сторонах бислоя, значительно различаются по таким параметрам, как плотность упаковки молекул, ионный состав среды, рН, наличие или отсутствие каких-либо мембрано-



Мак-Коннел (McConnell) Гарден Мерсен (р. 1927), американский физикохимик. Образование получил в университете Дж. Вашингтона в Сент-Луисе и Калифорнийском технологическом институте в Пасадене, с 1964 г. работает в Стэнфордском университете. Основные работы — по применению методов ЭПР и ЯМР в химии и исследованиях мембран и рецепторов. Связал спектры ЭПР сверхтонкой структуры с распределением спиновой плотности неспаренных электронов по углеродным атомам молекулы (1956, уравнение Мак-Коннелла).



активных веществ и др. В результате состав липидов на наружной стороне бислоя может быть иным, чем на внутренней. Это явление, известное под названием «топологической асимметрии липидов», действительно имеет место в случае везикулярных липидных мембран. Факторы, влияющие на трансмембранное распределение липидных компонентов, весьма разнообразны, и изучение их в липидных бислоях способствует пониманию механизмов формирования топологически асимметричных биологических мембран.

Рис. 297. Асимметричное распределение и флип-флоп липидных молекул в бислое.

Модельные мембраны

Бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ), называемые также бислойнными или «черными» липидными мембранами, представляют собой широко используемую экспериментальную модель, которая позволяет воспроизводить в искусственных условиях многие свойства и характеристики биологических мембран. Структурной

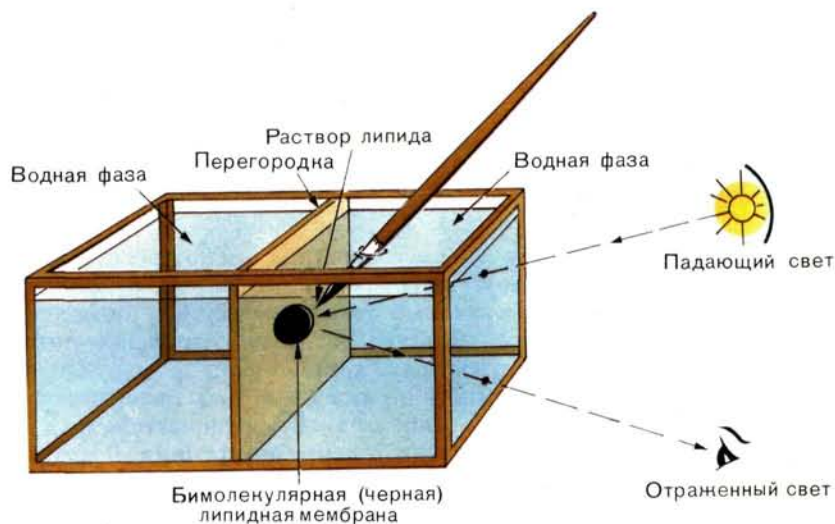
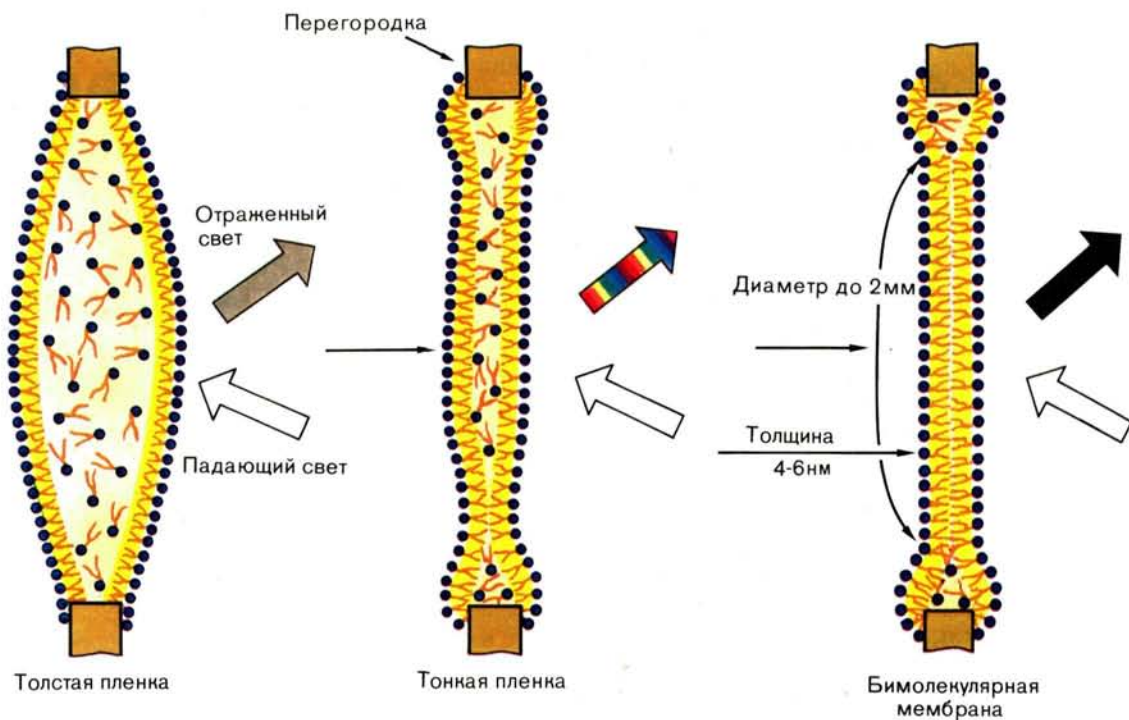


Рис. 298. Процесс формирования БЛМ.



основой таких мембран является одиночный липидный бислой, разделяющий две водные фазы и прикрепленный по периметру к инертной подложке из гидрофобного материала типа полиэтилена или тефлона. Самопроизвольное образование мембраноподобной пленки на небольшом отверстии в перегородке, разделяющей два водных отсека, было впервые описано американским ученым П. Мюллером в 1962 г.

Предложенный П. Мюллером с сотрудниками способ формирования бислойных мембран технически прост. Капельку раствора липида в органическом растворителе с помощью кисточки наносят под водой на отверстие диаметром 1—2 мм, сделанное в тонкой тефлоновой перегородке. Образующаяся при этом пленка сначала является довольно толстой и в отраженном свете имеет серый оттенок. Затем за счет действия сил поверхностного натяжения она в течение нескольких минут становится все тоньше и тоньше, приобретая вследствие интерференции света яркую, постоянно меняющуюся радужную окраску. В этот момент пленка имеет толщину в пределах 100—600 нм. Наконец на пленке появляются сначала отдельные черные пятна, а затем она вся становится «черной» (рис. 298). Это происходит за счет смыкания двух липидных монослоев в один протяженный бислой, который вследствие своей малой толщины практически утрачивает отражательную способность по отношению к видимому свету. В процессе формирования бислоя органический растворитель выдавливается к краям отверстия, где он образует визуально легко наблюдаемый толстый слой. Следует отметить, что образовавшаяся липидная пленка не является идеально бимолекулярной. Она все еще содержит довольно значительное количество остаточного растворителя, который собирается в средней области бислоя в отдельные микролинзы (рис. 299).

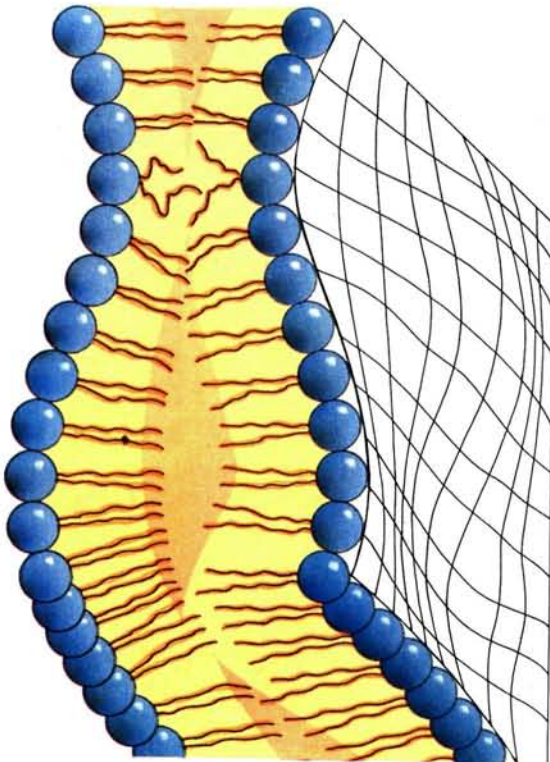


Рис. 299. Микролинзы растворителя в гидрофобной области БЛМ.

Можно, однако, приготовить так называемые «сухие» бислойные мембраны, не содержащие органического растворителя, путем механического приведения в соприкосновение двух мономолекулярных слоев, образуемых липидом на границе раздела вода — воздух. Этот способ впервые был предложен японскими исследователями (М. Такаги и сотр., 1965) и впоследствии был усовершенствован М. Монталом (1972—1974). Важным преимуществом метода формирования БЛМ по М. Монталу является возможность получения асимметричных мембран из исходных монослоев разного липидного состава (рис. 300).

Для формирования бимолекулярных липидных мембран могут быть использованы в чистом виде или в смеси практически любые липиды. В первых работах мембраны приготавливали из плохо охарактеризованных тканевых липидных экстрактов и затем получали их из индивидуальных липидов, как природных, так и синтетических. При формировании БЛМ по методу П. Мюллера применяется широкий набор различных растворителей, однако наилучшие результаты дает использование высших нормальных алканов, таких, как *n*-декан или *n*-тетрадекан.

Несмотря на кажущуюся простоту приготовления БЛМ, работа с ними требует от экспериментатора большого мастерства, терпения и настойчивости. Существенной является проблема стабильности бислойных мембран, так как рано или поздно, а чаще всего в самый неподходящий момент любая мембрана лопается. Время жизни

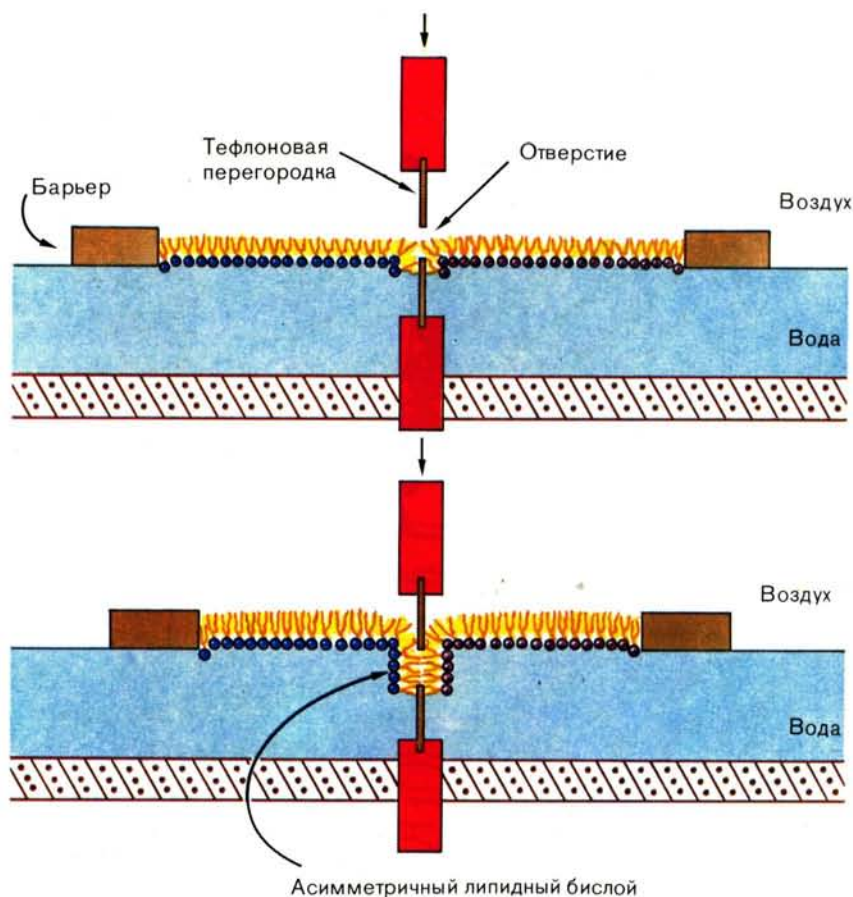


Рис. 300. Схема формирования БЛМ из двух монослоев.

мембран обычно варьирует от нескольких минут до 1—3 ч. Нестабильность бислоевых мембран вызывают разнообразные факторы, такие, как наличие нежелательных примесей в образце, окисление липидов, загрязнение оборудования и посуды, неподходящий для формирования растворитель, колебания температуры, вибрация, резкие перепады концентрации и вязкости среды и т. д. Тем не менее образующийся липидный бислой обладает исключительно высокой механической прочностью и эластичностью. Бислоевые мембраны выдерживают осторожное прикосновение стеклянной палочки, несколько прогибаясь при ее нажиме. Они легко деформируются под действием механического или осмотического давления, переходя при этом из плоской конфигурации в полусферу и обратно. Можно даже выдувать из бислоя так называемые сферические бислои, которые представляют собой пузырьки довольно большого размера с площадью поверхности до 50 мм^2 (рис. 301). Более того, липидный бислой такого пузырька или плоской мембраны можно проткнуть волосом, тонкой проволокой или кончиком стеклянного микроэлектрода и вынуть их обратно, не вызвав разрушения мембраны. Таким образом, липидный бислой обладает не только высокой прочностью, но и способностью к «самозалечиванию» его повреждений.

БЛМ отличаются также исключительно высокой устойчивостью к кратковременному действию сильного электрического поля. Электрический пробой мембраны происходит при потенциале около

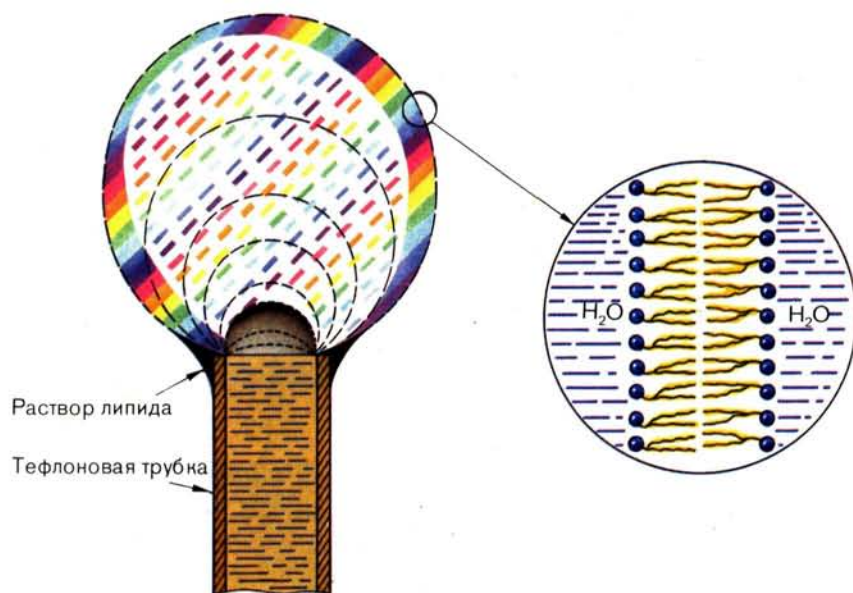


Рис. 301. Образование сферической БЛМ.

$4 \cdot 10^5 \text{ В/см}$. По своим диэлектрическим свойствам липидный бислой не уступает лучшим из известных в настоящее время изоляторов, таким, как, например, твердый парафин, циркониевый фарфор или поливинилхлорид. При этом, в отличие от пробоя в твердых телах, действие электрического поля на бислой является обратимым: после снятия поля мембрана полностью восстанавливает свои функции.

Какие характеристики липидного бислоя можно изучать, используя БЛМ как мембранную модель? На рисунке 302 показана схема экспериментальной установки, обычно применяемой для проведения измерений на бислойных мембранах. Лучше всего эта модельная система подходит для измерения электрических характеристик липидного бислоя, таких, как электрическая емкость, проводимость, потенциал пробоя, мембранные потенциалы и др. Именно благодаря возможности проведения разнообразных электрических измерений БЛМ сыграли исключительно важную роль в изучении ионного транспорта через биологические мембраны. В таблице 25 сравниваются некоторые физические характеристики БЛМ и биологических мембран.

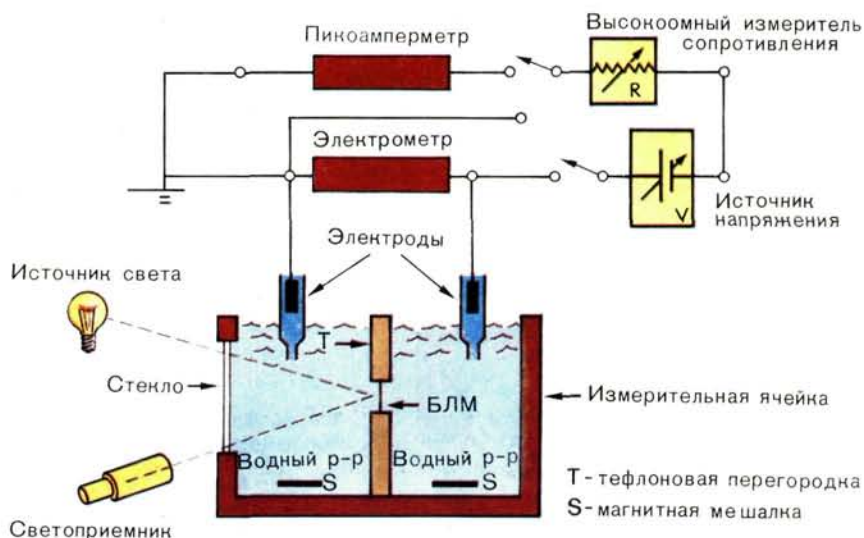


Рис. 302. Схема экспериментальной установки для изучения БЛМ.

Таблица 25

Сравнение некоторых свойств искусственных бислойных и биологических мембран

Свойства	Бислойные мембраны	Биологические мембраны
Толщина (нм)	4 – 9	4 – 13
Электрическое сопротивление (Ом · см ²)	10 ⁶ – 10 ⁹	10 ² – 10 ⁵
Электрическая емкость (мкФ · см ⁻²)	0,33 – 1	0,5 – 1,3
Потенциал пробоя (В/см)	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ² – 10 ⁵
Поверхностное натяжение (мН · м ⁻¹)	0,5 – 2	0,03 – 1
Проницаемость (мкм · с ⁻¹ · 10 ²)		
вода	31,7	0,37 – 400
мочевина	4,2	0,015 – 280
глицерин	4,6	0,003 – 27
эритрит	0,75	0,007 – 5

Включение мембранных белков в бимолекулярные липидные мембраны открывает новые перспективы на пути дальнейшего сближения этой модельной системы с биологическими мембранами. В качестве примера успешной реконструкции функционально активных бислоевых мембран можно привести слияние белок-содержащих липосом с уже сформированными мембранами в условиях осмотического стресса или под действием ионов Ca^{2+} и других агентов, облегчающих слияние мембран (рис. 303).

Таким образом, возможности практического использования бислоевых мембран в различных исследованиях весьма широки и перспективы их применения непрерывно растут. Следует также указать на реальную возможность создания на основе бислоевых мембран биосенсорных устройств. Можно ожидать, что созданные на этом принципе устройства будут обладать высокими технологическими параметрами, легкостью использования, портативностью, биосовместимостью и дешевизной.

Липосомы. Другой модельной системой, хорошо воспроизводящей многие свойства биологических мембран, являются *липосомы*. На возможность использования липосом в качестве моделей биологических мембран впервые обратил внимание А. Бэнгхем. В 1965 г. он показал, что фосфолипиды при набухании в воде самопроизвольно образуют пузырькообразные частицы, которые состоят из множества замкнутых липидных бислоев, разделенных водными промежутками. Использование липосом в качестве модельных систем оказалось исключительно плодотворным и позволило выяснить целый ряд вопросов, касающихся молекулярной организации и функционирования биологических мембран.

В зависимости от размера частиц и числа образующих их липидных слоев липосомы подразделяются на три основных типа:

- многослойные (мультиламеллярные) липосомы, имеющие диаметр 5—10 мкм и насчитывающие до нескольких десятков, а то и сотен липидных бислоев;

- малые моноламеллярные липосомы, образованные одинарным липидным бислоем и имеющие диаметр в пределах 20—50 нм;

- крупные моноламеллярные липосомы, также образованные одинарным бислоем, с диаметром обычно от 50 до 200 нм, а иногда и более.

Многослойные липосомы (рис. 304), как правило, легко образуются при простом механическом встряхивании водной дисперсии набухшего липида. При этом получается гетерогенная взвесь липо-

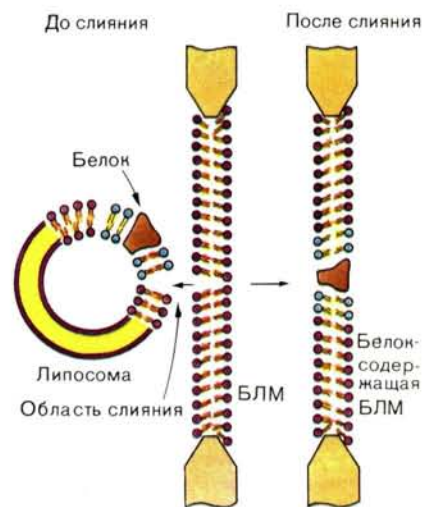


Рис. 303. Образование белоксодержащих БЛМ путем слияния липосом с плоским бислоем.

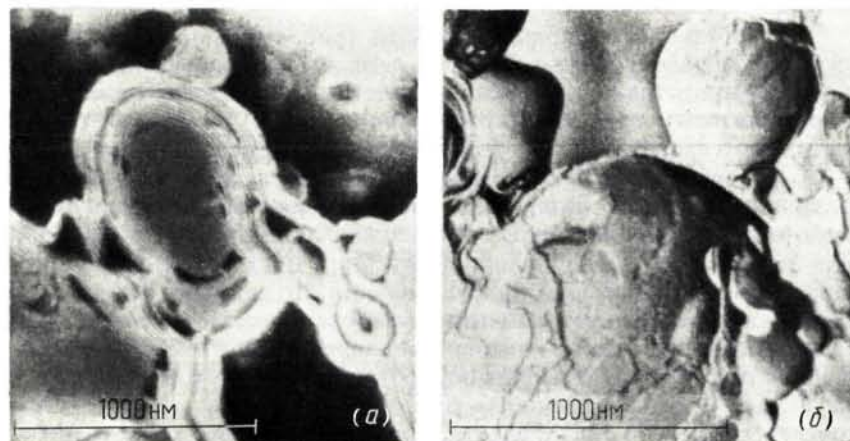


Рис. 304. Микрофотографии многослойных липосом, образовавшихся из фосфатидилхолина: (а) — негативное контрастирование молибдатом аммония; (б) — «замораживание — скалывание» (см. с. 583).



Бэнгхем (Bangham) Алек Д. (р. 1921), английский биофизик. Окончил Лондонский университет (1944), с 1952 г.— в Институте физиологии животных в Бабрахаме. Основные работы — по изучению физики и химии клеточной поверхности, явлений адгезии и слияния клеток, свойств фосфолипидов и модельных мембран. Впервые предложил использовать липосомы в качестве моделей биологических мембран.

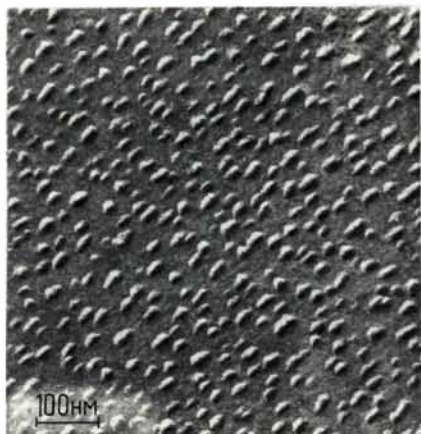


Рис. 305. Микрофотография малых монослойных липосом, приготовленных из фосфатидилхолина обработкой ультразвуком (негативное контрастирование фосфовольфрамом калия).

сом с широким распределением частиц по размерам. Сравнительно гомогенную дисперсию липосом можно получать, пропуская их через фильтры с определенным размером пор. Способность фосфолипидов к диспергированию в водной среде с образованием липосом зависит от температуры фазового перехода липида. Так, липосомы легко получаются из ненасыщенных фосфолипидов, которые при обычных температурах находятся в жидкокристаллическом состоянии. В то же время фосфолипиды с насыщенными жирнокислотными остатками образуют липосомы только при температурах, превышающих температуру их фазового перехода. Существенную роль играет также природа полярной группы фосфолипида. Например, фосфатидилэтаноламин не дает замкнутых бислоев при диспергировании в солевых растворах при нейтральных рН. Это объясняется слабой гидратацией полярных групп фосфатидилэтаноламина вследствие образования солевой связи между аминоклассами и фосфатными группами соседних молекул. Однако липосомы удается получить, если диспергирование фосфатидилэтаноламина проводить в растворах с низкой ионной силой и при высоких значениях рН или диспергировать фосфатидилэтаноламин в смеси с фосфатидилхолином.

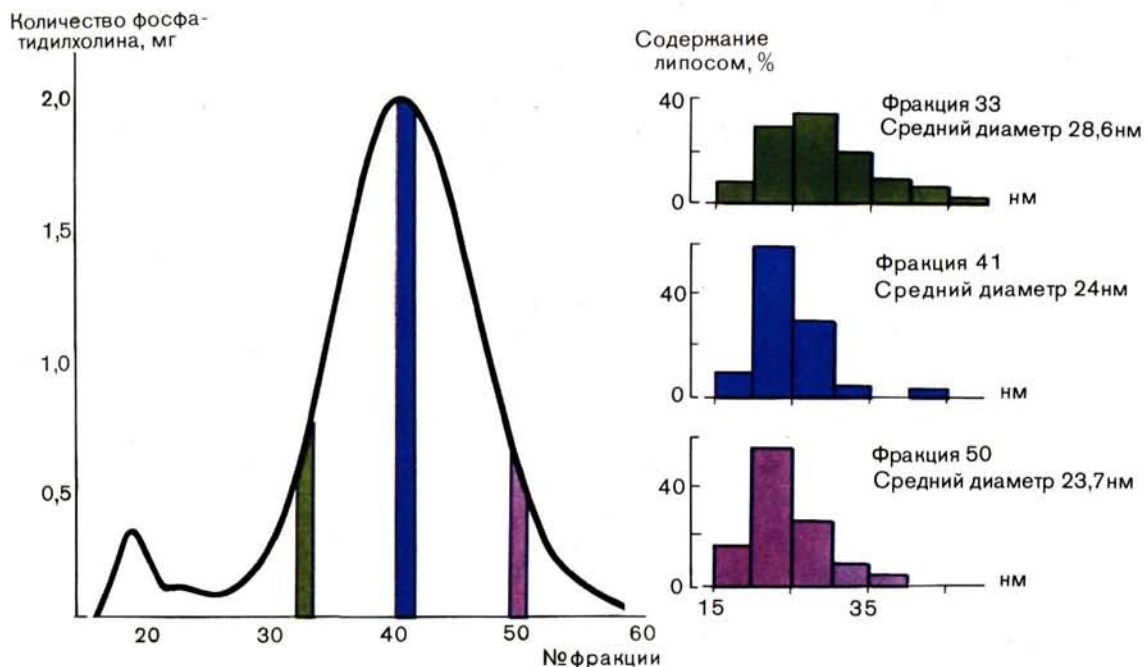
По данным рентгеноструктурного анализа общая толщина липидного бислоя в многослойных липосомах из яичного фосфатидилхолина составляет 4 нм, а толщина его диглицеридной части равна 3 нм. Площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфатидилхолина в липосомальном бислое, составляет около $0,72 \text{ нм}^2$, что соответствует площади в фосфатидилхолиновом монослое, сжатом до давления $2,0\text{—}2,5 \cdot 10^{-4} \text{ н/см}$. Толщина водного промежутка между двумя соседними липидными бислоями составляет около 2—3 нм, но может возрастать до 20 нм и более в случае заряженных бислоев. Соответственно увеличивается и суммарный внутренний водный объем липосом. В среднем объем водной фазы многослойных липосом обычно составляет около 20—40% от их общего объема. В расчете на 1 моль липида ($\sim 1000 \text{ г}$) многослойные липосомы могут включать от 1 до 4 л воды.

Большая часть внутренней воды многослойных липосом осмотически активна, благодаря чему они обладают свойствами идеального осмометра, меняя свой объем в ответ на изменение концентрации наружного раствора. В гипотонических растворах вода устремляется внутрь липосом и они быстро набухают. В гипертонических средах липосомы «сморщиваются» за счет потери воды из межламеллярного пространства. Однако часть воды в липосомах остается осмотически неактивной. Например, у яичного фосфатидилхолина на 1 молекулу липида приходится около 25 молекул осмотически неактивной воды, что отвечает минимальной ширине межламеллярного пространства в 1,2—1,4 нм.

Малые монослойные липосомы (рис. 305) могут быть получены при обработке многослойных липосом ультразвуком. Другие способы приготовления малых липосом включают инъекцию (впрыскивание) спиртовых растворов липидов в водную среду, экструзию (продавливание) водных липидных дисперсий под большим давлением в так называемом прессе Френча, а также удаление солибилизирующего детергента диализом или гель-фильтрацией. Гомогенную фракцию малых липосом удается выделить при их гель-фильтрации на крупнопористых агарозных гелях (рис. 306) либо с помощью ультрацентрифугирования. По данным светорассеяния, аналитического ультрацентрифугирования и электронной микроскопии, средний диаметр монослойных липосом, полученных из яичного фосфатидилхолина обработкой ультразвуком, составляет 25 нм, а их молекулярная масса равна $1,5 \cdot 10^6$ — $2,1 \cdot 10^6$. Это соответствует 2—3 тыс. молекул фосфатидилхолина на одну липо-

сому. Диаметр внутренней водной полости малых липосом составляет 7—8 нм. Удельный водный объем малых липосом сравнительно невелик и составляет всего 0,2—1,5 л/моль липида. В отличие от многослойных малые моноламеллярные липосомы не проявляют осмотической активности.

Размер липосом, получаемых обработкой ультразвуком, зависит от природы используемого липида. В случае кислых фосфолипидов (например, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и др.) образуются, как правило, липосомы меньшего размера (диаметр около 20 нм). Размер однослойных липосом также уменьшается по мере снижения длины жирнокислотных цепей фосфолипидных молекул. Напротив, включение холестерина в липосомы приводит к увеличению их диаметра до 35—40 нм.



Вследствие того что размеры малых липосом по порядку величины сравнимы с толщиной образующего их липидного бислоя, имеются значительные различия в расположении и характере упаковки липидных молекул на наружной и внутренней сторонах мембраны. Прежде всего это проявляется в различном количестве молекул на обеих сторонах бислоя: в липосомах диаметром 20—25 нм наружный монослой содержит примерно вдвое больше липидных молекул, чем внутренний. Впервые такое различие удалось показать в 1969 г. В. Ф. Быстрову и Л. И. Барсукову с помощью предложенного ими метода ЯМР с использованием гидрофильных парамагнитных зондов, сдвигающих или уширяющих сигналы от молекул на наружной стороне бислоя (рис. 307). Метод оказался также весьма полезным в установлении факта спонтанно возникающей асимметрии липидного бислоя в малых липосомах. В зависимости от размера полярных групп, их заряда, а также от длины и степени ненасыщенности углеводородных цепей наружный и внутренний монослои малых везикул могут значительно различаться по своему липидному составу (рис. 308). Как правило, на наружной стороне бислоя находятся преимущественно те липиды, которые имеют более крупную полярную головку, нескомпенсированный заряд, а также более длинные насыщенные углеводородные цепи. Липидные молекулы с более короткими или ненасыщенными жирнокислотными остатками располагаются предпочтительно во внутренней половине бислоя.

Рис. 306. Элюирование малых моноламеллярных липосом на колонке с 2%-ным гелем агарозы.

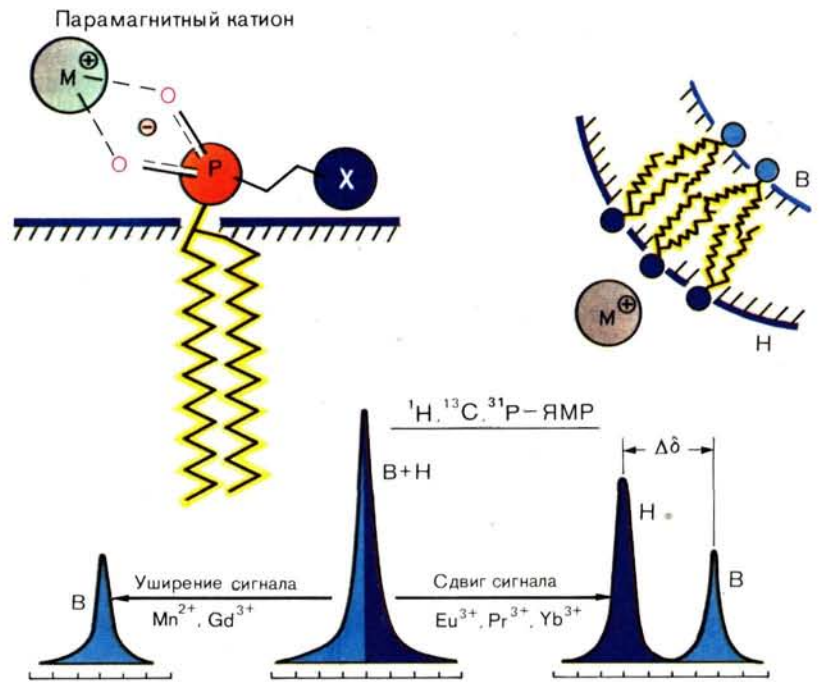


Рис. 307. Дифференциация наружной и внутренней сторон бислоя методом ЯМР (В — внутренний, Н — наружный).

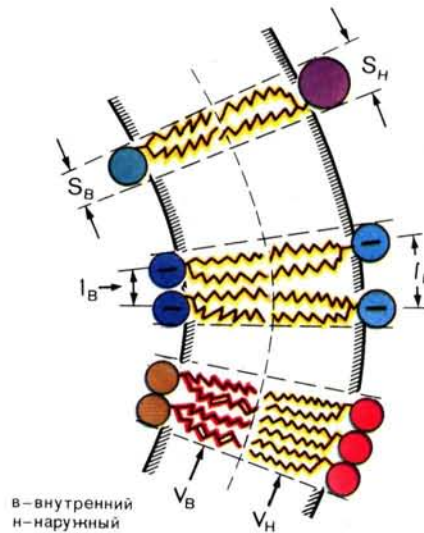


Рис. 308. Асимметрия липидного бислоя на участках большой кривизны:
 S — площадь, приходящаяся на одну липидную молекулу на границе раздела мембрана — вода;
 l — расстояние между полярными головками соседних липидных молекул;
 V — объем, занимаемый углеводородными цепями липидных молекул.

Липидные дисперсии, состоящие из малых мономеллярных липосом, как правило, отличаются высокой устойчивостью к агрегации и не коагулируют в течение длительного времени. Поэтому эти дисперсии оказались весьма подходящими объектами для исследования различными спектральными методами. Недостатком малых липосом является небольшой внутренний объем, что ограничивает возможности их применения для моделирования транспортных функций мембранных систем.

Этого недостатка лишены большие моноламеллярные липосомы (рис. 309), которые в настоящее время широко используются для реконструкции различных систем мембранного транспорта. По своим свойствам они занимают промежуточное положение между малыми моноламеллярными липосомами и многослойными липосомами. Как и последние, большие моноламеллярные липосомы имеют значительный внутренний удельный водный объем (8—14 л/моль липида) и обладают осмотической активностью. В то же время к ним применимы многие спектральные методы, что позволяет более полно охарактеризовать свойства образующего их липидного бислоя. Методы получения крупных моноламеллярных и малых липосом во многом сходны. Они включают, например, удаление солибилизирующего детергента в условиях контролируемого диализа, а также инъекцию раствора липида в легколетучем растворителе (диэтиловый эфир, петролейный эфир, пентан) в подогретую до 60 °С водную фазу (метод обращенно-фазового упаривания). Крупные однослойные липосомы могут быть также получены из малых липосом путем их слияния под действием ионов Ca^{2+} или в условиях термотропного фазового перехода.

В процессе приготовления липосом в их внутренний водный объем включаются те вещества, которые содержатся в исходном водном растворе. Обмен этими веществами между липосомами и окружающей средой связан с их прохождением через липидный бислой, являющийся диффузионным барьером, вследствие чего липосомы широко используются для выяснения барьерной функции липидов и для моделирования различных транспортных процессов.

Существующие методы изучения проницаемости липосом можно разделить на две группы: 1) методы, основанные на прямом измерении количества какого-либо вещества, вышедшего из липосом за определенный промежуток времени; 2) методы, основанные на осмотических свойствах липосом. Наибольшее распространение получил метод прямого измерения концентрации диффундирующего вещества. Этот метод сравнительно прост в техническом отношении и особенно пригоден для веществ, имеющих низкую проницаемость, например для неорганических катионов и анионов, глюкозы, аминокислот и т. д. Обычно используются соединения, меченные радиоактивными изотопами: соли, содержащие $^{22}\text{Na}^+$, $^{24}\text{Na}^+$, $^{42}\text{K}^+$, $^{36}\text{Cl}^-$, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ или органические соединения, меченные ^{14}C или ^3H .

Как модели, липосомы значительно ближе к биологическим мембранам, чем бислоиные липидные пленки. Как и биологические мембраны, они представляют собой замкнутые системы, что делает их пригодными для изучения пассивного транспорта ионов и малых молекул через липидный бислой. В отличие от БЛМ, липосомы достаточно стабильны и не содержат органических растворителей. Состав липидов в липосомах можно произвольно варьировать и таким образом направленно изменять свойства мембраны. В настоящее время хорошо разработаны методы включения функционально-активных мембранных белков в липосомы. Такие искусственные белково-липидные структуры обычно называются *протеолипосомами* (рис. 310). Благодаря возможности реконструкции мембраны из ее основных компонентов удается моделировать ферментативные, транспортные и рецепторные функции клеточных мембран. В липосомы можно ввести антигены, а также ковалентно присоединить антитела (рис. 311) и использовать их в иммунологических исследованиях. Они представляют собой удобную модель для изучения действия многих лекарственных веществ, витаминов, гормонов, антибиотиков и т. д. Как уже отмечалось, при образовании липосом водорастворимые вещества захватываются вместе с водой и попадают во внутреннее пространство липосом. Таким путем можно «начинать» липосомы различными веществами, включая

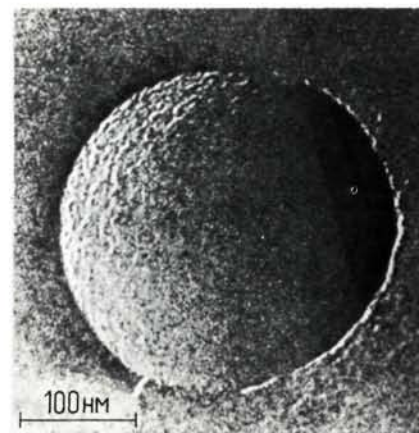


Рис. 309. Микрофотография сколов крупных моноламеллярных липосом, полученных из азолектина удалением хлорида натрия диализом. Оттенение Pt—С.

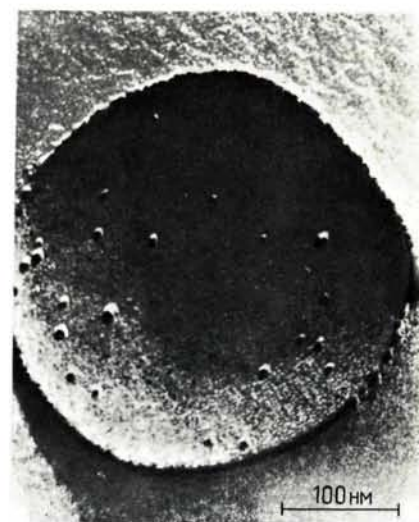


Рис. 310. Микрофотография сколов реконструированных протеолипосом, содержащих Na^+ , K^+ -АТФазу почечки свиньи. Оттенение Pt—С.

лекарственные препараты, пептиды, белки и даже нуклеиновые кислоты и их фрагменты.

В настоящее время во многих лабораториях мира ведутся интенсивные работы по выяснению возможностей медицинского применения липосом в качестве средства доставки различных лекарственных препаратов в определенные органы и ткани с целью воздействия на целый организм. По-видимому, наиболее интересные

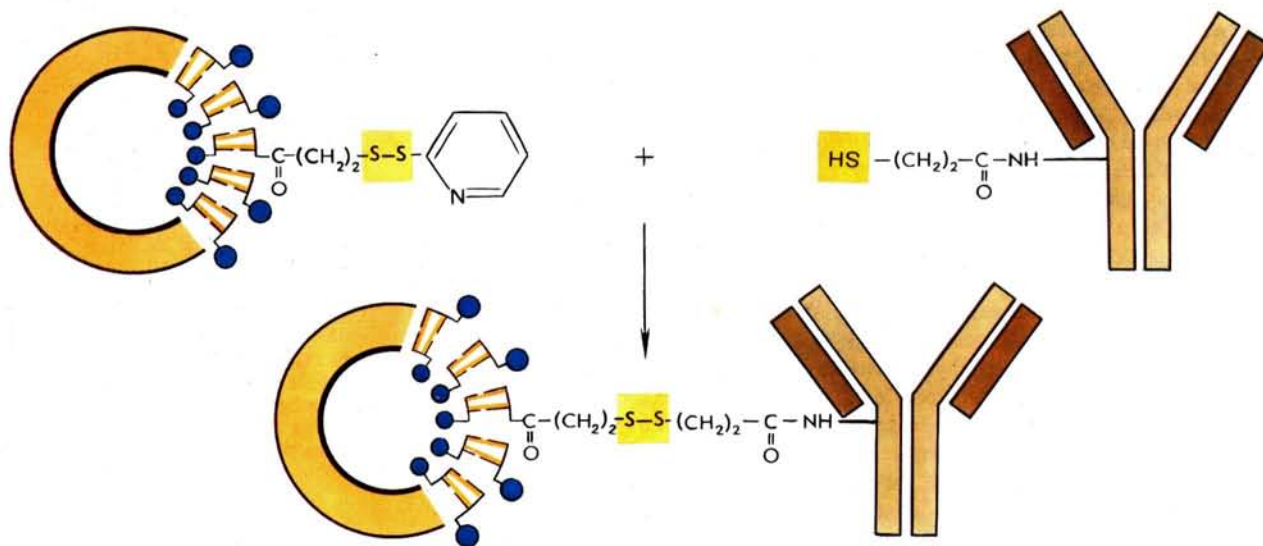


Рис. 311. Ковалентное присоединение антител к липосомам.

перспективы практического применения липосом связаны с химиотерапией рака, лечением диабета, артрита и лейшманиоза, коррекцией ферментной недостаточности и исправлением дефектов клеточных мембран, модификацией иммунного ответа организма, а также с введением РНК и ДНК в клетки для решения проблем генной инженерии и биотехнологии.

Молекулярная организация биологических мембран

В стремлении понять то, как устроены биологические мембраны, многие исследователи давно пытались свести все разнообразие различных мембранных систем к одной универсальной модели, которая объясняла бы имеющиеся экспериментальные факты. Однако возникновение новых методов открывало неизвестные ранее стороны в функционировании и структуре мембран и приводило к рождению новых идей и концепций.

Первые представления о структуре биологических мембран, по-видимому, следует связывать с предположением Э. Овертона о том, что мембрана должна иметь липидную природу (1899). В 1925 г. голландские исследователи Э. Гортер и Ф. Грендель измерили площадь, занимаемую в монослое липидами, экстрагированными из мембраны эритроцитов, и пришли к выводу, что количества липидов, имеющихся в одной клетке, достаточно для образования по всей ее поверхности сплошного слоя толщиной в две молекулы. На основании этого они высказали гипотезу, что клеточная мембрана представляет собой двойной липидный слой, в котором гидрофильные группы липидных молекул локализованы на поверхности, а углеводородные цепи образуют гидрофобную внутреннюю область. Несмотря на то что в работе были допущены методические ошибки, представление о липидном бислое как о полупроницаемом барьере, окружающем клетку, захватило воображение биологов того времени и дало мощный толчок развитию дальнейших исследований.

Мысль о том, что с мембранами связаны белки, высказал впервые Дж. Даниелли в 1935 г. в связи с необходимостью объяснить явное расхождение между поверхностным натяжением на границе раздела масло — вода и мембрана — вода. Хотя в то время какая-либо информация о мембранных белках отсутствовала, Дж. Даниелли и Х. Давсон в том же 1935 г. выдвинули гипотезу об общем принципе структурной организации клеточных мембран, в соответствии с которым мембрана представляется как трехслойная структура (рис. 312) — своеобразный сэндвич, где двойной слой ориентированных одинаковым образом липидных молекул заключен между двумя слоями глобулярного белка, формирующего границу мембраны с водой. Предполагалось, что в этой структуре связывание липидов с белками осуществляется за счет полярных взаимодействий. Поскольку толщина мембраны в то время не была известна, считалось, что пространство между двумя липидными монослоями может быть заполнено липоидным, жироподобным материалом.

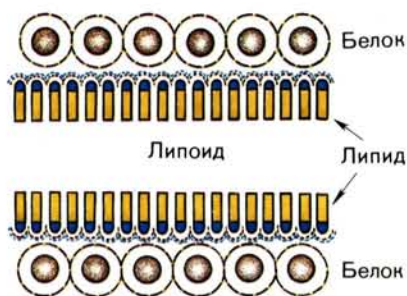


Рис. 312. Модель Даниелли — Давсона.

Впоследствии Дж. Даниелли в совместной работе с В. Стейном (1956) несколько усовершенствовал предложенную ранее модель, чтобы учесть возможность гидрофобных взаимодействий неполярных боковых цепей аминокислотных остатков с липидными молекулами, а также согласовать ее с уже известным в то время фактом облегченной диффузии через мембрану некоторых низкомолекулярных водорастворимых веществ. Было предположено, что белок на поверхности мембраны находится в развернутой конформации, а его алифатические цепи частично проникают в липидный бислой (рис. 313). На отдельных участках мембраны белок полностью пронизывает липидный бислой, формируя в нем поры, через которые могут транспортироваться различные водорастворимые вещества.

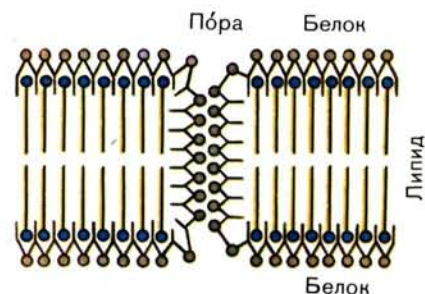
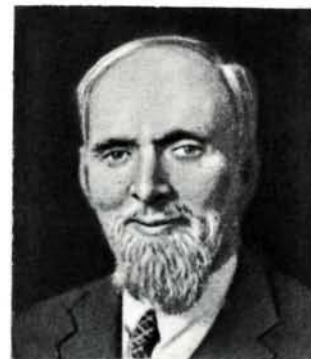


Рис. 313. Модель Стейна — Даниелли.



Гортер [Gorter] Эверт (1881—1954), голландский химик. Образование получил в Лейдене и Париже, с 1923 г. — профессор Лейденского университета. Основные работы посвящены коллоидной химии. Изучал мономолекулярные слои жирных кислот и белков, разработал методы анализа белков.

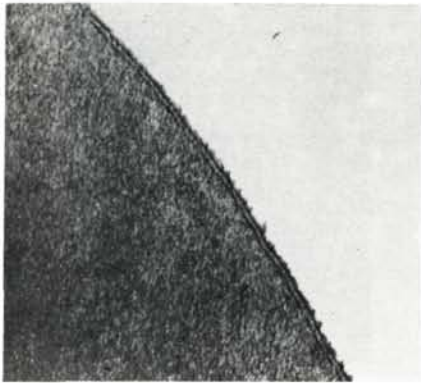


Рис. 314. Микрофотография мембраны эритроцита, полученная методом ультратонких срезов.

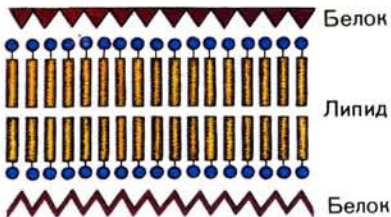
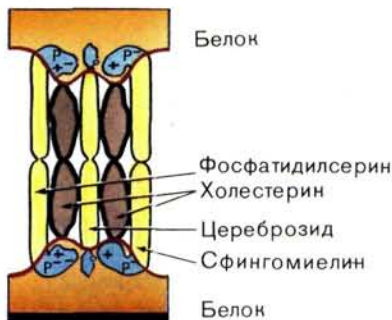


Рис. 315. Модель Робертсона.



Модель мембраны по Финеану

За период с 1936 по 1960 г. с помощью методов дифракции рентгеновских лучей, поляризационной микроскопии, измерений электрических характеристик мембран, их проницаемости и поверхностной активности были получены многочисленные факты, свидетельствующие в пользу моделей Даниелли — Давсона. Но наиболее мощную поддержку эта модель получила на рубеже 1950—1960 гг. благодаря прогрессу, достигнутому в технике приготовления ультратонких срезов тканевых препаратов для электронной микроскопии. На полученных микрофотографиях различных мембран была отчетливо видна трехслойная структура толщиной 6—12,5 нм, состоящая из двух темных слоев электроплотного материала по краям и светлого слоя в середине (рис. 315). Такая картина прекрасно соответствовала модели липопротеинового сэндвича, предложенной Дж. Даниелли и Х. Давсоном.

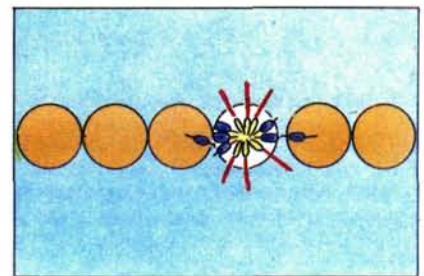
Трехслойная структура наблюдалась на фиксированных срезах многих биологических мембран. Основываясь на этом морфологическом сходстве, Дж. Д. Робертсон в 1959 г. предположил, что все клеточные мембраны — как плазматические, так и внутриклеточные — построены по единому принципу, и высказал концепцию унитарной (или единообразной) мембраны. В целом модель, предложенная Дж. Д. Робертсоном в 1960 г. (рис. 314), во многом сходна с классической моделью Дж. Даниелли: основу мембраны составляет липидный бислой, а ее нелипидные компоненты (прежде всего белок) в полностью развернутой конформации лежат на поверхности бислоя, связываясь с липидами электростатически и за счет гидрофобных взаимодействий. Однако в модели Робертсона нашла отражение еще одна важная структурная особенность мембраны — ее асимметрия.

На структурную асимметрию биологических мембран указывали данные дифракции рентгеновских лучей, свидетельствовавшие о неодинаковом характере распределения электронной плотности на противоположных сторонах мембраны. В этом отношении представляет интерес модель мембраны миелина, описанная Дж. Б. Финеаном в 1957—1966 гг., в которой на основании данных рентгеновской дифракции подчеркнуты различия в распределении белка между двумя сторонами мембраны. Особенность модели Финеана состоит еще и в том, что она представляет собой первую попытку описать структуру конкретной мембраны на основе рассмотрения реальной формы образующих ее липидных молекул.

Дальнейшее развитие техники электронной микроскопии, сопровождавшееся улучшением разрешения, и в частности применение нового метода, основанного на негативном контрастировании мембранных препаратов, позволило выявить морфологически более сложную картину структурной организации биологических мембран. Оказалось, что во многих случаях, и особенно на микрофотографиях внутриклеточных органелл, мембрана выглядит не как сплошная трехслойная линия, а как гранулярная структура, имеющая разрывы (или поры) и состоящая из отдельных глобулярных частиц.

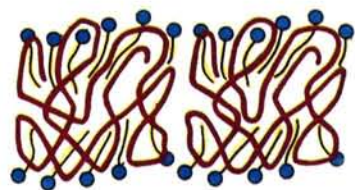


Модель Шёстранда



Модель Люси

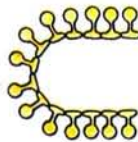
Более того, попытки разобрать мембрану с помощью детергентов привели к получению отдельных липопротеиновых фрагментов, из которых при удалении детергента удавалось вновь собрать мембраноподобные структуры. Эти факты вызвали сомнения в правильности модели Робертсона и породили целый ряд новых моделей, в той или иной форме отражающих концепцию глобулярной организации биологических мембран.



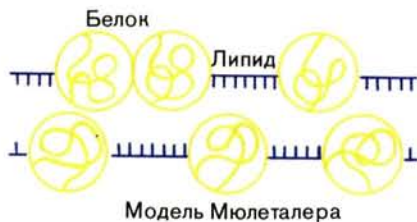
Модель Бенсона



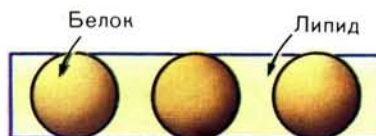
Модель Грина — Пердюю



Так, Ф. С. Шёstrand в 1963 г. предположил, что глобулярные частицы в мембране представляют собой липиды в форме мицелл. Полярные головки липидных молекул находятся на поверхности мицелл, покрытых слоем белка. В модели, предложенной Дж. А. Люси (1964), мицеллярная форма приписывалась не только липидам, но и белкам, а вся мембрана рассматривалась как структура, построенная из чередующихся липидных мицелл и белковых глобул. А. А. Бенсон (1966) рассматривал мембрану как ассоциат липопротеиновых комплексов своеобразной структуры, в которых углеводородные цепи липидов тесно переплетены с белковой полипептидной цепью и удерживаются ею за счет гидрофобных взаимодействий; при этом отрицательно заряженные головки фосфолипидов находятся на поверхности липопротеиновых комплексов. Согласно модели Д. Е. Грина и Дж. Ф. Пердюю (1966), предложенной прежде всего применительно к митохондриям, основой мембраны является регулярно построенный ассоциат липопротеиновых субъединиц довольно сложной конфигурации.



Модель Мюлеталера



Модель Брэнтона

Благодаря усилиям К. Мюлеталера (1963) и впоследствии Д. Брэнтона (1966) был разработан новый вариант электронной микроскопии, не требующий предварительной фиксации и окрашивания мембранного препарата и потому устраняющий возможность появления связанных с данными операциями артефактов. Метод, получивший название «замораживание — скалывание», и его модификация, известная как «замораживание — травление», основаны на раскалывании быстро замороженных препаратов мембран по их гидрофобной области (рис. 316). На электронных микрофотографиях поверхность скола многих мембран выглядела как гладкий матрикс, испещренный большим количеством нерегулярно расположенных внутримембранных частиц. Хотя электронная микроскопия не давала возможности химически идентифицировать эти характерные структурные образования, однако косвенные данные говорили о том, что внутримембранные частицы имеют белковую природу. Исходя из полученной картины, мембрану можно было представить как сложную мозаику, состоящую из липидного бислоя, в который вкраплены многочисленные мембранные белки. Некоторые из них лишь частично погружены в бислой, тогда как другие пронизывают его насквозь.

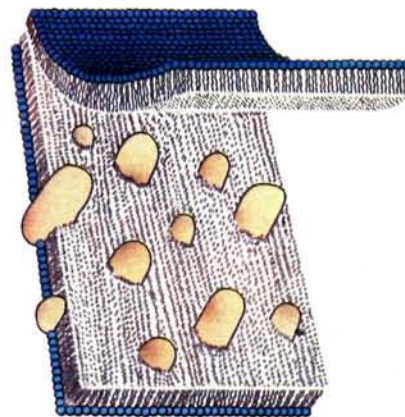


Рис. 316. Раскалывание мембраны по методу «замораживания — скалывания».



Робертсон [Robertson] Джеймс Дэвид (р. 1922), американский биофизик. Окончил Алабамский университет (1942), с 1966 г.— профессор университета Дьюка в Дареме. Известен работами по изучению биологических мембран с помощью электронной микроскопии, автор унитарной модели организации мембран.

В середине 60-х годов химия мембранных белков только зарождалась и делались первые попытки найти подходы к разработке методов их выделения и характеристики. Было известно, что мембраны различного происхождения содержат разное количество белка (от 20 до 75% от сухой массы). Многие мембрано-связанные белки обладают ферментативной активностью. В ряде случаев экстракция липидов из мембраны приводила к полной утрате или к значительному снижению ферментативной активности. Иногда активность удавалось восстановить после обратного добавления липидов. Более детально изучать мембранные белки было затруднительно: они плохо растворялись как в воде, так и в органических растворителях.

Решающий сдвиг в исследованиях мембранных белков произошел, когда в экспериментальную практику был введен метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии анионного детергента — додецилсульфата натрия (А. Л. Шапиро с сотр., 1967; К. Вебер и М. Осборн, 1969). Оказалось, что большинство мембран содержат весьма богатый набор белков, причем точное определение их числа в каждой мембране ограничивается главным образом разрешающей способностью методов, используемых для анализа. Эти работы положили начало широкому использованию различных детергентов для выделения, очистки и анализа индивидуальных мембранных белков.

По своему аминокислотному составу типично мембранные белки часто не отличались от обычных водорастворимых белков. Это подтверждало предположение о том, что особенностью мембранных белков является характерная последовательность расположения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Принципиально важное значение для выработки правильного взгляда на структуру мембран имело открытие В. Луццати в 1968 г. фазового полиморфизма водно-липидных систем, а также установление того факта, что во многих природных мембранах липиды при физиологических температурах находятся в жидкокристаллическом состоянии. Введенная в 1966 г. Д. Чепменом концепция текучести липидного бислоя заставила по-новому взглянуть на мембраны как на подвижную, динамичную систему, обладающую свойствами двумерной жидкости. Идея молекулярной подвижности липидов и белков в бислое была подтверждена, в частности, измерениями скорости их латеральной диффузии как в биологических, так и в модельных мембранах, проведенными Л. Д. Фраем и М. Эдином в 1970 г. и Г. М. Мак-Коннелом в 1971 г.

Таким образом, к началу 70-х годов накопилось достаточно много новых фактов, на основании которых С. Дж. Синджер и Г. Л. Николсон предложили в 1972 г. новую модель молекулярной организации биологических мембран, получившую название жидкомозаичной модели (рис. 317).

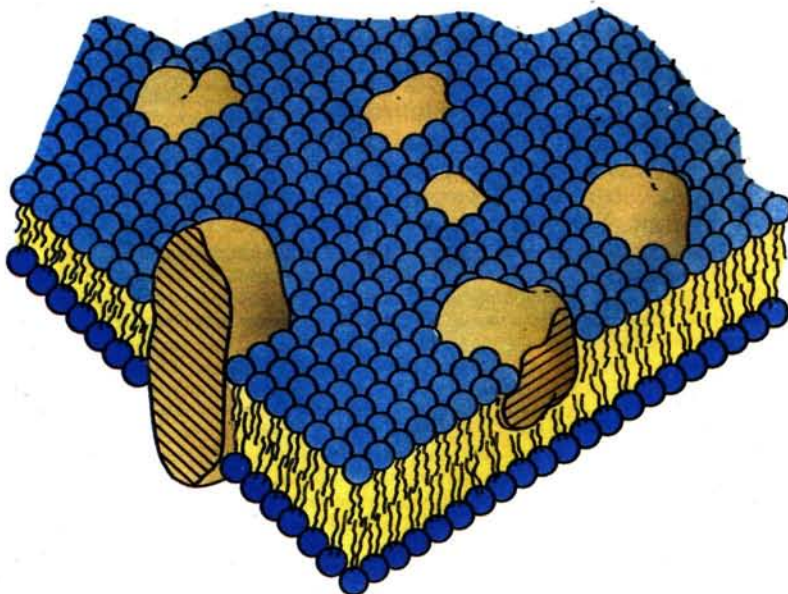


Рис. 317. Модель Синджера — Николсона.

В соответствии с этой моделью, структурной основой биологических мембран является липидный бислой, в котором углеводородные цепи молекул фосфолипидов находятся в жидкокристаллическом состоянии. В бислой, имеющий вязкость растительного масла, погружены или встроены молекулы белков, способные передвигаться по мембране. В противоположность прежним моделям, рассматривавшим мембраны как системы, состоящие из жестко фиксированных элементов, жидкомозаичная модель представляет мембрану как «море» жидких липидов, в котором плавают «айсберги» белков.

В зависимости от прочности связи с мембраной белки в рамках мозаичной модели подразделяются на два типа: периферические и интегральные. К периферическим относятся белки, которые связаны с мембраной за счет полярных и ионных взаимодействий и относительно легко отделяются от нее в мягких условиях, например при промывании буферными растворами с различными значениями рН или ионной силы, либо растворами, содержащими комплексообразующие вещества типа ЭДТА (этилендиаминотетрауксусная кислота) или ЭГТА ([этилен-бис(оксиэтилендинитрил)]-тетрауксусная кислота).

Интегральные белки имеют на своей поверхности большие гидрофобные участки и располагаются внутри мембраны. Для выделения интегральных белков необходимо сначала разрушить липидный бислой.

Солюбилизация интегральных белков может проводиться с использованием органических растворителей, хаотропных веществ и детергентов. Применение органических растворителей для извлечения липидов и освобождения интегральных белков в настоящее время является весьма ограниченным, поскольку такая обработка часто инактивирует мембранные белки. Хаотропные вещества, вызывающие нарушение упорядоченной структуры воды, тоже разрушают липидный бислой. Однако и они применяются довольно редко, так как их солюбилизирующая эффективность в большинстве случаев очень мала.

Наиболее широко применяемый в настоящее время метод солюбилизации мембранных белков — это разрушение липидного бислоя детергентами. Чтобы в максимальной степени сохранить нативную конформацию выделяемого белка, необходимо использовать для солюбилизации неденатурирующие детергенты. К ним, например, относятся соли желчных кислот или их производные. Для солюбилизации и очистки мембранных белков используются также такие неионные детергенты, как тритон, нонидет, эмульфоген, октилглюкозид и др. Интегральные белки, солюбилизированные солями желчных кислот или неионными детергентами, как правило, сохраняют свою биологическую активность.

Хотя жидкомозаичная модель сейчас общепризнана, следует помнить, что она все же представляет собой упрощенное и схематичное отражение столь сложной и разносторонней системы, как биологическая мембрана. Одним из основных постулатов этой модели является предположение о свободном движении молекул белков и липидов в двумерной фазе липидного бислоя. Однако вскоре выяснилось, что не все белки и липиды способны к свободному перемещению, в некоторых случаях их подвижность сильно ограничена. Во многих мембранах интегральные белки находятся в фиксированных положениях за счет высокой концентрации белка, вследствие его агрегации, образования липидных доменов, а также в результате взаимодействия белков с цитоскелетом, образуемым внутренними структурами клетки.

В некоторых мембранах значительные количества липидов могут находиться в сильно упорядоченном состоянии или, наоборот, в составе так называемых небислойных фаз. Это означает, что распределение липидов вдоль поверхности мембраны не является гомогенным, как можно было бы ожидать в случае их свободной диффузии, а в значительной мере гетерогенно. Гетерогенное распределение липидов в биологических мембранах обусловлено также их топологической асимметрией.

Для выполнения векторных функций клеточные мембраны должны быть асимметричны, т. е. наружная и внутренняя стороны мембраны должны отличаться по



Николсон (Nicolson) Гарт Л. (р. 1943), американский биохимик и биофизик. Окончил Калифорнийский университет в Лос-Анжелесе (1965), с 1980 г. — профессор Техасского университета в Хьюстоне. Основные работы посвящены изучению молекулярных механизмов злокачественного перерождения клеток. Вместе с Дж. Синджером является автором гипотезы жидкомозаичной модели структуры биологических мембран (1971).

составу образующих их компонентов. В создании этой асимметрии участвуют как белковые, так и липидные компоненты мембраны. Существенная особенность асимметрии липидов состоит в том, что она, в отличие от топологической асимметрии белков, носит относительный характер: как правило, одни и те же липиды находятся как в наружном, так и во внутреннем монослое, но концентрация их в каждом из слоев неодинакова. Асимметрия белков в мембране является абсолютной в том отношении, что пространственная ориентация белковой молекулы в бислой всегда является однозначной.

Если асимметрия белков в мембранах определяется путями их биогенеза, то трансмембранное распределение липидов может складываться также под влиянием различных условий среды по обе стороны мембраны. Существенное значение может иметь кривизна мембраны. На участках высокой кривизны различия в упаковке липидных молекул между наружным и внутренним монослоями могут быть причиной неодинакового трансмембранного распределения липидных молекул, отличающихся по стерическим требованиям и заряду.

Топологическое распределение липидов тесно связано с их межмембранным обменом, а также с трансмембранной миграцией. В модели Синджера — Николсона подразумевается, что асимметричное распределение липидов сохраняется, поскольку молекулы липидов чрезвычайно медленно переходят с одной стороны мембраны на другую. Однако исследования последних лет показали, что скорость флип-флопа в биологических мембранах может быть очень велика (полупериод $\sim 1-2$ мин), причем это ускорение вызывается действием некоторых интегральных мембранных белков.

Таким образом, в настоящее время модель Синджера — Николсона нуждается в значительных уточнениях. Особенность современного этапа исследований по молекулярной организации биологических мембран состоит в том, что настала пора переходить от общих всеобъемлющих схем к построению детальных «топографических карт» конкретных мембранных систем, оценивая степень подвижности отдельных компонентов в мембране, их взаимное расположение, а также специфичность взаимодействия друг с другом. Воспользовавшись образным сравнением липидного бислоя с «морем», а белков — с «айсбергами», можно сказать: чтобы уверенно плавать в «липидном море», не опасаясь крушений и столкновения с айсбергами, необходимо иметь на руках надежную лодку и верный прогноз погоды. Именно в этом направлении развиваются сегодня работы по молекулярной организации биологических мембран во многих лабораториях мира.

Биогенез мембран

Трудно говорить об образовании мембран *de novo*, поскольку существование клетки предполагает существование ее мембран. Однако можно считать установленным, что процесс формирования клеточной мембраны идет непрерывно, путем введения в нее новых составных частей, обновления компонентов, прежде всего липидов, белков и т. п. В частности, полупериод жизни мембранных компонентов клеток печени, в течение которого обновляется половина их исходного содержания, составляет для белков микросом, ядерной мембраны и цитоплазматической мембраны 2—3 дня, белков внешней митохондриальной мембраны — 5—6 дней, внутренней митохондриальной мембраны — 8—10 дней, для липидов микросом — 1—2 дня. Однако, несмотря на постоянное обновление всех мембранных элементов, их структурная организация в течение жизни клетки сохраняется неизменной.

Биосинтез мембран, как правило, начинается в эндоплазматическом ретикулуме, где образуется большая часть фосфолипидов, холестерина; кроме того, здесь синтезируются и многие интегральные мембранные белки. Затем образовавшиеся мембранные компоненты перемещаются к месту назначения, например в плазматическую мембрану; в этом случае они проходят последовательно через аппарат Гольджи и цитоплазму, модифицируясь в соответствии со своими функциональными потребностями (гликозилирование, процессинг и т. п.). Перемещение осуществляется путем диффузии в форме липидных везикул; подходя к мембране, везикулы, часто нагруженные белками, встраиваются в тот или иной участок мембраны с помощью экзоцитоза. Другими словами, везикулярный транспорт мембранных компонентов функционирует в клетке постоянно и проходит с достаточно большими скоростями (рис. 318). При этом везикулы играют роль своеобразных «челночных» переносчиков, специализированных для каждого липида или белка.

Скорость обновления различных липидов во внутриклеточных мембранах неодинакова. Медленнее всего обновляется сфингомиелин (время, за которое обновляется половина исходных молекул, $\tau_{1/2} \sim 38$ ч), несколько быстрее — фосфатидилсерин ($\tau_{1/2} \sim 23$ ч); скорость обновления фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина примерно одинакова (около 15 ч). К наиболее быстро обновляемым липидам относятся фосфатидилинозит и фосфатидовая кислота, обмен которых может проходить за несколько минут в условиях действия на мембрану внешних стимулов. Такие значительные различия показывают, что фосфолипидные компоненты во время синтеза возникают в мембране неодновременно и, по-видимому «новая

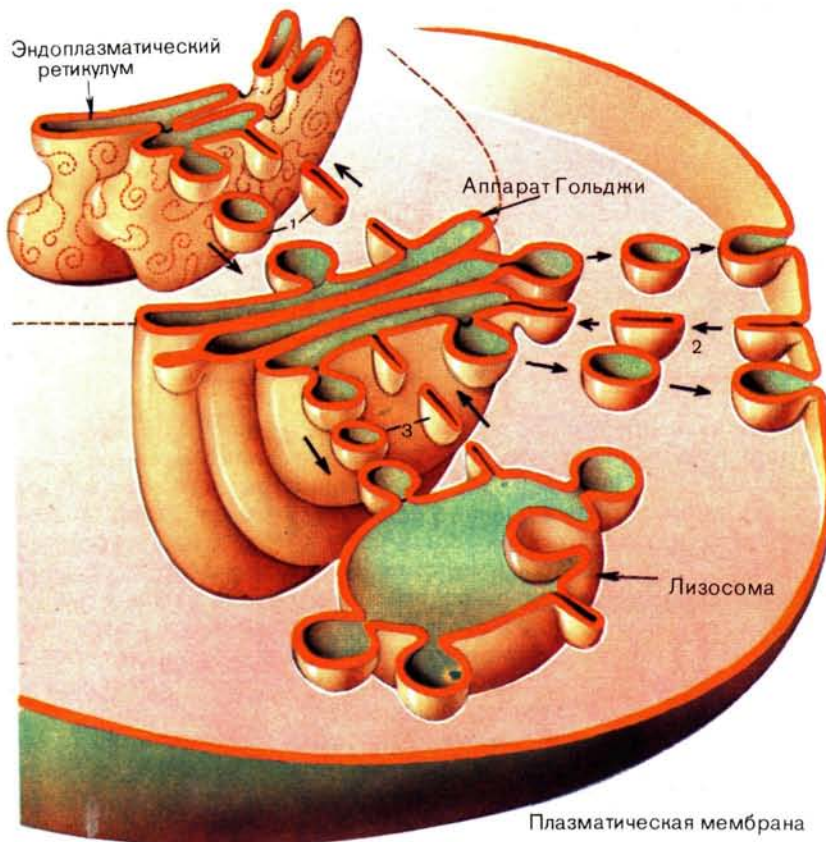


Рис. 318. Везикулярный внутриклеточный транспорт мембран:

1 — челночный перенос между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи; 2 — перенос секреторных везикул между аппаратом Гольджи и плазматической мембраной; 3 — перенос везикул между аппаратом Гольджи и лизосомами.

мембрана» не синтезируется целиком заново, а наращивается путем постепенного добавления различных липидных компонентов к уже существующей основе. Внутри клетки доставка вновь синтезированных липидов к месту сборки мембраны осуществляется иногда с помощью специальных цитозольных белков-переносчиков, открытых в 1969 г.

Что же касается мембранных белков, то их биосинтез и встраивание в мембрану осуществляются в соответствии с механизмом, предложенным Г. Блобелом и Д. Сабатини (см. с. 245).



Перенос белка от места синтеза к месту сборки мембраны обычно сопровождается посттрансляционными изменениями его структуры. Многие мембранные белки, особенно предназначенные для плазматической мембраны эукариотических клеток, подвергаются гликозилированию. N-Гликозилирование проходит через две основные стадии (рис. 319). Начальная стадия протекает в полости эндоплазматического ретикулума и представляет собой перенос

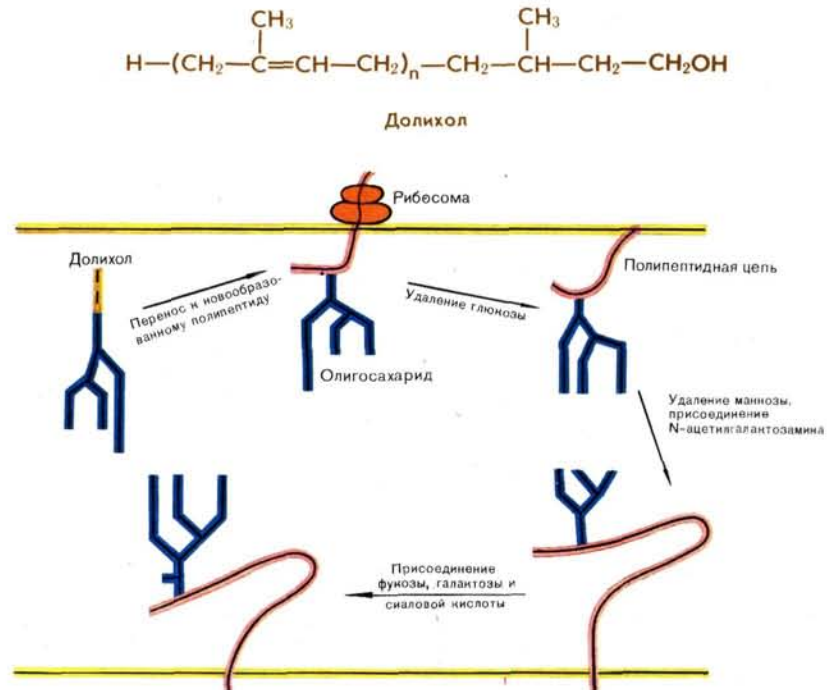


Рис. 319. Отдельные этапы N-гликозилирования мембранных белков.

маннозосодержащего олигосахаридного фрагмента от гликозилированного долихолфосфата к новообразованной полипептидной цепи. После этого синтезированные белки транспортируются в аппарат Гольджи, где происходит удлинение углеводной цепи.

Аппарат Гольджи выполняет также такую важную функцию, как «сортировка» белков, углеводов, липидов и мукополисахаридов, предназначенных для различных внутриклеточных органелл. Пройдя через слой мембран Гольджи, они собираются в мембранных везикулах, которые отделяются от цистерн и транспортируются

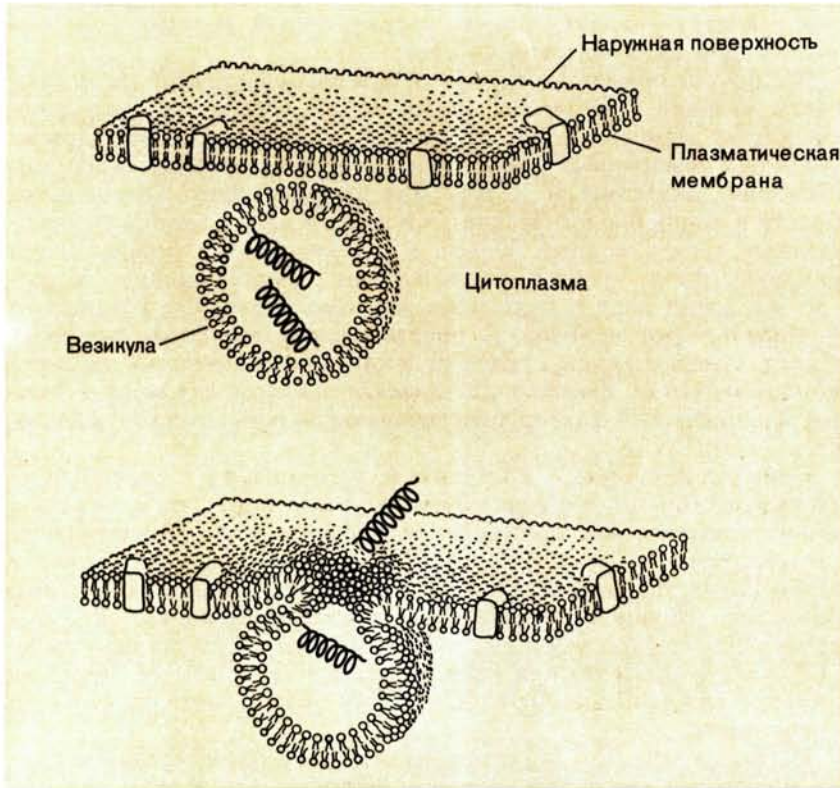
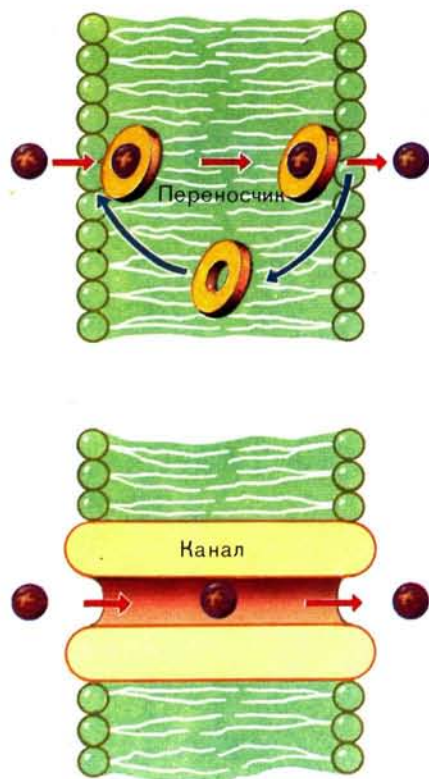


Рис. 320. Слияние везикулы с плазматической мембраной.

к другим клеточным мембранам. Секреторные пузырьки направляются к плазматической мембране и сливаются с ней; при этом содержимое пузырьков изливается наружу (рис. 320). Таким образом, в клетке происходит постоянный перенос мембран от эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи и из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану.

Безусловно, конкретные пути транспорта и комплектования тех или иных компонентов мембран требуют детального изучения. У митохондрий, например, часть мембранных структур (субъединиц белков и т. п.) синтезируется внутри митохондриального матрикса и затем переносится к внутренней мембране, в то время как другая часть синтезируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, вне митохондрии, и транспортируется к ней через всю цитоплазму. В настоящее время биосинтез ряда мембранных систем изучен достаточно хорошо (Г. Шатц и др.).

Транспорт через мембраны



Избирательный транспорт различных веществ и ионов — главная функция биологических мембран. Он обеспечивает активный обмен клетки и ее органелл с окружающей средой, служит основой всех биоэнергетических механизмов, определяет эффективность процессов рецепции, передачи нервного возбуждения и т. п. Именно функционирование многочисленных транспортных мембранных комплексов, строго скоординированных в пространстве и времени, делает клетку — элементарную ячейку живой материи — весьма совершенной динамической системой.

Все формы обмена между клеткой и внешней средой, за исключением явлений пинацитоза, предполагают пересечение окружающей клетку мембраны; это остается в силе и для любых других замкнутых мембранных структур, находящихся в клетке (ядро, митохондрии, лизосомы и т. п.). Для подавляющего большинства веществ и ионов биологические (и искусственные) мембраны представляют диффузионный барьер, и в таком случае перенос через липидную фазу требует значительных энергетических затрат. В то же время вода и некоторые низкомолекулярные соединения проникают через мембрану с поразительной легкостью, вероятно, за счет использования дефектов жидкокристаллической решетки липидного бислоя. Высокая проницаемость клеток для воды — важный биологический фактор, обеспечивающий осмотическое равновесие.

Принято различать активный транспорт через биологические мембраны, требующий специальных источников энергии и обычно совершаемый против электрического или концентрационного градиента, и пассивный транспорт, определяемый только разностью концентраций переносимого агента на противоположных сторонах мембраны или направлением поля. В обоих случаях, однако, должен существовать механизм селективного переноса данного вещества или иона, поскольку сама по себе липидная (липопротеиновая) мембрана для такого рода агентов практически непроницаема.

Наиболее детально исследованы процессы транспорта ионов через модельные мембраны, которые описываются в этом разделе. Собственно биологические системы, участвующие в транспорте различных метаболитов через клеточную мембрану, рассматриваются далее.

Принципиально возможны два пути переноса веществ и ионов через мембрану: с помощью так называемых переносчиков, функционирующих по «челночному» механизму, или с помощью каналов.

Ионофоры

Под переносчиками понимаются специфические молекулы или их ансамбли, которые связывают транспортируемый агент на одной стороне мембраны и в виде комплекса переносят его через гидрофобную зону. После диссоциации комплекса на противоположной стороне мембраны переносимый агент оказывается в водной фазе,

а переносчик возвращается в исходное положение. Таким образом, транспорт в целом включает стадии образования и диссоциации комплекса, а также движение в мембране как комплекса, так и свободного переносчика.

Идея о том, что в мембранах для переноса электролитов могут использоваться вещества, образующие с соответствующими ионами растворимые в липидах комплексы, высказывалась в общем виде еще в 1930—1935 гг. В. Остергоутом. Однако впервые явление транспорта ионов через биологические мембраны по механизму переносчиков было обнаружено Б. Прессманом в 1964 г. В качестве таких переносчиков он использовал некоторые антибиотики, названные им ионофорами. Классическим представителем мембранных ионофоров является антибиотик депсипептидной природы — валиномицин.

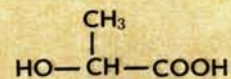
Валиномицин выделен Г. Брокманном в 1955 г., его строение как циклододекадепсипептида окончательно установлено М. М. Шемякиным и сотрудниками в 1963 г. и подтверждено полным синтезом как самого антибиотика, так и его многочисленных аналогов.

Молекула валиномицина построена из трех идентичных фрагментов, в каждый из которых входит остаток D-валина, L-молочной кислоты, L-валина и D-гидроксиизовалериановой кислоты.

Уникальный принцип функционирования валиномицина в качестве ионофора выяснен на основе исследований, осуществленных главным образом в СССР М. М. Шемякиным и др. Валиномицин способен избирательно увеличивать проницаемость липидных бислоев для ионов щелочных металлов (А. А. Лев, 1967; П. Мюллер, Д. Рудин, 1967). Валиномицин образует в неполярных растворителях устойчивые комплексы с K^+ , Rb^+ , Cs^+ , но очень слабо взаимодействует с ионами Na^+ ; K , Na -селективность этого депсипептида является рекордной и составляет величину порядка 10^4 — 10^5 . Такое поведение валиномицина связано с его пространственным строением: депсипептидная цепь антибиотика формирует «ионную ловушку», точно подогнанную под ионы калия.

Конформация самого валиномицина в неполярных средах напоминает собой браслет, стабилизированный шестью внутримолекулярными водородными связями ($C=O \cdots H-N$); в более полярных средах реализуется форма лишь с тремя H -связями, а в водных растворах предпочтительной оказывается открытая форма, лишенная водородных связей (рис. 321).

В конформации валиномицина, установленной на основании данных ЯМР- и ИК-спектроскопии и подтвержденной затем рентгеноструктурным анализом, амидные карбонилы участвуют в стабилизации «браслета», а сложноэфирные карбонилы свободны (рис. 322, а).



Молочная кислота

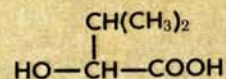
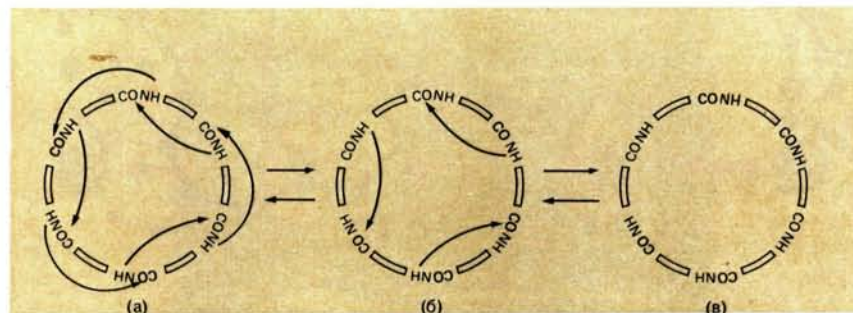
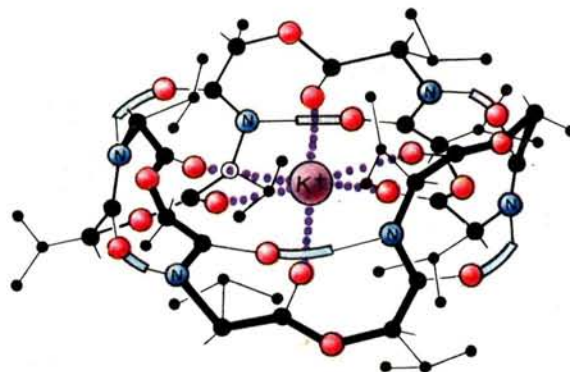
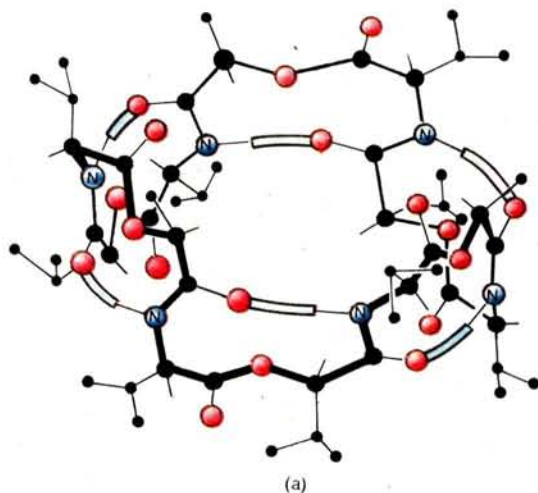
Гидроксиизовалериановая
кислота

Рис. 321. Система внутримолекулярных водородных связей валиномицина в неполярных средах (а), в средах средней полярности (б) и в воде (в).



Рис. 322. Конформация валиномицина (а) и его K^+ -комплекса (б).



Комплексы валиномицина с K^+ в любых средах сохраняют конформацию браслета, при этом ион металла попадает во внутреннюю полость молекулы и связывается шестью сложноэфирными карбонилами с помощью ион-дипольных взаимодействий (рис. 322, б).

Размеры полости хорошо соответствуют ионным радиусам несольватированных ионов калия ($r=0,133$ нм) и рубидия ($r=0,149$ нм), но несколько малы для цезия ($r=0,165$ нм) и слишком велики для натрия ($r=0,098$ нм), что находится в полном согласии с данными по селективности комплексообразования. Валиномицин, таким образом, обеспечивает связываемому иону идеальную «сольватную оболочку», фиксированную в оптимальном положении молекулярным каркасом антибиотика, и благоприятными для комплексообразования оказываются не только энергетические (энергия шести ион-дипольных взаимодействий), но и энтропийные факторы.

В комплексе валиномицин — калий ион оказывается хорошо «спрятанным» во внутренней сфере антибиотика, а внешняя сфера достаточно гидрофобна и обеспечивает беспрепятственное передвижение иона через липидную мембрану. Установленный впервые на примере валиномицина принцип функционирования ионофоров оказался универсальным не только для мембранных переносчиков, но и для других типов молекулярных ловушек и катализаторов, широко используемых в настоящее время в химии и в технике. Неудивительно поэтому, что скульптурная композиция, изображающая изящную структуру калиевого комплекса валиномицина, украшает здание Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР в Москве.

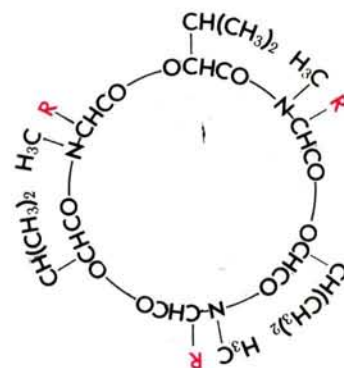
Достаточно часто высказывается мысль, что валиномицин во многих отношениях напоминает фермент. Действительно, роль ферментов сводится к катализу тех или иных химических реакций, т. е. к снижению их энергии активации. Валиномицин понижает энергетический барьер перехода ионов калия с одной стороны мембраны на другую. Как и ферменты, валиномицин действует в каталитических количествах (вплоть до 10^{-9} – 10^{-11} моль/л), многократно регенерируясь после выполнения своей функции. Валиномицин имеет ярко выраженный специфический субстрат, а именно ион K^+ , причем проявляет по отношению к этому субстрату высочайшую селективность. Более того, при связывании «субстрата»

(б)

молекула валиномицина претерпевает характерную для ферментов «индуцированную подгонку» (induced fit) своей конформации, заключающуюся в переориентации сложноэфирных карбонильных группировок из положения «наружу» в положение «внутри» для захвата катиона. Наконец, валиномицин обладает высокой биологической активностью как антимикробный агент, что позволяет четко контролировать его поведение.

Аналогично валиномицину ведут себя и депсипептидные антибиотики энниатиновой группы, открытые П. Платтнером в 1947 г. и охарактеризованные в структурном отношении М. М. Шемякиным и сотр. в 1963 г.

Меньшая эффективность комплексообразования в данном случае связана с более открытой структурой комплекса и большей доступностью иона для растворителя. Однако этот недостаток может в существенной степени компенсироваться тем, что ионы щелочных металлов способны в таком случае переноситься через мембрану в виде «сэндвичей» или «стопок» (рис. 323), где соотношение макроцикл — катион равно 2:1 или 3:2 (рис. 324).



	R
Энниатин А	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$
Энниатин В	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Энниатин С	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Боверицин	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

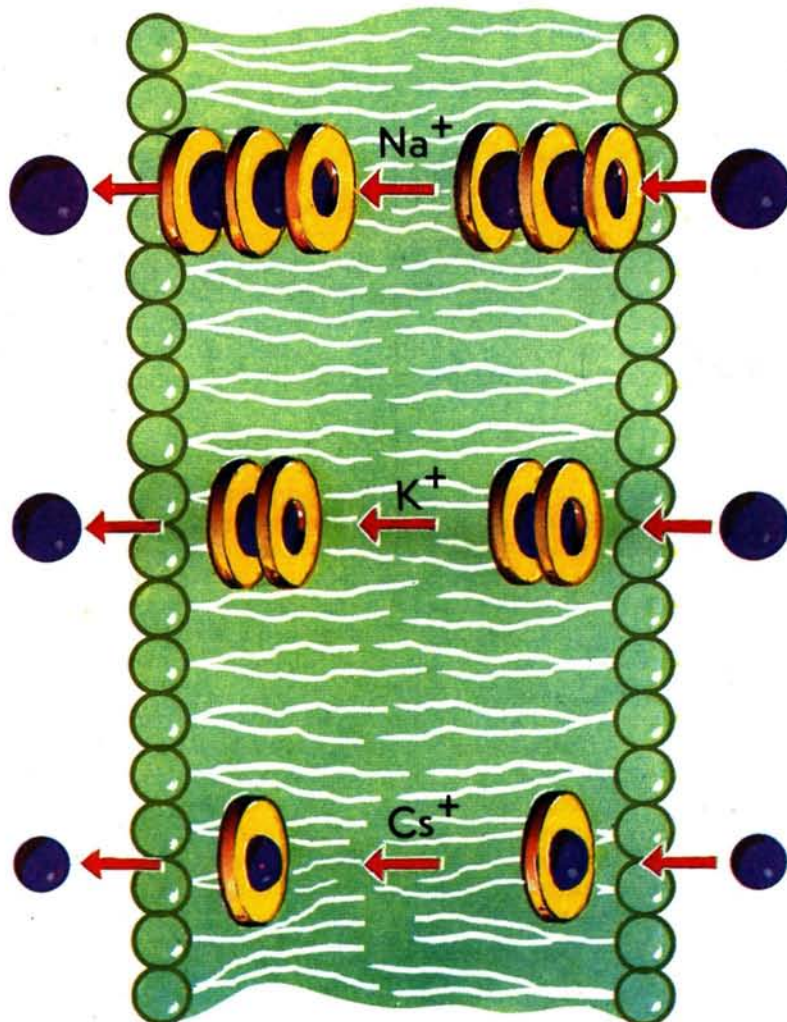


Рис. 323. Транспорт ионов щелочных металлов переносчиками энниатиновой группы.

Структура комплексов энниатина с K^+ была выяснена Д. Данитцем с сотр. (в кристалле) и М. М. Шемякиным с сотр. (в растворе) в 1969 г., а образование межмолекулярных «сэндвичей» и «стопок» в неполярных средах и в процессе транспорта через мембраны однозначно доказано на основе структурных и кинетических данных.

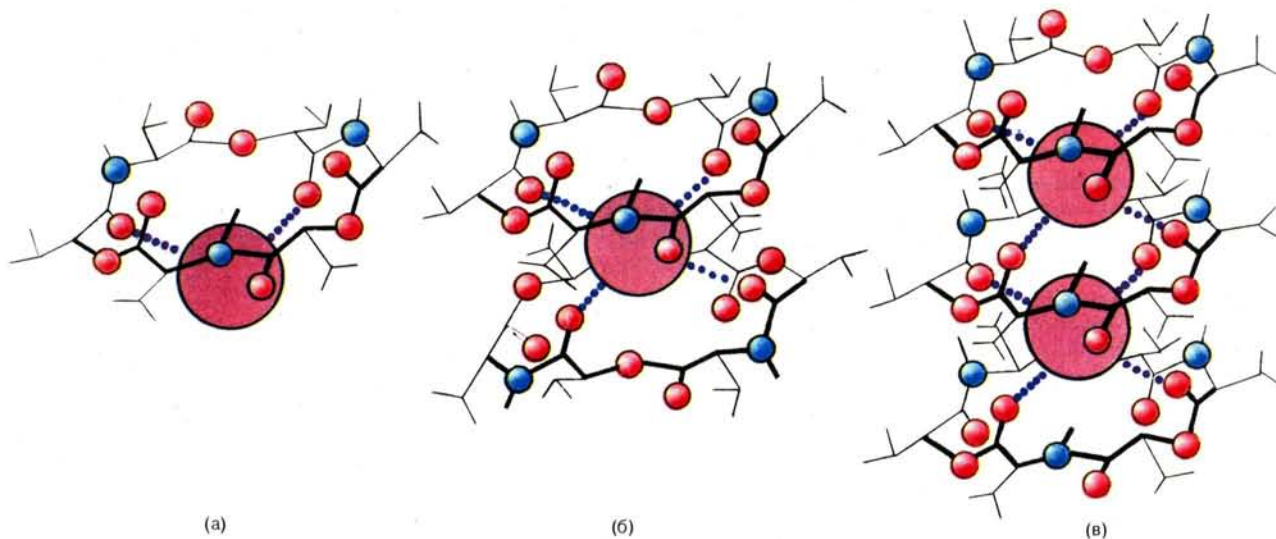


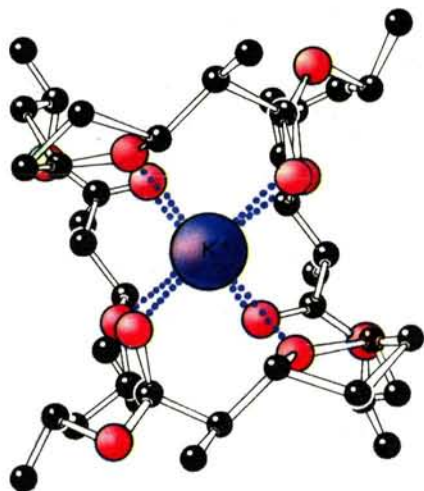
Рис. 324. Структура комплексов энниатина В. Соотношение макроцикл — катион 1 : 1 (а), 2 : 1 (б) и 3 : 2 (в).

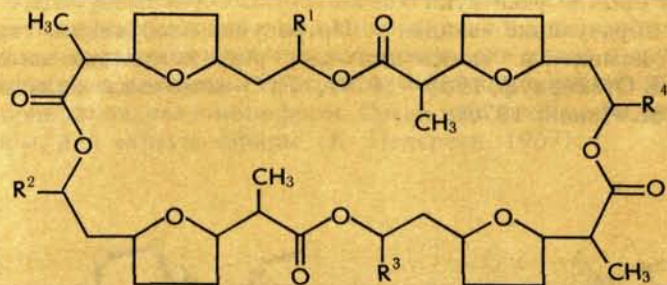
Другую известную группу ионофоров, открытую практически одновременно с депсипептидами, представляют макротетралиды группы нонактина. Строение этих макроциклических лактонов было установлено швейцарским исследователем В. Прелогом с сотр. в 1962 г., Д. Данитцем и др. в 1967 г. на основе рентгенографических данных выяснена структура кристаллического комплекса нонактина с K^+ .

В калиевом комплексе нонактина форма цепи молекулы антибиотика напоминает бороздку теннисного мяча, а восемь О-атомов сложноэфирных и простых эфирных группировок расположены в вершинах куба и связывают ион за счет ион-дипольных взаимодействий. Существенно, что макротетралиды являются наиболее селективными переносчиками для ионов аммония (NH_4^+).

Позднее была открыта новая интересная группа антибиотиков-ионофоров, содержащих незамкнутую полиэфирную цепь; наиболее известными среди них являются моненсин, нигерицин, антибиотик А-537 и кальцимицин (антибиотик А-23187).

Некоторые из этих антибиотиков, например моненсин, селективно связывают ионы щелочных металлов, в частности натрия. Однако особую популярность они получили как переносчики ионов Ca^{2+} и по масштабам использования в исследованиях мембран приближаются к валиномицину. Как установлено с помощью рентгеноструктурного анализа, в комплексах с ионами молекулы полиэфирных антибиотиков «обволакивают» связываемый ион, удерживая его за счет ион-дипольных взаимодействий с простыми эфирными группировками. Подковообразная конформация антибиотика нередко стабилизируется водородной связью между группами, расположенными на противоположных концах цепи; в случае Ca^{2+} в

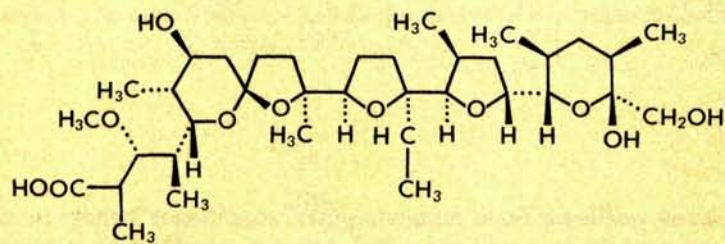




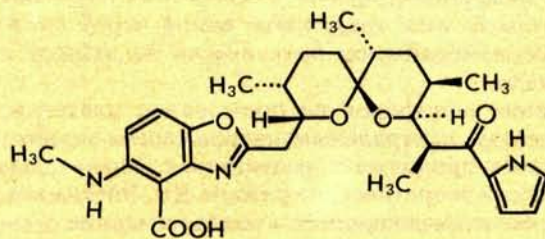
Нонактин $R^1=R^2=R^3=R^4=CH_3$
 Монактин $R^1=R^2=R^3=CH_3; R^4=C_2H_5$
 Динактин $R^1=R^3=CH_3; R^2=R^4=C_2H_5$
 Тринактин $R^1=CH_3; R^2=R^3=R^4=C_2H_5$



Нигерицин

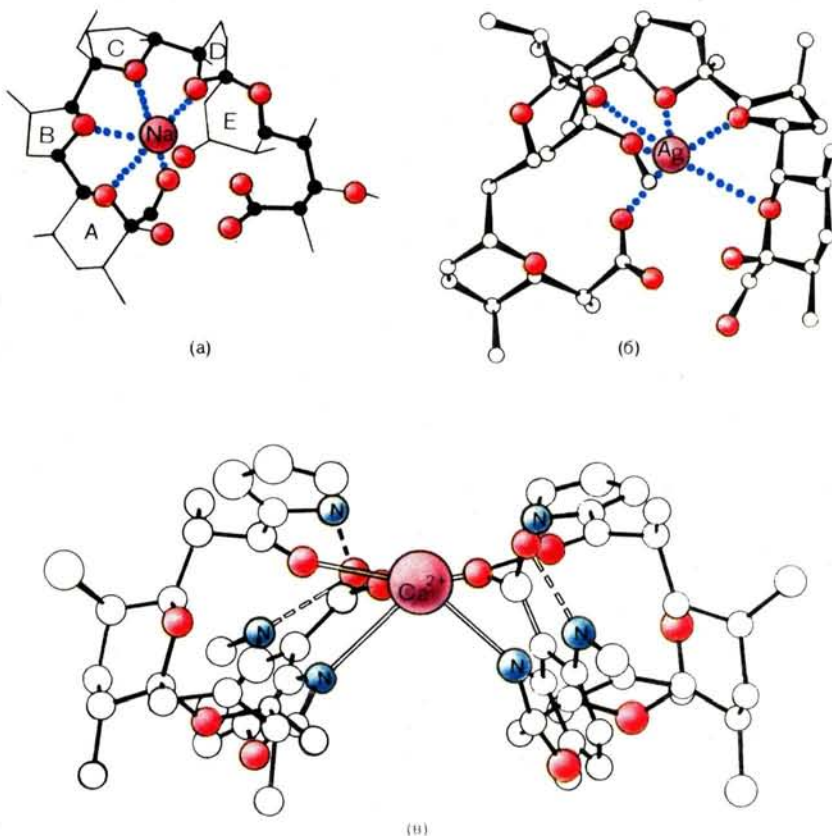


Моненсин



Кальцимидин (А—23187)

связывании обычно участвуют две молекулы соответствующего антибиотика, образующие «сэндвич». На рисунке изображены структуры Na^+ -комплекса моненсина (а), Ag^+ -комплекса нигерицина (б) (Л. Стейнрауф, 1968—1970), Ca^{2+} -комплекса кальцимицина (в) (М. Чаней, 1976).

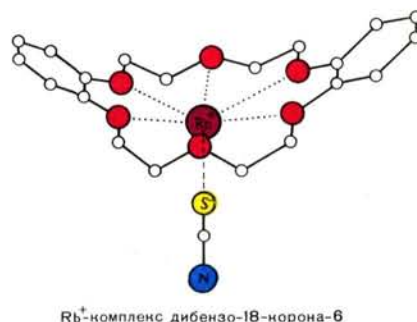
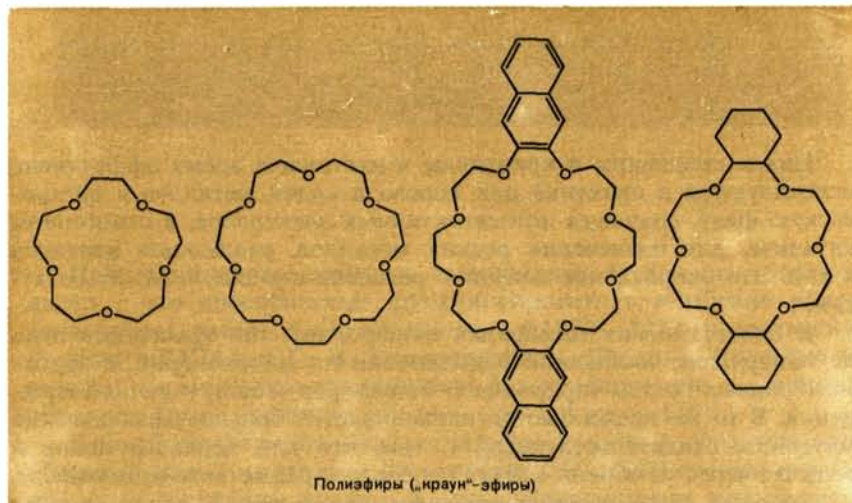


Грелл [Grell] Эрнст (р. 1941), немецкий физикохимик. Образование получил в Базельском университете (1967), с 1978 г. работает в Институте биофизики Общества М. Планка во Франкфурте-на-Майне. Основные работы посвящены изучению механизма ферментативных реакций методами быстрой кинетики и спектроскопии, а также ионного транспорта через мембраны.

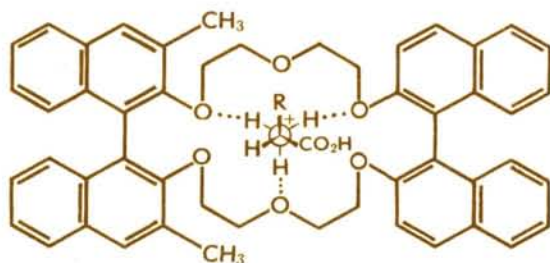
Важной особенностью полиэфирных ионофоров является наличие в их молекуле карбоксильной группы, которая ионизуется в процессе комплексообразования. Поэтому, в отличие от положительно заряженных комплексов депсипептидов и нактинов (например, валиномицин· K^+), комплексы полиэфирных антибиотиков, как правило, электронейтральны. Отсюда и их различное поведение при индуцируемом ими транспорте ионов через биологические и искусственные мембраны: он практически не зависит от мембранного потенциала.

Исследование ионофоров на протяжении длительного периода было, по существу, центральным направлением мембранологии и в настоящее время продолжает развиваться. Значительный вклад в эту область внесли теоретические работы Дж. Эйзенмана и П. Лойгера, кинетические исследования Э. Грелла, создание новых ионофорных молекул В. Симоном и другие работы. Ионофоры — тончайшие инструменты изучения процессов транспорта ионов через искусственные и биологические мембраны.

В этой связи можно отметить, что в настоящее время в химии, химической технологии и медицине широко и успешно применяются синтетические молекулярные «ловушки» для ионов и других полярных агентов, которые и построены и функционируют на основе тех же принципов, что и ионофоры. Среди них наиболее известны полиэферы, или «краун»-эферы (К. Педерсен, 1967):



Соединения этого типа селективно связывают ионы металлов, ионы аммония, аминокислоты и т. п.; если такой полиэфер обладает асимметрическим строением, т. е. является хиральным, он способен избирательно связывать L- или D-формы соответствующих соединений (В. Прелог, Д. Крам, 1973—1975)



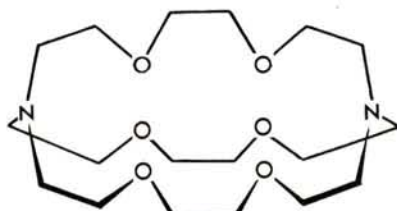
Неменьший интерес представляют предложенные Ж.-М. Леном криптанты (а) (и их комплексы — криптаты (б)), которые могут быть сконструированы для избирательного связывания самых разнообразных низкомолекулярных веществ и ионов



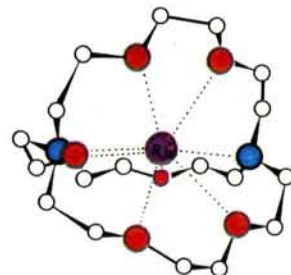
Эйзенман [Eisenman] Джордж. (р. 1929), американский биофизик. Окончил Гарвардский университет (1949), с 1965 г. — профессор Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Основные работы — по изучению селективности ионного транспорта через биологические мембраны. Открыл катион-селективные стеклянные электроды (1956) и разработал теорию ионной селективности.



Богатский Алексей Всеволодович (1929—1983), советский химик-органик, академик АН УССР (1976). Окончил Одесский университет (1951); с 1977 г.— директор Физико-химического института АН УССР, председатель Южного научного центра АН УССР. Основные работы посвящены динамической стереохимии, конформационному анализу гетероциклов, химии физиологически активных веществ, химии макроциклов. Лауреат Государственной премии СССР (1980).



(a)



(б)

Циклополиэфиры и криптанды в настоящее время эффективно используются в практике для перевода солей металлов в органическую фазу, создания ион-селективных электродов, в гомогенном катализе, для извлечения редких металлов, разделения изотопов и т. п. Это направление получило развитие и в СССР (А. В. Богатский).

В биологических мембранах ионофорный тип транспорта пока не обнаружен; сообщения о выделении из митохондрий и других мембранных систем «природных» ионофоров не получили подтверждения. В то же время быстро накапливается большой фактический материал, свидетельствующий о том, что для переноса ионов и веществ через мембраны клетка использует различного типа каналы.

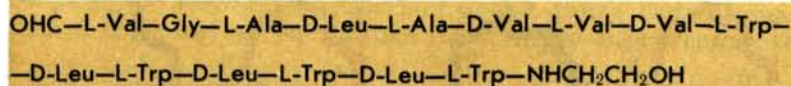
Впервые существование ион-проводящих мембранных каналов было постулировано еще в 40—50-х годах нашего столетия при изучении проблемы проведения нервного импульса (А. Ходжкин, Э. Ф. Хаксли). Позднее получила распространение концепция «биологических насосов», обеспечивающих активный транспорт ионов через плазматическую мембрану клетки. Принцип переноса веществ и ионов через селективные каналы биологических мембран хорошо согласовывался с данными теории и кинетическими экспериментами. Все более очевидным становился факт, что роль каналов в мембранах выполняют сложные белковые комплексы, однако их выделение и структурное изучение представило значительную проблему.

Антибиотики-каналообразователи

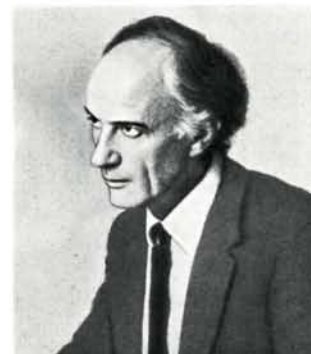
Определенный прогресс в понимании того, какой может быть молекулярная организация трансмембранных каналов, связан с изучением антибиотиков-каналообразователей; среди них наиболее известны грамицидин А, амфотерицин В, аламетин.

Антибиотики грамицидиновой группы были открыты Р. Дюбо в 1939 г., строение основного представителя этого семейства, грамицидина А, установлено Р. Сарджесом и Б. Виткопом в 1965 г. Как оказалось, антибиотик является линейным пентадекапептидом с блокированными концевыми группами и чередующимися L- и D-конфигурациями аминокислотных остатков.

После того как Б. Прессманом было обнаружено индукционное влияние грамицидина А на ионный транспорт (K^+ , Na^+ , H^+ и др.) через биологические мембраны, С. Хладки и Д. Хейдон в 1970 г. однозначно установили, что антибиотик функционирует в мембране по принципу канала.



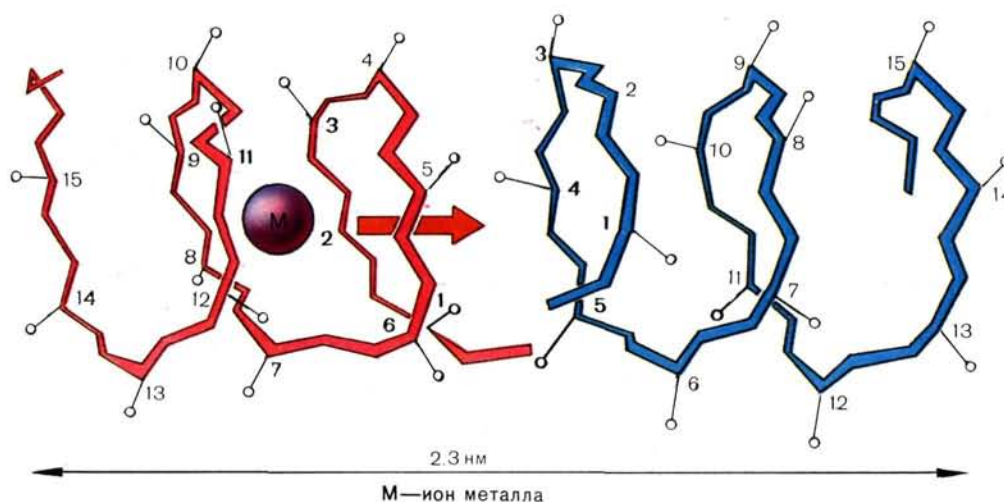
Грамицидин А



Хейдон [Haydon] Дэнис (р. 1930), английский биофизик. Образование получил в Лондонском университете, с 1980 г.— профессор Кембриджского университета. Известен работами по изучению характеристик липидных бислоев и способов их формирования. Совместно с С. Хладки разработал методику измерения проводимости одиночных ионных каналов.

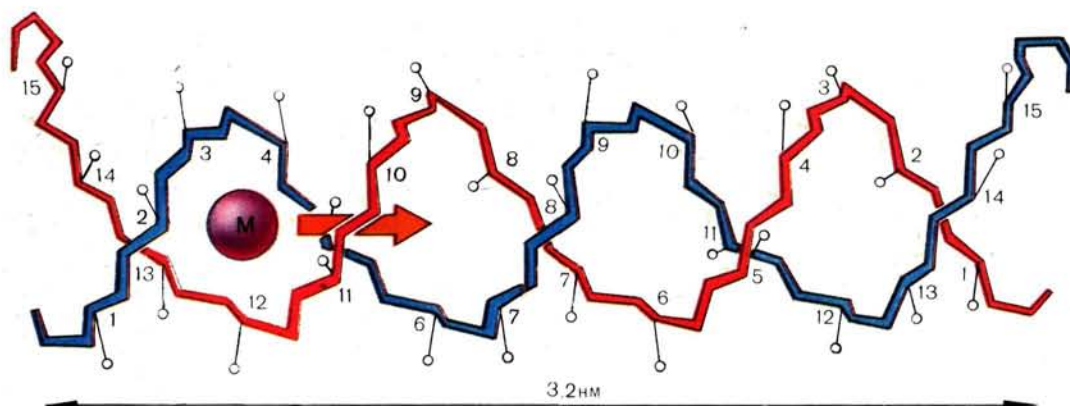
Пространственное строение грамицидина А, хорошо согласующееся с его способностью функционировать в мембране в виде каналообразователя, было предложено в 1971—1972 гг. независимо Д. Урри (США) и Г. Н. Рамачандраном (Индия). Согласно их модели, две молекулы грамицидина А в конформации π_{LD} -спирали образуют димер «голова к голове» (см. также с. 117).

В такой конформации молекулы грамицидина А образуют своеобразный полый цилиндр, в котором все СО- и NH-группы пептидной цепи соединены внутри- и межмолекулярными водородными связями.

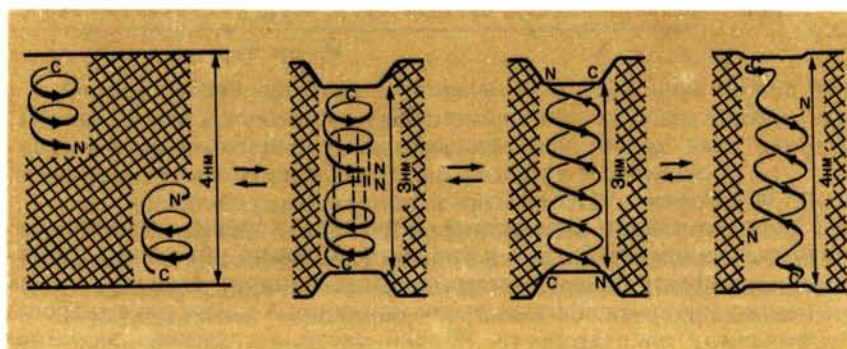


Хотя по своим параметрам структура хорошо соответствует толщине липидного бислоя и удовлетворительно объясняет наблюдаемую эффективность и селективность ионного транспорта, тем не менее вопрос о конформации грамицидина А в мембране требовал однозначных доказательств. В этой связи заслуживал внимания

предложенный в 1974 г. Э. Блоутом и Б. Витчем альтернативный вариант пространственной укладки молекулы грамицидина А, в котором две молекулы антибиотика образуют двойную спираль



Как сейчас можно считать установленным, и в растворах, и в мембране грамицидин А участвует в сложном конформационном равновесии, наиболее важными компонентами которого являются одно- и дутьяжевые спиральные димеры. Диаметр осевой полости как одנותяжевых, так и дутьяжевых спиралей около 0,3 нм, т. е. достаточен для внедрения ионов металлов, а длина димера (~ 3 нм) близка толщине углеводородной зоны липидного бислоя. По-видимому, оба типа димеров способны образовывать ион-проводящие каналы. Отметим, что производительность одиночного канала грамицидина А весьма высока, до 10^9 ионов в секунду, что значительно превышает соответствующий показатель для антибиотиков-переносчиков ($\sim 10^5$ ионов в секунду). Предполагается, что «выключение» грамицидинового канала, т. е. переход в непроводящее состояние, сопряжено с флуктуацией толщины мембраны: при увеличении толщины димер «голова к голове» диссоциирует до мономера, а двойная спираль частично расплетается. С этим предположением согласуется тот факт, что время жизни грамицидинового канала монотонно увеличивается при уменьшении средней толщины мембраны. Возможные структурные перестройки грамицидина А в мембране схематически могут быть изображены так:

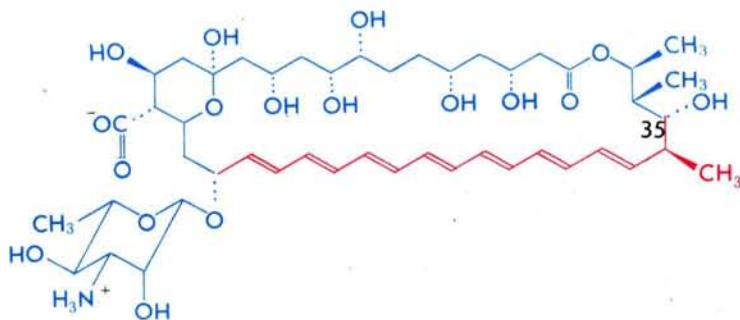


При выяснении поведения грамицидиновых антибиотиков в мембране большую роль сыграло исследование его синтетических аналогов, в том числе ковалентно связанных димеров и производных, несущих заряженные группы (В. Т. Иванов, Е. Бамберг и др.); важный вклад был внесен также на основе теоретических расчетов (А. Пюльман) и физико-химических измерений (В. Ф. Быстров, В. Т. Иванов и др.). Следует отметить, что заверченный Б. Уоллес в 1985 г. первый рентгеноструктурный анализ кристаллов грамицидина А позволил сделать вывод, что в избранных условиях, т. е. в мембране, антибиотик представляет собой димер типа двойной спирали и содержит во внутренней полости два переносимых им иона.

Среди антибиотиков-каналообразователей особого внимания заслуживают некоторые полиеновые макролиды, и прежде всего амфотерицин В



Пюльман (Pullman) Альберта (р. 1920), французский биохимик. Руководит лабораторией Института физико-химической биологии в Париже. Ею выполнены работы по анализу влияния среды на структуру биологических молекул, в том числе нуклеотидов, липидов, белков, и проведены теоретические исследования ион-ионофорных взаимодействий.

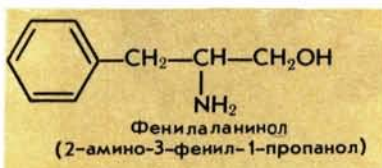


Амфотерицин В

Как оказалось, такие антибиотики образуют в мембранах довольно селективные поры с радиусом Стокса — Эйнштейна порядка 0,4 нм, которые в силу своих размеров оказываются проницаемыми для воды, ионов одновалентных металлов, некоторых анионов и небольших нейтральных молекул, например глюкозы. Согласно модели, выдвинутой А. Финкельштейном и Р. Хольцем в 1973 г., амфотерицин В образует канал, состоящий из двух стыкующихся внутри мембраны полупор, каждая из которых представляет собой агрегат из чередующихся молекул антибиотика и стерина (обычно эргостерина, имеющего 3 β -гидроксигруппу и при атоме С-9 боковую цепь), ориентированных длинными осями своих молекул перпендикулярно поверхности мембраны; размеры этих молекул и обычного мембранного фосфолипида — лецитина — практически совпадают. В образовании полупоры принимают участие 8—16 (обычно 10) молекул антибиотика, располагающихся так, что гидрофильные части (гидроксилы) ориентированы внутрь поры, а гидрофобные (полиеновые) части — в сторону мембраны; полупоры собираются на противоположных сторонах мембраны и стабилизируются на поверхности мембран полярными головками антибиотика, состоящими из заряженных группировок карбоксилат-иона и протонированного по аминогруппе остатка сахара (микозамина), а внутри мембраны — водородными связями между гидроксильными группами при атоме С-35 (рис. 325).

В изучении механизма действия амфотерициновых каналообразователей принимают активное участие лаборатории в Голландии (Б. де Круифф) и в СССР (Л. Н. Ермишкин).

Особую группу каналообразователей представляют собой антибиотик аламетицин I и родственные соединения (сузукациллины, антиамёбины, эмеримицины, трихотоксины и др.), в состав которых входят остатки α -аминоизомасляной кислоты (Aib) и фенилаланинола (Phol)



Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro
-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Phol

Aib— α -изомасляная кислота
Аламетицин I



Аналогично амфотерицину и грамицидину А, аламетицин образует в мембранах серию ион-проводящих агрегатов. Число молекул аламетицина в агрегате варьирует от 6 до 10. Агрегаты меньшего размера проводят только одновалентные катионы, напоминая в этом отношении каналы, образованные грамицидином А. В более крупных агрегатах диаметр канала достигает 1,5 нм и появляется анионная проводимость. Характерной особенностью аламетициновой проводимости

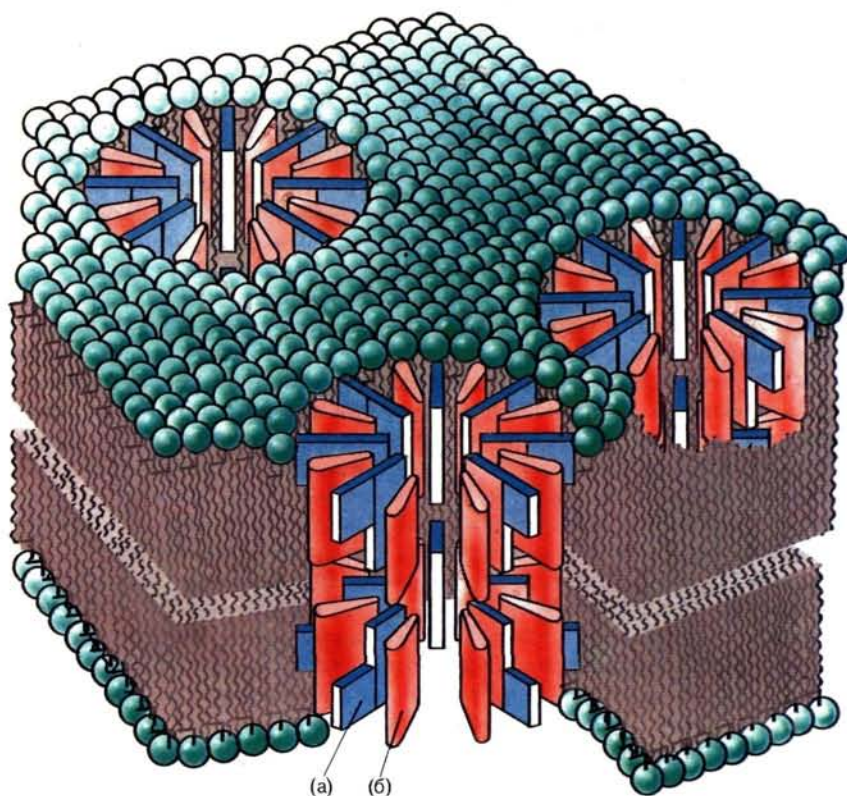


Рис. 325. Модель мембранной поры, образованной молекулами амфотерицина В (а) и стерина (б) (красным цветом показаны гидрофобные, синим — гидрофильные районы молекулы).

мости является ее зависимость от приложенного электрического поля. В отсутствие поля аламетицин не образует ион-проводящих форм, а по мере увеличения потенциала проводимость модифицированных аламетицином мембран резко растет, т. е. увеличивается вероятность пребывания канала во включенном состоянии. В этом отношении аламетицин может рассматриваться как простейшая модель ионных каналов возбудимых мембран. Несмотря на большое число привлечательных гипотез, пока еще нет достаточных данных для окончательного суждения о молекулярной структуре аламетицинового канала. Согласно одной из моделей такого канала, первоначально предложенной Р. Мюллером и долго служившей рабочей гипотезой, сконцентрированные на поверхности мембраны молекулы аламетицина (а) под действием поля ориентируются перпендикулярно плоскости мембраны (б) и затем образуют агрегаты, функционирующие в качестве канала (в).

Впоследствии появились модели, основанные на детальном изучении конформационных особенностей аламетицина. В частности, было установлено (рис. 326), что в кристалле аламетицин принимает в основном α -спиральную конформацию с изломом в районе остатка Pro-14 и несколько разупорядоченной С-концевой частью (Р. Фокс). На этом основании была предложена модель, согласно которой аламетицин образует в мембране агрегаты с утопленной гидрофобной α -спиральной частью и выступающей гидрофильной С-концевой частью. Агрегат, ввиду однонаправленности карбонильных групп в α -спирали, имеет высокий дипольный момент и смещается при включении электрического поля, дотягиваясь до противоположной стороны мембраны, в результате чего канал включается.

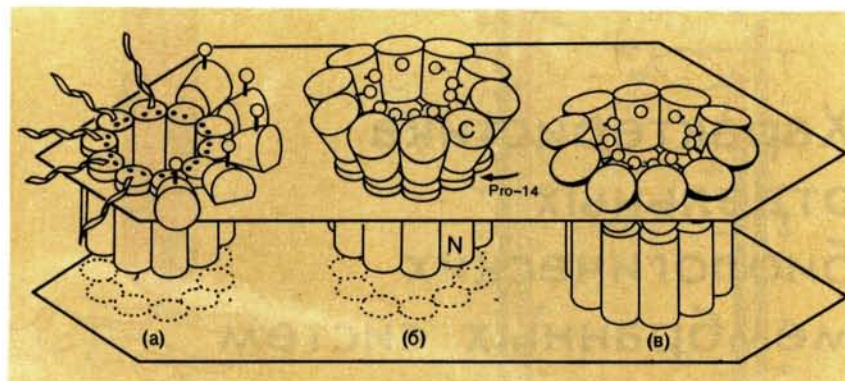
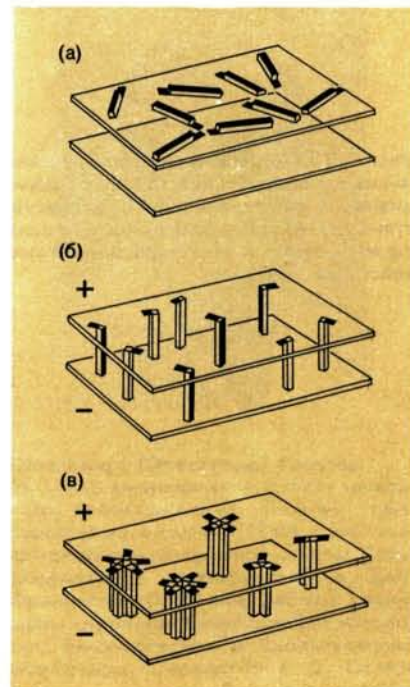
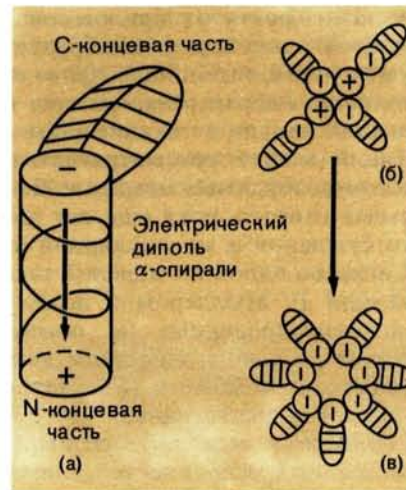


Рис. 326. Аламетициновый ассоциат в мембране в отсутствие электрического поля (а); промежуточная форма, образующаяся под действием приложенного электрического поля (б), и открытая форма ионного канала (в).

Весьма правдоподобна модель Г. Юнга (рис. 327), суммирующая элементы двух рассмотренных выше моделей. В отсутствие поля аламетицин ассоциирует в мембране за счет электростатического взаимодействия антипараллельно ориентированных α -спиральных

Рис. 327. Схематическое изображение мономера аламетидина (а) и его ассоциация в отсутствие (б) и в присутствии (в) внешнего электрического поля (флип — флоп и включение канала под действием поля).



участков; данное состояние не является проводящим. После приложения поля достаточной величины мономеры, ориентированные против поля, вынуждены переориентироваться. В результате растапливания одинаково направленных диполей образуется пора достаточно большого диаметра.

Характеристика отдельных биологических мембранных систем

В каждой клетке сосредоточено множество функционально детерминированных мембранных систем или их комплексов, выполняющих задачи переработки и передачи информации, генерации энергии, синтеза важнейших метаболитов и т. п. Сейчас можно с достаточным основанием утверждать, что такие системы представляют собой белковые ансамбли, встроенные строго ориентированно в липидный матрикс мембраны и работающие как единое целое. Четкое структурное описание этих систем требует привлечения самых современных методов химии, физики и биологии и пока достигнуто лишь на отдельных примерах.

Пурпурная мембрана и бактериородопсин

Хотя соль обычно убивает бактерии и поэтому издавна используется для консервирования пищевых продуктов, тем не менее некоторые бактерии выработали способность жить в средах с очень высокой концентрацией (до 4 М) поваренной соли. Такие микроорганизмы получили название галофильных (т. е. «любящих соль»); среди них особую известность приобрела культура *Halobacterium halobium*, обладающая способностью преобразовывать энергию солнечного света.

В 1971 г. В. Стоккениус (США) и Д. Остерхельт (ФРГ) выделили из клеток *H. halobium* мембраны интенсивно пурпурного цвета, главным белковым компонентом которых оказался хромопротеид, названный по аналогии с белком зрительного аппарата млекопитающих бактериородопсином. В качестве хромофорной



Стоккениус (Stoeckenius) Вальтер (р. 1921), американский биолог немецкого происхождения. Окончил Гамбургский университет (1950), с 1967 г. — профессор медицинской школы Калифорнийского университета в Сан-Франциско. Основные работы посвящены клеточной биологии, фотобиологии, биоэнергетике и биологическим мембранам. Совместно с Д. Остерхельтом открыл бактериородопсин (1971).

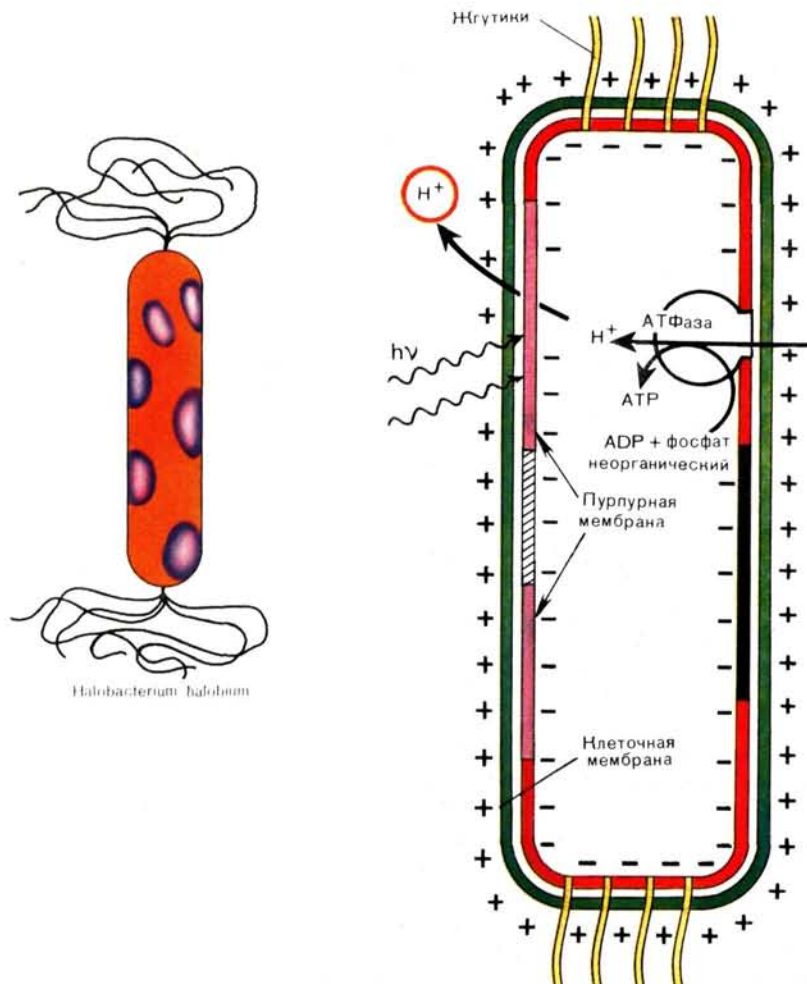


Рис. 328. Светозависимый синтез АТФ в клетках *Halobacterium halobium*.



Хендерсон (Henderson) Ричард (р. 1945), английский ученый, работающий в области молекулярной биологии и мембранологии, член Лондонского Королевского общества. Окончил Эдинбургский университет, с 1973 г. — в лаборатории молекулярной биологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже. Основные работы посвящены рентгеноструктурному и электронно-микроскопическому анализу структуры мембранных белков.

группы этот мембранный белок содержит эквимолекулярную смесь 13-*цис*- и полностью *транс*-ретиналя. Липидная компонента пурпурной мембраны *H. halobium* представлена диэфирным аналогом фосфатидилглицерофосфата (50%), сульфогликолипидами (30%), каротиноидами и неполярными липидами.

Оказалось, что в галофильных микроорганизмах бактериородопсин выполняет роль светозависимого протонного насоса, создающего градиент ионов водорода; энергия этого градиента используется клеткой для синтеза АТФ (рис. 328). Другими словами, фотосинтетическая машина галофильных бактерий представлена достаточно простой белковой системой, которая выполняет уникальную функцию «бесхлорофильного фотосинтеза».

Пурпурная мембрана представляет собой естественный двумерный кристалл. Молекулы бактериородопсина организованы в мембране в виде тримеров, причем каждый тример окружен шестью другими так, что образуется правильная гексагональная решетка (рис. 329).

Это обстоятельство позволило применить прямые физические методы для изучения третичной структуры бактериородопсина в мембране. Комбинацией электронно-микроскопических и дифракционных методов анализа была определена молекулярная структура белка в плане мембраны с разрешением в 0,37 нм, в то время как разрешение внутримембранных участков полипептидной цепи достигало всего лишь 1,4 нм. Полученная карта электронной плотности позволила выделить семь сегментов белковой молекулы, пронизывающих всю толщу мембраны в направлении, перпендикулярном ее плоскости. Р. Хендерсону удалось также установить, что каждый сегмент молекулы бактериородопсина находится в конформации α -спирали.



Выяснение первичной структуры бактериородопсина было завершено практически одновременно в 1979 г. в СССР Ю. А. Овчинниковым с сотр. и в США Г. Кораной с сотр. Полипептидная цепь белка состоит из 248 аминокислотных остатков, 67% которых являются гидрофобными. Необходимо отметить, что бактериородопсин явился первым истинно мембранным белком, строение которого было полностью расшифровано.

Одним из главных препятствий при структурном изучении интегральных белков биологических мембран является их низкая растворимость. Мембранные белки практически нерастворимы в водных буферных системах, и это фактически исключает использование протеолитических ферментов в традиционной форме. В процессе работы по установлению полной аминокислотной последовательности бактериородопсина применялись в основном химические методы расщепления полипептидной цепи, и образовавшиеся фрагменты разделялись на биогелях, уравновешенных концентрированным раствором муравьиной кислоты.

При изучении бактериородопсина были, по существу, впервые сформулированы принципы определения топографии мембранных белков. Анализ распределения гидрофобных и гидрофильных аминокислотных остатков в полипептидной цепи позволяет сделать вывод о ее пространственной укладке в мембране. Гидрофобные зоны, по всей видимости, представляют собой трансмембранные сегменты, в то время как гидрофильные районы выступают из мембраны и соединяют отдельные внутримембранные α -спиральные тяжи белковой молекулы. Такого рода анализ выявил в первичной структуре бактериородопсина семь участков повышенной гидрофобности, что хорошо согласуется с электронно-микроскопическими данными по топографии белка в мембране.



Остерхельт (Oesterhelt) Дитер (р. 1940), немецкий биохимик. Окончил Мюнхенский университет (1965), с 1979 г.— профессор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы посвящены биохимии, биоэнергетике и молекулярной биологии фоторецепторов, мембран и ферментов. Установил, что ретинальсодержащий белок бактериородопсин функционирует как светочувствительный протонный насос (1972).

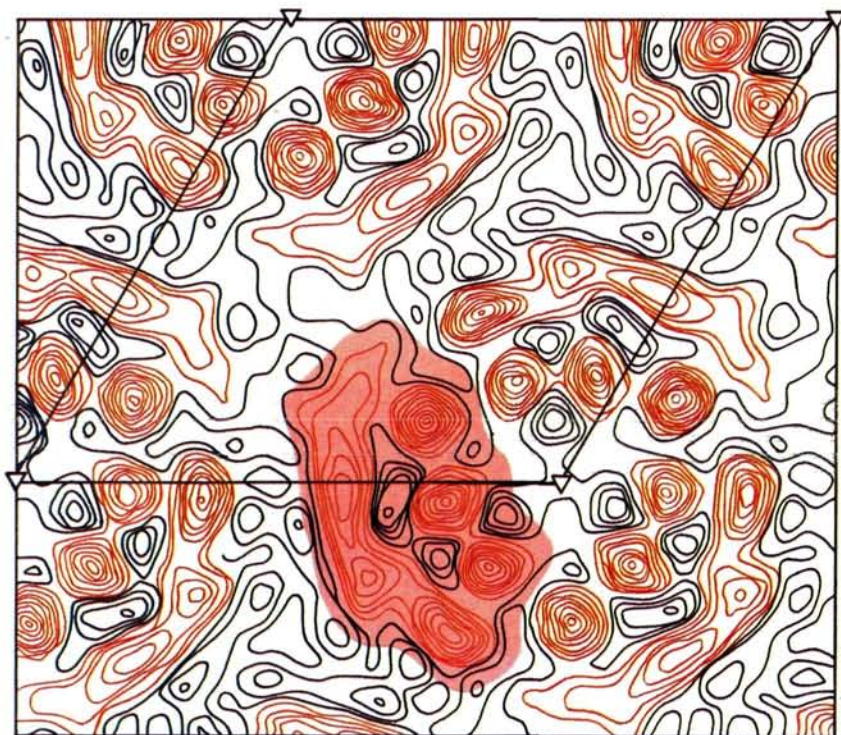


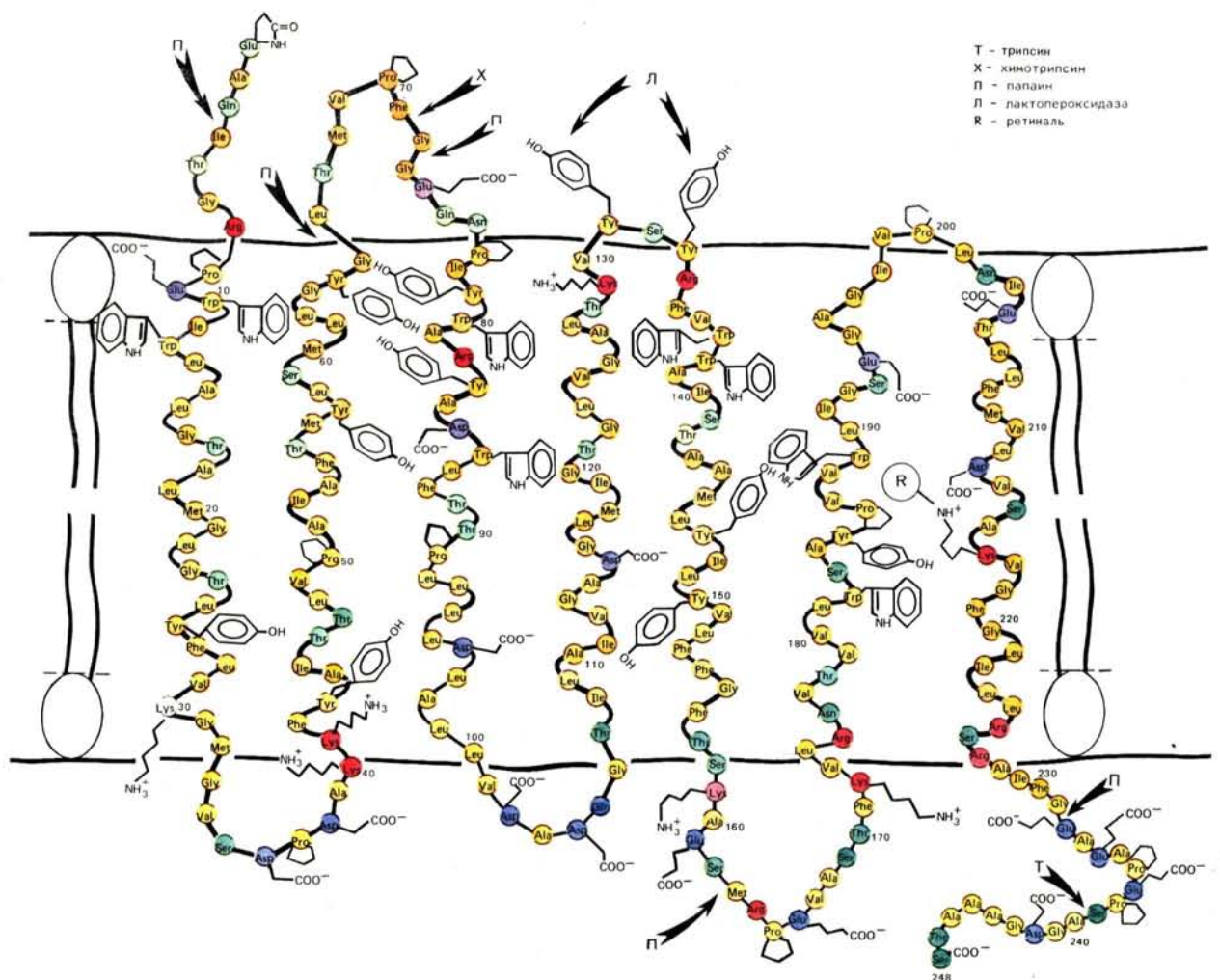
Рис. 329. Карта электронной плотности пурпурных мембран.

Широкое применение нашел метод ограниченного протеолиза в изучении топографии бактериородопсина. Так как молекула бактериородопсина в пурпурной мембране обладает довольно жесткой упаковкой, можно было ожидать, что ее участки, расположенные внутри мембраны, окажутся недоступными для макромолекул ферментов, в то время как области, экспонированные наружу, будут подвергаться ферментативному гидролизу. Ограниченный протеолиз позволил локализовать N- и С-концевые участки белка соответственно на наружной и цитоплазматической поверхностях мембраны.

При обработке пурпурных мембран протеиназами широкой специфичности, в частности папаином, было обнаружено четыре участка полипептидной цепи (рис. 330), выступающих на поверхность по обе стороны липидного бислоя.

Следует подчеркнуть, что бактериородопсин, расщепленный в различных положениях полипептидной цепи и лишенный участков 1—3, 66—72 и 232—248, сохраняет в мембране специфическую укладку, определяющую его функционирование в качестве протонного насоса (В. П. Скулачев). Особо следует отметить тот факт, что как полностью денатурированный бактериородопсин, так и фрагмен-

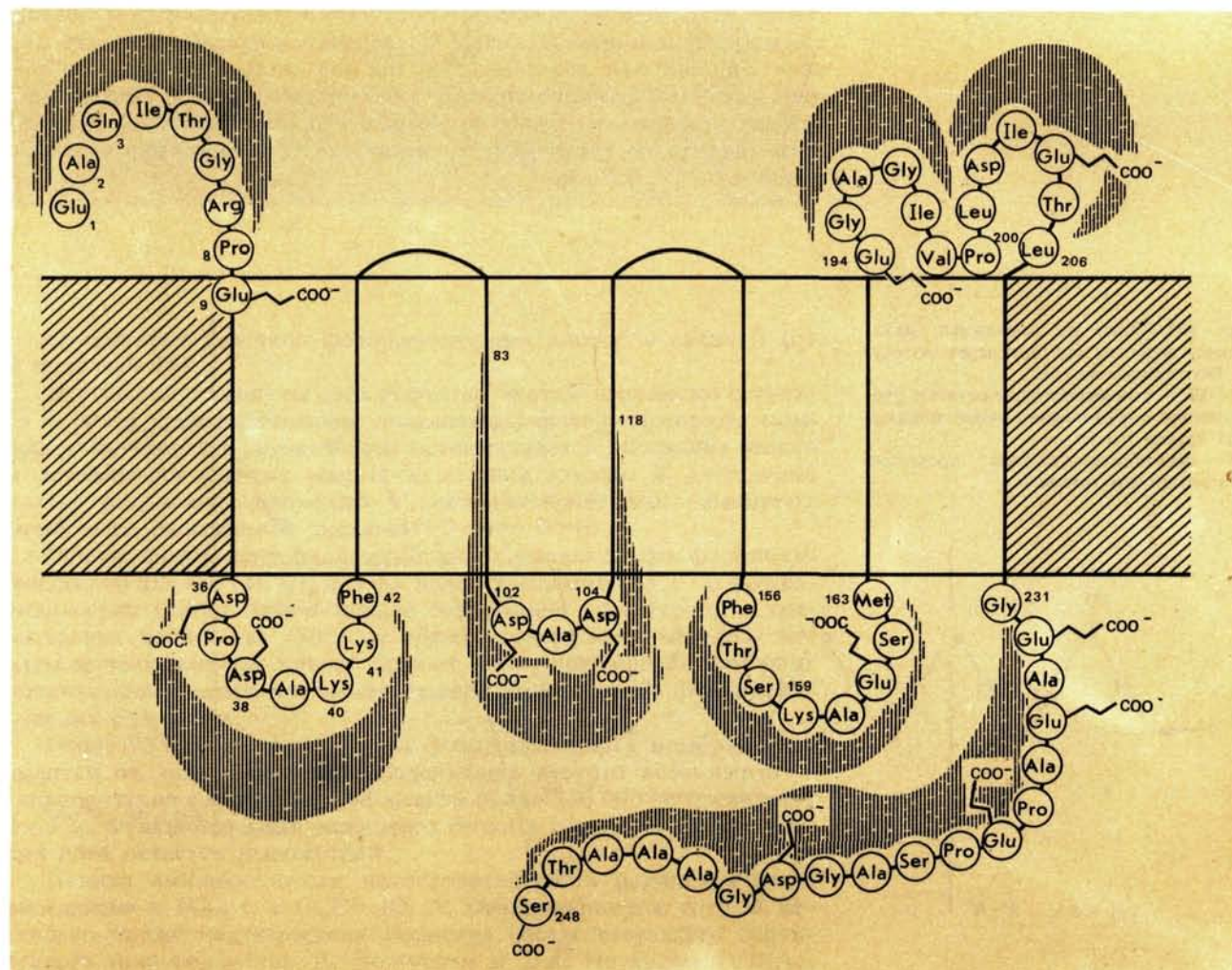
Рис. 330. Топография бактериородопсина в мембране.



ты ограниченного протеолиза химотрипсином способны в присутствии фосфолипидов и ретиналя давать реконструированный комплекс, активность которого практически не уступает активности нативного белка.

Весьма эффективным методом уточнения топографии мембранных белков, прежде всего точной локализации внеклеточных участков, является использование моноклональных антител. Для получения гибридом использовались фрагменты бактериородопсина, полученные путем его расщепления протеолитическими ферментами. Наиболее ценными в этом случае оказались синтетические фрагменты: коррелируя величину синтетического пептида и эффективность связывания соответствующего антитела, можно с высокой степенью достоверности зондировать выступающие из мембраны полипептидные петли. Ниже показана локализация различных антигенных детерминант молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране (Г. Корана, Н. Г. Абдулаев).

Как же бактериородопсин работает? В ответ на поглощение кванта света бактериородопсин вступает в цикл фотохимических превращений. При этом происходит обратимая изомеризация ретиналя с последующим выбросом протона из молекулы белка и его



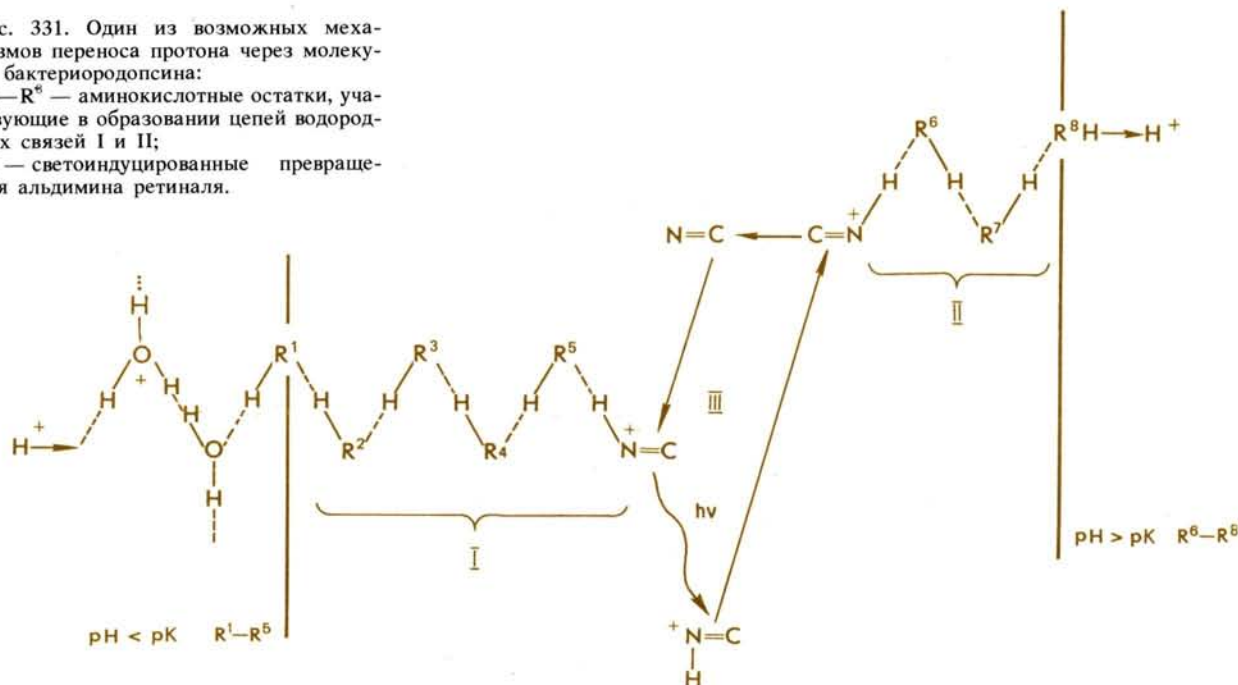
присоединением со стороны цитоплазмы. Одна из спектральных форм бактериородопсина с максимумом поглощения при 412 нм (M-412) обладает депротонированной альдиминной связью между остатком ретиналя и белком.

Возможный механизм переноса протона через бактериородопсин предполагает наличие цепи водородных связей, образованной боковыми радикалами гидрофильных аминокислот и простирающейся через всю толщу белка. Векторный перенос протона через подобную цепь может осуществляться в том случае, если она состоит из двух участков и включает в себя функциональную группировку, способную под действием света изменять свое микроокружение и тем самым последовательно «закрывать» и «размыкать» эти участки. Альдимин ретиналя в молекуле бактериородопсина (при Lys-216) может выполнять роль такого рода «челночного» механизма между двумя предполагаемыми белковыми проводниками протонов, один из которых сообщается с внешней, другой — с цитоплазматической поверхностью мембраны (рис. 331).

В настоящее время природа протон-проводящего пути бактериородопсина интенсивно изучается в различных лабораториях. Одним из наиболее эффективных подходов в этом направлении является использование методов белковой инженерии, суть которых состоит в замене одних аминокислот белка другими путем изменения соответствующих кодонов в гене с помощью направленного мутагенеза. В лаборатории Г. Кораны получено около 15 мутантных генов. Детальное исследование полученных таким образом белков с измененной аминокислотной последовательностью позволит ответить на вопрос о вовлеченности тех или иных аминокислот в общий механизм функционирования бактериородопсина. Безусловно, важная информация будет получена из данных рентгеноструктурного анализа по третичной структуре бактериородопсина с разрешением $0,25 \div 0,3$ нм.

Рис. 331. Один из возможных механизмов переноса протона через молекулу бактериородопсина:

R^1-R^8 — аминокислотные остатки, участвующие в образовании цепей водородных связей I и II;
III — светоиндуцированные превращения альдимина ретиналя.



Родопсин — светочувствительный пигмент фоторецепторных клеток сетчатки глаза позвоночных — является в настоящее время одним из наиболее изученных мембранных белков.



Существуют два типа фоторецепторных клеток — палочки (а) и колбочки (б).

Эти клетки состоят из двух основных частей: наружного сегмента — места непосредственной локализации фоторецепторных мембран и внутреннего сегмента, где осуществляется биосинтез белков и локализован аппарат энергообеспечения клетки. В зрительной клетке родопсин расположен в специализированных замкнутых мембранах, называемых дисками.

Основу фоторецепторной мембраны составляют фосфолипиды: фосфатидилхолин (40%), фосфатидилэтаноламин (38%) и фосфатидилсерин (13%). Очень низкое содержание холестерина и значительные количества (80% от общего содержания липидов) ненасыщенных жирных кислот делают фоторецепторную мембрану чрезвычайно жидкой, что имеет важное значение для функционирования родопсина.

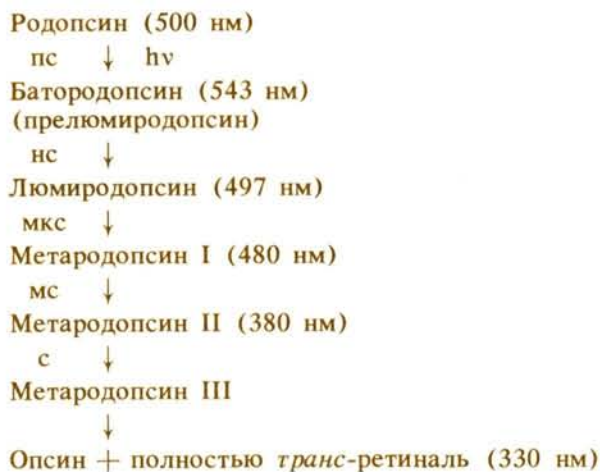
Около 95% белкового состава фоторецепторных мембран приходится на долю родопсина. Содержание второго компонента — гликопротеина с молекулярной массой около 250 000 не превышает 2—3%. Функциональная роль этого белка в процессах фоторецепции пока остается неизвестной.

Полная аминокислотная последовательность родопсина была определена в 1982 г. в СССР Ю. А. Овчинниковым с сотр. и несколько позже подтверждена анализом соответствующего структурного гена родопсина Д. Хогнесом и Дж. Натансом (США).

ный протеолиз белка в составе нативной мембраны, моноклональные антитела, а также химическая модификация проникающими и непроникающими реагентами. Было показано, что мембранную часть молекулы родопсина составляют 7 сегментов полипептидной цепи, находящихся в α -спиральной конформации и пронизывающих толщу фоторецепторной мембраны (рис. 332). Наиболее значительными по величине участками, экспонированными в водную фазу, являются N- и C-концевые области белка. Интересно, что специфическая укладка родопсина и бактериородопсина в мембране во многом аналогична, хотя белки практически не имеют структурной гомологии, а эволюционно их разделяет не один десяток миллионов лет.

Знание структуры родопсина открывает путь к пониманию того, каким образом функционирует этот важнейший белок. Молекула родопсина состоит из белковой части — опсина и хромофорной группы — 11-*цис*-ретиная, связанного с ним альдиминной связью. Белок обладает характерным спектром поглощения с максимумами при 280 и 500 нм. Поглощение при 500 нм обусловливается специфическим взаимодействием хромофора с белковым окружением.

Первым и важнейшим звеном в цепи событий, приводящих к зрительному возбуждению, является индуцированная светом изомеризация 11-*цис*-ретиная в полностью *транс*-форму. С момента поглощения кванта света молекула родопсина претерпевает ряд спектральных превращений



Абдулаев Нажмутин Гаджимагомедович (р. 1941), советский химик-биоорганик. Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1967), работает в Институте биорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы посвящены выяснению структурных основ функционирования мембранных светочувствительных белков. Лауреат Государственной премии СССР (1986).

Таким образом, молекула родопсина проходит через ряд промежуточных стадий, превращаясь в молекулу опсина и свободный ретинаяль. Весь процесс завершается в течение нескольких секунд.

Одно из важнейших событий, происходящих вслед за фотоизомеризацией ретинаяля, — поляризация плазматической мембраны зрительной клетки. Эта мембрана в темноте проницаема для ионов натрия. Существующий в темноте градиент ионов натрия поддерживается Na^+ , K^+ -зависимой АТФазой, расположенной в плазматической мембране внутреннего сегмента. Поглощение кванта света каким-то непонятным до сих пор механизмом блокирует поступление ионов натрия в клетку. Понижение скорости поступления ионов натрия внутрь клетки приводит к избыточному отрицательному заряду на внутренней стороне плазматической мембраны, т. е. гиперполяризации клетки. Именно этот сигнал,



Скулачев Владимир Петрович (р. 1935), советский биохимик, член-корреспондент АН СССР (1974). Окончил Московский университет (1957), с 1973 г. — заведующий Межфакультетской проблемной лабораторией биоорганической химии и молекулярной биологии им. А. Н. Белозерского в МГУ. Основные работы — по изучению механизма превращения энергии в биологических мембранах. Лауреат Государственной премии СССР (1975).

возникший на плазматической мембране, и передается к синаптическому окончанию зрительной клетки, что и приводит к нервному импульсу.

Фоторецепторные диски морфологически отделены от плазматической мембраны клетки. Молекула родопсина, поглотившая квант света, находится на расстоянии нескольких сотен нанометров от плазматической мембраны. Для объяснения механизма передачи информации от обесцвеченной молекулы родопсина на плазматическую мембрану выдвинуты две гипотезы, каждая из которых основывается на существовании в зрительной клетке медиаторов, способствующих передаче информации от фоторецепторного диска на плазматическую мембрану. Роль таких медиаторов выполняют ионы Ca^{2+} или циклический гуанозинмонофосфат (сGMP). В последнее время общепринято, что роль родопсина в процессах зрительного восприятия состоит в том, чтобы контролировать уровень этих двух медиаторов в клетке.

Согласно первой (так называемой Ca^{2+}) гипотезе, конформационные изменения молекулы родопсина, происходящие в результате поглощения кванта света, приводят к образованию поры в мембране диска. Эта пора служит своеобразным путем выхода Ca^{2+} из внутридискового пространства в цитоплазму. Ионы Ca^{2+} , диффундируя к плазматической мембране, могут блокировать натриевые каналы плазматической мембраны. Основными предпосылками Ca^{2+} гипотезы явились следующие данные: введение ионов Ca^{2+} в клетку в темноте приводит к гиперполяризации, а удаление их из клетки — к деполяризации мембраны. Введение хелатирующих агентов снижает чувствительность клетки к свету.

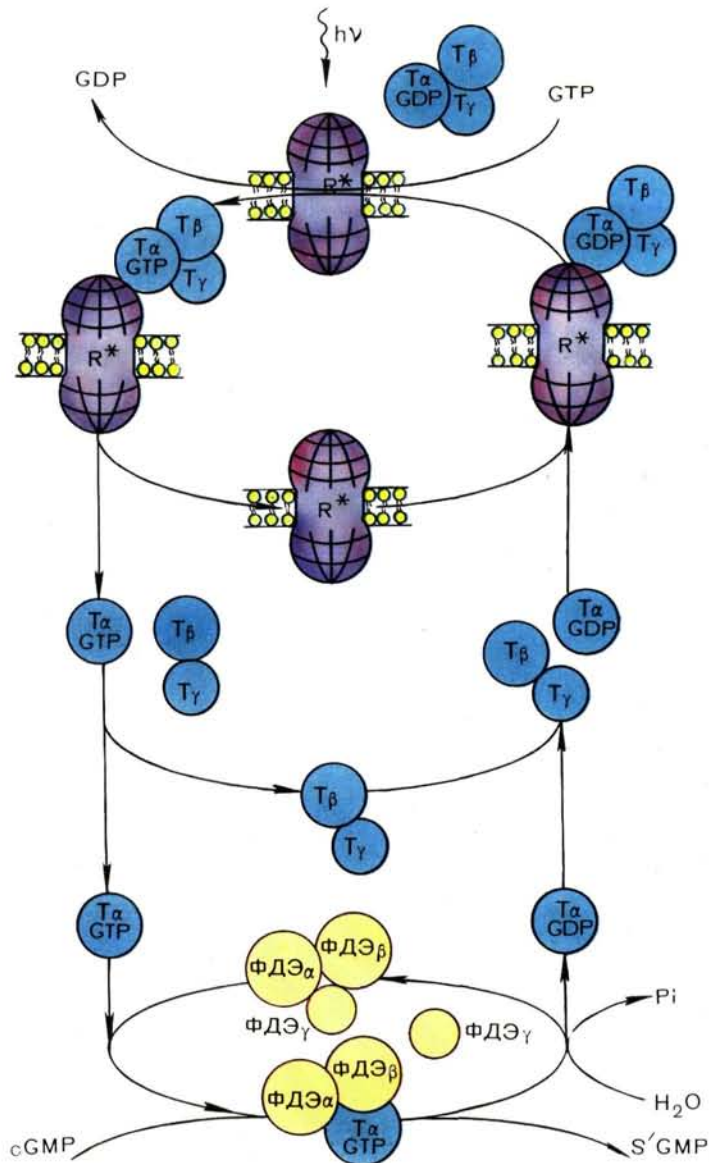
Согласно более вероятной нуклеотидной гипотезе, роль переносчика сигнала от фотовозбужденного родопсина выполняют молекулы сGMP, понижение уровня концентрации которых вызывает блокирование натриевых каналов.

Активируемая светом молекула родопсина — метародопсин II — образует специфический комплекс с находящимся в GDP-связанной форме трансдуцином (первое звено в цепи усиления сигнала света) и катализирует обмен связанного с его α -субъединицей GDP на GTP. GTP-Связанная форма трансдуцина имеет низкое сродство к фотоактивированному родопсину, в результате чего после обмена GDP на GTP комплекс быстро диссоциирует. Разница в аффинности двух форм трансдуцина к родопсину дает возможность последнему совершать быстрый круговорот и активировать большое число молекул трансдуцина. После связывания GTP трансдуцин диссоциирует на комплекс β , γ -субъединиц и комплекс α -субъединицы с GTP. α -Субъединица трансдуцина в GTP-связанной форме активирует цикло-GMP-зависимую фосфодиэстеразу (ФДЭ), снижая ингибиторный эффект γ -субъединицы фермента. Активирующее влияние α -субъединицы трансдуцина на фосфодиэстеразу прекращается после гидролиза GTP. Однако, поскольку гидролиз GTP протекает медленно, фосфодиэстераза находится в активном состоянии достаточно долго и успевает за это время гидролизовать сотни молекул сGMP. Комплекс β , γ -субъединиц трансдуцина ассоциирует с GDP-связанной формой α -субъединицы, и молекулы трансдуцина снова приобретают способность взаимодействовать с фотоактивированным родопсином. Отдельная α -субъединица с родопсином не взаимодействует. Далее весь цикл повторяется.

Строение трех субъединиц (α , β , γ) трансдуцина и фосфодиэстеразы в настоящее время выяснено с помощью методов белковой химии и генетической инженерии, что открывает путь к расшифровке молекулярных механизмов зрительного возбуждения.

Увеличение концентрации $cGMP$ при его непосредственном введении в зрительную клетку коррелирует с увеличением проницаемости цитоплазматической мембраны для ионов, приводит к деполяризации зрительной клетки и увеличивает амплитуду электрического ответа. Избыток $cGMP$ увеличивает латентный период ответа в зависимости от количества введенного циклического нуклеотида. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что молекулы циклического GMP могут быть вовлечены в зрительный процесс.

На рисунке представлена схема функционирования белков зрительного каскада.



Цитохром-с-оксидаза

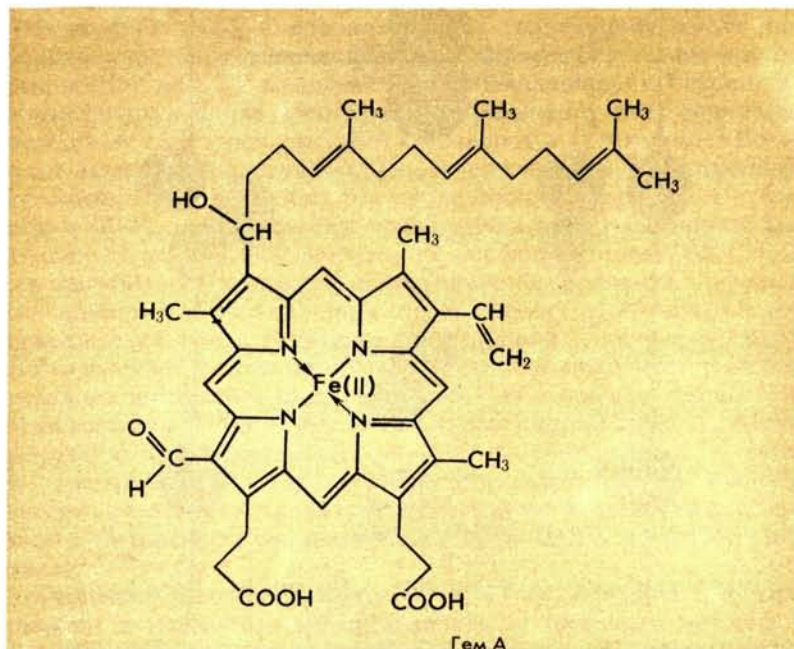
Цитохром-с-оксидаза (называемая также цитохромоксидазой, или цитохромом aa_3) — конечный компонент дыхательной цепи всех аэробных организмов. Этот фермент был открыт О. Варбургом в 20-х годах нашего столетия и был назван им «дыхательным ферментом». Цитохромоксидаза играет фундаментальную роль в жизни аэробных организмов; 90% потребляемого ими кислорода используется в качестве субстрата этого фермента.

Цитохромоксидаза, расположенная в эукариотических организмах во внутренней мембране митохондрий, осуществляет перенос электронов от одноэлектронного донора — ферроцитохрома c к акцептору четырех электронов — молекулярному кислороду. Таким образом происходит восстановление кислорода до воды и окисление цитохрома c :



В ходе этого процесса, вплоть до полного завершения восстановления, не обнаружено образования каких-либо промежуточных продуктов. Одна молекула фермента может катализировать окисление до 400 молекул ферроцитохрома c в секунду.

Цитохромоксидаза представляет собой мультисубъединичный интегральный мембранный белок, содержащий 2 гема a и 2 иона меди. Мономер цитохромоксидазы является минимальной функциональной единицей, хотя в нативной мембране фермент существует главным образом в виде димеров. Гемы химически идентичны, но находятся в различном белковом окружении, что обуславливает их различные функциональные и спектроскопические свойства.



Субъединичный состав цитохромоксидазы сильно варьирует в зависимости от источника выделения. Так, цитохром-с-оксидазы бактерий содержат 2—3 субъединицы, митохондрий дрожжей — 7—8, а митохондрий высших животных — 12—13 (Г. Бузе, Б. Каденбах). В настоящее время установлена полная аминокислотная последовательность всех субъединиц фермента из митохондрий сердца быка (Г. Штеффенс, Г. Бузе и др.). Фермент состоит из 12 субъединиц. Их молекулярные массы равны: I — 57 000, II — 26 000, III — 30 000, IV — 17 000, V — 12 500, остальных субъединиц от 5 000 до 10 000. Первичная структура субъединиц I и III предсказана на основании нуклеотидной последовательности соответствующих структурных генов митохондриальной ДНК (Ф. Сенгер и др.). Молекула цитохромоксидазы содержит, по-видимому, по одной копии большинства субъединиц. Биосинтез трех больших субъединиц (I—III) происходит в митохондриях, остальные субъединицы синтезируются в цитоплазме в виде предшественников с N-концевыми сигнальными последовательностями (от 2 000 до 6 000), необходимыми для транспорта через мембрану. Детали процесса самосборки активного комплекса из отдельных субъединиц пока не выяснены. Считается общепризнанным, что субъединицы I и II участвуют в связывании простетических групп (гемов и ионов меди) и образовании 4 окислительно-восстановительных центров. Точная локализация простетических групп в апобелках затруднена, так как они не связаны ковалентно с аминокислотными остатками этих белков и легко теряются при выделении субъединиц.

В результате функционирования цитохромоксидазы происходит генерация электрохимического градиента протонов — движущей силы синтеза АТФ. Долгое время предполагалось, что фермент осуществляет этот процесс, катализируя перенос электронов, а эквивалентное число протонов, необходимых для образования молекулы воды, поглощается из матрикса. В настоящее время имеется ряд убедительных данных, свидетельствующих о том, что цитохромоксидаза функционирует как истинный протонный насос и в действительности на один транспортируемый электрон переносит два протона, один из которых используется в a_3 -Cu-центре, где происходит восстановление кислорода, а второй пересекает мембрану. Предполагается, что основная роль в транспорте протонов принадлежит субъединице III.

Показано, что обработка цитохромоксидазы дициклогексилкарбодиимидом (DCC) приводит к потере протон-транслоцирующей активности, в то время как транспорт электронов практически не затрагивается. DCC в данном случае модифицирует главным образом остатки Glu-90 субъединицы III. Этот район полипептида расположен внутри мембраны и структурно подобен DCC-связывающему участку протеолипида H^+ -АТФазы. Потеря протон-транслоцирующей активности происходит под действием антител к III субъединице. Препараты цитохромоксидазы, из которых избирательно удалена субъединица III (например, с помощью хроматографии комплекса на ДЭАЭ-агарозе), не способны к переносу протонов после реконструкции в липосомы; транспорт электронов при этом не нарушается.

Общие представления о пространственном строении молекулы цитохромоксидазы получены при электронно-микроскопическом анализе двумерных кристаллов этого белка (Р. Хендерсен, Р. Капальди). Согласно этой модели (рис. 333) молекула напоминает по форме букву Y, и общая длина ее ~ 11 нм. Два верхних домена (M_1 и M_2) в основном погружены в липидный бислой и выступают в матрикс на ~ 2 нм, а нижняя часть молекулы (С) экспонирована в цитозоль на 5,5 нм. Расстояние между центрами M_1 и M_2 ~ 4 нм.



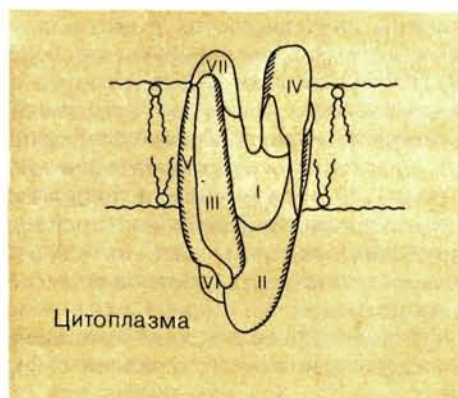
Рис. 333. Трехмерная модель мономера цитохромоксидазы (разрешение $\sim 2,5$ нм).



Митчелл [Mitchell] Питер (р. 1920), английский химик. Окончил Кембриджский университет (1950), с 1964 г.— научный руководитель Глинновского исследовательского института в Корнуолле. Основные работы — по изучению направленности биохимических реакций в пространстве. Разработал хемиосмотическую теорию окислительного фосфорилирования (1961—1966). Лауреат Нобелевской премии по химии (1978).

Домен M_1 больше по объему, чем M_2 . Методом малоуглового рентгеновского рассеяния показано, что оба эти домена содержат α -спиральные структуры, перпендикулярные липидному бислою (8—12 α -спиралей в M_1 и 5—8 в M_2).

Для исследования пространственной организации молекулы фермента в мембране широко используются методы химической модификации непроникающими, гидрофобными и кросс-сшивающими реагентами. В качестве непроникающих меток применяются также антитела к отдельным субъединицам. По имеющимся данным, предложена следующая модель организации цитохромоксидазы в мембране.



Цитохромоксидаза объединяет в себе свойства нескольких металлопротеинов, выполняющих транспортные или окислительно-восстановительные функции для осуществления более сложной комбинации процессов, включающих связывание и восстановление кислорода и транспорт электронов и протонов. Реальные механизмы этих реакций, так же как и многие вопросы относительно структурной организации фермента, в настоящее время неизвестны.

Транспортные аденозинтрифосфатазы (АТФазы)

Важнейшую роль в клетке играют мембранные системы активного (т. е. энергозависимого) транспорта катионов против градиента их электрохимического потенциала, использующие для процесса транслокации энергию гидролиза АТФ и объединенные под названием транспортных аденозинтрифосфатаз, или ионных насосов.

Все известные транспортные АТФазы *in vitro* способны катализировать как сопряженный с гидролизом АТФ активный транспорт ионов, так и обратную реакцию — синтез АТФ за счет энергии

электрохимического градиента. Выполнение *in vivo* преимущественно одного из этих процессов, а также принципиальные различия в структурной организации и механизмах функционирования послужили основой для разделения этих ферментов на две группы. К первой относятся H^+ -АТФазы сопрягающих мембран (АТФ-синтетазы), ко второй — катион-транспортирующие АТФазы, например Na^+ , K^+ -АТФаза, Ca^{2+} -АТФаза и т. п.

H^+ -АТФаза. Обратимая протон-транслоцирующая АТФаза, или H^+ -АТФаза, катализирует последний этап окислительного и фотосинтетического фосфорилирования в митохондриях, хлоропластах и бактериях. Согласно хемиосмотической гипотезе П. Митчелла, постулированной им в 1961 г. и получившей к настоящему времени множество экспериментальных подтверждений, дыхательная или фотосинтезирующая цепь, асимметрично расположенные в мембране, генерируют разность протонных потенциалов на сопрягающей мембране. Обратный транспорт протонов посредством H^+ -АТФазы обуславливает синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Поэтому этот фермент иногда называют еще АТФ-синтетазой. Следует отметить, что существуют и другие теории сопряжения окисления и фосфорилирования (Ф. Липман, Э. Слейтер, П. Бойер, Р. Вильямс и др.). Однако они не получили столь широкого распространения, как гипотеза П. Митчелла.

H^+ -АТФазы, выделенные из различных эукариотических и бактериальных клеток, представляют собой сложные мембраносвязанные комплексы и имеют весьма сходную структурную организацию (рис. 334). Их молекулярные массы равны примерно 450 000—500 000. Молекулы этих ферментов состоят из двух частей: водорастворимой каталитической части (F_1), которая, диссоциируя с мембраны, может функционировать только как АТФаза, но не как АТФ-синтетаза, и мембранного сектора (F_0), обладающего протон-транслоцирующей активностью. Обе части имеют сложный субъединичный состав. Только полный $F_1 \cdot F_0$ -комплекс способен осуществлять реакции преобразования энергии, т. е. ре-



Бойер (Boyer) Пол (р. 1918), американский биохимик. Окончил Висконсинский университет, профессор биохимии Калифорнийского университета в Лос-Анжелесе. Основные работы — в области энзимологии. Один из основателей учения об окислительном фосфорилировании.

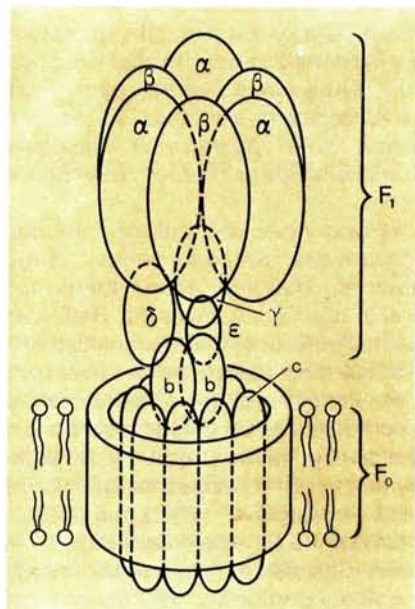


Рис. 334. Модель структурной организации H^+ -АТФазы *E. coli*.



Эрнстер [Ernster] Ларс (р. 1920), шведский биохимик, иностранный член АН СССР (1982). Образование получил в Стокгольмском университете (1956), с 1967 г. — профессор биохимии там же. Основные работы посвящены биоэнергетике, мембранной биохимии и химическому канцерогенезу.

акции, связанные с переносом протонов через мембрану. Связывание N,N' -дициклогексилкарбодиимида (DCC) с F_0 блокирует транслокацию протонов и поэтому ингибирует как синтез, так и гидролиз АТФ $F_1 \cdot F_0$ -комплексом. По данным электронной микроскопии, у бактерий, митохондрий и хлоропластов каталитическая часть F_1 представляет собой сферическую глобулу с диаметром 9—10 нм, прикрепленную к мембране. В митохондриях F_1 прикрепляется к внутренней мембране со стороны матрикса посредством «ножки» длиной 4,5—5 нм. Молекулярная масса F_1 составляет 350 000—400 000. Считается общепринятым, что каталитический центр гидролиза и синтеза АТФ локализован на F_1 . Впервые часть F_1 была выделена Э. Ракером с сотрудниками в 1960 г. из митохондрий сердечной мышцы быка. Позднее было описано выделение белковой мембранной фракции митохондрий сердечной мышцы быка, сообщающей F_1 чувствительность к ингибиторам. Эта фракция была названа F_0 (индекс «0» означает чувствительность к олигомицину). Было показано, что для реконструкции $F_1 \cdot F_0$ -активного комплекса необходимо добавление фосфолипидов, и установлено, что мишенью действия олигомицина является F_0 . Большой вклад в изучение механизма действия как F_1 и F_0 , так и всего $F_1 \cdot F_0$ -комплекса митохондрий внесли работы Л. Эрнстера и сотр.

Очищенный $F_1 \cdot F_0$ -комплекс впервые был выделен Я. Кагавой из мембран термофильных бактерий PS-3.

H^+ -АТФазы бактерий и хлоропластов имеют близкую структурную организацию: F_1 состоит из 5 типов субъединиц, обозначаемых α , β , γ , δ , ϵ в порядке уменьшения их молекулярной массы, а F_0 из трех — a , b , c . До сих пор нет общепринятого мнения о стехиометрии субъединиц $F_1 \cdot F_0$ -комплекса, однако для бактериальных ферментов большинство данных свидетельствует в пользу соотношений $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ для F_1 и $a_1b_2c_6-10$ для F_0 .

Современные представления о функциональной роли субъединиц H^+ -АТФазы, в частности субъединиц F_1 , сформировались главным образом на базе данных, полученных Я. Кагавой, который показал, что каталитический центр фермента локализован в β -субъединице, а в α — находится центр связывания ADP, которому приписывается роль аллостерического регулятора. Комплекс $\gamma\delta\epsilon$ взаимодействует с F_0 , блокируя его протонную проводимость. На основании этих результатов Я. Кагава предположил, что в состав молекулы H^+ -АТФазы входят три функциональных компонента: энергетический трансформер ($\alpha_3\beta_3$), «ворота» ($\gamma\delta\epsilon$) и протонный канал (F_0). Канальная часть непосредственно взаимодействует с воротами, переход которых из закрытого в открытое состояние управляется либо разностью электрохимического потенциала протонов на мембране, либо гидролизом АТФ в трансформере.

В отличие от каталитической части, функциональная роль субъединиц F_0 исследована гораздо хуже. Наиболее изученной является субъединица c . Именно этот белок является мишенью для DCC, поэтому его обычно называют DCC-связывающим белком, а из-за его растворимости в органических растворителях — протеолипидом; в настоящее время ни у кого не вызывает сомнения тот факт, что он непосредственно вовлечен в процесс трансмембранного переноса протонов. Субъединица b , возможно, формирует на мембране центр связывания F_1 и, вероятно, совместно с протеолипидом участвует в образовании протон-проводящего пути в сопрягающей мембране. Функциональная роль третьей субъединицы F_0 остается пока невыясненной.

Ф. Гибсоном было показано, что гены, кодирующие субъединицы H^+ -АТФазы *E. coli*, образуют *unc*-оперон (иногда его назы-



Кагава [Kagawa] Ясуо (р. 1932), японский биохимик. Окончил Токийский университет (1957), с 1972 г.— профессор биохимии медицинской школы Дзэти. Известен работами в области изучения структуры мембранных белков, прежде всего белков, выделенных из мембран термофильных бактерий.

вают атр-опероном), нуклеотидная последовательность которого была установлена благодаря работам Д. Уолкера, М. Футаи и их сотр. (рис. 335).

На основании нуклеотидной последовательности кДНК соответствующих мРНК структурных генов *unc*-оперона были определены аминокислотные последовательности всех субъединиц H^+ -АТФазы *E. coli*. Подобным же методом установлена первичная структура субъединиц H^+ -АТФазы термофильных бактерий PS-3. В случае H^+ -АТФаз митохондрий и хлоропластов информация об аминокислотной последовательности была получена в основном с помощью методов классической белковой химии. H^+ -АТФаза митохондрий имеет более сложное субъединичное строение, чем соответствующие ферменты бактерий и хлоропластов. Установление первичной структуры субъединиц митохондриального фермента (Д. Уолкер, Ю. А. Овчинников, Л. Эрнстер и др.) позволило осуществить сравнительный анализ первичных структур субъединиц H^+ -АТФаз из различных источников с использованием компьютерных программ. На основании полученных данных был сделан вывод, что субъединицы, выполняющие важную функциональную роль в комплексе, например формирующие каталитический центр фермента (α , β) или составляющие основу мембранного сектора (а, с), имеют в значительной степени более консервативную аминокислотную последовательность, вероятно, и более консервативную пространственную организацию в $F_1 \cdot F_0$ - комплексе, чем субъединицы, принимающие участие во взаимодействии каталитической (F_1) и протон-проводящей (F_0) частей комплекса, а также в регуляции его АТФазной или АТФ-синтезирующей активностей.

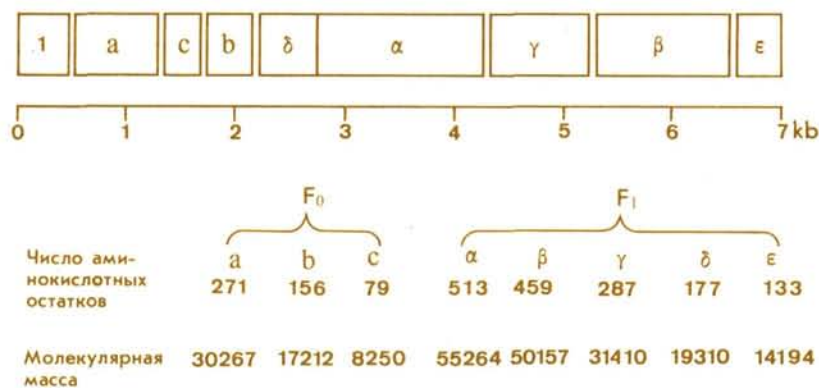


Рис. 335. Схема строения *unc*-оперона *E. coli*.

Na^+ , K^+ -Активируемая аденозинтрифосфатаза. Характерной особенностью животных клеток является резко выраженная асимметрия их ионного состава относительно внешней среды. Так, внутриклеточная концентрация ионов калия примерно в 30 раз выше, а ионов натрия в 10 раз ниже, чем в окружающей среде. Градиенты концентрации ионов натрия и калия регулируют объем клетки и ионный состав в узких пределах колебаний, обеспечивают электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток и служат движущей силой для транспорта в клетку сахаров и аминокислот. Трансмембранные градиенты концентраций катионов являются

результатом функционирования Na^+, K^+ -активируемой аденозинтрифосфатазы плазматических мембран. Это одно из самых «энергоемких производств» клетки, потребляющее до 40% производимого АТФ.

Более ста лет назад Ю. Либих установил, что в клетках содержится гораздо меньше натрия, чем во внеклеточной среде. С тех пор был накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о неравновесном распределении катионов между клеткой и средой. С появлением метода радиоактивных изотопов было обнаружено, что ионы натрия непрерывно проходят через мембрану в обоих направлениях, и возникло предположение о существовании «натриевого насоса» — особого мембранного энергозависимого механизма перекачки ионов натрия из клетки в окружающую среду (Р. Б. Дин, 1941).

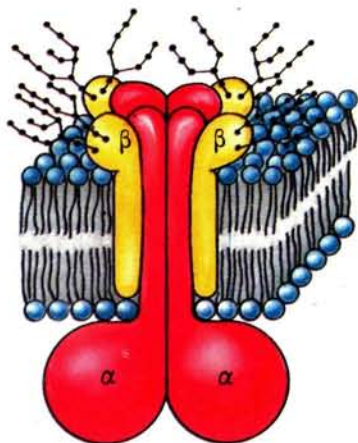
Многочисленные исследования процессов транспорта, проведенные в 50-х годах главным образом на аксонах головоногих моллюсков и «тенях» эритроцитов, выявили следующие основные характеристики «натриевого насоса». Активный выброс ионов натрия зависит от внеклеточной концентрации ионов калия, и, наоборот, внутриклеточное содержание Na^+ управляет потоком K^+ в клетку, т. е. потоки Na^+ из клетки и K^+ в клетку взаимосвязаны. Активный транспорт энергозависим и возможен лишь при наличии в клетке АТФ, т. е. ионные потоки сопряжены с гидролизом АТФ.

Na^+, K^+ -Активируемая аденозинтрифосфатаза была открыта Й. Скоу в 1957 г. Во фракции плазматических мембран нервов краба им была обнаружена Mg^{2+} -зависимая АТФ-гидролизующая активность, функционирующая только при одновременном присутствии Na^+ и K^+ и ингибируемая кардиоактивными стероидами. Й. Скоу предположил, что данная АТФаза обеспечивает энергией транспорт ионов натрия и калия против их градиентов.

Na^+, K^+ -Активируемая АТФаза обнаружена во всех исследованных клетках животных. Особенно велико ее содержание в органах, осуществляющих интенсивный солевой обмен (почка, солевая железа) или выполняющих электрическую работу (нерв, мозг, электрический орган). Разработаны методы получения высокоочищенных препаратов Na^+, K^+ -АТФазы. В настоящее время наиболее широко используется метод П. Йоргенсена (1974), заключающийся в избирательном удалении из плазматических мембран (с помощью низких концентраций додецилсульфата натрия в присутствии АТФ) всех белковых компонентов, за исключением Na^+, K^+ -АТФазы, остающейся в мембранном матриксе и полностью сохраняющей функциональную активность. Гомогенный фермент состоит из двух полипептидных цепей с молекулярными массами $\sim 112\,000$ (каталитическая субъединица α) и $\sim 45\,000$ (гликозилированная субъединица β). В опытах по реконструкции очищенного фермента в протеолипосомы Л. Хокиным в 1975 г. было прямо показано, что Na^+, K^+ -АТФаза является не просто энергопреобразующей частью « Na -насоса», но сама осуществляет активный транспорт Na^+ и K^+ , сопряженный с гидролизом АТФ, т. е. представляет собой «натриевый насос».

Активный транспорт одновалентных катионов, сопряженный с гидролизом АТФ, является сложным многостадийным процессом, детальный механизм которого на молекулярном уровне еще не выявлен. В оптимальных условиях функционирования Na^+, K^+ -АТФазы при гидролизе одной молекулы АТФ происходит перенос двух ионов калия внутрь клетки и трех ионов натрия в противоположном направлении.

Пониманию того, как функционирует Na^+, K^+ -АТФаза, способствовало детальное структурное исследование фермента, осуществ-



ленное в 1985—1986 гг. Большая α -субъединица ($\sim 112\ 000$) формирует каталитически активный центр, осуществляющий гидролиз АТФ и расположенный на цитоплазматической стороне мембраны, а также участвует в создании участка связывания кардиоактивных стероидов на наружной стороне мембраны. Таким образом, полипептидная цепь α -субъединицы пронизывает насквозь липидный бислой. Меньшая, гликозилированная β -субъединица ($\sim 45\ 000$) локализована главным образом на наружной стороне мембраны, где она участвует во взаимодействии с кардиоактивными стероидами и где расположены ее углеводные цепи.

В состав молекулы фермента α - и β -субъединицы входят в эквимольных количествах. Протомер $\alpha\beta$ ($\sim 155\ 000$) является, таким образом, практически минимальной структурной единицей Na^+, K^+ -АТФазы.

Общие представления о пространственном строении молекулы Na^+, K^+ -АТФазы были получены с помощью различных подходов. На основании результатов электронно-микроскопических исследований двумерных кристаллов белка была построена трехмерная модель Na^+, K^+ -АТФазы с разрешением 2 нм. В очищенном препарате фермента, представляющем собой фрагменты плазматической мембраны, молекулы белка (в концентрации до 1 г/мл) плотно упакованы в липидном бислое. В результате длительного ингибирования этих препаратов при пониженной температуре в присутствии ионов $\text{Mg}^{2+}, \text{K}^+$ и ванадата происходит ассоциация молекул фермента и формируется область двумерной кристаллизации. Элементарная ячейка этих кристаллов включает два протомера $\alpha\beta$. Результаты трехмерной реконструкции независимых наклонных серий изображений негативно окрашенных кристаллов показаны на рисунке 336 (Ю. А. Овчинников, В. В. Демин, 1985). Вертикальные размеры модели (~ 11 нм) значительно больше толщины липидного бислоя, что также свидетельствует о внемембранном расположении основной части молекулы Na^+, K^+ -АТФазы.

В 1985 г. были определены полные первичные структуры каталитических α -субъединиц Na^+, K^+ -АТФаз из электрического органа ската (Ш. Нума), свиных почек (Ю. А. Овчинников) и почек овцы (А. Шварц). Чуть позднее были расшифрованы аминокислотные последовательности β -субъединиц фермента из двух первых источников. Во всех этих исследованиях использованы главным образом методы анализа нуклеотидных последовательностей, соответствующих их структурным генам. Детекция мРНК в процессе выделения и скрининг библиотек клонов осуществлялись с помощью специфических олигонуклеотидных зондов. Структурная информация, необходимая для синтеза этих олигонуклеотидов, была получена из аминокислотной последовательности пептидных фрагментов белка. Остановимся подробнее на анализе первичной структуры Na^+, K^+ -АТФазы почек свиньи. Как уже упоминалось, α -субъединица в составе нативного мембраносвязанного фермента имеет большие гидрофильные участки, экспонированные на обеих сторонах мембраны, и более чувствительна к действию протеиназ по сравнению с гликозилированной β -субъединицей. В специально подобранных условиях удалось осуществить глубокое расщепление трипсином экспонированных участков α -субъединицы в составе нативной Na^+, K^+ -АТФазы (при полном сохранении интактности β -субъединицы). В результате была установлена структура большинства внемембранных фрагментов α -субъединицы, что в дальнейшем легло в основу модели пространственной организации ее полипептидной цепи.

В случае β -субъединицы для получения пептидов был осуществлен триптический гидролиз гомогенного белка, иммобилизованного на тиол-кремнеземе (см. с. 56).



Скоу (Skou) Йенс Кристиан (р. 1918), датский биохимик. Окончил Копенгагенский университет (1944), с 1963 г.— профессор университета в Аарусе. Исследовал механизм действия местных анестетиков, что привело к открытию Na^+, K^+ -АТФазы (1957).

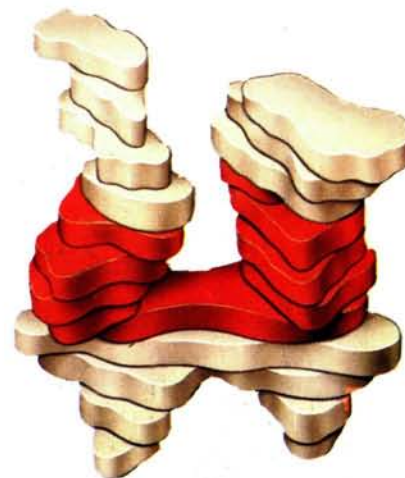


Рис. 336. Трехмерная модель Na^+, K^+ -АТФазы.

Полные нуклеотидные последовательности кДНК, соответствующие транскрибируемым областям мРНК, и выведенные аминокислотные последовательности α - и β -субъединиц Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи приведены на рисунках 337 и 338 (Ю. А. Овчинников, Е. Д. Свердлов, Н. Н. Модянов). Полипептидная цепь α -субъединицы содержит 1016 аминокислотных остатков. Знание N-концевой последовательности белка позволило установить, что первичный продукт трансляции длиннее на 5 аминокислотных остатков, отщепляемых в ходе процессинга. Структура одного из триптических пептидов полностью совпадает с последовательностью, предшествующей терминирующему кодону (TAG). Аналогичная ситуация имеет место и в случае β -субъединицы. Таким образом, в C-концевых областях обеих субъединиц процессинг отсутствует. β -Субъединица состоит из 302 аминокислотных остатков. Иницирующий

Рис. 337. Аминокислотная последовательность α -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи.

1-15	AGGACCCGGCGCGGGACACAGACCACCCGCACT ATG GGG AAG GGG GTT
(-5)-(-1)	Met-Gly-Lys-Gly-Val-
16-90	GGA CGC GAT AAA TAT GAG CCC GCA GCC GTG TCA GAG CAT GGC GAC AAA AAG AAG GCC AAG AAG GAG AGG GAT ATG
1-25	Gly-Arg-Asp-Lys-Tyr-Glu-Pro-Ala-Ala-Val-Ser-Glu-His-Gly-Asp-Lys-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Glu-Arg-Asp-Met-
91-165	GAT GAG CTG AAG AAG GAA GTT TCT ATG GAT GAC CAT AAA CTT AGC CTT GAT GAG CTT CAT CGC AAA TAC GGA ACG
26- 50	Asp-Glu-Leu-Lys-Lys-Glu-Val-Ser-Met-Asp-Asp-His-Lys-Leu-Ser-Glu-Asp-Glu-Leu-His-Arg-Lys-Tyr-Gly-Thr-
166-240	GAC TTG AGC CGA GGC TTA ACA CCT GCT CGA GCT GCT GAG ATC CTA GCC CGA GAC GGT CCC AAT GCC CTG ACA CCC
51- 75	Asp-Leu-Ser-Arg-Gly-Leu-Thr-Pro-Ala-Arg-Ala-Ala-Glu-Ile-Leu-Ala-Arg-Asp-Gly-Pro-Asn-Ala-Leu-Thr-Pro-
241-315	CCA CCC ACA ACC CCT GAA TGG GTC AAG TTC TGT CCG CAG CTC TTC GGA GGC TTC TCC ATG TTA CTG TGG ATC GGA
76-100	Pro-Pro-Thr-Thr-Pro-Glu-Trp-Val-Lys-Phe-Cys-Arg-Gln-Leu-Phe-Gly-Gly-Phe-Ser-Met-Leu-Leu-Trp-Ile-Gly-
316-390	GCG ATT CTT TGT TTC TTG GCC TAT GGC ATT CAA GCT GCT ACA GAA GAG GAA CCT CAA AAT GAT AAT CTG TAC CTT
101-125	Ala-Ile-Leu-Cys-Phe-Leu-Ala-Tyr-Gly-Ile-Glu-Ala-Ala-Thr-Glu-Glu-Glu-Pro-Gln-Asn-Asp-Asn-Leu-Tyr-Leu-
391-465	GGT GTG GTG CTC TCC GCC GTC GTC ATC ATA ACT GGC TGT TTC TCC TAC TAT CAA GAA GCG AAA AGC TCA AAG ATC
126-150	Gly-Val-Val-Leu-Ser-Ala-Val-Val-Ile-Ile-Thr-Gly-Cys-Phe-Ser-Tyr-Tyr-Gln-Glu-Ala-Lys-Ser-Ser-Lys-Ile-
466-540	ATG GAA TCC TTC AAA AAC ATG GTT CCT CAG CAA GCC CTC GTG ATT CGA AAT GGT GAA AAG ATG AGC ATA AAT GCA
151-175	Met-Glu-Ser-Phe-Lys-Asn-Met-Val-Pro-Gln-Gln-Ala-Leu-Val-Ile-Arg-Asn-Gly-Glu-Lys-Met-Ser-Ile-Asn-Ala-
541-615	GAG GAA GTC GTC GTC GGG GAT CTG GTG GAG GTG AAG GGA GGG GAT CGA ATC CCT GCT GAC CTC AGG ATC ATA TCT
176-200	Glu-Glu-Val-Val-Val-Gly-Asp-Leu-Val-Glu-Val-Lys-Gly-Gly-Asp-Arg-Ile-Pro-Ala-Asp-Leu-Arg-Ile-Ile-Ser-
616-690	GCG AAC GGC TGC AAG GTG GAC AAC TCC TCC CTC ACT GGT GAA TCA GAA CCG CAG ACC AGG TCT CCA GAT TTC ACC
201-225	Ala-Asn-Gly-Cys-Lys-Val-Asp-Asn-Ser-Ser-Leu-Thr-Gly-Glu-Ser-Glu-Pro-Gln-Thr-Arg-Ser-Pro-Asp-Phe-Thr-
691-765	AAT GAG AAC CCC CTG GAG ACT AGG AAC ATC GCC TTT TTT TCA ACC AAC TGC GTT GAA GGC ACT GCA CGT GGT ATT
226-250	Asn-Glu-Asn-Pro-Leu-Glu-Thr-Arg-Asn-Ile-Ala-Phe-Phe-Ser-Thr-Asn-Cys-Val-Glu-Gly-Thr-Ala-Arg-Gly-Ile-
766-840	GTG GTG TAC ACT GGC GAT CGC ACC GTG ATG GGC AGA ATC GCT ACC CTT GCT TCC GGG CTG GAA GGG GGC CAG ACT
251-275	Val-Val-Tyr-Thr-Gly-Asp-Arg-Thr-Val-Met-Gly-Arg-Ile-Ala-Thr-Leu-Ala-Ser-Gly-Leu-Glu-Gly-Gly-Gln-Thr-
841-915	CCC ATC GCT GCG GAG ATT GAA CAT TTT ATC CAC ATC ATC ACG GGC GTG GCC GTG TTC CTG GGC GTG TCC TTC TTC
276-300	Pro-Ile-Ala-Ala-Glu-Ile-Glu-His-Phe-Ile-His-Ile-Ile-Thr-Gly-Val-Ala-Val-Phe-Leu-Gly-Val-Ser-Phe-Phe-
916-990	ATC CTT TCT CTG ATC CTC GAG TAC ACC TGG CTC GAG GCC GTC ATC TTC CTC ATC GGG ATC ATT GTA GCC AAC GTG
301-325	Ile-Leu-Ser-Leu-Ile-Leu-Glu-Tyr-Thr-Trp-Leu-Glu-Ala-Val-Ile-Phe-Leu-Ile-Gly-Ile-Ile-Val-Ala-Asn-Val-
991-1065	CCT GAA GGT TTG CTG GCC ACC GTC ACG GTG TGC TTG ACC CTG ACT GCC AAG CGC ATG GCC AGG AAG AAC TGC CTT
326- 350	Pro-Glu-Gly-Leu-Leu-Ala-Thr-Val-Thr-Val-Cys-Leu-Thr-Leu-Thr-Ala-Lys-Arg-Met-Ala-Arg-Lys-Asn-Cys-Leu-
1066-1140	GTG AAG AAC TTG GAG GCT GTG GAG ACC CTG GGG TCC ACA TCC ACC ATC TGC TCA GAC AAA ACC GGA ACC CTC ACC
351- 375	Val-Lys-Asn-Leu-Glu-Ala-Val-Glu-Thr-Leu-Gly-Ser-Thr-Ser-Thr-Ile-Cys-Ser-Asp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu-Thr-
1141-1215	CAG AAC CGA ATG ACA GTG GCC CAC ATG TGG TTC GAC AAT CAA ATC CAC GAG GCT GAC ACG ACG GAA AAT CAG AGC
376- 400	Gln-Asn-Arg-Met-Thr-Val-Ala-His-Met-Trp-Phe-Asp-Asn-Gln-Ile-His-Glu-Ala-Asp-Thr-Thr-Glu-Asn-Gln-Ser-
1216-1290	GGT GTC TCA TTC GAC AAG ACT TCG GCC ACC TGG CTT GCT CTG TCC AGA ATT GCA GGT CTT TGT AAC AGG GCA GTG
401- 425	Gly-Val-Ser-Phe-Asp-Lys-Thr-Ser-Ala-Thr-Trp-Leu-Ala-Leu-Ser-Arg-Ile-Ala-Gly-Leu-Cys-Asn-Arg-Ala-Val-
1291-1365	TTC CAG GCC AAC CAG GAA AAC CTA CCT ATC CTG AAG CGG GCA GTG GCG GGC GAC GCC TCC GAG TCC GCG CTC TTA
426- 450	Phe-Gln-Ala-Asn-Gln-Glu-Asn-Leu-Pro-Ile-Leu-Lys-Arg-Ala-Val-Ala-Gly-Asp-Ala-Ser-Glu-Ser-Ala-Leu-Leu-
1366-1440	AAG TGC ATC GAG CTG TGC TGT GGG TCC GTG AAG GAG ATG AGG GAG CGA TAC ACC AAG ATC GTC GAG ATT CCC TTC
451- 475	Lys-Cys-Ile-Glu-Leu-Cys-Cys-Gly-Ser-Val-Lys-Glu-Met-Arg-Glu-Arg-Tyr-Thr-Lys-Ile-Val-Glu-Ile-Pro-Phe-
1441-1515	AAC TCC ACC AAC AAG TAC CAG CTG TCC ATC CAC AAG AAC CCC AAC ACG GCT GAG CCC CGG CAC CTG CTG GTG ATG
476- 500	Asn-Ser-Thr-Asn-Lys-Tyr-Gln-Leu-Ser-Ile-His-Lys-Asn-Pro-Asn-Thr-Ala-Glu-Pro-Arg-His-Leu-Leu-Val-Met-

кодон в мРНК расположен непосредственно перед последовательностью, кодирующей N-концевую область белка.

Аминокислотные последовательности каталитических α -субъединиц Na^+ , K^+ -АТФаз имеют удивительно высокую степень гомологии, достигающей почти 90% даже для биологически весьма отдаленных источников (почки млекопитающих и электрический орган рыб). Стабильность структуры в ходе эволюции еще раз подчеркивает физиологическое значение «натрий-калиевого насоса» и большую роль α -субъединицы в его функционировании. Этого нельзя сказать о β -субъединице (структуры белков из электрического органа и почек различаются уже на 38%).

АТР-Гидролизующий центр расположен в цитоплазматической области α -субъединицы. Функционально важный остаток аспарагиновой кислоты, подвергающийся фосфорилированию при обра-

1516-1590 AAA GGT GCT CCA GAA AGG ATC CTG GAC CGC TGC AGC TCC ATC CTC ATC CAC GGC AAG GAG CAG CCC CTA GAC GAG
501- 525 Lys-Gly-Ala-Pro-Glu-Arg-Ile-Leu-Asp-Arg-Cys-Ser-Ser-Ile-Leu-Ile-His-Gly-Lys-Glu-Gln-Pro-Leu-Asp-Glu-

1591-1665 GAG CTG AAG GAC GCC TTT CAG AAC GCC TAC CTG GAG CTG GGT GGC CTC GGG GAA CGC GTG CTG GGT TTC TGC CAC
526- 550 Glu-Leu-Lys-Asp-Ala-Phe-Gln-Asn-Ala-Tyr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Leu-Gly-Glu-Arg-Val-Leu-Gly-Phe-Cys-His-

1666-1740 CTT TTC CTG CCG GAC GAG CAG TTC CCC GAA GGC TTC CAG TTT GAC ACC GAC GAT GTG AAT TTC CCT CTC GAT AAT
551- 575 Leu-Phe-Leu-Pro-Asp-Glu-Gln-Phe-Pro-Glu-Gly-Phe-Gln-Phe-Asp-Thr-Asp-Val-Asn-Phe-Pro-Leu-Asp-Asn-

1741-1815 CTC TGC TTC GTT GGG CTC ATC TCC ATG ATT GAC CCA CCG CGA GCG GCC GTC CCG GAT GCC GTG GGC AAA TGT CGA
576- 600 Leu-Cys-Phe-Val-Gly-Leu-Ile-Ser-Met-Ile-Asp-Pro-Pro-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Asp-Ala-Val-Gly-Lys-Cys-Arg-

1816-1890 AGC GCT GGC ATT AAG GTC ATC ATG GTC ACC GGC GAT CAT CCC ATC ACA GCC AAA GCC ATT GCC AAA GGT GTG GGC
601- 625 Ser-Ala-Gly-Ile-Lys-Val-Ile-Met-Val-Thr-Gly-Asp-His-Pro-Ile-Thr-Ala-Lys-Ala-Ile-Ala-Lys-Gly-Val-Gly-

1891-1965 ATC ATC TCG GAA GGC AAT GAA ACG GTC GAA GAC ATC GCT GCC CGC CTC AAC ATC CCA GTG AGC CAG GTG AAC CCC
626- 650 Ile-Ile-Ser-Glu-Gly-Asn-Glu-Thr-Val-Glu-Asp-Ile-Ala-Ala-Arg-Leu-Asn-Ile-Pro-Val-Ser-Gln-Val-Asn-Pro-

1966-2040 AGG GAT GCC AAG GCC TGC GTG GTC CAT GGA AGC GAT CTG AAA GAC ATG ACC TCG GAG CAG CTG GAT GAC ATC TTG
651- 675 Arg-Asp-Ala-Lys-Ala-Cys-Val-Val-His-Gly-Ser-Asp-Leu-Ser-Asp-Met-Thr-Ser-Gln-Leu-Asp-Asp-Ile-Leu-

2041-2115 AAG TAC CAC ACG GAG ATC GTG TTT GCC CGG ACG TCT CCT CAG CAG AAG CTC ATC ATT GTG GAA GGC TGC CAG AGA
676- 700 Lys-Tyr-His-Thr-Glu-Ile-Val-Phe-Ala-Arg-Thr-Ser-Pro-Gln-Gln-Lys-Leu-Ile-Ile-Val-Glu-Gly-Cys-Gln-Arg-

2116-2190 CAG GGC GCC ATC GTG GCC GTG ACT GGC GAC GGT GTC AAT GAC TCT CCC GCT CTG AAG AAG GCA GAC ATC GGG GTT
701- 725 Gln-Gly-Ala-Ile-Val-Ala-Val-Thr-Gly-Asp-Gly-Val-Asn-Asp-Ser-Pro-Ala-Leu-Lys-Lys-Ala-Asp-Ile-Gly-Val-

2191-2265 GCC ATG GGG ATT GCT GGC TCG GAC GTG TCA AAG CAA GCT GCT GAC ATG ATC CTC CTG GAT GAC AAC TTC GCC TCC
726- 750 Ala-Met-Gly-Ile-Ala-Gly-Ser-Asp-Val-Ser-Lys-Gln-Ala-Ala-Asp-Met-Ile-Leu-Leu-Asp-Asp-Asn-Phe-Ala-Ser-

2266-2340 ATT GTG ACG GGA GTA GAG GAA GGT CGT CTG ATC TTT GAT AAC TTG AAG AAA TCC ATT GCC TAC ACC CTC ACC AGT
751- 775 Ile-Val-Thr-Gly-Glu-Glu-Gly-Arg-Leu-Ile-Phe-Ile-Asp-Asn-Lys-Lys-Lys-Ser-Ile-Ala-Tyr-Thr-Leu-Thr-Ser-

2341-2415 AAC ATT CCA GAG ATC ACC CCC TTC CTG ATA TTT ATT ATT GCG AAC ATT CCA CTG CCC CTG GGC ACC GTC ACC ATC
776- 800 Asn-Ile-Pro-Glu-Ile-Thr-Pro-Phe-Leu-Ile-Phe-Ile-Ile-Ala-Asn-Ile-Pro-Leu-Pro-Leu-Gly-Thr-Val-Thr-Ile-

2416-2490 CTC TGC ATC GAC TTG GGC ACA GAC ATG GTT CCT GCC ATC TCC CTG GCG TAT GAG CAG GCG GAG AGC GAC ATC ATG
801- 825 Leu-Cys-Ile-Asp-Leu-Gly-Thr-Asp-Met-Val-Pro-Ala-Ile-Ser-Leu-Ala-Tyr-Glu-Gln-Ala-Glu-Ser-Asp-Ile-Met-

2491-2565 AAG AGG CAG CCC CGA AAC CCC AAG ACA GAC AAA CTC GTC AAT GAG CAG CTC ATC AGC ATG GCC TAC GGA CAG ATA
826- 850 Lys-Arg-Gln-Pro-Arg-Asn-Pro-Lys-Thr-Asp-Lys-Leu-Val-Asn-Glu-Gln-Leu-Asn-Ile-Ser-Met-Ala-Tyr-Gly-Gln-Ile-

2566-2640 GGT ATG ATC CAG GCC CTG GGC GGC TTC TTC ACT TAC TTT GTG ATC CTG GCT GAG AAC GGC TTC CTC CCG ATT CAC
851- 875 Gly-Met-Ile-Gln-Ala-Leu-Gly-Gly-Phe-Phe-Thr-Tyr-Phe-Val-Ile-Leu-Ala-Glu-Asn-Gly-Phe-Leu-Pro-Ile-His-

2641-2715 CTG CTG GGC CTC CGG GTG AAC TGG GAT GAC CGC TGG ATC AAC GAC GTG GAG GAC AGC TAC GGG CAG CAG TGG ACC
876- 900 Leu-Leu-Gly-Leu-Arg-Val-Asn-Trp-Asp-Asp-Arg-Trp-Ile-Asn-Asp-Val-Glu-Asp-Ser-Tyr-Gly-Gln-Gln-Trp-Thr-

2716-2790 TAC GAA CAG AGG AAG ATC GTG GAG TTC ACC TGC CAC ACG GCC TTC TTT GTC AGC ATC GTG GTG GTG CAG TGG GCC
901- 925 Tyr-Glu-Gln-Arg-Lys-Ile-Val-Glu-Phe-Thr-Cys-His-Thr-Ala-Phe-Phe-Val-Ser-Ile-Val-Val-Val-Gln-Trp-Ala-

2791-2865 GAC TTG GTC ATC TGC AAG ACC CGG AGG AAT TCC GTC TTC CAG CAG GGG ATG AAG AAC AAA ATC TTG ATC TTT GGC
926- 950 Asp-Leu-Val-Ile-Cys-Lys-Thr-Arg-Arg-Asn-Ser-Val-Phe-Gln-Gln-Cys-Lys-Met-Lys-Asn-Lys-Ile-Leu-Ile-Phe-Gly-

2866-2940 CTC TTC GAA GAG ACG GCC CTG GCT GCT TTC CTC TCC TAC TGC CCC GGA ATG GGC GTG GCC CTG AGG ATG TAC CCC
951- 975 Leu-Phe-Glu-Glu-Thr-Ala-Leu-Ala-Ala-Phe-Leu-Ser-Tyr-Cys-Pro-Gly-Met-Gly-Val-Ala-Leu-Arg-Met-Tyr-Pro-

2941-3015 CTC AAA CCT ACC TGG TGG TTC TGT GCC TTC CCC TAC TCG CTC CTC ATC TTC GTC TAT GAC GAA GTC AGG AAG CTC
976-1000 Leu-Lys-Pro-Thr-Trp-Trp-Phe-Cys-Ala-Phe-Pro-Tyr-Ser-Leu-Leu-Ile-Phe-Val-Tyr-Asp-Glu-Val-Arg-Lys-Leu-

3016-3066 ATC ATC AGG CGA CGC CCT GGC GGC TGG GTG GAG AAG GAA ACC TAC TAC TAG ACCCCCTCCTGCACGCCG
1001-1016 Ile-Ile-Arg-Arg-Arg-Pro-Gly-Gly-Trp-Val-Glu-Lys-Glu-Thr-Tyr-Tyr



Модянов Николай Николаевич (р. 1944), советский химик-биоорганик. Окончил Московский университет (1967), работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Занимается изучением систем активного транспорта ионов через биологические мембраны. Лауреат Государственной премии СССР (1982).

зовании интермедиата, локализован в положении 369. Другой участок α -субъединицы, предположительно входящий в активный центр фермента, включает остаток Lys-501, который модифицируется при необратимом ингибировании фермента изотиоцианатом флуоресцеина. О принадлежности к активному центру этой области белка свидетельствует тот факт, что АТФ защищает фермент от ингибирования и модификации.

Для выявления потенциальных внутримембранных участков рассчитывались профили гидрофобности полипептидных цепей субъединиц. В случае α -субъединицы было выявлено 11 таких участков. Из сопоставления полученных данных с аминокислотными последовательностями выделенных внеклеточных пептидов предполагается, что α -субъединица 7 раз пересекает липидный бислой. Поскольку N-концевой участок локализован в цитоплазме, то С-концевая часть экспонирована на внешней стороне мембраны (рис. 339).

Как уже упоминалось, экспонированные участки β -субъединицы выявлены только на наружной стороне мембраны. Результаты

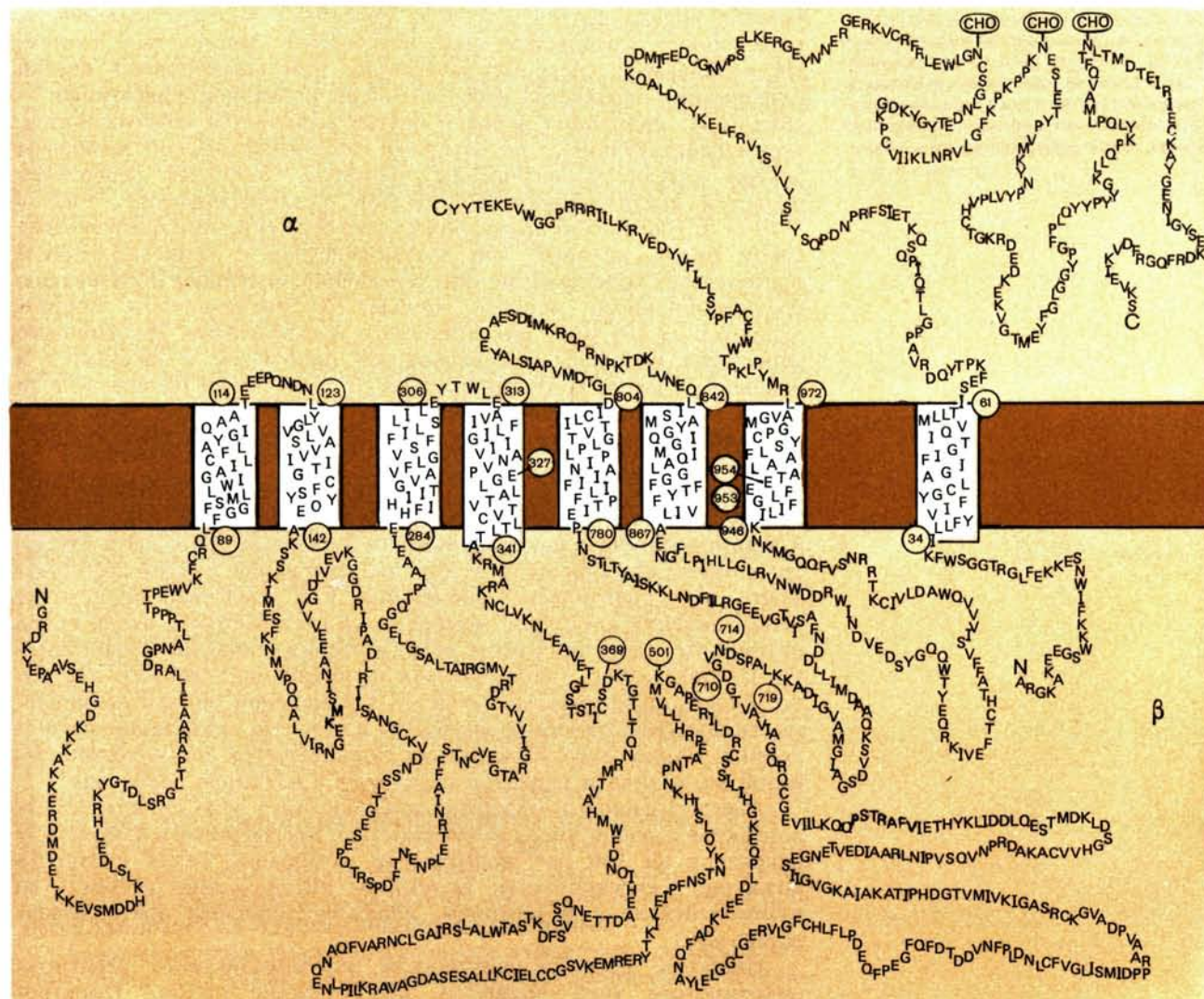
1-3 (-1)	TTGGCAGGAGAGGACGCAAGACGACGCGGCAATCACCCATCTTCAATCCCAGCAGAGCTGCTGACCCGCCACC	ATG Met
4-63 1-20	GCC CGC GGA AAA GCC AAG GAG GAG GGC AGC TGG AAG AAA TTG ATG TGG AAC TCC GAA AAG Ala-Arg-Gly-Lys-Ala-Lys-Glu-Glu-Gly-Ser-Trp-Lys-Lys-Phe-Ile-Trp-Asn-Ser-Glu-Lys-	
64-123 21- 40	AAG GAG TTT TTG GGC AGG ACC GGT GGC AGT TGG TTT AAG ATC CTT CTA TTC TAC GTT ATA Lys-Glu-Phe-Leu-Gly-Arg-Thr-Gly-Gly-Ser-Trp-Phe-Lys-Ile-Leu-Leu-Phe-Tyr-V1-Ile-	
124-183 41- 60	TTT TAT GGC TGC CTG GCT GGC ATC TTC ATT GGA ACC ATC CAA GTG ATG CTG CTC ACC ATC Phe-Tyr-Gly-Cys-Leu-Ala-Gly-Ile-Phe-Ile-Gly-Thr-Ile-Gln-Val-Met-Leu-Leu-Thr-Ile-	
184-243 61- 80	AGT GAA TTT AAG CCC ACA TAT CAG GAC CGA GTG GCC CCA CCA GGA TTA ACA CAG ATT CCT Ser-Glu-Phe-Lys-Pro-Thr-Tyr-Gln-Asp-Arg-Val-Ala-Pro-Pro-Gly-Leu-Thr-Gln-Ile-Pro-	
244-303 81-100	CAG AGC CAA AAG ACT GAA ATT TCT TTT CGT CCT AAT GAT CCC CAA AGC TAT GAA TCC TAT Gln-Ser-Gln-Lys-Thr-Glu-Ile-Ser-Phe-Arg-Pro-Asn-Asp-Pro-Gln-Ser-Tyr-Glu-Ser-Tyr-	
304-363 101-120	GTG GTA AGC ATA GTG AGG TTC CTG GAG AAG TAC AAA GAT TTG GCG CAG AAG GAT GAT ATG Val-Val-Ser-Ile-Val-Arg-Phe-Leu-Glu-Lys-Tyr-Lys-Asp-Leu-Ala-Gln-Lys-Asp-Asp-Met-	
364-423 121-140	ATT TTT GAA GAT TGT GGC AAT GTG CCC AGC GAA CTC AAA GAA CGA GGA GAA TAT AAC AAC Ile-Phe-Glu-Asp-Cys-Gly-Asn-Val-Pro-Ser-Glu-Leu-Lys-Glu-Arg-Gly-Glu-Tyr-Asn-Asn-	
424-483 141-160	GAA CGA GGA GAG CGA AAA GTG TGC AGG TTC AGG CTC GAA TGG TTG GGA AAC TGC TCT GGA Glu-Arg-Gly-Glu-Arg-Lys-Val-Cys-Arg-Phe-Arg-Leu-Glu-Trp-Leu-Gly-Asn-Cys-Ser-Gly-	
484-543 161-180	TTA AAT GAT GAA ACC TAT GGC TAC AAA GAT GGC AAA CCC TGT GTC ATT ATA AAG CTC AAC Leu-Asn-Asp-Glu-Thr-Tyr-Gly-Tyr-Lys-Asp-Gly-Lys-Pro-Cys-Val-Ile-Ile-Lys-Leu-Asn-	
544-603 181-200	CGA GTT CTG GGC TTC AAA CCT AAG CCT CCC AAG AAT GAG TCC TTG GAG ACT TAC CCA GTG Arg-Val-Leu-Gly-Phe-Lys-Pro-Lys-Pro-Pro-Lys-Asn-Glu-Ser-Leu-Glu-Thr-Tyr-Pro-Val-	
604-663 201-220	ATG AAG TAT AAT CCA TAT GTC CTG CCC GTT CAT TGC ACT GGC AAG CGT GAC GAA GAT AAG Met-Lys-Tyr-Asn-Pro-Tyr-Val-Leu-Pro-Val-His-Cys-Thr-Gly-Lys-Arg-Asp-Glu-Asp-Lys-	
664-723 221-240	GAG AAA GTT GGA ACC ATG GAG TAT TTT GGC CTG GGC GGC TAC CCT GGT TTT CCT CTA CAG Glu-Lys-Val-Gly-Thr-Met-Glu-Tyr-Phe-Gly-Leu-Gly-Gly-Tyr-Pro-Gly-Phe-Pro-Leu-Gln-	
724-783 241-260	TAT TAC CCT TAC TAC GGC AAG CTC CTG CAG CCC AAG TAC CTG CAG CCC CTG ATG GCT GTG Tyr-Tyr-Pro-Tyr-Tyr-Gly-Lys-Leu-Leu-Gln-Pro-Lys-Tyr-Leu-Gln-Pro-Leu-Met-Ala-Val-	
784-843 261-280	CAG TTC ACC AAC CTC ACC ATG GAC ACT GAA ATC CGC ATA GAG TGT AAG GCG TAT GGT GAG Gln-Phe-Thr-Asn-Leu-Thr-Met-Asp-Thr-Glu-Ile-Arg-Ile-Glu-Cys-Lys-Ala-Tyr-Gly-Glu-	
844-903 281-300	AAC ATT GGG TAC AGT GAG AAA GAC CGT TTT CAG GGA CGC TTT GAT GTA AAA ATT GAA GTT Asn-Ile-Gly-Tyr-Ser-Glu-Lys-Asp-Arg-Phe-Gln-Gly-Arg-Phe-Asp-Val-Lys-Ile-Glu-Val-	
904-912 301-302	AAG AGC TGA TCACAACCTCTTCCCACTAGCCATTAAGAGTTAAAGATTGAGAAACAAAAACCTACTAGTCT Lys-Ser	
	TGAACAAACTGTCATACGTAAGGACCTACACTTAATCTATATGCTTTACACTAGCTTCTGCATTTAATAGGTTAGAAT	
	GTAATTTAAAGGTAGCAATAGCAACAAATATTTATTCTACTG	

Рис. 338. Аминокислотная последовательность β -субъединицы Na^+ , K^+ -АТФазы почек свиньи.

модификации Na^+, K^+ -АТФазы проникающими реагентами свидетельствуют о наличии в β -субъединице также гидрофобной внутримембранной области. В β -субъединице Na^+, K^+ -АТФазы почек свиньи есть три углеводные цепи, присоединенные к остаткам Asp-157, Asp-192, Asp-264; следовательно, эти области белка экспонированы на внешней стороне мембраны. Сопоставляя расположение углеводных цепей с расчетом профиля гидрофобности и данными ограниченного протеолиза, можно предложить, что β -субъединица содержит один трансмембранный участок. Эта модель служит хорошей основой для детального анализа пространственного строения и механизма функционирования Na^+, K^+ -АТФазы.

Среди других ион-транспортирующих АТФаз наиболее хорошо изучена Ca^{2+} -АТФаза мембран саркоплазматического ретикулума. В 1985 г. Д. Мак-Кленоном с сотр. установлена полная первичная структура этого фермента. Он состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 997 аминокислотных остатков, и весьма близок по структурной организации и функциональным параметрам к

Рис. 339. Схема пространственной организации молекул α - и β -субъединиц Na^+, K^+ -АТФазы. Предполагаемые внутримембранные фрагменты белка обозначены прямоугольниками. Гликозилированные остатки аспарагина обозначены CHO.





Карафоли (Carafoli) Эрнесто (р. 1932), швейцарский биохимик. Образование получил в Моденском университете (Италия, 1957), с 1973 г. — профессор Высшей технической школы в Цюрихе. Основные работы посвящены биоэнергетике, биохимии мембран, транспорту кальция и его метаболической роли.

α -субъединице Na^+ , K^+ -АТФазы (ионы Ca^{2+} являются в данном случае аналогом Na^+).

В клетках животных существует и другой тип Ca^{2+} -АТФазы — так называемая калмодулин-зависимая Ca^{2+} -АТФаза плазматических мембран. Фермент состоит из одной полипептидной цепи (молекулярная масса $\sim 140\,000$) и содержится в мембранах в крайне малом количестве (П. Шацман, Э. Карафоли).

Ацетилхолиновый рецептор

Среди разнообразных мембранных белков важное место занимают рецепторные системы, ответственные за передачу информации возбудимыми клетками. Рецепторы клеточной мембраны воспринимают сигнал другой клетки и реагируют на него изменением мембранного потенциала или активацией ферментных систем. На возбудимые (нервные, мышечные или секреторные) клетки информация передается через специализированное образование — синапс. Из окончания нервной клетки выделяется нейромедиатор, взаимодействующий с рецепторами постсинаптической мембраны другой клетки. Классическим примером подобных рецепторов является ацетилхолиновый рецептор (холинорецептор). Еще в 1953 г. Д. Нахманзон предположил, что этот рецептор представляет собой белок, который при взаимодействии с нейромедиатором претерпевает конформационные изменения, ведущие к образованию трансмембранного ионного канала. Холинорецепторы подразделяются на два типа: никотиновые и мускариновые. Никотиновые рецепторы способны активироваться никотином и находятся в основном в месте контакта аксонов со скелетными мышцами, в то время как мускариновые рецепторы имеют высокое сродство к мускарину и сосредоточены в мозге, секреторных клетках, гладких и сердечных мышцах (см. с. 770).

Связывание ацетилхолина с мускариновыми рецепторами сопровождается увеличением концентрации циклических нуклеотидов, а взаимодействие с никотиновыми рецепторами приводит к открытию ионных каналов и соответственно изменению ионной проницаемости постсинаптической мембраны. Как следствие происходит деполяризация клеточной мембраны за счет быстрого входа ионов натрия, что в конечном итоге ведет к возбуждению мышечной клетки. Следовательно, биологическая функция никотинового ацетилхолинового рецептора заключается в изменении ионной проницаемости постсинаптической мембраны в ответ на связывание ацетилхолина. После этого ацетилхолин гидролизуеться ацетилхолинэстеразой до холина и рецептор переходит в исходное состояние.

Ацетилхолиновый рецептор локализован в зоне синаптических контактов с очень высокой плотностью, превышающей 1 молекулу рецептора на 100 нм^2 поверхности мембраны. Такая плотность позволяет секретлируемым молекулам ацетилхолина вступать во взаимодействие с рецептором, избежав гидролиза ацетилхолинэстеразой.

Наиболее богатым источником ацетилхолинового рецептора никотинового типа являются электрические органы (электро-



Шанже (Changeux) Жан-Пьер (р. 1936), французский биохимик. Окончил Парижский университет (1958), с 1975 г.— профессор Пастеровского института и Коллеж де Франс. Предложил (1965, совместно с Ж. Моно и Дж. Уайманом) гипотезу аллостерической регуляции ферментов. Впервые выделил, очистил и охарактеризовал ацетилхолиновый рецептор.

плаксы) скатов *Torpedo marmorata* или *Torpedo californica*, в которых на 1 кг ткани приходится около 100 мг рецептора (для сравнения следует отметить, что в скелетных мышцах млекопитающих холинорецептора примерно в 600 раз меньше). Мембранные препараты электроплаксов на 25—30% состоят из рецептора. Впервые ацетилхолиновый рецептор был выделен в начале 70-х годов с помощью полипептидных нейротоксинов из яда змей. Такие нейротоксины, например α -бунгаротоксин из яда крайта *Bungarus multicinctus* (см. с. 281), способны селективно и практически необратимо связываться с холинорецептором, что позволяет их использовать в процессе его выделения для идентификации и приготовления аффинных сорбентов. Значительный вклад в исследование холинорецепторов внесли лаборатории Ж.-П. Шанже (Франция) и М. А. Рафтери (США), где было осуществлено их выделение, определение субъединичного состава и установление частичной аминокислотной последовательности компонентов.

Ацетилхолиновый рецептор электроплаксов является олигомерным белком, состоящим из четырех субъединиц с предполагаемыми молекулярными массами ~ 40 000, 48 000, 58 000 и 65 000, которые называются соответственно α -, β -, γ - и δ -субъединицами и присутствуют в молярном соотношении 2:1:1:1. Участки связывания ацетилхолина расположены на α -субъединицах, и с одной молекулой рецептора одновременно могут связаться две молекулы нейромедиатора. Все субъединицы белка гликозилированы: из общей молекулярной массы рецептора 285 000—290 000 около 20 000 приходится на углеводные остатки. В мембране электроплаксов ската рецептор в основном находится в димерной форме, образованной за счет дисульфидной связи между δ -субъединицами, причем по функциональной активности мономерная и димерная формы практически не отличаются. Ацетилхолиновый рецептор связан с белком молекулярной массы 43 000, с помощью которого он закрепляется в цитоскелете постсинаптической мембраны.

Холинорецептор является кислым гликопротеином со значением pI 4,5—4,8. Для него характерно высокое содержание остатков дикарбоновых аминокислот. По данным аминокислотного анализа в нем обнаружено присутствие остатков фосфотреонина и фосфосерина. Следовательно, субъединицы рецептора способны фосфорилироваться, однако физиологическая роль этого процесса остается пока неизвестной.

Первоначально были установлены полные аминокислотные последовательности всех субъединиц рецептора ацетилхолина из электрического органа ската *Torpedo*. Работы по структурному анализу холинорецептора методами молекулярной генетики проводились Э. Барнардом (Англия) и Д. М. Патриком (США), а основная часть исследования осуществлена в лаборатории Ш. Нумы (Япония). Поскольку около 2,4% суммарной информационной РНК электроплаксов ската кодирует компоненты рецептора, в библиотеке кДНК удалось достаточно быстро идентифицировать клоны, содержащие структурные гены всех субъединиц. При анализе структуры этих генов было выяснено, что α -субъединица построена из 437, β из 469, γ из 489 и δ из 498 аминокислотных остатков (соответствующие молекулярные массы 50 116, 53 681, 56 601 и 57 565). Трансляция каждой субъединицы осуществляется отдельной мРНК, и для всех субъединиц характерно наличие гидрофобных сигнальных пептидов, состоящих из 17—24 аминокислотных остатков. Оказалось, что субъединицы рецептора обладают высокой степенью структурной гомологии и, по-видимому, их гены образовались в процессе эволюции из одного гена-предшественника.

Аминокислотная последовательность субъединиц холинорецептора определена также на основании исследования соответствующей



Барнард (Barnard) Эрик (р. 1927), английский биохимик, работающий в области молекулярной нейробиологии. Образование получил в Королевском колледже в Лондоне, в настоящее время — руководитель отдела нейробиологии Медицинского исследовательского совета в Кембридже. Основные работы — по исследованию мембранных рецепторов. Одним из первых установил структуру α -субъединицы ацетилхолинового рецептора (1982).

ших генов человека, теленка, цыпленка и др. Так, в геномном банке цыпленка при гибридизации с кДНК γ -субъединицы из электроплаксов обнаружен фрагмент ДНК, состоящий из 9000 нуклеотидов и кодирующий γ - и δ -субъединицы холинорецептора. Гены этих субъединиц содержат по 12 экзонов, характеризуются аналогичной структурой и локализованы в геноме в непосредственной близости друг от друга. α -Субъединицы ацетилхолинового рецептора человека и теленка состоят также из 437 аминокислотных остатков и обладают соответственно 81% и 80% структурного сходства с α -субъединицей из электроплаксов Torpedo. В целом структура компонентов холинорецептора весьма консервативна и сходна для всех исследованных животных. При анализе кДНК мышцы теленка было обнаружено существование нового компонента рецептора — ε -субъединицы, обладающей более 50% структурной гомологии с γ -субъединицами рецепторов человека, теленка и электрического ската.

Первоначально на основании анализа профиля гидрофобности полипептидных цепей холинорецептора было предположено, что каждая субъединица имеет по четыре трансмембранных фрагмента, а N- и C-концевые участки белков расположены снаружи постсинаптической мембраны. Однако с помощью антител против синтетических пептидов, соответствующих C-концевым областям различных субъединиц, удалось доказать локализацию C-концевого фрагмента на цитоплазматической стороне мембраны, вследствие чего субъединицы холинорецептора должны иметь по крайней мере по пять трансмембранных сегментов.

При трансляции мРНК, кодирующих субъединицы холинорецептора, *in vitro* в бесклеточной системе наблюдалось образование белков, соответствующих по размерам компонентам рецептора, но в этих условиях не были обнаружены ни специфичное связывание α -нейротоксинов из яда змей, ни самосборка субъединиц в пентамерный рецепторный комплекс. Трансляцию функционально активных холинорецепторов удалось провести в ооцитах лягушки *Xenopus*. Инъекция в ооциты суммарной мРНК электроплаксов или смеси мРНК, соответствующих четырем субъединицам, приводит к образованию рецепторного комплекса, который не только специфично связывает α -бунгаротоксин, но и изменяет ионную проницаемость клеточной мембраны под действием ацетилхолина, либо его агонистов; это использовалось для изучения функциональной роли отдельных субъединиц.

Дальнейшие исследования были направлены на получение в ооцитах гибридного холинорецептора. Рецептор, построенный из α -, β - и δ -субъединиц электроплаксов Torpedo и γ -субъединицы мышцы теленка, обладал функциональной активностью, при этом замена δ -субъединицы на соответствующий компонент из мышцы теленка заметно изменяла воротные свойства, не влияя на проводимость канала ацетилхолинового рецептора. С помощью метода направленного мутагенеза была установлена важная роль остатков Cys-192 и Cys-193 α -субъединицы холинорецептора Torpedo в связывании ацетилхолина, а также охарактеризованы отдельные остатки или фрагменты полипептидной цепи, модификация или делеция которых приводит к блокированию ионного канала (Ш. Нума).

Дифракционными методами были определены размеры молекулы ацетилхолинового рецептора и установлена его трансмембранная организация (рис. 340). На электронных микрофотографиях рецептор имеет вид розетки диаметром около 8,5 нм, в центральной части которой различают входное отверстие ~ 2 нм для трансмембранного канала. Предполагается, что этот канал образован фрагментами полипептидных цепей всех пяти субъединиц. Наиболее

вероятное расположение субъединиц рецептора друг относительно друга — α - β - α - γ - δ .

В электрофизиологических экспериментах установлены основные параметры одиночного канала холинорецептора: его проводимость составляет 20 пСм (См — сименс, единица измерения электропроводности), а время жизни не превышает 1—3 мс. Канал проницаем для ионов натрия, калия, кальция и даже некоторых органических катионов. С учетом размера последних полагают, что канал представляет собой пору, размеры которой в самой узкой части должны быть не менее $0,65 \times 0,65$ нм.

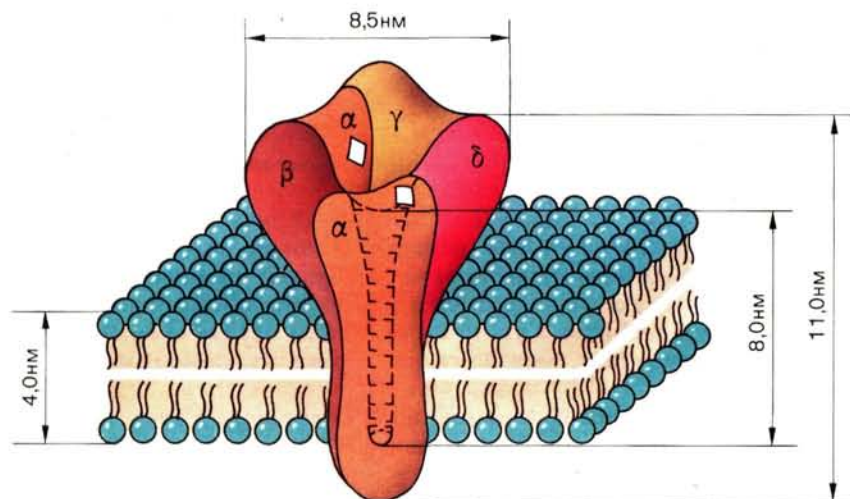


Рис. 340. Модель трансмембранной организации ацетилхолинового рецептора.

Согласно существующим моделям функционирования канала ацетилхолинового рецептора, рецептор может находиться в трех состояниях: покоя, открытом (активированном) и десенситизированном. Активация канала достигается взаимодействием с ацетилхолином и является быстрым процессом, протекающим в миллисекундном диапазоне. В десенситизированном состоянии медиатор все еще связан с рецептором, но канал уже закрыт. Переход из одного состояния в другое, по-видимому, сопровождается существенными конформационными изменениями субъединиц белкового комплекса. Таким образом, ацетилхолиновый рецептор никотинового типа представляет собой трансмембранный комплекс пяти гликопротеинов, образующий хемовозбудимый ионный канал. В отсутствие ацетилхолина канал находится в закрытом состоянии. При связывании с ацетилхолином канал на короткое время открывается для прохождения через него ионов натрия и калия, а затем переходит в десенситизированное состояние.

Натриевый канал

При генерации и проведении нервного импульса первоначальное изменение мембранного потенциала нервного волокна осуществляется за счет повышения проницаемости мембраны для ионов натрия. Этот процесс связан с функционированием быстрых натриевых каналов, управляемых мембранным потенциалом. Еще в начале 50-х годов А. Л. Ходжкин и Э. Ф. Хаксли детально изучили изменение мембранной проницаемости аксонального волокна и предложили теорию функционирования ионных каналов, являющихся, в отличие от хемовозбудимых ацетилхолиновых каналов, типичными представителями электровозбудимых мембранных транспортных систем. При прохождении нервного импульса происходит некоторое снижение мембранного потенциала нерва, что оказывается достаточным для изменения конформации белковых компонентов натриевого канала и перехода его в открытое состояние. Ионы натрия входят внутрь волокна и вызывают деполяризацию мембраны, которая, в свою очередь, активирует находящиеся рядом каналы. Предполагается, что в составе натриевого канала существует два основных функциональных участка — ион-проводящий фрагмент с селективным фильтром и потенциал-чувствительный воротный механизм.

Максимальная концентрация натриевых каналов обнаружена в области перехватов Ранье нервных волокон, где их плотность достигает 2 на 100 нм^2 поверхности мембраны; примерно в 100 раз меньшее количество их находится в тканях мозга и мышц. Исследование этих транспортных систем в основном осуществлялось электрофизиологическими методами, а также с помощью нейротоксинов.

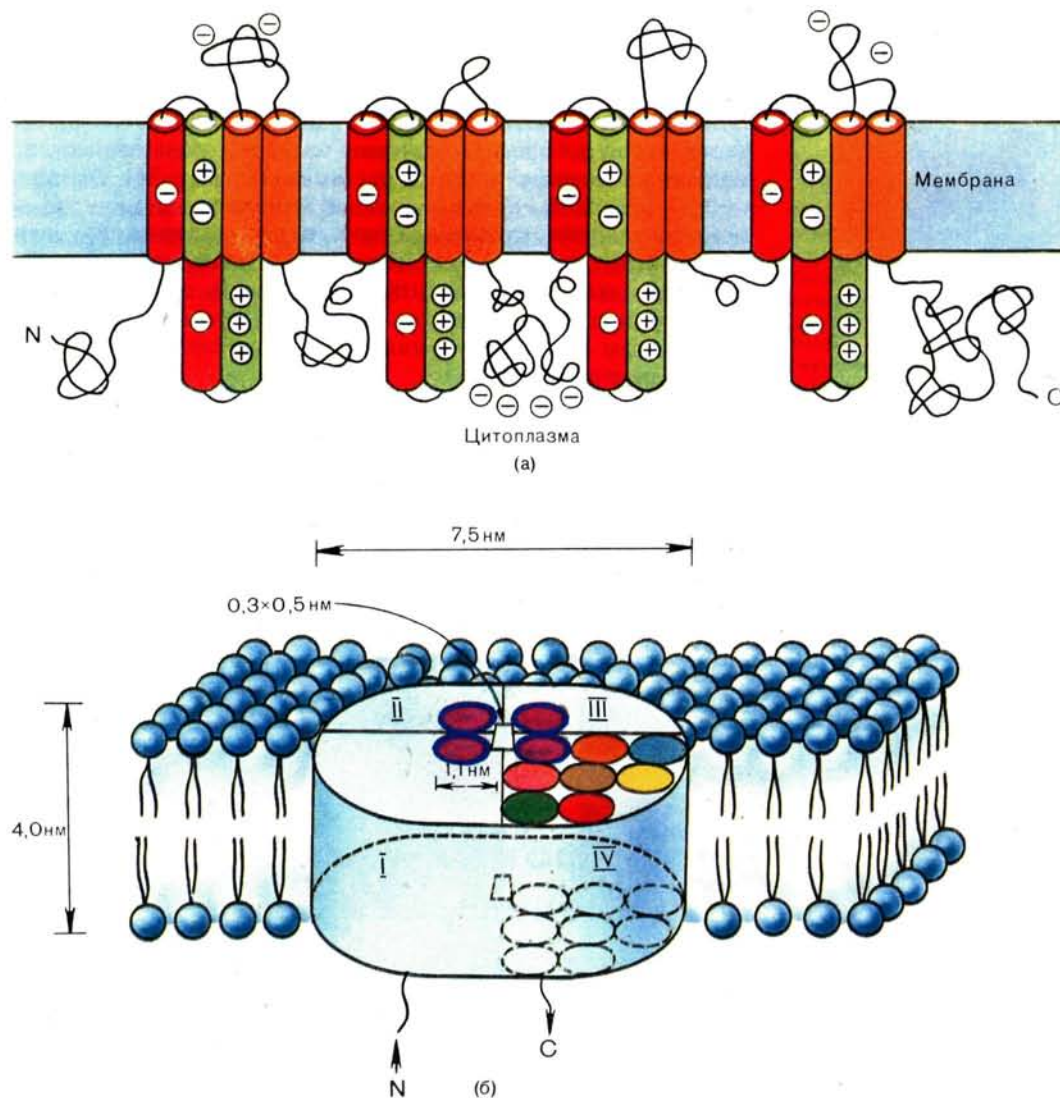
Природные нейротоксины можно использовать в качестве своеобразных инструментов, позволяющих селективно воздействовать на отдельные компоненты канала. В изучение молекулярной организации натриевых каналов как рецепторов нейротоксинов значительный вклад внесли исследования В. А. Катералла (США), М. Лаздунского (Франция), Е. В. Гришина (СССР).

Существуют по крайней мере четыре группы нейротоксинов, по-разному влияющих на работу натриевых каналов. Тетродотоксин и сакситоксин (см. с. 763, 771) селективно блокируют трансмембранный ток ионов натрия и, по-видимому, связываются с ион-проводящей частью канала. Батрахотоксин, аконитин и вератридин влияют на активацию натриевых каналов и, по всей видимости, также взаимодействуют с компонентами, осуществляющими транспорт ионов натрия. Полипептидные токсины скорпионов (см. с. 283) и морских анемонов (см. с. 284) замедляют инактивацию, а некоторые нейротоксины из яда американских скорпионов воздействуют на процесс активации натриевых каналов. Наиболее вероятно, что их рецепторы входят в состав воротного механизма мембранной системы транспорта ионов натрия.

Натриевые каналы были впервые выделены М. А. Рафтери из электрических органов угря *Electrophorus electricus*. Установлено, что они представляют собой гликопротеины молекулярной массы около 260 000, в которых ~30% приходится на углеводные компоненты. Детекция каналов в процессе выделения осуществлялась с помощью радиоактивных производных тетродотоксина или сакситоксина. В других тканях натриевые каналы содержат несколько компонентов. Например, в мозге крысы они образуют олигомерный комплекс из трех гликопротеинов молекулярной массы 260 000 (α), 39 000 (β_1) и 37 000 (β_2). Все субъединицы характеризуются высокой степенью гликозилирования и наличием большого числа остатков дикарбоновых аминокислот. Выделенные препараты каналов из различных электровозбудимых тканей удалось реконструировать

в искусственных мембранах с восстановлением практически полной функциональной активности, присущей натриевым каналам электро-возбудимых мембран.

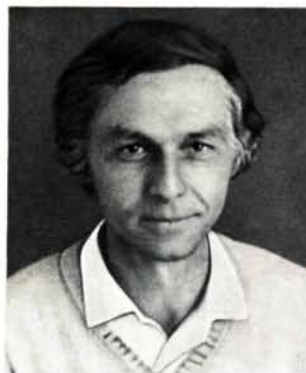
Аминокислотная последовательность белка натриевого канала из электрического органа угря была определена в лаборатории Ш. Нумы при анализе кДНК, полученной с использованием мРНК электроплаксов. Идентификация клонов в библиотеке кДНК



Участки полипептидной цепи с аминокислотными остатками, заряженными:



Рис. 341. Гипотетическая модель натриевого канала:
(а) — схема укладки полипептидной цепи;
(б) — схема пространственной организации.



Хубер [Huber] Роберт (р. 1937), немецкий биохимик и кристаллограф. Окончил Технический университет в Мюнхене (1960), с 1972 г. — профессор Института биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы — в области изучения структуры и функции белков методом кристаллографии.



Михель [Michel] Хартмут (р. 1948), немецкий биохимик и кристаллограф. Образование получил в Мюнхенском и Тюбингенском университетах, с 1979 г. работает в Институте биохимии Общества М. Планка в Мартинсриде. Основные работы связаны с изучением структуры и функции мембранных белков методом кристаллографии.

осуществлялась с помощью антител к выделенному белку, а также гибридизацией с синтетическими нуклеотидными зондами, комплементарными ряду триптических фрагментов его полипептидной цепи.

Полипептидная цепь натриевого канала из электрического органа угря *Electrophorus electricus* состоит из 1820 аминокислотных остатков, причем сигнальный гидрофобный пептид отсутствует, что предполагает локализацию ее N- и C-концевых участков на цитоплазматической стороне электровозбудимой мембраны. В составе молекулы найдено четыре гомологичных повторяющихся фрагмента, в каждом из которых находятся характерные участки полипептидной цепи с основными, кислыми или незаряженными аминокислотными участками (рис. 341). Предполагается, что четыре подобных участка своими гидрофильными поверхностями образуют трансмембранный канал (рис. 341, а) с размером в самой узкой части около 0,42 нм. По данным электрофизиологических экспериментов размеры ионной поры канала (рис. 341, б) оцениваются ~ 0,3—0,5 нм. В состав воротного механизма канала, по-видимому, входят участки полипептидной цепи, содержащие заряженные аминокислотные остатки, изменение конформации которых под действием электрического поля мембраны, вероятно, и обуславливает переход натриевого канала в открытое состояние. Характерно, что в целом организация канала подобна организации ацетилхолинового рецептора.

Таким образом, ионные каналы непосредственно участвуют в передаче сигнала возбудимыми клетками. Существуют хемовозбудимые (рецепторы ацетилхолина, γ -аминомасляной кислоты, глутамата, глицина и др.) и электровозбудимые (натриевые, калиевые, кальциевые, хлорные и др.) каналы. В эти транспортные системы входят участки связывания нейромедиаторов или сенсоры изменения силы электрического поля мембраны, а также непосредственно ионные поры, образованные несколькими трансмембранными белковыми фрагментами.

Белки фотосинтетических реакционных центров

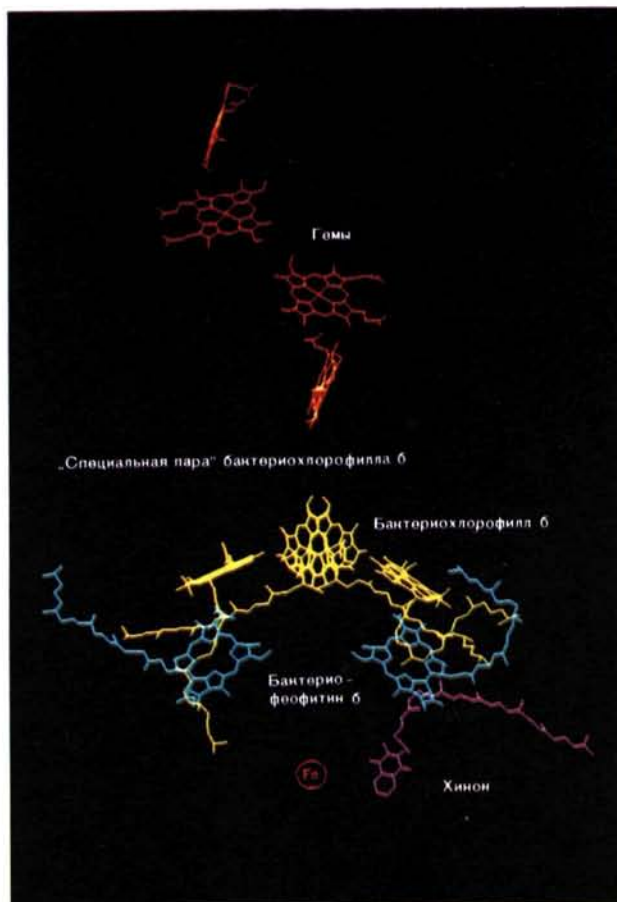
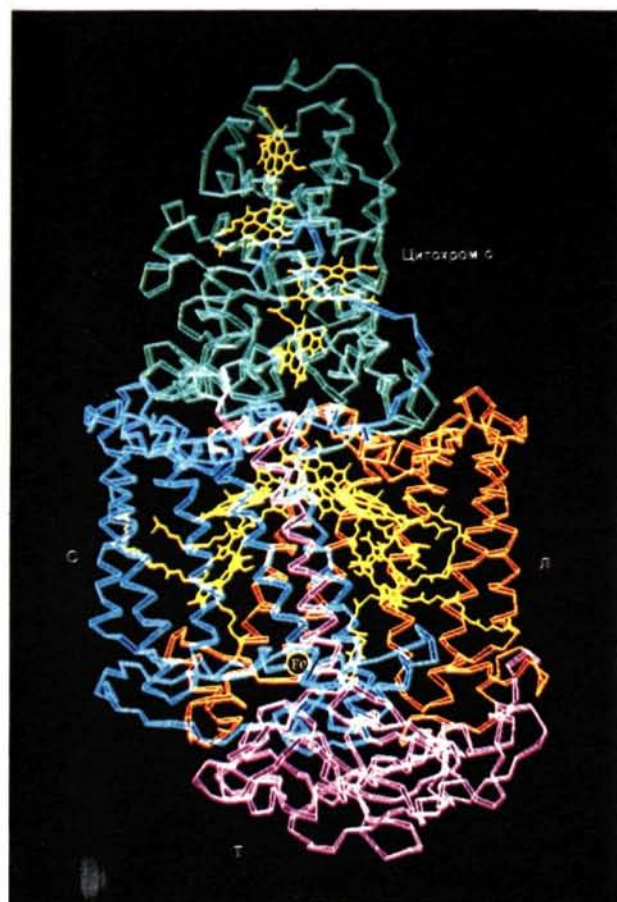
Начальные этапы процесса фотосинтеза осуществляются при непосредственном участии белково-пигментных комплексов фотосинтетических мембран. Энергия света первоначально поглощается светособирающим комплексом и передается далее на реакционные центры, где она с очень высокой эффективностью используется для транспорта электронов через мембрану.

В настоящее время получены данные о структуре мембранных реакционных центров фотосинтезирующих бактерий (Р. Хубер, Х. Михель). Так, в состав реакционного центра пурпурных бактерий *Rhodospseudomonas viridis* входят цитохром *c* и три белка (субъединицы), называемые Л (легкий), С (средний), Т (тяжелый). Простетическими группами, ассоциированными с белками реакционного центра, являются: четыре молекулы бактериохлорофилла *b*, две молекулы бактериофеофитина *b*, две молекулы хинона, два атома негемового железа и каротиноиды.

Полные аминокислотные последовательности белков Л, С и Т были получены из анализа соответствующих генов. Первичная структура четвертого белка реакционного центра, т. е. цитохрома с, пока не установлена. Субъединицы Л, С и Т содержат 273, 323 и 258 аминокислотных остатков соответственно. Важной структурной особенностью является наличие в каждой из легких и средних субъединиц по пяти, а в тяжелой — одного спирализованного участка. Эти участки состоят в основном из 24—30 гидрофобных аминокислот и прерываются короткими гидрофильными фрагментами. Такое построение полипептидных цепей является характерным для мембранных белков. Молекула цитохрома с, входящая в состав реакционного центра, согласно данным аминокислотного анализа содержит 323 аминокислотных остатка и носит ярко выраженный гидрофильный характер. Белок содержит 4 характерных участка связывания гема, последовательность которых аналогична последовательности соответствующих участков других цитохромов с.

Реакционный центр фотосинтезирующих бактерий является единственным комплексом интегральных мембранных белков, полученным в виде высокоупорядоченных кристаллов. Рентгеноструктурный анализ этих кристаллов позволил рассчитать карту электронной плотности с разрешением в 0,3 нм и получить модель пространственного строения протетических групп. Карта электронной

Рис. 342. Трехмерная модель (слева) и пространственное расположение кофакторов внутри этой модели (справа) для белков фотореакционного центра фотосинтезирующих бактерий *Rhodospseudomonas viridis*.



плотности, даже при отсутствии значительной информации о первичной структуре цитохрома *c*, дала возможность однозначно проследить ход отдельных полипептидных цепей (рис. 342). Центральная часть комплекса состоит из субъединиц Л и С, которые связывают бактериохлорофилл *b*, бактериофеофитин *b*, негемовое железо и хинон.

Высокая степень гидрофобности центрального участка реакционного центра свидетельствует о том, что пять α -спиральных сегментов субъединиц Л и С, а также N-концевой фрагмент субъединицы Т расположены в толще мембраны. Все эти 11 участков и составляют мембранную часть комплекса. Спиральные участки расположены в пространстве практически перпендикулярно плоскости мембраны. Субъединица Т и цитохром *c* связываются с внутренней и наружной поверхностями мембраны соответственно, причем цитохром *c* не содержит участков, пронизывающих мембрану. По два мембранных фрагмента от каждой из субъединиц Л и С участвуют в связывании негемового железа. Более того, четыре лиганда, необходимые для связывания атома железа, обеспечиваются этими же четырьмя спиральями. На поверхности связывания цитохрома *c* между субъединицами Л и С располагается специальная пара, образованная двумя молекулами бактериохлорофилла *b*, и дополнительные молекулы бактериохлорофилла *b* и бактериофеофитина *b*. Лиганды для ионов магния молекул бактериохлорофилла — остатки гистидина — расположены у самого входа α -спиральных сегментов в мембрану. Что же касается негемового железа, то в его связывании участвуют четыре остатка гистидина субъединиц Л и С и глутаминовая кислота субъединицы С.

Трехмерная структура реакционного центра в полном соответствии со спектроскопическими данными дает представление о пути переноса электрона. После поглощения света электрон переносится с возбужденного первичного донора электронов (специальной пары) через бактериохлорофилл *b* на промежуточный акцептор — бактериофеофитин *b* и далее на первичный хиноновый акцептор. Хинон восстанавливает вторичный акцептор — слабо связанный хинон. Полностью восстановленный и протонированный вторичный акцептор освобождается из реакционного центра, а на его место поступает хинон из мембранного окружения. Окисленная специальная пара восстанавливается цитохромом. Перенос электронов через фотосинтетическую мембрану сопровождается транспортом протонов, который сопряжен с синтезом АТФ.

НИЗКО- МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ

Алкалоиды

Витамины

Терпены

Стероиды

Регуляторы роста и развития
растений

Антибиотики

Простагландины и тромбоксаны.
Лейкотриены

Яды и токсины

Феромоны и ювенильные гормоны
насекомых

Пестициды



Сертюрнер (Sertürner) Фредерик Вильгельм (1783—1841), немецкий химик и фармацевт. Образование получил самостоятельно, работал аптекарем в Гамелне. Основное направление работ — фармацевтическая химия. Впервые выделил активное вещество из опийного мака и показал, что оно содержит азот, углерод, водород и кислород и является солеобразующим основанием.

Низкомолекулярные биорегуляторы — весьма многочисленная группа физиологически активных соединений, как природных, так и синтетических, выполняющих разнообразные функции в организмах человека и животных, в растениях и микроорганизмах. К ним относятся алкалоиды, витамины, терпеноиды, антибиотики, стероидные гормоны и гормоны растений, феромоны, простагландины, природные яды и токсины, лекарственные препараты, пестициды и др. Объединение таких веществ в единую группу во многом условно и базируется в основном на сравнительно небольшой молекулярной массе этих соединений. Другими словами, подчеркивается их отличие от биополимеров — белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, хотя, конечно, четкую грань между этими группами провести практически невозможно ни с химической, ни с биологической точек зрения.

В то же время исторически, а в известной мере и методически такое подразделение представляется оправданным и целесообразным. Действительно, алкалоиды, витамины, терпеноиды и родственные соединения были первыми объектами химии природных веществ, строение которых было расшифровано, а синтез этих соединений и их аналогов достиг немалых успехов уже к началу нашего столетия. Исследование же биополимеров, развивавшееся лишь в последние десятилетия, потребовало разработки и применения принципиально новых подходов и привело в конечном итоге к рождению физико-химической биологии.

Изучение низкомолекулярных биорегуляторов — увлекательная область знания, затрагивающая не только проблемы жизнедеятельности клетки, но и вопросы медицинской и сельскохозяйственной практики, взаимодействия различных организмов в природной экосистеме и охраны окружающей среды.

Алкалоиды

Алкалоиды (от араб. al-qali — щелочь) — азотсодержащие органические основания, встречающиеся в растениях и, как правило, обладающие физиологической активностью. В последнее время аналогичные соединения обнаружены и в ряде животных организмов, в высших и низших грибах, водорослях.

Биологическая роль алкалоидов до конца не выяснена — они способны быть своеобразными катализаторами биохимических процессов, могут в растениях играть роль защитных или сигнальных веществ типа инсектицидов или феромонов. Не исключено, что в ходе биогенеза азотистых оснований из аминокислот алкалоиды являются так называемыми «тупиковыми» продуктами биосинтеза. Интересно, что высоким содержанием алкалоидов отличаются бобовые, пасленовые, маковые, мотыльковые, лютиковые и некоторые другие виды растений, встречаются они и в грибах (мухомор, спорынья и др.), но их очень мало или совсем нет у роз, папоротников, лишайников и мхов. Алкалоиды не обнаружены и у бактерий.

В настоящее время описано свыше 5 тыс. различных алкалоидов, для многих из них полностью установлено химическое строение. Алкалоиды издавна привлекали исследователей ввиду их разнообразного физиологического действия, и химия алкалоидов, по всей вероятности, является наиболее древним разделом химии природных соединений.

Алкалоиды классифицируют по различным признакам — по видам содержащих их растений (как одно из направлений химиче-



Рис. 343. Мак снотворный (Papaver somniferum).

ской таксономии), по их химической природе (производные индола, пиридина, пирролизидина и т. п.) или по характеру физиологического действия (болеутоляющие, сосудорасширяющие, антигельминтики и т. п.).

Группа морфина

Морфин — главный алкалоид мака снотворного (*Papaver somniferum*) (рис. 343), где он находится наряду с наркотинном, папаверином, кодеином, тебаином и двумя десятками других алкалоидов. Его добывают из опия — высохшего на воздухе млечного сока незрелых плодов (головок) мака. Впервые в чистом виде морфин был получен Ф. Сертюрнером в 1806 г. Строение алкалоида — в основе его лежит скелет пиперидинофенантрена — было установлено в 1925—1927 гг. Р. Робинсоном. Синтез морфина осуществлен в 1952 г. М. Гейтсом. Установление полной стереохимии морфина было завершено в 1955 г. на основе рентгеноструктурного анализа (Д. Ходжкин).

Исходным соединением в первом полном синтезе морфина послужил диметокси-о-нафтохинон (1), полученный в свою очередь по 10-стадийной схеме из 2,6-дигидроксинафталина. Реакцией Михаэля с цианаксусным эфиром и дальнейшими превращениями хинон (1) был переведен в цианметильное производное (2), к которому диеновым синтезом был достроен третий карбоцикл молекулы алкалоида. Частичное гидрирование полученного цианодикетона (3) сопровождалось циклизацией, но в образовавшемся кетолактаме (4) гетероцикл и второй карбоцикл молекулы имели нежелательное *cis*-сочленение. Удаление кетогруппы по Кижнеру — Вольфу, восстановление лактамного карбонила алюмогидридом лития, N-метилирование и расщепление на антиподы с помощью дибензоилвинной кислоты привели к оптически активному N-метилизоморфинану (5), который путем гидратации двойной связи, гидролиза одной из метоксигрупп и окисления по Опенауэру был превращен в кетопроизводное (6). При монобромировании и дегидробромировании последнего с одновременным образованием фенилгидразона происходила необходимая изомеризация в *транс*-сочлененное соединение (7), которое затем было вновь переведено в кетопроизводное (8), имеющее уже нужную стереохимию. Превращение его в кодеин легко протекало при трибромировании, замыкании пятого (дигидрофуранового) кольца и восстановлении кетогруппы с одновременным восстановительным дебромированием; морфин образовывался при деметилировании кодеина хлоргидратом пиридина.

Морфин относится к болеутоляющим веществам — наркотическим анальгетикам (от греч. *αν* — отрицание, *αλγος* — боль). Он обладает также седативным и снотворным действием, стимулирует гладкую мускулатуру, а в больших концентрациях вызывает рвоту, запоры, затрудняет диурез, угнетает центры терморегуляции (гипотермия) и дыхания; при его передозировке может наступить смерть от дыхательного паралича.

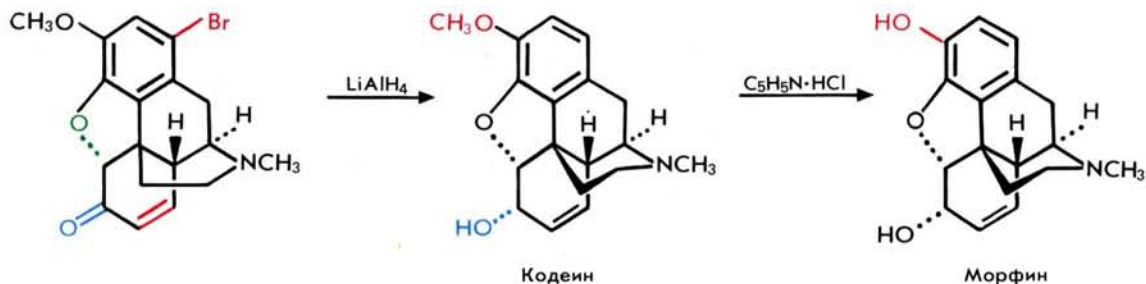
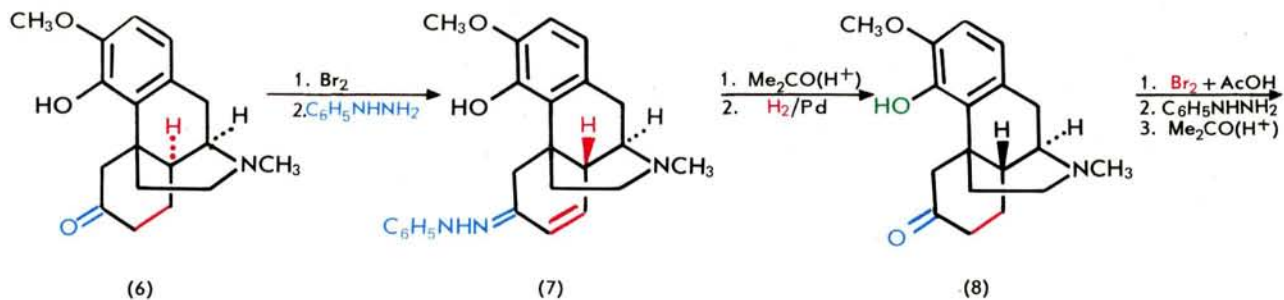
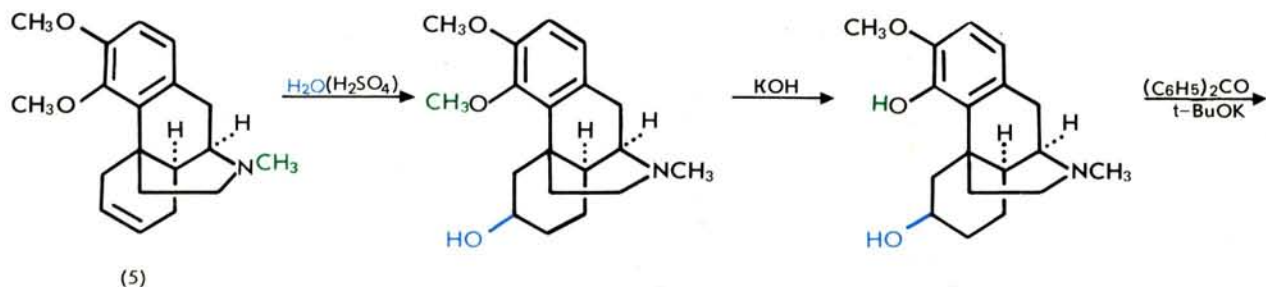
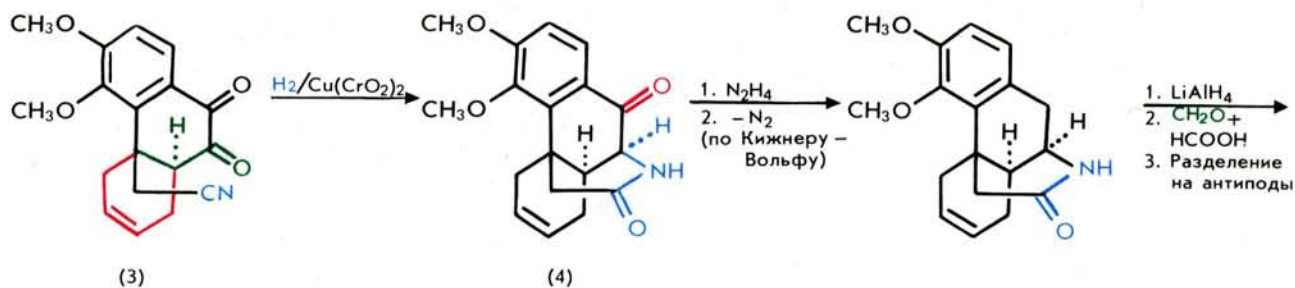
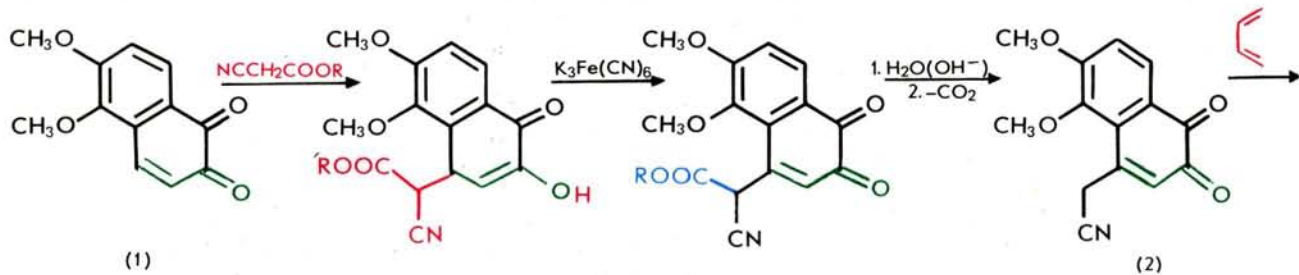
Свое название морфин получил в честь древнегреческого бога сна и сновидений Морфея. Опий с незапамятных времен был известен в древнем Средиземноморье, а позднее появился также в Западной Европе и Азии. Уже в XVI в. до н. э. в известном папирусе Эберса опий упоминается в качестве лекарственного вещества, широко применяемого в Древнем Египте (наряду с мятой, различными бальзамами и т. п.). Одурманивающее действие опийных алкалоидов стало причиной того, что в средневековой Индии распространилось жевание опия, в Китае — его курение и т. д.

Морфин действует на центральную нервную систему, точнее, на кору больших полушарий. Он вызывает эйфорию (от греч. *ευ* — хорошо, *φρω* — переносу) — психическое состояние душевного покоя и уединения, устранения гнетущих ощущений и переживаний. При регулярном употреблении наркотика развивается привыкание к нему, а затем и лекарственная зависимость — болезненное пристрастие, являющееся одним из видов наркомании (морфинизм). Резкое прекращение употребления морфина приводит к болезненному состоянию абстиненции (лишения), которое в тяжелых случаях может даже вызвать смертельный исход.



Робинсон (Robinson) Роберт (1886—1975), английский химик-органик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Манчестерский университет (1906); в 1945—1950 гг. — президент Лондонского Королевского общества, с 1955 г. работал в фирме «Шелл». Исследовал молекулярные структуры и биосинтез алкалоидов и других природных соединений. Установил строение морфина (1925). Широко известен работами по химии стероидных гормонов, антибиотиков. Лауреат Нобелевской премии по химии (1947).

Синтез морфина



В настоящее время установлено, что морфин влияет на специфические рецепторы в коре больших полушарий, получившие название опиатных (каппа, лямбда и др.). Эндогенными их агонистами являются нейропептиды мозга — энкефалины, эндорфины и др. (см. с. 261). Вероятно, конформации этих нейропептидов и морфина в рецепторном комплексе во многом сходны.

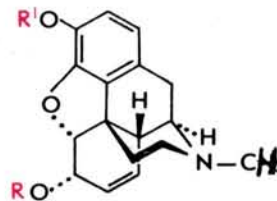
В медицине помимо чистого морфина (гидрохлорида или сульфата) применяются также препараты опия под названием опион (50% морфина) и пантопон (смесь гидрохлоридов пяти опиатных алкалоидов).

Второй алкалоид группы морфина — кодеин является метиловым эфиром морфина, и его содержание в опиуме составляет от 0,2 до 6%. Кодеин обладает слабым наркотическим действием и широко употребляется как препарат против кашля. Третий природный морфиновый алкалоид — тебаин не обладает наркотической активностью, вызывает конвульсии (как стрихнин) и является вредной примесью в опиумных препаратах.

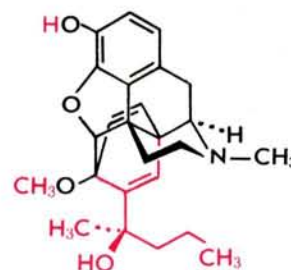
Среди искусственно полученных производных морфина следует упомянуть героин (диацетилморфин) — один из наиболее распространенных наркотиков со значительно более сильным действием, чем морфин, а также так называемое соединение Бентли (по имени К. Бентли), которое в 10 тыс. раз активнее морфина (1 мг его успокаивает разъяренного слона). Эти препараты не только оказывают наркотический эффект, но и вызывают серьезные нарушения дыхания, а в отношении развития болезненного пристрастия еще опаснее морфина.

Интересно, что простое производное N-деметилованного морфина — налорфин (N-аллилморфин) является конкурентным антагонистом морфина и других наркотических анальгетиков и часто применяется для лечения наркомании и острых отравлений наркотиками.

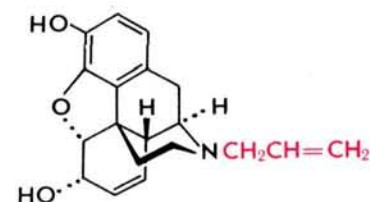
Другие алкалоиды опия отличаются от морфина по химической природе и являются производными изохинолина. Среди них наиболее ценен папаверин, выделенный в 1848 г. В. Мерком. Он обладает спазмолитическим и умеренным сосудорасширяющим действием, повышает потребление миокардом кислорода и широко применяется при гипертонии, стенокардии, спазмах коронарных сосудов и сосудов мозга, гладкой мускулатуры брюшной полости и других заболеваниях. Строение папаверина выяснено в 1883—1898 гг. Г. Гольдшмидтом, а синтез осуществлен в 1909 г. А. Пикте. Большая часть мировой потребности в папаверине удовлетворяется сейчас за счет химического синтеза. Среди синтетических аналогов папаверина наиболее широко известны но-шпа и дибазол. Наркотин (его



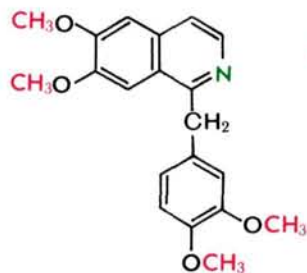
Кодеин R = H, R¹ = CH₃
 Тебаин R = CH₃, R¹ = CH₃
 Героин R = COCH₃, R¹ = COCH₃



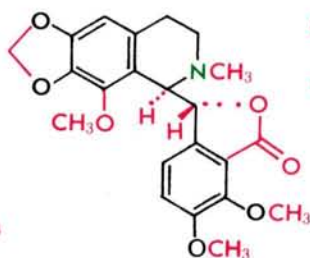
Соединение Бентли



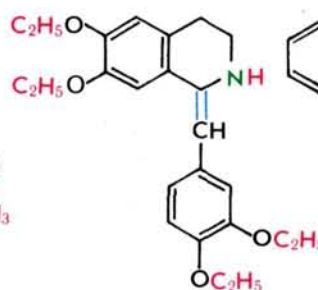
Налорфин



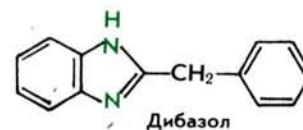
Папаверин



Наркотин



Но-шпа



Дибазол



Гольдшмидт [Goldschmidt] Гвидо (1850—1915), австрийский химик, ученик А. Байера, профессор Пражского и Венского университетов. Известен многочисленными работами в области алкалоидов и полициклических углеводов, в том числе хризена, пирена и т. п.



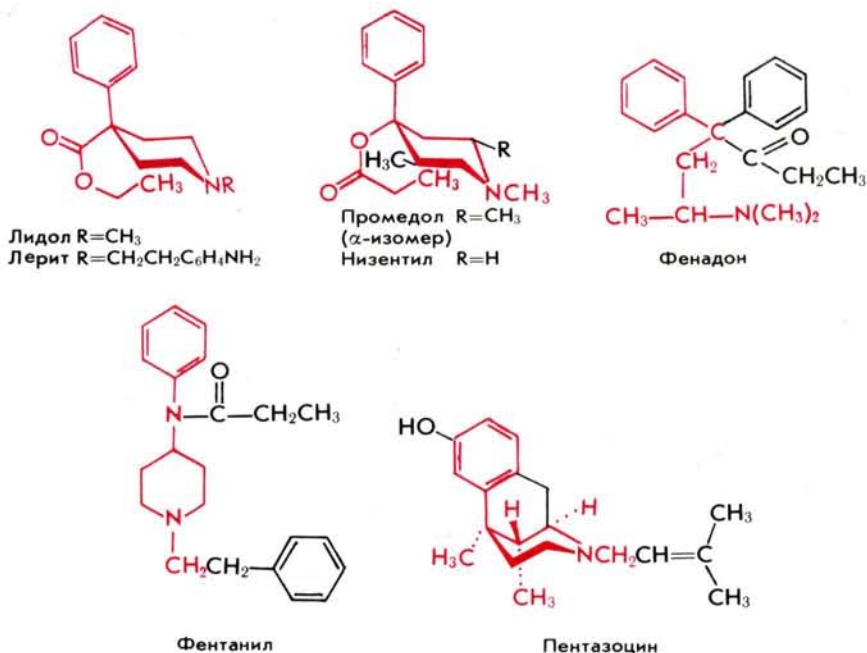
Пикте [Pictet] Аме (1857—1937), швейцарский химик-органик. Окончил Высшую нормальную школу в Париже (1880), с 1882 г. — профессор Женевского университета. Ему принадлежат основополагающие труды по химии алкалоидов и углеводов. Синтезировал никотин (1904) и разделил его на оптические антиподы, получил мальтозу, лактозу и др. углеводы.

содержание в опиуме составляет 2—12%, строение установлено У. Г. Перкиным, Р. Робинсоном и В. М. Родионовым) применяется как средство от кашля и используется в качестве сырья для синтеза других ценных лекарственных средств.

Синтетические анальгетики

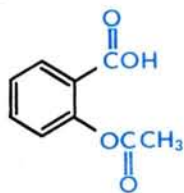
В настоящее время получены многие синтетические наркотические анальгетики, часто в десятки и сотни раз превосходящие по активности морфин. Среди них широко известен лидол, являющийся производным изоникотиновой кислоты (структурное сходство его с морфином очевидно); лидол примерно в 10 раз слабее морфина, но значительно менее токсичен. В СССР И. Н. Назаровым создан аналогичный препарат — промедол, уступающий морфину по активности только в 2—4 раза. В медицине находят применение также низентил, лерит, фенадон и фентанил; последний активнее морфина в 100—400 раз. Заслуживает особого внимания также пентазоцин — он несколько менее активен, чем морфин, но реже вызывает лекарственную зависимость.

Среди анальгетиков большую и важную группу составляют ненаркотические вещества, которые обычно обладают противовоспалительным и жаропонижающим действием и не вызывают привыкания или лекарственной зависимости. Главным их представителем является аспирин, или ацетилсалициловая кислота. Аспирин снижает температуру, уменьшает местное воспаление и широко используется для обезболивания. Механизм его биологического действия, по всей вероятности, связан с торможением синтеза простагландинов (см. с. 756). Саму салициловую кислоту, ее Na-соль,

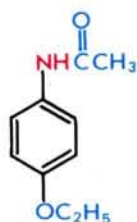


метилвый эфир и амид применяют в медицине для лечения острых и хронических ревматических заболеваний, артритов и подагры.

Следует отметить, что салициловая кислота встречается в виде сложных эфиров во многих растениях. К группе ненаркотических анальгетиков принадлежат также такие хорошо известные препараты, как фенацетин и индометацин, производные пиразолона амидопирин (пирамидон), анальгин и бутадиион; их применяют как порознь, так и в смеси друг с другом или с барбитуратами, кофеином, флавоноидами и другими лекарственными средствами.



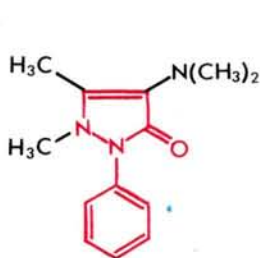
Аспирин



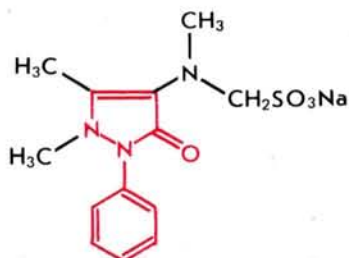
Фенацетин



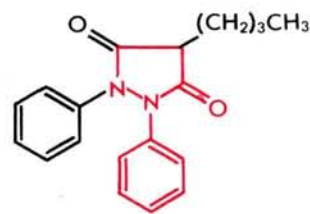
Индометацин



Амидопирин



Анальгин



Бутадиион

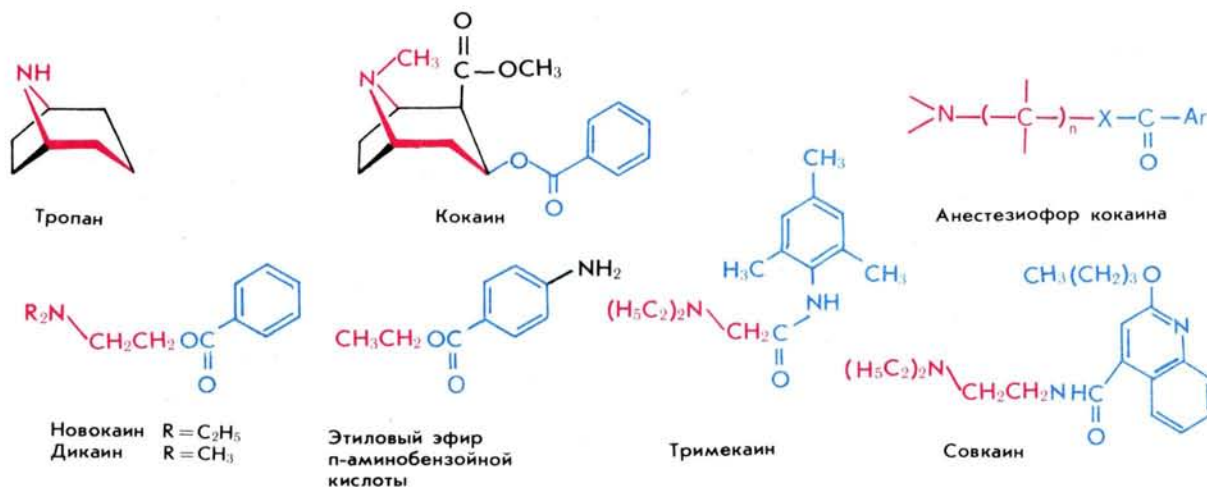
Группа кокаина

Кокаин, наряду с другими родственными алкалоидами, содержится в листьях кокаинового куста — южно-американского растения *Erythroxylon coca* L. (рис. 344), которое в настоящее время культивируется не только в Южной Америке, но и в Шри-Ланке, Индии, Юго-Восточной Азии, Африке, а также в закавказских субтропиках СССР. Впервые этот алкалоид был выделен из листьев кока и назван эритроксилином, а в кристаллическом виде получен в 1860 г. К. Ниманом. Кокаин является представителем большой группы алкалоидов, в основу которых входит бициклический скелет тропана. Хотя первый синтез кокаина осуществлен еще в 1909 г. Р. Вильштеттером, его относительная и абсолютная конфигурации установлены только в 1953 г. работами групп Г. Фодора (Венгрия) и С. П. Финдлея (США). При гидролизе кокаин дает бензойную кислоту, метанол и экгонин (2-гидрокси-3-карбокситропан). Последний получают обычно гидролизом смеси сопутствующих кокаину алкалоидов и легко превращают в наиболее ценный алкалоид группы — кокаин одновременным метилированием и бензоилированием.



Ниман (Nieman) Карл Георг (1908—1964), американский химик-органик. Известен работами по химии разнообразных природных веществ, в том числе алкалоидов, углеводов и др. Исследовал активные центры ряда ферментов, в частности с помощью конформационно-закрепленных субстратов.

Кокаин обладает мощным локальным обезболивающим действием и относится к местным анестетикам (от греч. $\alpha\nu$ — отрицание, $\alpha\iota\sigma\theta\eta\sigma\iota\zeta$ — чувствительность). Анестезирующее действие кокаина впервые было установлено и рекомендовано для медицинского применения русским фармакологом В. К. Анрепом в 1879 г. Алкалоид оказывает парализующее действие на парасимпатическую (периферическую) нервную систему и может использоваться при хирургических операциях глаз, носа, горла и в зубной практике, однако из-за высокой токсичности применяется довольно редко.



В начале XX в. кокаин был широко распространенным наркотиком (кокаинизм). Как и морфин, он вызывает сильное привыкание и психическую зависимость, но явлений физической абстиненции не проявляет. Сейчас широкое применение в медицине нашли синтетические аналоги кокаина, обладающие более высокой анестетической активностью и практически лишенные наркотических свойств. Первым среди таких аналогов оказался новокаин (прокаин), введенный в практику А. Эйнхорном в 1905 г. и являющийся ганглиоблокатором. Аналогичный ему по строению дикаин приблизительно в 10 раз активнее кокаина. Многочисленные исследования показали, что анестезиофором кокаина является группировка, состоящая из арилкето- и аминоалкильной групп, соединенных гетероатомом, а самый простой из местных анестетиков — это этиловый эфир п-аминобензойной кислоты. Сейчас широко применяют такие более сложные по структуре соединения, как анид тримекаин и хинолиновое производное совкаин; последний в 25 раз активнее кокаина, но примерно во столько же раз токсичнее.

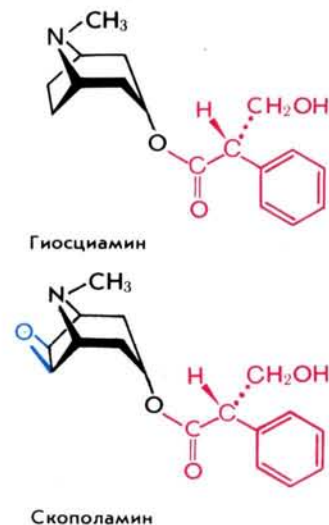
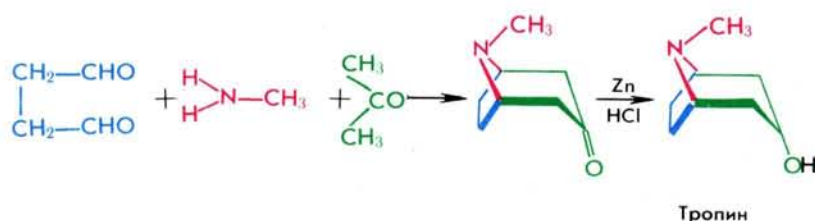


Рис. 344. Ветвь кокаинового куста (*Erythroxylon coca*).

Группа атропина

Скелет тропана лежит в основе структур многих других алкалоидов, из которых наиболее известны атропин, гиосциамин и скополамин.

Атропин — сложный эфир тропина и рацемической троповой (α -фенил- β -гидроксипропионовой) кислоты — встречается в растениях семейства пасленовых (Solanaceae), особенно в красавке (*Atropa belladonna*) (рис. 345), дурмане (*Datura stramonium*) (рис. 346) и белене (*Hyoscyamus niger*) (рис. 347), а также в различных видах *Scopolia*, *Mandragora* и *Duboisia*. Алкалоид был выделен в 1833 г. вместе с оптически активным (левовращающим) гиосциамином. По всей вероятности, в растениях содержится только гиосциамин, а рацемизация входящего в него остатка троповой кислоты происходит в условиях экстракции. Главным источником гиосциамин и атропина является сейчас *Scopolia carniolica*, неправильно называемая «кавказской мандрагорой», и другие виды скополии. Основной вклад в изучение структуры тропановых алкалоидов внесла в конце прошлого века группа Р. Вильштеттера, первый синтез атропина из тропина осуществлен ими еще в 1901 г. Изящный синтез самого тропина из янтарного диальдегида, метиламина и ацетона выполнен в 1917 г. Р. Робинсоном.



Атропин и гиосциамин являются типичными блокаторами м-холинорецепторов.

Вегетативная и двигательная иннервации человеческого организма подразделяются в зависимости от нейромедиатора на адренергическую (медиатор — норадреналин) и холинергическую, или парасимпатическую (медиатор — ацетилхолин). Вегетативные рецепторы парасимпатической системы, расположенные обычно на ганглионарных нейронах внутри органов, делятся, в свою очередь, на никотин-чувствительные, или н-холинорецепторы (см. с. 650), и мускарин-чувствительные, или м-холинорецепторы (о мускарине см. с. 628). Для м-холиноблокаторов, называемых иногда атропиноподобными веществами, характерно подавление акта взаимодействия ацетилхолина с его рецепторами, при этом ни синтез или высвобождение ацетилхолина, ни его гидролиз холинэстеразой не затрагиваются.

Для атропина и гиосциамин характерна высокая избирательность действия. Они снижают тонус гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта, желчного и мочевого пузыря, бронхов и т. п. и применяются при язвенных и других болезнях, для стимуляции сердечной деятельности при лечении инфаркта миокарда. Кроме того, они уменьшают секрецию различных желез и тонус мышц глаза, что приводит к параличу аккомодации и используется при диагностике глазных болезней. Местно анестезирующее действие и влияние на центральную нервную систему у этих алкалоидов выражено слабее, чем у кокаина, но тем не менее они применяются при лечении паркинсонизма и отравлений морфином и другими анальгетиками и холиномиметиками.

Скополамин был впервые выделен в 1888 г., строение его установлено только в 1921—1923 гг., а синтез осуществлен Г. Фодором лишь в 1956 г. По физиологическому действию этот алкалоид близок атропину, но его влияние на центральную нервную систему значи-



Андрей Василий Константинович (1854—1925), русский ученый, профессор медицины и фармакологии. Окончил курс Петербургской медико-хирургической Академии, затем изучал физиологию и фармакологию в Лейпциге. Описал анестезирующее действие кокаина и рекомендовал его для применения в медицинской практике.



Эйнхорн [Einhorn] Альфред (1856—1917), немецкий химик. Основные работы посвящены исследованию связи между строением и физиологическим действием органических веществ, вызывающих анестезию, а также химии алкалоидов (кокаин, эггонин, тропинин).

Рис. 345. Красавка обыкновенная (*Atropa belladonna*).



Рис. 346. Дурман обыкновенный (*Datura stramonium*)

тельно сильнее, и он часто применяется как успокаивающее средство в психиатрии, наркологии и при морской болезни (входит в состав таблеток «Аэрон»).

Рассмотрение фармакологических свойств морфина, кокаина, их аналогов и производных невольно наводит на мысль о веществах, известных человеку с глубокой древности и помогающих ему справиться с острой физической болью, душевным смятением или с предельным нервным напряжением. Очень хорошо потребность в таких веществах выразил В. Шекспир словами Макбета, обращенными к врачу:

Ты можешь исцелить болящий разум,
Из памяти с корнями вырвать скорбь,
Стереть в мозгу начертанную смуту
И сладостным каким-нибудь дурманом
Очистить грудь от пагубного груза,
Давящего на сердце?

Мы по праву можем назвать такие средства веществами милосердия. Однако многие из них стали служить не только медицине, но и использоваться людьми слабыми, безвольными, а иногда и злонамеренными в качестве наркотиков, и наркомания, поощряемая «черным бизнесом», превратилась сейчас в настоящее социальное бедствие. Систематическое употребление наркотиков и алкоголя, особенно в постоянно возрастающих дозах, необратимо расшатывает нервную систему, приводит к нарушению всех функций организма и в конечном итоге к трагическому концу. Поэтому с наркоманией и ее «безобидными» разновидностями — алкоголизмом и курением — надо вести самую решительную борьбу.

Хотя наркоз (от греч. *ναρῶω* — оцепенение) был известен уже в средние века, лишь в 1846 г. У. Т. Г. Мортон предложил использовать для хирургического наркоза серный эфир, и этот год считается официальной датой открытия наркоза. Русский хирург Н. И. Пирогов широко применял эфир и хлороформ для ингаляционного наркоза при хирургических операциях начиная с 1847 г. Сейчас для этого используют различные газы: оксид азота (I), циклопропан, гелий, неон, этилен, трихлорэтилен, хлористый этил, ацетилен в смеси с кислородом, некоторые спирты, фторотан, метоксифлуран и нарколам. Первое применение неингаляционного (ректального) наркоза описано в 1847 г. Н. И. Пироговым, а в 1902 г. Н. П. Кравков предложил внутривенный наркоз с помощью гедонала. В настоящее время обычно сочетают ингаляционный и неингаляционный наркоз, а для последнего применяют вещества различного срока действия: ультракороткого (продолжительность наркоза 3—10 мин) — обычно это пропанидид; короткого (15—30 мин) — предион, гексенал или тиопентал натрия; длительного (1,5—2 ч) — оксибутират натрия. Подобные средства, принадлежащие к самым разным классам органических веществ, несомненно, действуют на мембраны нейронов, но точные биохимические их мишени пока не известны.





Фторотан



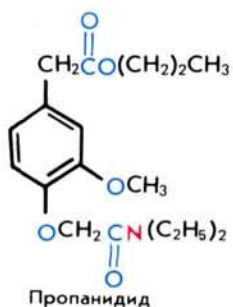
Метоксифлуран



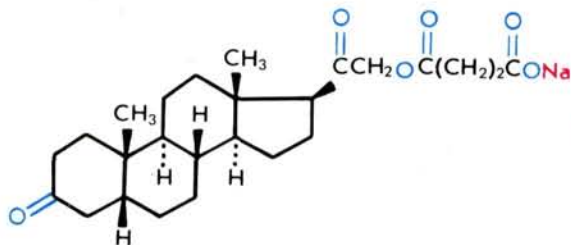
Нарколан



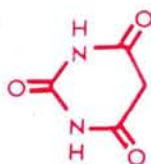
Оксибутират натрия



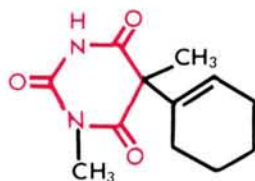
Пропанидид



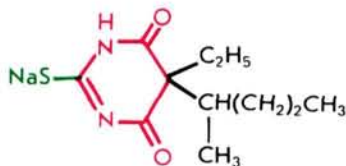
Предион



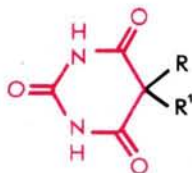
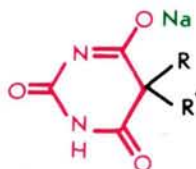
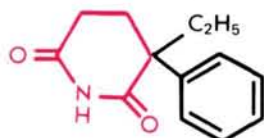
Барбитуровая кислота



Гексенал



Тиопентал натрия

Веронал $\text{R} = \text{R}' = \text{C}_2\text{H}_5$
Люминал $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$; $\text{R}' = \text{C}_6\text{H}_5$ Барбамил $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$, $\text{R}' = (\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
Нембутал $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$, $\text{R}' = \text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ 

Ноксирон



Хлоралгидрат



Бромурал



Вильштеттер (Willstätter) Рихард Мар-тин (1872—1942), немецкий химик и биохимик, иностранный член-корреспондент Российской АН и иностранный почетный член АН СССР (1929). Окончил Мюнхенский университет (1894). Впервые исследовал растительные пигменты (хлорофилл, антоцианы), изучал алкалоиды, ферменты, пигменты крови, процесс фотосинтеза. Лауреат Нобелевской премии по химии (1915).



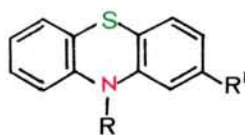
Рис. 347. Белена черная (*Hyoscyamus niger*).



Мортон (Morton) Уильям Томас Грин (1819—1868), американский зубной врач. Окончил зубоучебную школу в Балтиморе, работал в Бостоне. Один из основоположников метода общего обезболивания. Первым успешно продемонстрировал (1846) эфирный наркоз при хирургической операции.



Пирогов Николай Иванович (1810—1881), русский хирург и педагог, академик Петербургской АН (1847). Окончил Московский университет (1828). Основные работы посвящены хирургии и анатомии. Применит эфирный наркоз при хирургической операции на поле боя (1847). Изучал влияние анестезирующих веществ на организм человека.

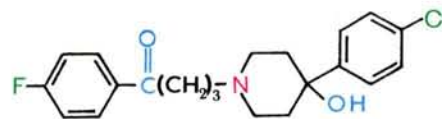


Фенотиазин $R=R^1=H$

Аминазин $R=(CH_2)_3N(CH_3)_2, R^1=Cl$

Пропазин $R=(CH_2)_3N(CH_3)_2, R^1=H$

Пипальфен $R=CH_2CH(CH_3)N(CH_3)_2, R^1=H$

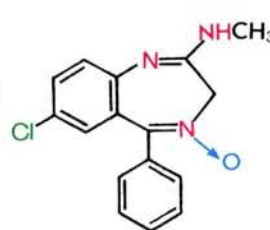


Галоперидол

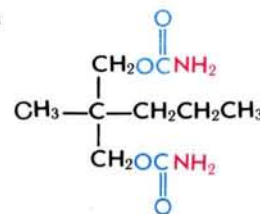


Седуксен (валиум) $R=CH_3, R^1=H$

Оксазепам (тазепам) $R=H, R^1=OH$



Элениум (либриум)



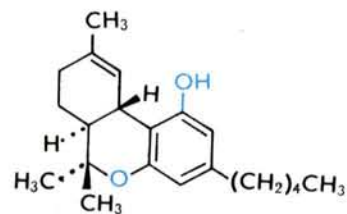
Мепротан

Некоторые вещества, обладающие наркотическими свойствами, такие, как, например, барбитураты, по своему действию близки к снотворным препаратам и могут употребляться в этом качестве. Барбитураты — производные барбитуровой кислоты — уреиды малоновой кислоты, впервые полученного А. Байером в 1864 г. и названного им по имени своей знакомой Барбары, составляют среди снотворных одну из наиболее многочисленных групп. Из них следует отметить веронал (барбитал), известный с 1881 г., фенобарбитал (люминал, 1912 г.), барбамил (амитал) и нембутал, несколько особняком стоит глутаримидное производное — оксирион. Производство барбитуратов в мире сейчас превышает 1000 т в год. Из снотворных алифатического ряда можно упомянуть хлоральгидрат, впервые синтезированный Ю. Либихом в 1831 г., и бромурал (бромизовал), известный с 1909 г.

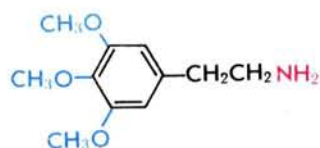
Открытие и широкое применение психотропных средств (нейролептиков, антидепрессантов, психостимуляторов) и более мягких психоседативных средств, транквилизаторов (от лат. *tranquillo* — успокаиваю) — одно из важнейших достижений биоорганической химии и медицины за последние четверть века. Среди психотропных препаратов (нейролептиков) наиболее важными являются производные фенотиазина, в частности аминазин, пропазин, дипразин (пипальфен, фереган) и производные бутирофенона, например галоперидол. Эти препараты позволили вернуть к нормальной жизни большой контингент людей, страдавших тяжелейшими психическими расстройствами (неврозами, шизофренией и т. п.). Более широко употребляемыми, «модными» являются сейчас транквилизаторы бензодиазепинового ряда — диазепам (седуксен, валиум), оксазепам и хлордiazепоксид (элениум, либриум), позволяющие почти без побочных эффектов снимать чувства тревоги, страха или напряженности; иногда их применяют также для лечения алкоголизма. Аналогичные эффекты оказывают и препараты других групп, например мепротан (андаксин, мепробамат).

Особую группу составляют природные соединения, вызывающие галлюцинации (галлюциногены), их относят к наиболее сильным наркотикам. Среди этих веществ особо опасны тетрагидроканнабинолы, например Δ^1 -производное. Оно является основным компонентом гашиша и марихуаны, которые готовят из индийской конопли (*Cannabis sativa* L.).

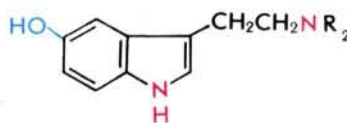
Сильным галлюциногенным действием обладают содержащиеся в грибах *Psilocybe mexicana* (теонакль, Мексика) псилоцин и псилоцибин, образующий псилоцин при метаболическом дефосфорилировании. В дозах 0,1—0,2 мг/кг они вызывают психомиметические эффекты в продолжение 2—4 ч и еще 1500 лет назад широко использовались жрецами ацтеков и майя при религиозных обрядах под названием «пища богов». К тому же классу относится буфотенин, добываемый из кожи тропических жаб (*Bufo vulgaris*), применяемый и сейчас как примесь к нюхательному табаку (Гаити, Колумбия, Эквадор). По всей вероятности, сильное биологическое действие этих соединений на нервную систему обусловлено их химическим сходством с известным медиатором передачи нервного импульса в центральной нервной системе — серотонином. По физиологическому действию псилоцинолу близок мескалин, выделяемый из мексиканских кактусов действа (*Lophophora williamsii*). За всеми соединениями этой группы укоренилось название «молекулы мистики». По праву к веществам аналогичного действия можно отнести диэтиламинд

 Δ^1 -Тетрагидроканнабинол

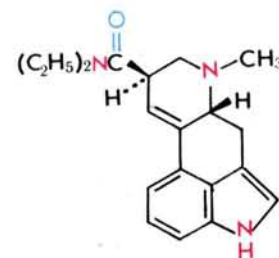
Псилоцин R = H
 Псилоцибин R = P(OH)₂



Мескалин



Буфотенин R = CH₃
 Серотонин R = H

ЛСД₂₅

лизергиновой кислоты, печально знаменитый ЛСД₂₅, являющийся сильнейшим галлюциногеном; сама лизергиновая кислота, также иногда применяемая в медицине как психотомиметик, является составной частью эргоалкалоидов спорыньи (рис. 348) (см. с. 769).



Фон Байер [Ваеуег] Адольф Иоганн Фридрих Вильгельм (1835—1917), немецкий химик-органик, иностранный член-корреспондент Петербургской АН (1892). Образование получил в Гейдельбергском и Берлинском университетах; с 1875 г.—профессор Мюнхенского университета. Основные работы посвящены стереохимии и синтетической органической химии. Установил строение мочевой кислоты и продуктов ее превращений (1861—1864). Открыл барбитуровую кислоту и барбитураты. Установил строение и синтезировал индиго (1883), разработал основы синтеза органических красителей. Выдвинул теорию напряжения (1885), ввел понятие о *цис-транс*-изомерии. Лауреат Нобелевской премии по химии (1905).



Рис. 348. Рожки спорыньи (*Claviceps purpurea*) в колосе ржи.

Низкомолекулярные
биорегуляторы



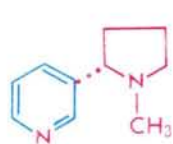
Рис. 349. Вирджинский табак (*Nicotiana glauca*).

Никотин — один из самых известных алкалоидов табака (*Nicotiana tabacum*, *N. glauca* и других видов) (рис. 349) представляет собой жидкость с характерным табачным (махорочным) запахом. Впервые он был выделен в 1828 г., строение его установлено в 1893 г., а первый синтез осуществлен А. Пикте в 1904 г.

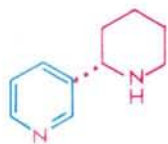
Как уже было отмечено, никотин и некоторые его производные — это ганглиоблокаторы, действующие на н-холинорецепторы центральной и особенно периферической нервной системы, активируя их в малых и угнетая в больших дозах. При остром отравлении никотином (для мышей его LD_{50} при внутривенном введении составляет 0,3 мг/кг) наблюдается тошнота, рвота, брадикардия, а затем тахикардия, судороги и угнетение (вплоть до остановки) дыхания. Никотин выделяют в настоящее время из растений главным образом для его окисления до никотиновой кислоты и синтеза препаратов на ее основе, а сам алкалоид находит ограниченное применение как инсектицид и эктопаразитоцид в ветеринарии.

Интерес к изучению свойств никотиновых алкалоидов с незапамятных времен связан с проблемой курения. Хотя вызываемый никотином физиологический эффект является причиной влечения, тяги к курению, жеванию и нюханию табака, справедливости ради надо отметить, что вред от курения связан отнюдь не только с никотином, но и с другими компонентами табачной смеси, в основном с продуктами их яролиза, в том числе с полиароматическими углеводородами, обладающими канцерогенными свойствами. Интересно, что в состав препаратов, часто употребляемых для того, чтобы отучиться курить и вызвать отвращение к табаку, часто добавляют некоторые алкалоиды, в частности алкалоид из многих видов рабитника и термпсиса цитизин (таблетки «Табекс»).

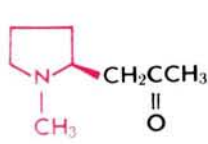
Среди родственных никотину алкалоидов можно упомянуть анабазин, впервые выделенный А. П. Ореховым в 1929 г. из ежевника (*Anabasis aphylla*) и применяемый как инсектицид, некоторые производные и аналоги анабазина (А. П. Орехов, А. С. Садыков), гигрин, обнаруженный в одной из разновидностей кокаинового куста, конииин, выделенный из растения болиголов (*Conium maculatum*) и являющийся сильным ядом (по преданию, Сократ был отравлен ядом болиголовы или цикуты, см. с. 768), а также антиспазматическим средством, и лобелин из *Lobelia inflata*, оказывающий возбуждающее действие на дыхательные центры.



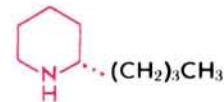
Никотин



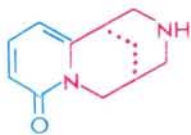
Анабазин



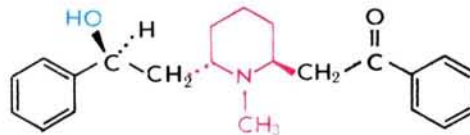
Гигрин



Кониин



Цитизин

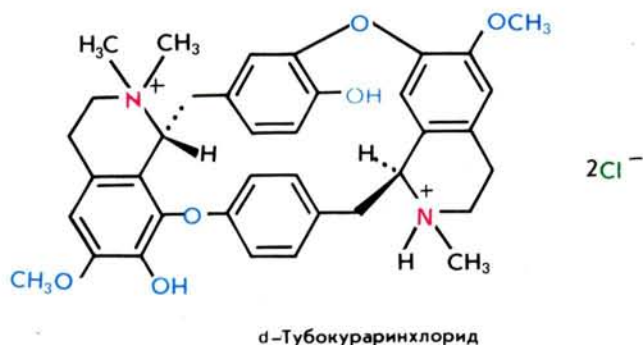


Лобелин

d-Тубокураринхлорид, алкалоид из кураре — растительных экстрактов, применявшихся южно-американскими индейцами в отдаленных районах долин Ориноко и Амазонки в качестве яда для стрел. Хотя физиологическое действие кураре было известно европейцам еще в XVI в., первые серьезные химические исследования его алкалоидов были предприняты Р. Бёмом только в 1895 г., чистый же d-тубокураринхлорид был выделен Г. Кингом в 1935 г. Подлинный источник этого алкалоида — хондродендрон войлочный (*Chondrodendron tomentosum*) Г. Кинг установил в 1937 г. и не вполне точную формулу предложил в 1948 г. Stereoхимия алкалоида выяснена в 1963 г., а исправленная формула установлена только в 1970 г. А. Дж. Эвереттом, Л. А. Лоу и С. Вилкинсоном.



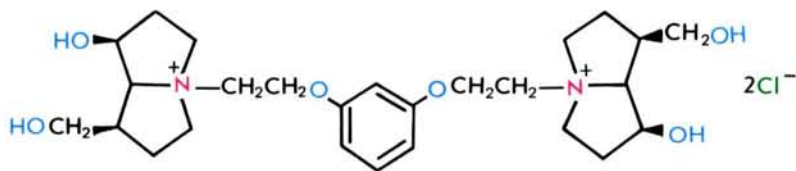
Орехов Александр Павлович (1881—1939), советский химик-органик, академик АН СССР (1939). Окончил Гиссенский университет (1908); работал в Женеве и Париже, с 1928 г. — в Научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте в Москве. Основные работы посвящены химии алкалоидов. Установил строение анабазина, сольсолина, сольсолидина, конвольвина. Разработал промышленные методы получения ряда лекарственных препаратов.



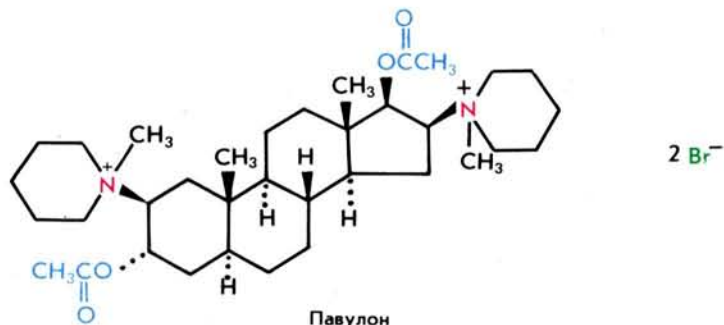
Большой интерес к d-тубокураринхлориду обусловлен его своеобразным миорелаксantным физиологическим действием: алкалоид конкурентно связывается с н-холинорецепторами концевой пластинки, деполаризуя постсинаптическую мембрану и блокируя нервно-



Дитилин



Диплацин



мышечную передачу. Это его свойство широко используется в хирургической практике, так как имеется достаточная дозозависимая избирательность в действии на различные группы мышц, причем дыхательные мышцы парализуются последними. Синтезировано большое количество аналогов d-тубокуарина и выяснено, что для проявления курареподобной активности совершенно необходимо наличие двух катионных центров на расстоянии 1,4—1,5 нм. Из этих аналогов следует упомянуть самый короткодействующий препарат (5—10 мин) — дитилин, полностью аналогичные d-тубокуарин-хлориду по продолжительности действия (20—40 мин) диплацин и павулон и препарат длительного действия (более 60 мин) — анатруксоний.

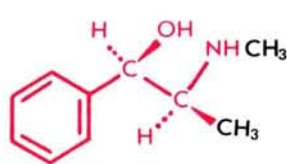
Группа эфедрина

Эфедрин, являющийся одним из компонентов древнего китайского лекарства Ма Хуанг, впервые был выделен в 1887 г. японским ученым Н. Нагаи из китайского растения хвойника темного (*Ephedra sinica*). Строение эфедрина было установлено в 1889 г., а стереохимия выяснена к 1932 г. Алкалоид содержится во многих растениях (С. Ю. Юнусов); в СССР он добывается из различных видов эфедры, растущих в Закавказье, южных степях, горах и предгорьях Средней Азии; получают его и химическим синтезом.

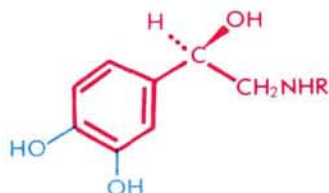
Эфедрин широко применяется в медицине при бронхиальной астме и других аллергических заболеваниях, для сужения сосудов и уменьшения воспалительных явлений, повышения кровяного дав-

ления при хирургических вмешательствах, травмах и при гипотонии, а также в глазной практике и при отравлениях снотворными и наркотиками. По своему строению и действию эфедрин близок важнейшему биологическому медиатору адренергических синапсов — норадреналину и гормонам надпочечников адреналину и дофамину; он слабо, но продолжительно стимулирует α - и β -адренорецепторы и действует на пресинаптические мембраны, высвобождая норадреналин и являясь симпатомиметиком.

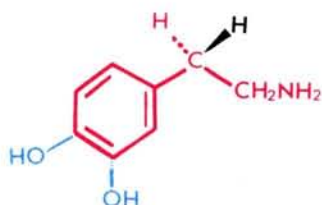
Среди синтетических препаратов, специфически взаимодействующих с адренорецепторами, можно отметить α -адреномиметики мезатон и нафтизин (санорин), β -адреномиметик изадрин, симпатолитический алкалоид резерпин (см. с. 665), мощный α -адреноблокатор дигидроэрготамин (об алкалоидах спорыньи см. с. 769) и β -адреноблокатор анаприлин, а также сильные α - и β -адреностимуляторы фенамин (амфетамин) и первитин (метамфенамин), оказывающие сильное и продолжительное действие на центральную нервную систему.



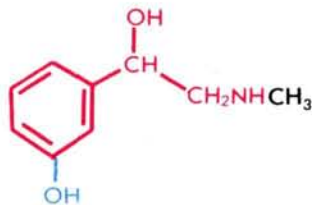
Эфедрин



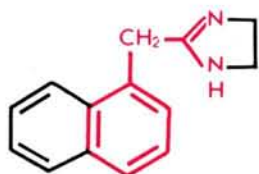
Норадреналин R = H
Адреналин R = CH₃
Изадрин R = CH(CH₃)₂



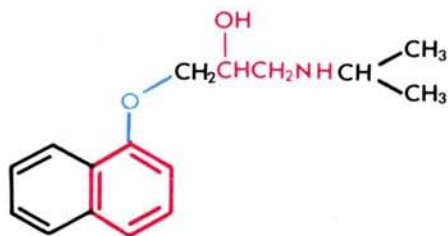
Дофамин



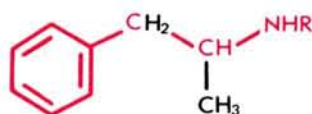
Мезатон



Нафтизин



Анаприлин



Фенамин R = H
Первитин R = CH₃



Прелог (Prelog) Владимир (р. 1906), швейцарский химик-органик, иностранный член АН СССР (1966). Окончил Пражский технологический институт (1928); с 1942 г. — в Высшей технической школе в Цюрихе. Широко известен работами по выяснению строения природных веществ, в том числе антибиотиков и алкалоидов. Один из создателей современного конформационного анализа. Лауреат Нобелевской премии по химии (1975, совместно с Дж. Корнфортом).

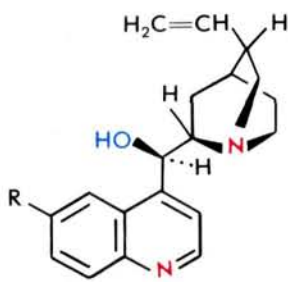
Для того чтобы понять особое место хинных алкалоидов в медицине, надо кратко остановиться на истории создания противомаларийных препаратов. Малярия относится к числу весьма распространенных в мире заболеваний. Еще сравнительно недавно, до 60-х годов нашего столетия, она ежегодно уносила сотни тысяч человеческих жизней, и даже сейчас, несмотря на большие успехи как в борьбе с ее переносчиками в природе, так и в разработке и применении новых лекарственных средств и вакцин, от нее страдают 200—400 млн. человек в странах тропического пояса.

Возбудителями малярии являются открытые в 1880 г. простейшие — малярийные плазмодии, которые переносятся особым видом комара *Anopheles*. Встречаются три основные формы малярии: трехдневная (*Malaria tertiana*), тропическая (*Malaria tropica*) и четырехдневная (*Malaria quartana*). Они имеют различные симптомы и промежутки между приступами и вызываются соответственно разными видами *Plasmodium* — *P. vivax* и более редким *P. ovale*, *P. falciparum* и *P. malaria*. В организме комара и крови человека плазмодии проходят несколько стадий своего развития и существуют в различных формах (у человека это — спорозоиты, шизонты, мерозоиты и гамонты, или гаметоциты), каждая из которых проявляет разную чувствительность к лекарственным препаратам.

Индийцы Южной Америки (Перу, Боливия) еще в глубокой древности использовали для борьбы с малярией кору хинного дерева (*Cinchona officinalis*). Их ценный опыт постепенно переняли странствовавшие по странам Латинской Америки миссионеры — священники ордена иезуитов. И уже в 1630 г. Дон Хуан Лопес де Канницарес вылечил этой корой от малярии жену вице-короля Перу Кондесу де Цинхон. Первое письменное упоминание о целебных свойствах хинной коры встречается в 1633 г. в хронике Святого Августина, а в Европе под названиями «кора иезуитов» и «иезуитский порошок» она начала распространяться с 1639 г. Посещавшие Рим паломники при заболевании лихорадкой получали от монахов пакетики с порошком, облегчавшим их страдания. Конклав римской церкви, состоявшийся в 1655 г., впервые прошел без случаев смерти его участников от малярии. Однако в странах, где господствовала протестантская церковь, «кору иезуитов» использовать запрещалось, и Оливер Кромвель, например, отказавшийся принять лекарство «нечестивых», умер от малярии в 1658 г.

Кора хинного дерева (цинхона) с ее чудодейственными терапевтическими свойствами нанесла ощутимый удар по сохранившим еще кое-где свое влияние воззрениям Галена, согласно которым считалось, что лихорадка вызывается нарушением равновесия между «черной и желтой желчью» и лечить ее надо кровопусканием и слабительными.

Европейцы хищнически вырубали хинное дерево в Южной Америке, и вскоре его пришлось культивировать как на Южноамериканском континенте, так и, главным образом, на плантациях в Индонезии, на островах Ява и Калимантан. К началу XX в. монополию на заготовку хинного дерева и производство хинина захватила англо-голландская компания, известная как «Хинный трест».



Хинин R = OCH₃
Цинхонидин R = H



Хининидин R = OCH₃
Цинхонин R = H

Природа действующего начала коры хинного дерева была выяснена в начале XIX в. В 1820 г. французские фармакологи П. Ж. Пельтье и Ж. Кавенту выделили из нее чистый алкалоид; позднее удалось установить, что в коре содержится по крайней мере 20 различных алкалоидов, но хинин является основным компонентом. Строение хинина было выяснено в 1907 г. немецким химиком П. К. Л. Рабе, а вскоре стало ясно и строение его ближайших аналогов: хинидина, цинхонина и цинхонидина; стереохимия этих алкалоидов установлена В. Прелогом к 1950 г.

Синтез хинина, осуществленный в 1945 г. Р. Б. Вудвордом и В. Дёрингом, полностью подтвердил его структуру и оказался в то время одним из блестящих достижений органической химии природных веществ.

С фармакологической точки зрения хинин представляет собой антибиотик. Он эффективно убивает гаметоцитные формы *Plasmodium vivax* и *P. malaria* (но не *P. falciparum*) в эритроцитах, причем и механизм его биологической активности, который заключается в избирательном подавлении репликации ДНК и транскрипции РНК, типичен для антибиотиков. Ограниченное применение хинин находит также для лечения некоторых сердечных заболеваний и в акушерской практике.

Ввиду сложности строения и высокой коммерческой стоимости хинина уже давно предпринимались попытки получения его синтетических аналогов с противомалярийной активностью. В 1856 г. У. Г. Перкин-старший, надеясь создать синтетический заменитель хинина путем окисления смеси анилина и толуидина бихроматом калия, получил один из первых синтетических красителей — мовеин, лишенный



Перкин [Perkin] Уильям Генри (старший) (1838—1907), английский химик-органик. Образование получил в Королевском химическом колледже в Лондоне, работал в домашней лаборатории. Основные работы — по изучению синтетических красителей. Впервые получил мовеин (1856) и организовал его производство. Разработал промышленные способы получения анилина, ализарина, а также метод получения ароматических ненасыщенных кислот (1868, реакция Перкина). Синтезировал кумарин, коричную и камфорную кислоты.

биологической активности. Впрочем, аналогичный путь — окисление N, N-диметил-п-фенилендиамина в присутствии сероводорода и соляной кислоты — позднее привел к получению метиленовой сини, оказавшейся более перспективной в этом отношении. Используя метиленовую синь для прокраски животных тканей при гистологических исследованиях, П. Эрлих обратил внимание на то, что малярийный плазмодий окрашивается ею высокоселективно. Это дало ему основание уже в 1891 г. рекомендовать метиленовую синь для широких клинических испытаний в качестве противомалярийного препарата и синтезировать ряд ее синтетических аналогов с целью выяснения связи между их строением и противопрозоидной активностью.

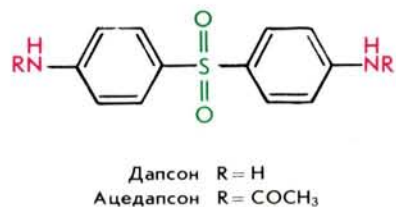
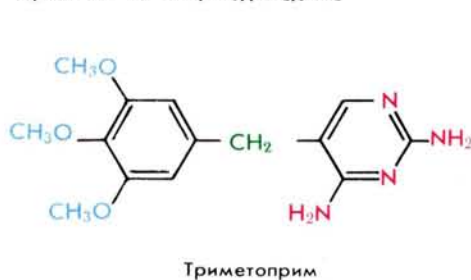
В 20—30-е годы были получены, главным образом в Германии, многие противомалярийные препараты, оказавшиеся весьма эффективными при лечении всех форм малярии и действующие не только на эритроцитарные, но и на тканевые шизонтные формы. Среди них производное акридина — акрихин (менакрин, атебрин), производное 4-аминохинолина — хингамин (хлорохин) и производные 8-аминохинолина — хиноцид и примахин применяются до сих пор.

В послевоенный период синтезирован ряд современных средств борьбы с малярией: производные пиридина — хлоридин (пириметамин) и триметоприм, гуанидина — прогуанил (бигумаль, палюдрин) и циклогуанил, особенно эффективные при тропической малярии и для борьбы с гаметоцитными и спорозoitными формами плазмодия, а также некоторые сульфамидные препараты и сульфоны дапсон и ацедапсон, которые в основном применяются для борьбы с проказой (лепрой) и туберкулезом.

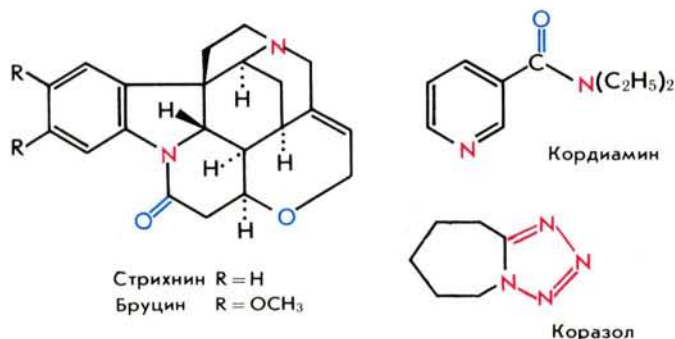
Принято считать, что работы П. Эрлиха по синтетическим противомаларийным средствам, в первую очередь по метиленовой сини и ее аналогам, а также ряд исследований в других направлениях означали рождение современной химиотерапии. Химиотерапия была и остается одним из важнейших разделов биорганической химии в сфере медицины, и прежде всего в том, что касается изучения связи между строением и биологическим действием синтезируемых веществ.



Хиноцид $R = (CH_2)_3CH(CH_3)NH_2$
 Примахин $R = CH(CH_3)(CH_2)_3NH_2$



Стрихнин, содержащийся в семенах различных видов чилибухи («рвотные орешки», *Strychnos nux-vomica* и др.) (рис. 350), широко распространенных от Индии до Северной Австралии, особенно на Зондском и Филиппинском архипелагах, был открыт в 1818 г.



Мажанди (Magendie) Франсуа (1783—1855), французский физиолог и врач. Окончил Парижский университет (1808), с 1831 г.— профессор Коллеж де Франс и руководитель лаборатории Парижского университета. Основные работы посвящены изучению физиологии нервной системы. Экспериментально доказал различие функций передних (двигательных) и задних (чувствительных) корешков спинного мозга. Исследовал действие растительных ядов на организм животного, роль лимфатической системы.

П. Ж. Пельтье и Ж. Кавенту, однако нельзя не упомянуть, что задолго до этого препараты стрихнина использовались местными жителями в качестве яда для стрел. Строение стрихнина установлено в 1946 г. Р. Робинсоном и В. Прелогом, абсолютная конфигурация выяснена П. Каррером в 1963 г., а синтез сложнейшего по



Рис. 350. Чилибуха (*Strychnos nux-vomica*).

структуре соединения завершен Р. Б. Вудвордом в 1954 г. Ближайшим аналогом стрихнина является также содержащийся в чилибухе бруцин. Издавна эти оптически активные алкалоиды используются для разделения органических кислот на антиподы.

Стрихнин представляет собой судорожный яд, действие которого на животных впервые обнаружил Ф. Мажанди в 1809 г.; он поражает в первую очередь спинной мозг, а затем центральную нервную систему, зрение, слух и обоняние, вызывает судороги всех мышц и смерть от удушья. В то же время стрихнин относят к аналептикам (от греч. *αναληψις* — восстановление), так как в малых дозах он стимулирует в продолговатом мозге центры кровообращения и дыхания, пораженные наркотиками, усиливает рефлекторные реакции и известен под названием «тонизирующая горечь». Бруцин менее ядовит, и для него характерна курареподобная активность. Аналогично стрихнину, т. е. возбуждающе, действуют синтетические аналептики кордиамин и коразол, которые обладают, однако, большей активностью в отношении центральной нервной системы.

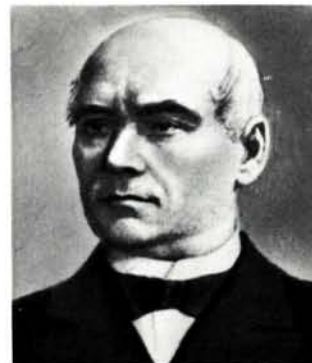
Группа кофеина

Главный алкалоид группы — кофеин содержится в листьях чая и зернах кофе (рис. 351) (содержание кофеина в бобах кофе 1,5%, а в некоторых сортах чая до 5%), а также в орехах кола. Возбуждающие напитки на этой основе известны с глубокой древности, что позволяет считать кофеин одним из наиболее «заслуженных» алкалоидов. Впервые он был выделен в 1819 г. Ф. Рунге. Кофеин является производным ксантина (дигидроксипурина) и близким родственником мочевой кислоты (тригидроксипурина), открытой К. Шееле в 1776 г. Аналогами кофеина являются теобромин, впервые обнаруженный А. А. Воскресенским в бобах какао (1842), а также содержащийся в чае теофиллин, выделенный



Рис. 351. Слева — ветвь чайного куста (*Camellia sinensis*); справа — ветвь кофейного дерева (*Coffea arabica*).

А. Косселем в 1889 г. В выяснение химической природы мочевой кислоты и алкалоидов этой группы внесли вклад многие химики прошлого столетия (Ф. Вёлер, Ю. Либих, А. Байер, Э. Фишер и др.), но фактически их строение было убедительно доказано только в результате химического синтеза. Наиболее удачным синтезом мочевой кислоты считается синтез М. Траубе (1900), который первым синтезировал также и ксантин. Метилированием ксантина в различных условиях были получены все алкалоиды этой группы, известен также переход от мочевой кислоты к кофеину. В настоящее время кофеин получают не только экстракцией отходов чайного производства, но также метилированием теобромина и теофиллина и химическим синтезом.

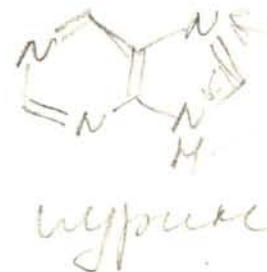


Воскресенский Александр Абрамович (1809—1880), русский химик-органик. Окончил Главный педагогический институт в Петербурге (1836), в 1863—1867 гг.— ректор Петербургского университета. Открыл хинин и теобромин, установил строение хинной кислоты и нафталина; автор фундаментальных работ по исследованию горючих ископаемых в России.



Кофеин является типичным психостимулятором, но он возбуждает также сердечную деятельность, расширяет коронарные сосуды, усиливает двигательную активность и диурез. Другие алкалоиды этой группы имеют аналогичную активность, но у теофиллина, например, преобладают бронхолитическое и мочегонное действия. Механизм физиологической активности этих алкалоидов связан с угнетением фосфодиэстеразы и накоплением внутриклеточного медиатора — сАМР.

Среди стимуляторов сердечной деятельности, действующих подобно кофеину, но обладающих большей активностью, следует упомянуть валидол, представляющий собой 30%-ный раствор ментола в ментоловом эфире изовалериановой кислоты, камфору и нитроглицерин (постепенно растворяющиеся, медленно действующие формы нитроглицерина известны под названиями сустак и нитронг).



Ментол $R = \text{H}$
 Ментоловый эфир изовалериановой кислоты $R = \text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Низкомолекулярные биорегуляторы

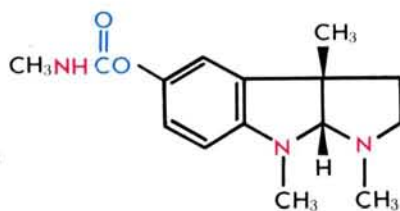


Рис. 352. Физостигма («калабарский боб») (*Physostigma venenosum*).

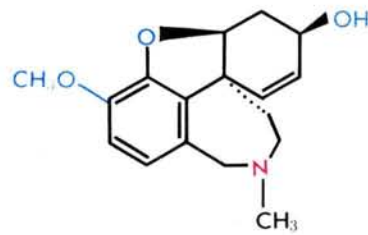
Физостигмин (эзерин) встречается в плодах ядовитого африканского растения *Physostigma venenosum*, известных под названием «калабарские бобы» (*Faba calabaria*) (рис. 352). Строение физостигмина после длительного изучения было установлено Р. Робинсоном, синтез осуществлен в 1935 г., а абсолютная конфигурация определена только в 1969 г. Алкалоид используется главным образом в глазной практике для понижения внутриглазного давления, а также для лечения некоторых нервных болезней и при парезе кишечника для усиления перистальтики. Механизм его действия связан с усилением влияния ацетилхолина на н-холинэргические синапсы в результате ингибирования холинэстеразы.

Аналогично физостигмину действуют алкалоид галантамин из клубней подснежника (*Galanthus wogonowii* и *G. nivalis*) и синтетические соединения: прозерин, диизопропилфторфосфат (флуостигмин) и фосфакол; последние два соединения связываются с холинэстеразой очень прочно и считаются препаратами «необратимого действия».

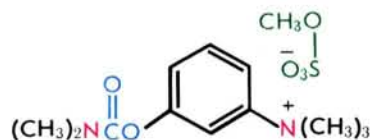
Кроме рассмотренных выше м-холиноблокаторов группы атропина, надо упомянуть также аналогичный по активности алкалоид платифиллин, выделенный



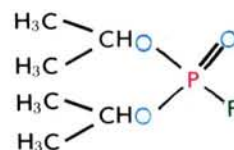
Физостигмин



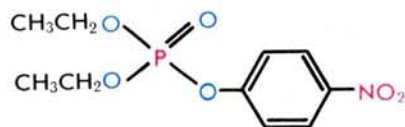
Галантамин



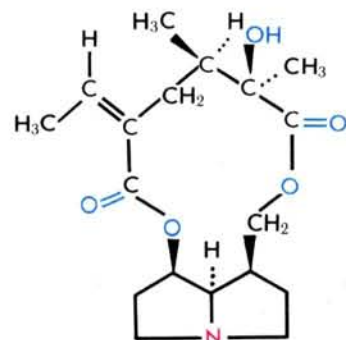
Прозерин



Диизопропилфторфосфат



Фосфакол



Платифиллин

впервые А. П. Ореховым в 1935 г. из крестовника широколистного (*Senecio platyphyllus*). Он относится к группе пирролизидиновых алкалоидов и известен своим сосудорасширяющим и спазмолитическим (папавериноподобным) действием, позволяющим применять его при спазмах гладкой мускулатуры и язвенных болезнях органов брюшной полости, спазмах сосудов головного мозга и для расширения зрачка в глазной практике, где он имеет некоторое преимущество перед атропином, так как меньше влияет на аккомодацию.

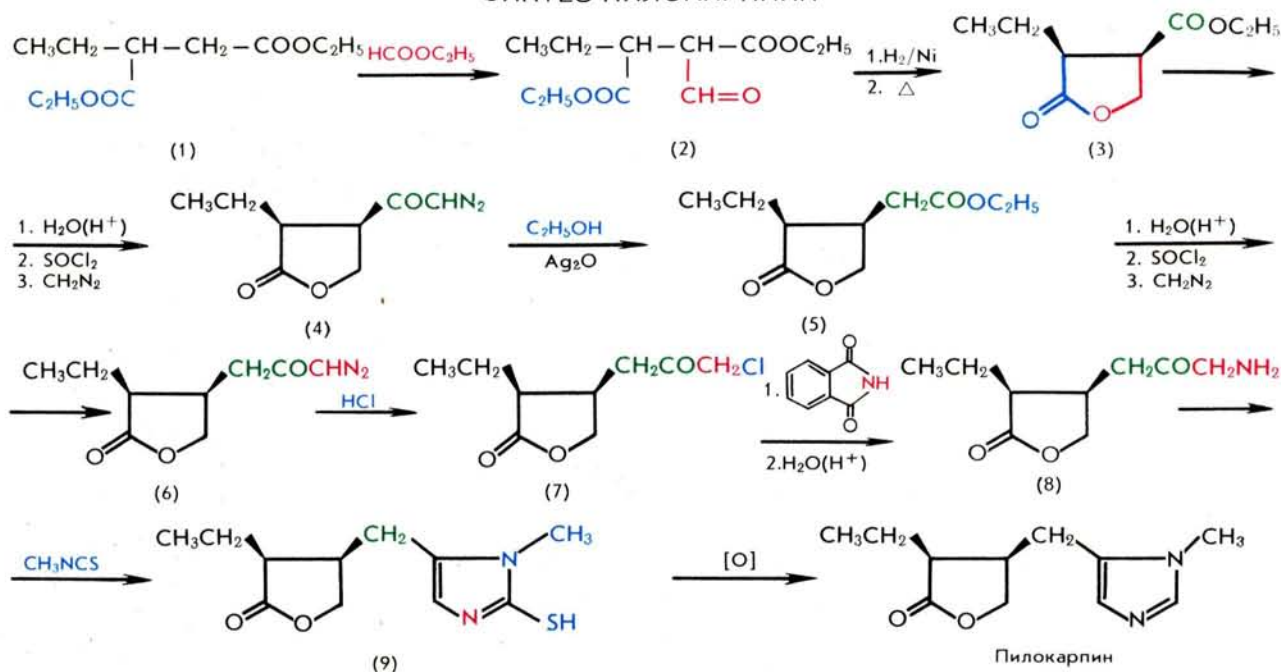
В отличие от м-холиноблокаторов, м-холиномиметики действуют подобно мускарину: повышают секрецию желез, суживают зрачок и снижают внутриглазное давление. Типичным представителем таких веществ, находящим широкое применение в медицине для борьбы с глаукомой и в качестве сильного потогонного средства, является алкалоид пилокарпин. Он встречается в африканских растениях *Pilocarpus* (*P. jaborandi*, *P. microphyllus* и другие виды) и впервые был выделен французским химиком А. Арди в 1875 г. Строение пилокарпина было установлено в 1900 г., а первый его синтез выполнен А. Е. Чичибабыным и Н. А. Преображенским (1933).

Согласно этой схеме диэфир этилянтарной кислоты (1) конденсировался по Клайзену с этилформиатом, полученное формилпроизводное (2) восстанавливалось и циклизовалось до смеси стереомерных лактоноэфиров, и необходимый эфир пилоповой кислоты (3) выделялся фракционированием и вымораживанием. Переход к этиловому эфиру гомопилоповой кислоты (5) осуществлялся через диазокетон (4) перегруппировкой Арнда—Айстерта, а полученная из эфира гомопилоповая кислота расщеплялась на антиподы с помощью бруцина. Оптически активная кислота далее последовательно превращалась в диазокетон (6), хлоркетон (7) и аминокетон (8), последний конденсировался с метилизотиоцианатом до меркаптопроизводного пилокарпина (9), из которого пилокарпин получался с высоким выходом путем окислительного отщепления тиогруппы.



Преображенский Николай Алексеевич (1896—1968), советский химик-органик. Окончил Московский университет (1924), в 1944—1968 гг. — профессор Московского института тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова. Основные работы посвящены химии природных соединений, в первую очередь алкалоидов и витаминов. Герой Социалистического Труда (1966), лауреат Государственной премии СССР (1952).

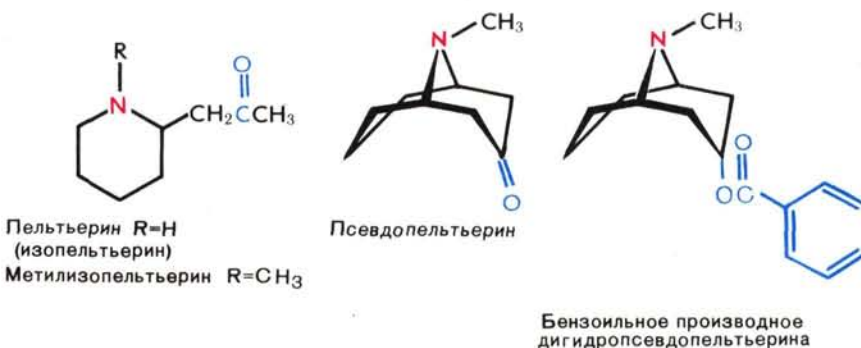
СИНТЕЗ ПИЛОКАРПИНА



Низкомолекулярные
биорегуляторы

Евстигнеева Римма Порфирьевна (р. 1925), советский химик-органик, член-корреспондент АН СССР (1976). Окончила Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1947), с 1950 г. работает там же (с 1965 г. — профессор). Научные исследования посвящены химии природных соединений, в первую очередь алкалоидов, порфиринов, липидов. Лауреат Государственной премии СССР (1985).

Эта группа алкалоидов, являющихся ближайшими биогенетическими родственниками описанных выше тропановых алкалоидов, кониина и лобелина, содержится в коре гранатового дерева *Punica granatum* (сем. миртовых — *Myrtales*, рис. 353). Алкалоиды пельтьерин [(–)-изопельтьерин], изопельтьерин [(±)-изопельтьерин]



и псевдопельтьерин были открыты в 1878—1879 гг., а метилизопельтьерин впервые выделен в 1899 г. Легкость рацемизации при выделении и несовершенные методы физико-химической идентификации были причиной длительных и противоречивых структурных и синтетических исследований этих алкалоидов. Впервые синтез



Рис. 353. Гранат (*Punica granatum*).

рацемического пельтьерина, в то время называвшегося изопельтьерином, был описан еще в 1928 г., но наиболее известными считаются синтезы Э. Анета и К. Шёпфа (1949). Псевдопельтьерин был синтезирован Р. Робинсоном в 1924 г. Бензоильное производное продукта его восстановления, по структуре сходное с кокаином, обладает сильным анестезирующим действием.

Еще в 1884 г. К. Шрёдер показал высокую токсичность пельтьерина для цепней и других ленточных глистов; и в 1932 г. он был включен в британскую, а вскоре и в другие фармакопеи в качестве антигельминтного средства.

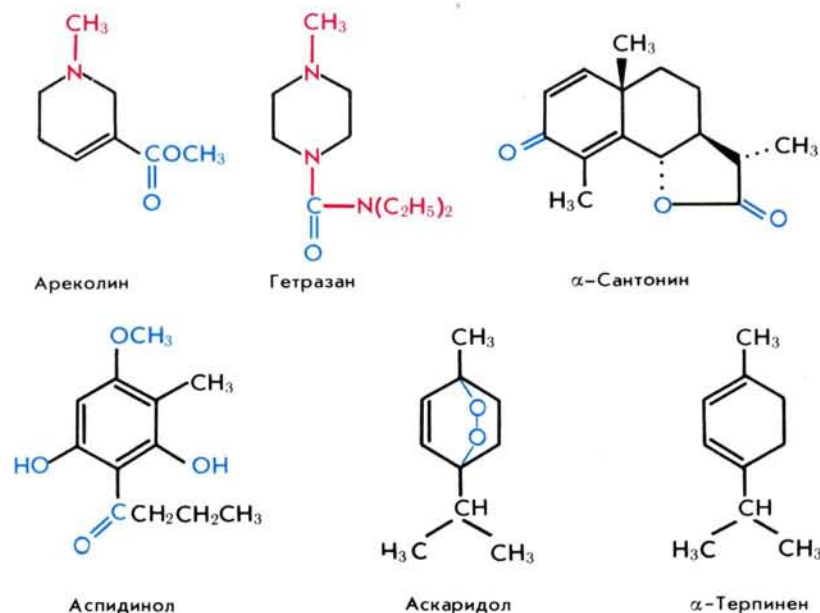


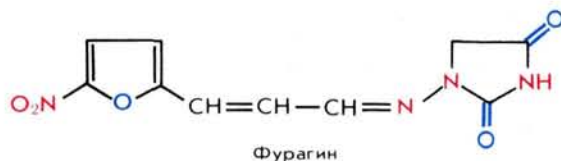
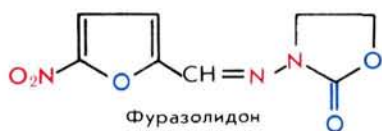
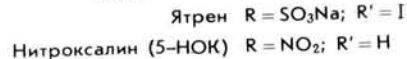
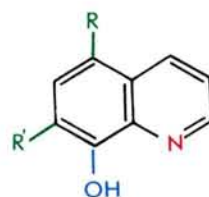
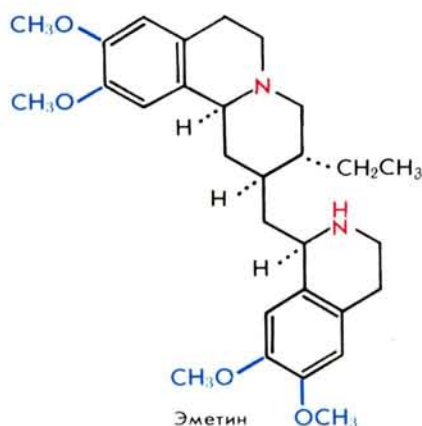
Рис. 354. Арековая пальма (*Areca catechu*) с плодами.

Аналогичным пельтьерину антигельминтным действием обладает алкалоид из плодов пальмы *Areca catechu* (рис. 354) — ареколин, широко используемый в ветеринарии.

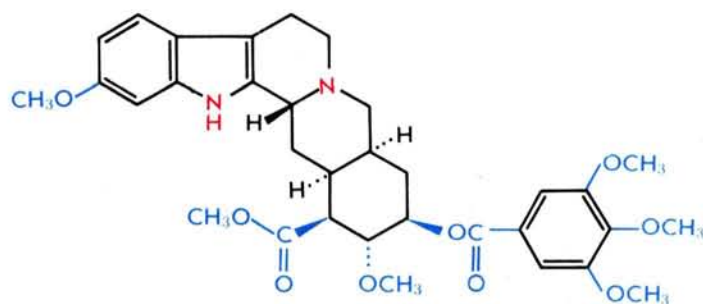
Гельминтные заболевания и сейчас представляют собой одну из серьезнейших медицинских проблем, и в фармацевтической химии известно большое число синтетических и природных антигельминтиков. Среди синтетических препаратов успешно используются пиперазин, его соли и производные, в частности гетразан, а также упомянутый выше противомаларийный препарат акрихин. В ряду лекарственных растений для лечения глистных инвазий очень давно применяют препараты из полыни (*Artemisia maritima*) и папоротника (*Dryopteris austriaca* и *Dryopteris filix mas*): в полыни содержится наиболее известный природный антигельминтик — терпеноид α-сантонин, а в папоротнике — аспидиноп. В хеноподиевом семени (*Chenopodium ambrosioides* var. *anthelminticum*, к семейству хеноподиевых относится, в частности, среднеазиатское растение солянка Рихтера) содержится такое эффективное глистогонное средство, как аскаридол; в настоящее время аскаридол получают синтетически — каталитическим окислением α-терпинена.

Несмотря на большой выбор эффективных антибиотиков (тетрациклины, мономицин, хлормицетин и др.), лечение амёбной дизентерии, вызываемой *Entamoeba histolytica*, протекает с трудом. Для этого до сих пор применяется главный алкалоид рвотного камня — корней ипекакуаны (*Uragoga* (*Cephaelis*) *ipescacuanha* из сем. мареновых — *Rubiaceae*) — эметин. Он впервые выделен в 1807 г. П. Ж. Пельтье, его строение выяснено в 1948 г. Р. Робинсоном, стереохимия — А. Р. Баттерсби и Э. ван Тамеленом в 1959 г., а первый синтез осуществлен Н. А. Преображенским и Р. П. Евстигнеевой в 1950 г. Среди синтетических препаратов, которые обычно применяются для долечивания амёбной дизентерии, надо

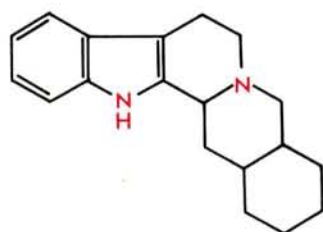
упомануть хинофон (ятрен) и некоторые мышьяковые средства, например осарсол, используемый также для лечения трихомонадных заболеваний и сифилиса. Для химиотерапии других протозойных и бактериальных желудочно-кишечных инфекций широко используется ряд синтетических лекарств. Это, в первую очередь, налидиксовая кислота (неграм) — производное нафтиридиновой кислоты, действующее на грамотрицательные бактерии (кишечная палочка, сальмонеллы, шигеллы) и на простейших, а также родственный ей по структуре энтеросептол (хиноформ) — иодхлоргидроксифинолин, активный против грамположительных и грамотрицательных бактерий и амёб и часто используемый при энтероколитах, амёбной и бациллярной дизентерии. Энтеросептол входит и в состав комбинированного препарата мексаформа, содержащего, кроме него, фанхинон и оксифеноний бромид. Более мягким действием обладает другой аналог 8-гидроксифинолина — нитроксалин (5-НОК). Среди дезинфицирующих, антисептических средств для борьбы с желудочно-кишечными инфекциями применяют также синтетические производные нитрофурана: фуразолидон, фурациллин и фурагин.



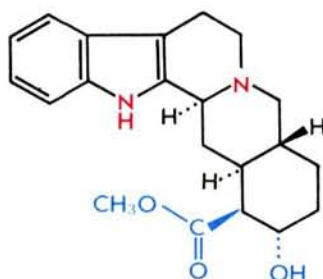
Резерпин — главный алкалоид растения раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina*, рис. 355) и многих других видов кутровых (Аросупасеае), произрастающих на Индостанском и Индокитайском полуостровах, в Шри-Ланке и Индонезии. Он открыт в 1952 г. Й. М. Мюллером, строение этого алкалоида установлено в 1954 г. усилиями нескольких групп химиков, а полный синтез, осуществленный в 1956 г. Р. Б. Вудвордом, представляет собой одно из блестящих достижений биоорганической химии.



Резерпин



Иохимбан



Иохимбин

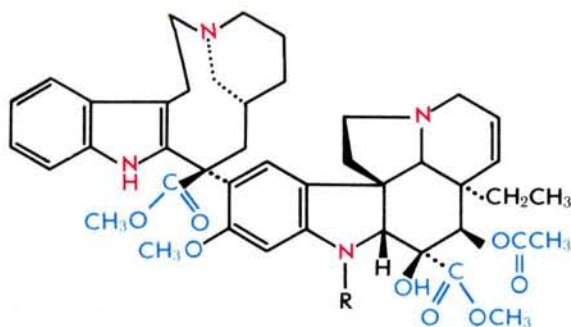
Резерпин обладает низкой токсичностью (но, по последним данным, заметной канцерогенностью), сильным гипотензивным действием и успокаивающим влиянием на центральную нервную систему; он является симпатолитиком, блокирующим адренергические нейроны на уровне пресинаптической мембраны и уменьшающим уровень норадреналина, дофамина и серотонина в крови. Алкалоид широко используется в медицине при гипертонии, а также для лечения психических и неврологических заболеваний. Кроме него в медицине часто применяется раунатин, представляющий собой смесь алкалоидов раувольфии.



Рис. 355. Раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina*).

Раувольфия змеиная получила свое название по имени описавшего ее в XVI в. врача Л. Раувольфа и из-за ее широкого употребления индийцами для лечения от укусов змей. В индийских и африканских видах раувольфии содержится более 20 алкалоидов, многие из которых имеют скелет иохимбана. Среди них особого внимания заслуживает иохимбин, открытый в 1896 г. в коре африканского дерева *Corynanthe yohimbe*. Его формула была выведена К. Шольцем в 1935 г. и окончательно подтверждена Б. Виткопом в 1943 г., а полный синтез впервые осуществлен Э. ван Тамеленом в 1958 г. Иохимбин, как и резерпин, является активным симпатолитиком (вазодилатором) и адренергическим блокатором, но основное применение он находит в качестве афродизака, т. е. средства, возбуждающего половую деятельность. Не исключено, что «любовные напитки» средневековых рыцарских романов реально готовили из коры коринанта, привозимого в Европу из Камеруна и Конго.

Биогенетически с иохимбановыми алкалоидами, по-видимому, тесно связано еще несколько групп индольных алкалоидов. Из них в последние годы особый интерес вызывают алкалоиды барвинка розового (*Vinca rosea*, или, правильнее, *Catharanthus roseus*), который культивируется теперь во многих тропических странах. Лечебные свойства растения были описаны еще в 1653 г., но только в

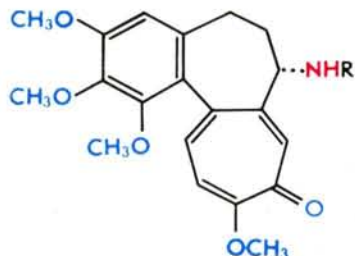


Винбластин R = CH₃
Винкристин R = CHO

1958 г. был выделен первый алкалоид этой группы — винбластин, а затем показана его противораковая активность. Димерные алкалоиды винбластин и винкристин, строение которых установлено в 1965 г. главным образом Дж. Монкрифом и У. Н. Липскомбом, в настоящее время довольно широко применяются в химиотерапии опухолей (карцином, сарком, меланом, лейкозов и т. п.), а также как противовирусные агенты; механизм их действия связан с подавлением микротубулярной системы и синтеза ДНК и РНК.

Группа колхицина

Колхицин и колхамин, наряду с несколькими другими алкалоидами, содержатся в луковицах растений родов *Colchicum* и *Meigenia*, например в безвременнике великолепном (*C. speciosum*) и безвременнике осеннем (*C. autumnale*), иногда неправильно назы-



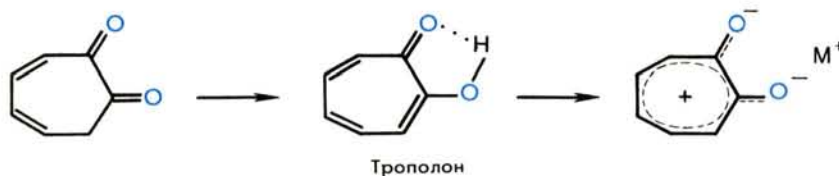
Колхицин $R = \text{COCH}_3$
Колхамин $R = \text{CH}_3$

ваемых крокусами. Колхицин выделен впервые П. Ж. Пельтье и Ж. Кавенту в 1819 г., а его формула установлена С. Дьюаром в 1945 г.; колхамин выделен Ф. Шантавы и сотр. в 1950 г., и структура его описана теми же авторами в 1953 г.

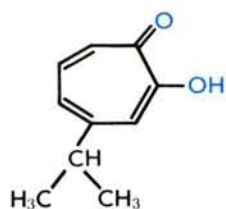
Колхицин широко применяется в селекционной работе как агент, вызывающий удвоение хромосом и образование полиплоидных форм растений. В то же время колхицин и колхамин, который существенно менее токсичен, применяются для лечения рака пищевода и рака кожи, а колхицин еще и как антиконвульсант и лучшее на сегодняшний день средство против средиземноморской лихорадки.



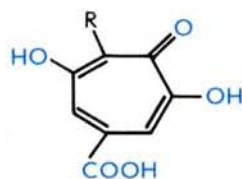
Дьюар [Dewar] Джеймс (1842—1923), английский физикохимик. Окончил Эдинбургский университет (1861), с 1877 г.— профессор Королевского Института в Лондоне. Предложил оригинальную формулу бензола («бензол Дьюара»), расшифровал структуру пиридина. Изобретатель «сосуда Дьюара», или термоса.



Трополон



β -Туяплицин



Стипitatedовая кислота $R = \text{H}$
Пуберуловая кислота $R = \text{OH}$

Колхицин является производным трополона. В природе встречаются и другие производные трополонов, проявляющие свойства ароматичности, особенно в виде солей металлов. Так, в эфирном масле и древесине кипарисовых (Cupressaceae) содержатся изомерные изопропилтрополоны, например β -туяплицин (хинокитол), а плесени *Penicillium stiptatum* и *P. ruberulum* продуцируют стипитатовую и пуберуловую кислоты; все эти соединения являются слабыми антибиотиками.



Хопкинс (Hopkins) Фредерик Гоулэнд (1861—1947), английский биохимик, иностранный почетный член АН СССР (1934). Окончил Лондонский университет (1894), работал в Кембриджском университете. Основные работы посвящены биохимии азотистого обмена. Открыл аминокислоту триптофан (1901). Один из основателей витаминологии. Обнаружил в молоке витамины А и D. Выделил из живой ткани глутатион (1921) и показал его роль в окислительных процессах в клетке. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1929, совместно с Х. Эйкманом).

Витамины

Витаминами (от лат. *vita* — жизнь) называют низкомолекулярные биорегуляторы, которые необходимы в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности человека и должны поступать с пищей, так как организм не может удовлетворить свою потребность в них за счет биосинтеза. К витаминам не относятся обычные продукты питания, обеспечивающие энергетические и белковые потребности организма, а также неорганические соли и микроэлементы, необходимые для жизни. Ряд незаменимых аминокислот (для человека это лизин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, а для детей еще и аргинин и гистидин) также не принято относить к витаминам. Биосинтез ряда витаминов все же может протекать в организме человека, но только под влиянием внешних факторов, например ультрафиолетового облучения (витамины группы D), или из каких-то предшественников (провитаминов), получаемых с пищей (например, витамин А синтезируется из каротинов). Большинство витаминов являются коферментами или их предшественниками и участвуют в многочисленных ферментативных реакциях. Существует и целый класс антивитаминов — химических аналогов витаминов, способных ингибировать их действие; антивитамины часто употребляются в биохимических исследованиях и при лечении некоторых заболеваний, в частности гипervитаминозов.

Исторический очерк. Уже в древности люди неоднократно замечали, что отсутствие в пище каких-то компонентов может быть причиной различных заболеваний. Так, в Древнем Китае было известно, что отвар рисовых отрубей излечивает болезнь, названную позднее бери-бери (от сингальского *beri* — слабость) и представляющую собой полиневрит, основными симптомами которого являются потеря веса, атрофия мышц, сердечно-сосудистые расстройства и отеки. В древнекитайских письменных источниках содержатся также сведения о «куриной слепоте», но лечение этой болезни употреблением в пищу печени впервые упоминается только в трудах великого врача древности Гиппократ; ему принадлежит и первое описание основных признаков цинги (слабость, мышечно-суставные боли, кровоточивость десен, выпадение зубов и т. п.).

Внимание медицины к отысканию эффективных способов лечения цинги (скорбута) было привлечено уже в XVI в., т. е. с наступлением эпохи Великих географических открытий. В 1601 г. Дж. Ланкастер ввел лимоны в качестве обязательного компонента пищевого рациона на английском военно-морском флоте (с тех пор английских моряков стали называть «лимонниками»). Несколько позднее, в 1757 г., английский морской врач Дж. Линд, основатель морской гигиены в Англии, отметил в своем «Трактате о цинге», что только свежие овощи и фрукты «эффективны как факторы, предохраняющие организм от этого заболевания».

В XVIII в. для лечения рахита начинает широко использоваться жир из печени трески. В 1735 г. Г. Казаль, врач испанского короля Филиппа V, впервые описал пеллагру (от итал. *pella agra* — шершавая кожа) — болезнь, при которой сначала поражаются кожа, язык, слизистые оболочки, желудочно-кишечный тракт, а позднее развиваются нервно-психические расстройства. Уже в 1785 г. итальянский врач Марзари нашел связь между этим заболеванием и питанием исключительно продуктами из кукурузы, которое характеризовалось им как неполноценная диета. В 1816 г. французский физиолог Ф. Мажанди одним из первых применил экспериментальный

метод в физиологии животных: он содержал молодых животных на искусственных рационах и установил, что они не могут оставаться здоровыми, если получают только белки, сахара и жиры.

Среди исследований, проложивших путь к открытию витаминов, следует упомянуть работы петербургского врача Н. И. Лунина. В 1880 г. он экспериментально доказал, что, кроме белков, углеводов, жиров, солей и воды, для нормального развития, роста и самой жизни животных необходимы особые вещества неизвестной природы, которые содержатся в природных продуктах питания (например, в молоке).

Огромный вклад в изучение витаминов внес голландский врач Х. Эйкман, долгое время работавший на острове Ява в Индонезии. В 1897 г. он установил, что болезнь бери-бери развивается при использовании в пищу исключительно полированного риса, а излечивается при приеме водных экстрактов рисовой шелухи или отрубей. Отсюда им был сделан вывод (1906), что рис содержит какой-то фактор — вещество, необходимое организму. В еще более явном виде это положение было сформулировано английским биохимиком Ф. Г. Хопкинсом; он, в частности, описывал цингу и рахит как «заболевания, о которых в течение многих лет известно, что их развитие связано с диетическими факторами». В 1929 г. Х. Эйкман и Ф. Г. Хопкинс были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие витаминов.

Термин «витамин» был предложен в 1912 г. польским биохимиком К. Функом, после того как из концентрата рисовых отрубей он выделил необходимый для жизнедеятельности фактор, оказавшийся амином (витамин В₁). К. Функ впервые использовал и понятие «авитаминоз». Основные успехи в изучении химии витаминов относятся к 30-м годам нашего века. В настоящее время известно более 30 витаминов, и основные направления исследований в этой области связаны с углубленным изучением биологической роли витаминов, разработкой биотехнологических способов их получения и применения в медицине.

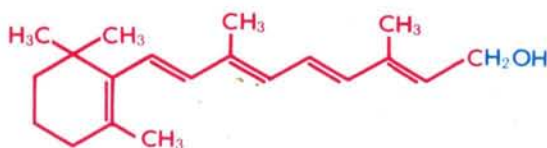


Лунин Николай Иванович (1853—1937), советский педиатр и биохимик. Окончил Дерптский университет (ныне Тартуский, 1878). Автор первой экспериментальной работы о веществах, названных впоследствии К. Функом витаминами. Показал, что наряду с белками, жирами, сахарами, солями и водой в молоке содержатся другие необходимые для жизни вещества (1880).

Витамин А

Жирорастворимый витамин А, называемый также витамином А₁, ретинолом и аксерофтолом, был открыт в неомыляемой фракции жиров в 1912 г.; его название предложено в 1916 г., а строение установлено П. Каррером в 1931 г.

Первый полный синтез кристаллического ретинола был осуществлен О. Ислером в 1947 г., и в настоящее время для медицинского применения он получается в основном химическим синтезом. Ретинол (в форме сложных эфиров, обычно β-глюкуроната) содержится

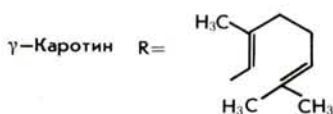
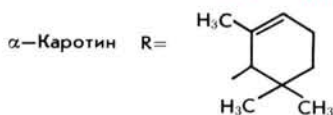
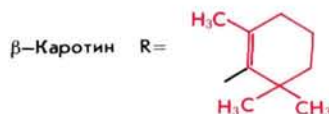
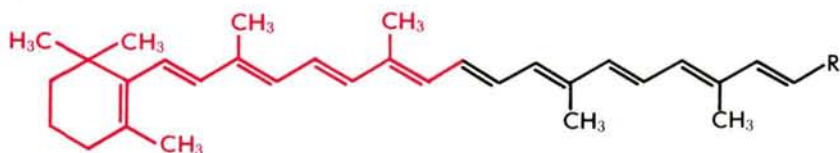


Витамин А



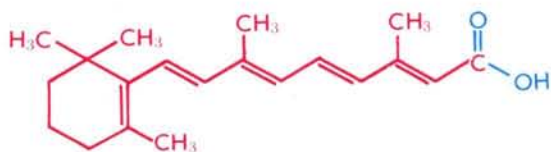
Каррер [Karrer] Пауль (1889—1971), швейцарский химик-органик и биохимик. Окончил Цюрихский университет (1911), с 1918 г. — профессор Цюрихского университета. Известен работами в области изучения структуры физиологически активных веществ — алкалоидов, витаминов, каротиноидов. Установил строение и осуществил синтез витаминов А, В₂, Е и К₁. Лауреат Нобелевской премии по химии (1937, совместно с У. Хеурсом).

главным образом в животных продуктах, особенно в печени морских животных и рыб. Человек может удовлетворять свою потребность в витамине А и за счет растительной пищи, так как содержащиеся в свежих овощах и фруктах провитамины А — каротины (от лат. *Daucus carota* — морковь) могут подвергаться окислительному расщеплению в печени и слизистой оболочке кишечника до ретинола; при этом симметрично построенный β-каротин дает две молекулы ретинола, а α- и γ-каротины — только по одной.



Недостаток ретинола (или провитаминов А) в пище особенно опасен для детей, так как он практически отсутствует у новорожденных. У взрослых ретинол способен накапливаться в печени в количествах, обеспечивающих потребности организма в течение 2 лет. При недостатке витамина А в первую очередь страдает зрение и проявляются специфические заболевания: ксерофтальмия (сухость роговой оболочки глаза) и гемералопия (нарушение темновой адаптации — ночная, или «куриная», слепота). У молодых растущих организмов происходит также остановка роста, особенно костей, кератинирующая метаплазия (перерождение) эпителиальных клеток («жабья кожа»), клеток надпочечников, эпителия семенников, повреждение тканей центральной нервной системы.

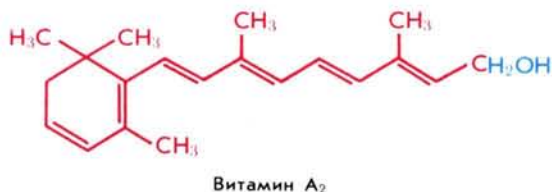
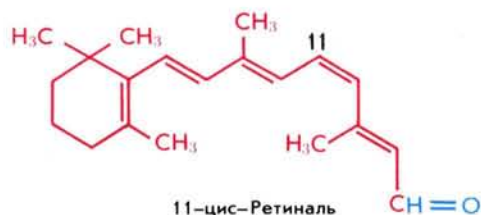
Витамин А участвует во многих биохимических процессах, в особенности связанных с функционированием мембран клеток. Ростовым фактором, по-видимому, является не ретинол, а продукт его окисления в печени — ретиновая кислота, кото-



Ретиновая кислота

рая является также и основным продуктом метаболической дезактивации ретинола; следует заметить, что гипervитаминоз А тоже приводит к ряду опасных заболеваний, например ломкости костей.

Основную роль в зрительных процессах играют продукты ферментативной изомеризации и окисления ретинола — 11-*цис*- и полностью *транс*-ретинолаль. Первый из них связывается с белком опсином и образует зрительный пурпур — родопсин, входящий в состав светочувствительных клеток — колбочек и палочек (см. с. 611). В ходе сложного процесса восприятия кванта света и трансформации его в нервный импульс 11-*цис*-ретинолаль изомеризуется в составе родопсина до полностью *транс*-ретинолаль, который после диссоциации белкового комплекса восстанавли-



вается до ретинола. Неизбежные потери последнего в этом цикле пополняются из печени.

В заключение следует упомянуть также витамин А₂ — дегидроретинол, открытый в 1937 г. Е. А. Ледерером и В. А. Розановой и представляющий собой хромоген светочувствительного пигмента пресноводных рыб — порфиросина.

Витамины В

Витамин В₁ (тиамин, анейрин, аневрин) был открыт Х. Эйкманом в 1906 г., а в кристаллическом состоянии выделен А. Виндаусом из дрожжей только в 1931 г. Строение тиамина установили независимо друг от друга Р. Уильямс и Р. Греве в 1936 г., и в этом же году его синтез был осуществлен Р. Уильямсом.

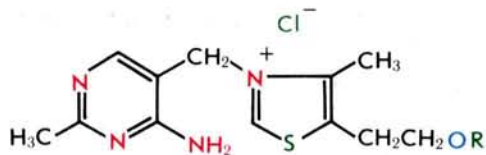
Действующей в организме формой витамина В₁ является его дифосфат, называемый также кокарбоксилазой; в медицине употребляется, кроме того, монофосфат тиамина и целый ряд его производных, превращающихся в кокарбоксилазу в процессе метаболизма.



Уильямс [Williams] Роберт (1886—1965), американский химик. Окончил Чикагский университет (1908). Основные работы посвящены синтезу органических соединений и изучению их строения. Показал, что тиамин (витамин В₁) является веществом, отсутствие которого вызывает заболевание бери-бери. Расшифровал его структуру и осуществил синтез (1936).



Сент-Дьёрдьи [Szent-Györgyi] Альберт (1893—1986), американский биохимик венгерского происхождения, иностранный член АН СССР (1947). Окончил Будапештский университет (1917); с 1931 г. — профессор Сегедского, затем Будапештского университетов, с 1947 г. — в Морской биологической лаборатории в Вудс-Холле (США). Основные работы посвящены химии витаминов, изучению углеводного обмена, механизма мышечного сокращения и биологического окисления. Впервые установил точный состав витамина С и изучил его метаболизм. Показал, что белок мышечных волокон состоит из актина и миозина, назвал его актомиозином. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1937).



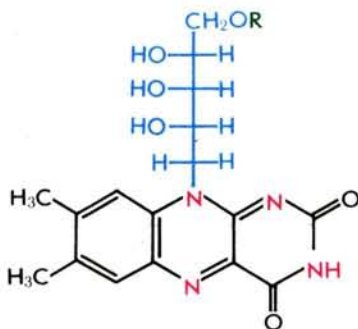
Витамин В₁ (тиамин) R = H

Тиаминмонофосфат R = $\begin{array}{c} \text{P}(\text{OH})_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$

Кокарбоксилаза R = $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \\ \text{P} - \text{O} - \text{P} - \text{OH} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$

Кокарбоксилаза — простетическая группа ряда ферментов, биохимическая функция которых заключается в декарбоксилировании пировиноградной кислоты (CH_3COCOON) и расщеплении С—С-связей других α -кетокислот и α -кетоспиртов, в результате чего становится возможным биосинтез ацилпроизводных кофермента А. Излишнее накопление α -кетокислот, особенно пировиноградной кислоты, образующейся при ферментативном расщеплении углеводов, крайне вредно для организма. Упомянутая уже болезнь бери-бери, особенно широко распространенная в Юго-Восточной Азии, вызывается отсутствием витамина В₁ в пище. Потребность здорового человека в тиамине невелика и составляет всего 1,5—2 мг/сут, но и она часто не удовлетворяется за счет питания. При целом ряде сердечно-сосудистых и нервных заболеваний употребление значительно больших количеств тиамин или кокарбоксилазы становится совершенно необходимым.

Витамин В₂, или рибофлавин, впервые описан в 1879 г. как желтый пигмент коровьего молока. Впоследствии он много раз описывался в разные годы как желтый водорастворимый фактор молока, солода, яиц, печени, свиного сердца. Строение рибофлавина установили и подтвердили синтезом в 1935 г. одновременно группы П. Каррера и Р. Куна. Он представляет собой D-рибитильное про-



Витамин В₂ (рибофлавин) R = H

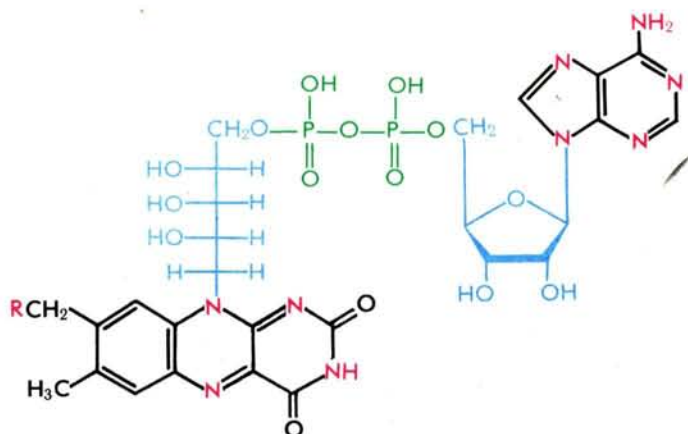
Флавинмононуклеотид (FMN) R = $\begin{array}{c} \text{P}(\text{OH})_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$

изводное гетероциклической системы изоаллоксазина; такие производные носят общее название — флавины; из природных источников выделено уже более 20 биологически активных веществ этого типа.

Первый флавиновый кофермент (флавиномононуклеотид, или FMN) был выделен А. Сент-Дьёрдьи из сердечной мышцы в 1932 г., а О. Г. Варбург и В. Христиан тогда же получили из дрожжей первый флавопротеид, содержащий FMN в качестве простетической группы. Второй важнейший флавиновый кофермент — флавинадениндинуклеотид (FAD) выделен ими же как кофактор оксидазы D-аминокислот в 1938 г. Позднее были установлены структуры еще двух флавиновых коферментов: 8α -(N-L-гистидил)-FAD и 8α -(N-L-цистеинил)-FAD. За счет окислительно-восстановительного превра-

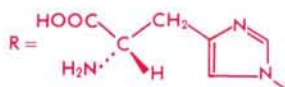


Варбург (Warburg) Отто Генрих (1883—1970), немецкий биохимик и физиолог. Учился в Берлинском университете у Э. Фишера и в Гейдельбергском университете, с 1930 г. — директор Института физиологии клетки в Берлине-Далеме. Основные работы — по изучению клеточного дыхания, окислительно-восстановительных процессов в клетке. Открыл флавин (1932), установил строение флавинадениндинуклеотида (1938, одновременно с Р. Куном) и никотинамидадениндинуклеотида (NAD). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1931).

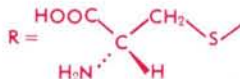


Флавинадениндинуклеотид (FAD) $R = H$

8α -(3-N-L-гистидил)-FAD

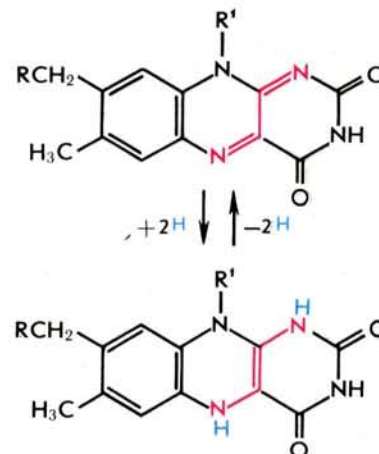


8α -(S-L-цистеинил)-FAD



щения флавинового кольца флавиновые коферменты осуществляют окислительно-восстановительные реакции в составе многих важнейших ферментных систем: оксидаз (в частности, оксидаз D- и L-аминокислот, моноаминоксидазы, регулирующей уровень катехоламинов в крови) и дегидрогеназ (часто с участием никотинамидадениндинуклеотида и убихинонов).

Основными источниками рибофлавина и его коферментных форм являются молоко, овощи, печень, почки и дрожжи; дополнительно он поступает в организм также за счет деятельности кишечной микрофлоры. При недостатке витамина в первую очередь обычно развиваются заболевания кожи (себоррея, псориаз), появляются трещины в углах рта (хейлоз), начинается воспаление слизистой оболочки рта, поражение сетчатки и роговой оболочки глаза, а затем проявляется ряд заболеваний кроветворной системы и желудочно-

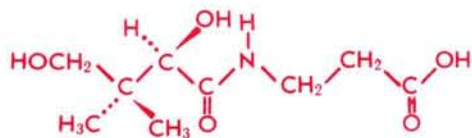




Фолкерс (Folkers) Карл Август (р. 1906), американский химик. Образование получил в Иллинойском и Висконсинском университетах, с 1968 г. — директор Института биомедицинских исследований Техасского университета. Основные работы — по изучению витаминов группы В, алкалоидов, антибиотиков. Впервые выделил и исследовал витамин В₁₂ (1948). Автор фундаментальных трудов в области выделения, определения строения и синтеза ряда природных соединений.

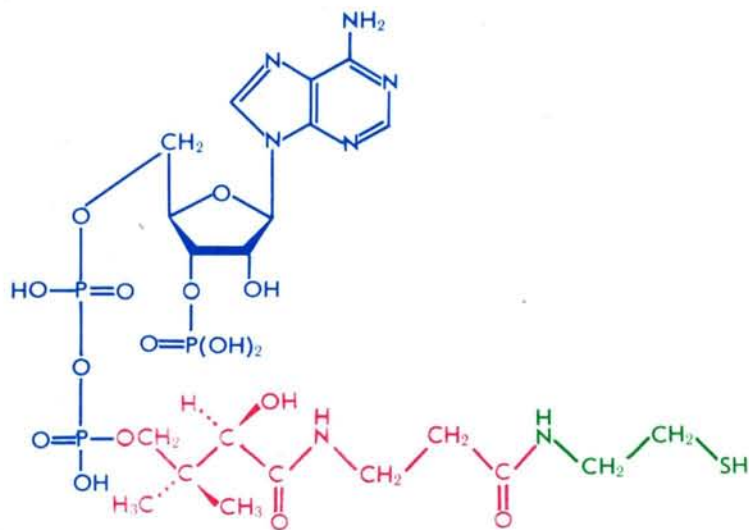
кишечного тракта, мышечная слабость и остановка роста у молодых организмов. Потребность в рибофлавине составляет 2—4 мг/сут, но лечебные дозы могут достигать 5—19 мг/сут. Широкое применение рибофлавина и его производные находят также в животноводстве.

Витамин В₃ был обнаружен в дрожжах и назван пантотеновой (т. е. «вездесущей») кислотой; его часто называют также «универ-



Витамин В₃ (пантотеновая кислота)

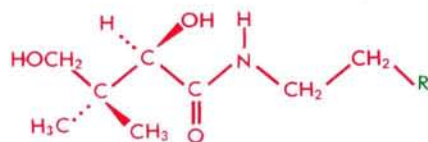
сальным витамином», а иногда — пантотеном и антидерматитным фактором. Впервые D-пантотеновая кислота была выделена Р. Уильямсом в 1938 г., тогда же было установлено ее строение, а через два года осуществлен ее синтез (Р. Уильямс, Т. Рейхштейн, Р. Кун, К. А. Фолкерс). Витамин В₃ представляет собой амид пантотеновой — (R)- α , γ -дигидрокси- β , β -диметилмасляной кислоты и β -аланина. Он входит в состав важнейшего кофактора ферментов биологического ацилирования — кофермента А, в котором его первичный гидроксил фосфорилирован трифосфоаденозином, а карбоксил амидирован β -меркаптоэтиламином. Выделение и выяс-



Кофермент А

нение биологической роли кофермента А проведено американским биохимиком Ф. А. Липманом, удостоенным за эти работы в 1953 г. Нобелевской премии, а строение кофермента А установлено Дж. Бадли и Э. Тэйном в 1951 г.

При отсутствии пантотеновой кислоты в рационе у животных возникает дерматит, выпадение шерсти и ряд других осложнений, в том числе изменения миелиновых оболочек спинного мозга. У че-



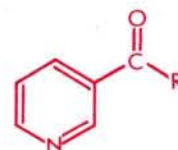
D-Пантотеин
D-Пантотенол
D-Гомопантотеновая кислота

R=CONHCH₂CH₂SH
R=CH₂OH
R=CH₂COOH

ловека авитаминоз В₃ редок, так как кишечная палочка синтезирует достаточные количества пантотеновой кислоты, которая затем всасывается из кишечника. Суточная потребность человека в этом витамине составляет около 10 мг. Наиболее богатыми его источниками являются дрожжи, горох, молоко, яйца, печень, сердце и почки. Пантотеновую кислоту по биологической активности у животных полностью заменяют D-пантотенол и пантотеин. Интересно также отметить, что D-гомопантотеновая кислота, в состав которой входит остаток γ-аминомасляной кислоты, широко распространена в природе, обладает высокой седативной активностью и применяется в медицине для лечения ряда нервных и психических заболеваний.

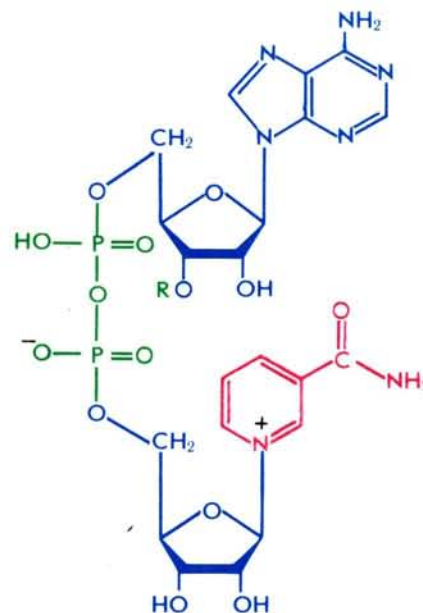
Витамин В₅, чаще называемый витамином PP (от англ. pellagra preventing factor — антипеллагрический фактор) или ниацином, химически представляет собой два вещества, обладающие одинаковой витаминной активностью: никотиновую (3-пиридинкарбоновую) кислоту (ниацин) и никотинамид (ниацинамид). Никотиновая кислота и ее амид стали известны еще в прошлом веке в связи с исследованиями никотина и других пиридиновых алкалоидов, а из природных источников (дрожжей и рисовых отрубей) она была выделена в 1911—1912 гг. К. Функом. Однако связь тяжелого заболевания — пеллагры с недостатком в диете каких-то витаминов установлена позднее. Идентификация витамина PP с никотиновой кислотой осуществлена в 1937 г. К. Элвехьемом. Никотинамид был выделен в 1934—1935 гг. из мышц Р. Куном и из коферментных форм витамина О. Г. Варбургом и Г. фон Эйлером.

Биохимическую роль витамин В₅ играет в форме коферментов: никотинамидадениндинуклеотида (NAD) и никотинамиддинуклеотидфосфата (NADP), открытых и исследованных О. Г. Варбургом, Г. фон Эйлером и Ф. Шленком в 1935—1936 гг. Эти коферменты входят в многочисленную группу оксидоредуктаз (дегидрогеназ), принимающих участие почти в 150 различных биохимических реакциях дегидрирования, окисления, N-алкилирования, изомеризации, в восстановлении нитрата до нитрита и далее до аммиака, фотосинтезе, дыхании, энергетическом обмене, анаэробном расщеплении углеводов и т. д. В ходе окислительно-восстано-



Витамин В₅, или PP
(никотиновая кислота)
Никотинамид

R= OH
R= NH₂

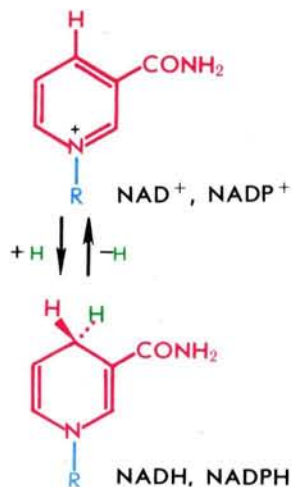


NAD R= H
NADP R= P(=O)(OH)₂

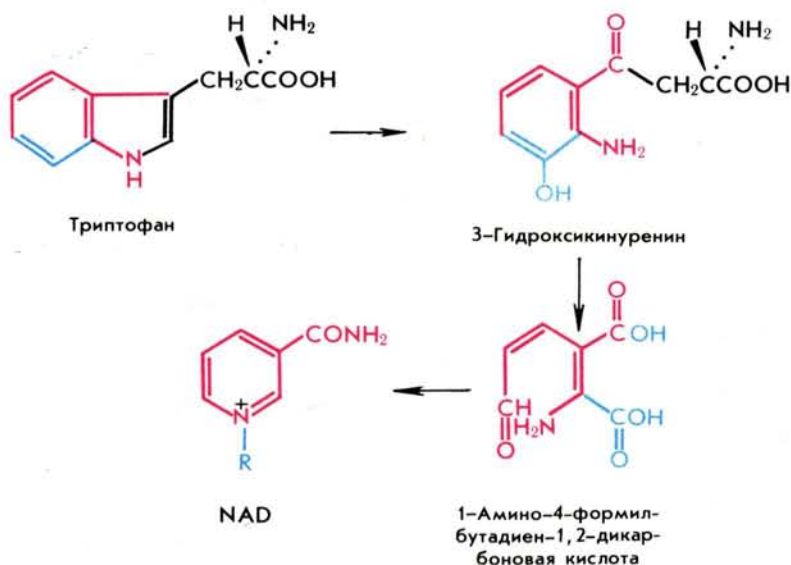


Липман (Lipman) Фриц Альберт (р. 1899), американский биохимик. Окончил Берлинский университет (1924), с 1957 г. — работает в Рокфеллеровском институте медицинских исследований. Основные работы — по изучению обмена веществ. Ввел представление о «богатых энергией фосфорных соединениях». Открыл кофермент А (1947) и установил его структуру. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1953, совместно с Х. Кребсом).

вительных реакций NAD^+ и NADP^+ реагируют в составе ферментов с органическими субстратами, стереоспецифически (чаще с нижней стороны пиридинового кольца) отнимая от них гидрид-ион и образуя NADH и NADPH ; обратная реакция также протекает стереоспецифически.

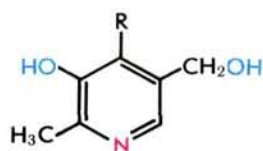


Здоровые люди не очень чувствительны к недостатку или даже отсутствию никотиновой кислоты или никотинамида в продуктах питания. Дело в том, что провитамином ниацина является триптофан, и именно недостаток этой незаменимой аминокислоты в кукурузе или сорго являлся причиной заболевания пеллагрой там, где они становились основными продуктами питания. В организме человека триптофан превращается прямо в NAD через кинуренин, 3-гидроскинуренин и 1-амино-4-формилбутадиев-1,2-дикарбоновую кислоту; эффективность процесса,



однако, невысока: 1 мг ниацина получается из 60 мг триптофана. Недостаток NAD и NADP может восполняться также за счет ферментативного синтеза из никотиновой кислоты, но не из никотинамида, поэтому истинным витамином следует считать никотиновую кислоту.

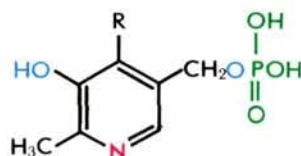
Витамин В₆ (адермин) может существовать в трех различных химических формах: пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин. Впервые пиридоксин выделен из полированного риса в 1932 г., а его строение выяснено и подтверждено синтезом в 1939 г. Строение пиридоксаля и пиридоксамина установлено и доказано синтезом в 1944 г. Структура коферментных форм витамина В₆ — пиридоксаль-5'-фосфата и пиридоксамин-5'-фосфата определена в 1951 г. В промышленности витамин В₆, его коферментные формы и производные получают синтетически.



Пиридоксин R = CH₂OH

Пиридоксаль R = CHO

Пиридоксамин R = CH₂NH₂



Пиридоксаль-5'-фосфат R = CHO

Пиридоксамин-5'-фосфат R = CH₂NH₂

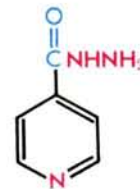


Шемьякин Михаил Михайлович (1908—1970), советский химик, один из основоположников биоорганической химии, академик АН СССР (1958). Окончил Московский университет (1930); организатор и первый директор Института химии природных соединений АН СССР (с 1974 г. — Институт биоорганической химии имени М. М. Шемьякина). Основные работы посвящены химии природных биологически активных соединений. Развил (1952, совместно с А. Е. Браунштейном) общую теорию действия пиридоксальных ферментов. Разработал методы синтеза многих антибиотиков, витаминов, аминокислот, хинонов, первым осуществил полный синтез тетрациклина (1966). Ряд работ посвящен исследованию структуры и функции белков и пептидов, биологических мембран. Герой Социалистического Труда (1969).

Из биохимических реакций, катализируемых пиридоксальными ферментами, первой была открыта в 1937 г. А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман (СССР) реакция переаминирования аминокислот; ее механизм был независимо установлен в 1952—1954 гг. А. Е. Браунштейном и М. М. Шемьякиным и американцем Э. Снеллом. Фосфаты пиридоксаля и пиридоксамина входят в состав более чем 50 ферментов, участвующих главным образом в процессах аминокислотного синтеза и метаболизма, а также в фосфорилировании углеводов и метаболизме жирных кислот и мембранных ненасыщенных липидов.

Значительная доля витамина В₆ поступает в организм человека за счет деятельности кишечной микрофлоры. При его недостатке у животных обычно наблюдаются специфическое заболевание кожи («симметричный» дерматит), судороги, анемия и задержка роста молодых особей. У взрослых людей авитаминоз В₆ обычно не возникает, однако прием значительных количеств противотуберкулезного препарата изониазида, способного химически связывать пиридоксаль, может вызвать тошноту, себоррейный дерматит, хейлоз и другие пеллагроподобные заболевания. У детей при неполноценном искусственном вскармливании наблюдаются конвульсии, связанные с недостатком γ-аминоасляной кислоты и пиридоксина, необходимого для нормального функционирования одной из форм глутамат-декарбоксилазы. Пиридоксин, пиридоксаль-5'-фосфат и некоторые их производные широко применяются в медицине для лечения ряда кожных и неврологических заболеваний, а также при хроническом гепатите, в гинекологии, гематологии, фтизиатрии и спортивной медицине.

Витамин В₉ (витамин В₁₂) впервые выделен Р. Уильямсом в 1941 г. из листьев шпината как фактор роста цыплят и назван фолевой кислотой (от лат. folium — лист). В 1940 г. в печени обнаружен

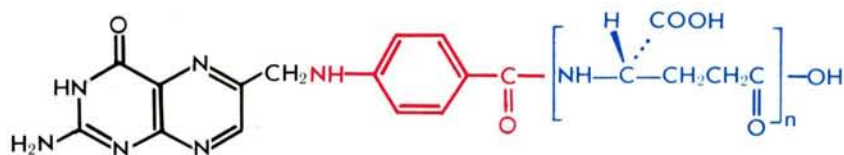


Изониазид



Вудворд [Woodward] Роберт Бёрнс (1917—1979), американский химик-органик, иностранный член АН СССР (1976). Окончил Массачусетский технологический институт (1936), работал в Гарвардском университете (с 1950 г. — профессор). Внес большой вклад в область синтетической и структурной органической химии. Установил строение и синтезировал многие биологически активные вещества, в том числе хинин (1944), холестерин и кортизон (1951), резерпин (1956), хлорофилл (1960), витамин В₁₂ (1971, совместно с А. Эшенмозером) и др. Лауреат Нобелевской премии по химии (1965).

фактор, устраняющий анемию у цыплят (витамин В_с, от англ. chicken — цыпленок), оказавшийся также фолиевой кислотой. Позднее этот витамин был выделен как активный ростовой фактор ряда микроорганизмов наряду с конъюгатами, содержащими 3 и 7 остатков глутаминовой кислоты в молекуле. Последний конъюгат был идентифицирован также с открытым еще в 1931 г. фактором, предохраняющим беременных женщин (и — при экспериментальной тестировке — обезьян) от заболевания злокачественной анемией и названным витамином М (от англ. monkey — обезьяна).



Витамин В₉ (фолиевая кислота) $n = 1$
и его конъюгаты $n = 3, 7$

Биохимические функции фолиевая кислота выполняет в форме кофермента — тетрагидрофолиевой, или фолиновой, кислоты, образующейся из витамина в результате восстановления фолатредуктазой с участием NADPH. Фолиновая кислота в виде соответствующих N₅- и/или N₁₀-алкилированных производных способна в составе ферментов переносить одноуглеродные радикалы: формил, оксиметил, метил, метилен, метин и формимин (CH=NH), участвуя в синтезе аминокислот (например, серина или метионина), пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеиновых кислот, холина и т. д.



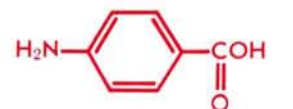
Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФН) (фолиновая кислота)	$R^1 = R^2 = H$
5-Формил-ТГФН	$R^1 = CHO, R^2 = H$
10-Формил-ТГФН	$R^1 = H, R^2 = CHO$
5-Формимино-ТГФН	$R^1 = CH = NH, R^2 = H$
5-Оксиметил-ТГФН	$R^1 = CH_2OH, R^2 = H$
5,10-Метилен-ТГФН	$R^1 + R^2 = CH_2$
5,10-Метенил-ТГФН	$R^1 + R^2 = \text{CH} \text{---} N^+$

В медицине фолиевая кислота применяется для борьбы с болезнями кроветворной системы, особенно при злокачественных анемиях и лучевой болезни, так как участвует в процессах гемо-

позза (она необходима для регуляции эритропоэза, тромбоцитопоэза и особенно лейкопоэза). Напротив, при лечении некоторых других злокачественных опухолей (лейкозов, лейкоемий, трофобластических новообразований), которые для своего развития нуждаются в повышенных количествах нуклеиновых кислот, часто применяются антагонисты фолиевой кислоты (антивитамины В_с) — аминоптерин и метотрексат (аметоптерин), способные сильно снижать активность фолатредуктазы и тем самым угнетать биосинтез нуклеиновых оснований и митоз.



Эшенмозер [Eschenmoser] Альберт (р. 1925), швейцарский химик-органик. Окончил Швейцарскую Федеральную Высшую техническую школу (1949), с 1965 г. — профессор органической химии там же. Основные работы — в области синтетической органической химии и химии природных соединений. Синтезировал колхицин, витамин В₁₂ (1971, совместно с Р. Б. Вудвордом).



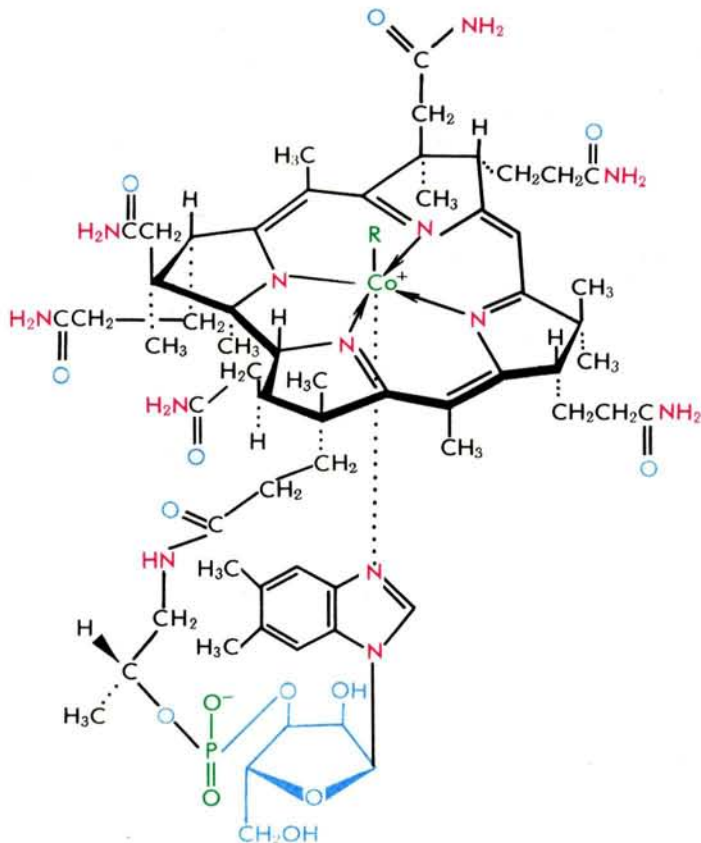
п-Аминобензойная кислота
(витамин В₉ или Н₁)

Фолиевая кислота широко распространена в природе в растительных и животных тканях и, кроме того, в достаточных количествах вырабатывается обычно кишечной микрофлорой.

В отличие от человека, многие микроорганизмы не могут использовать экзогенную фолиевую кислоту и вынуждены синтезировать ее сами. Поэтому для них, как было установлено, необходимым фактором роста и развития является п-аминобензойная кислота, называемая также витаминами В_х и Н₁, а в роли ее антивитамин могут выступать п-аминобензолсульфамид (белый стрептоцид) и его производные (см. с. 16).

История открытия **витамина В₁₂** (антианемического витамина, оксикобаламина, цианкобаламина, фактора кроветворения) тесно связана с поисками причины заболевания пернициозной анемией, которая, как теперь известно, обусловлена недостатком витаминов В₉ и В₁₂. Эта злокачественная летальная «пернициозная» (от лат. *perniciosus* — гибельный), считавшаяся неизлечимой форма малокровия (болезнь Аддисона—Бирмера) впервые описана в 1849 г. Позднее открыто лечебное действие сырой печени при данной болезни, а в 1929 г. обнаружена необходимость двух факторов для борьбы с ней: внешнего (пищевого) и внутреннего, адьювантного, впоследствии оказавшегося мукополисахаридом слизистой желудка, недостаток выделения которого препятствует всасыванию витамина В₁₂. С химической точки зрения цианкобаламин, впервые выделенный из печени в 1948 г. независимо Е. Л. Смитом и группой Э. Рикеса и К. А. Фолкерса, и оксикобаламин, выделенный К. А. Фолкерсом и Е. Л. Смитом в 1950 г. и считающийся теперь истинным витамином (замена ОН-группы на СN-происходит, вероятно, в процессе выделения), являются наиболее сложными химическими соединениями среди витаминов. Их строение, интенсивно изучавшееся как химическими, так и физико-химическими методами в течение 7—8 лет, было окончательно доказано в 1955—1956 гг. Д. Ходжкин, А. Р. Тоддом и Е. Л. Смитом, а полный синтез осуществлен в 1972 г. Р. Б. Вудвордом и А. Эшенмозером с сотрудниками.

В организме человека кобаламины (X = OH⁻, CN⁻, NO₂⁻, SO₃²⁻, Cl⁻ и другие) превращаются в кофермент В₁₂ — кобамамид



Витамин В₁₂ (оксикобаламин) R=OH

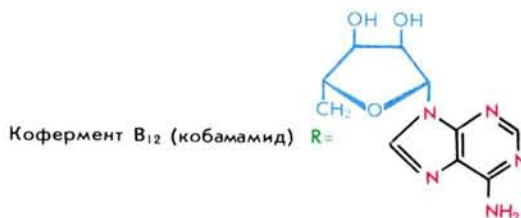
Цианкобаламин R=CN



Коррин



Порфин



Кофермент В₁₂ (кобамамид) R=

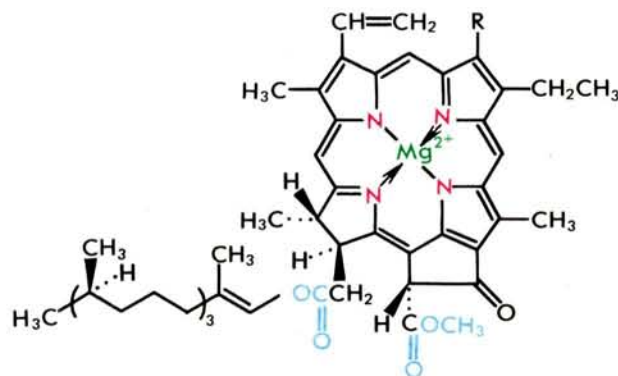
(кобамид); его структура установлена Д. Ходжин в 1961 г. Основные биохимические функции кобамиды заключаются в изомеризации L-глутаминовой кислоты в L-трео-β-метиласпарагиновую, метилмалонилкофермента А в сукцинилкофермент А, превращении глицерина в β-оксипропионовый альдегид, лизина—в масляную и уксусную кислоты, рибозидов—в дезоксирибозиды; он участвует также в ряде важнейших биохимических реакций, катализируемых им совместно с фолиевой кислотой, например в синтезе нуклеиновых оснований.

В медицине кобаламины применяются в гематологии — для лечения различных хронических анемий и нормализации функции кроветворения; в неврологии — при полиневритах, рассеянном склерозе, радикулитах и т. п.; в дерматологии; для нормализации липидного обмена при жировой дистрофии печени и ряде других заболе-

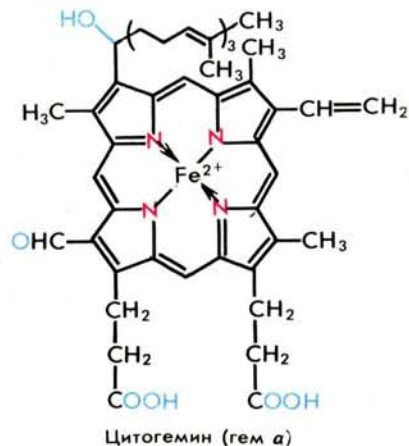
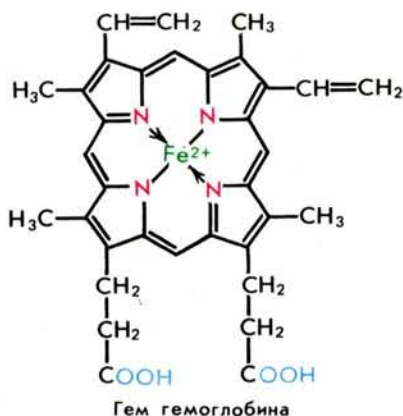
ваний; кобамамид проявляет также анаболические свойства и используется в педиатрии для новорожденных и детей с недостаточной массой тела.

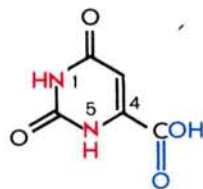
Диетическими источниками витамина B_{12} являются животные ткани и бобовые растения. Сейчас в промышленности витамин B_{12} (а из него кобамамид) получается микробиологическим путем с использованием как культуральных жидкостей после выделения некоторых антибиотиков, так и специальных продуцентов: *Propionibacterium shermanii*, *P. freudenreichii*, *Streptomyces olivaceus* и др., а также ряда метанообразующих бактерий.

Молекула витамина B_{12} состоит из трех частей: планарной, в основе которой лежит тетрапиррольное ядро коррина, стабилизированное центральным атомом кобальта; перпендикулярной к ней «нуклеотидной» части, построенной из рибозы и 5,6-диметилбензимидазола и замкнутой в макроцикл через карбоксамидный атом азота тетрапиррольной группировки и метилпропандиол; и анионной части, которая у кофермента B_{12} заменена на аденозильный остаток, соединенный с атомом кобальта необычной кобальт-углеродной связью. По своему строению коррин близок к порфиру, который лежит в основе структур таких важнейших порфириновых коферментов, как гем гемоглобина, хлорофиллы *a* и *b* и гемы цитохромов, например цитогемин (гем *a*) цитохромов класса *a*.



Хлорофилл *a* $R = \text{CH}_3$
Хлорофилл *b* $R = \text{CHO}$

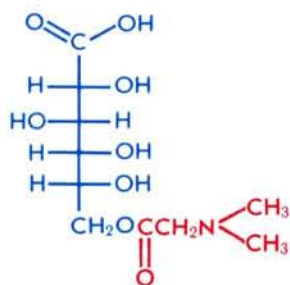
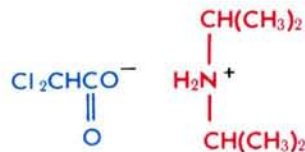


Витамин В₁₃

Витамин В₁₃, или оротовая кислота, впервые выделен в 1931 г. из коровьего молока. Обнаружен он также в женском молоке, печени и многих других животных и растительных продуктах; особенно богаты им дрожжи. По своему строению оротовая кислота является 4-карбоксиурацилом.

Биологическая роль витамина В₁₃ связана с тем, что он является важнейшим биосинтетическим предшественником пиримидиновых нуклеотидов; потребность в нем человеческого организма довольно велика: 1—1,5 г/сут. Обычно недостатка в оротовой кислоте, которая биосинтезируется из аспарагиновой кислоты, в организме человека не ощущается. Но К-соль оротовой кислоты широко используется в медицинской практике при заболеваниях, связанных с нарушениями 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 и выраженным анаболиком.

Витамин В₁₅ (6-О-диметилглициновый эфир D-глюконовой кислоты) открыт в 1950 г. в семенах различных растений и назван пангамовой кислотой (от греч. παν — все и γαμητη, γαμητηζ — супруга, супруг), а позднее обнаружен в рисе, дрожжах, бычьей крови и печени лошади.

Витамин В₁₅

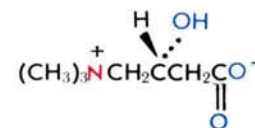
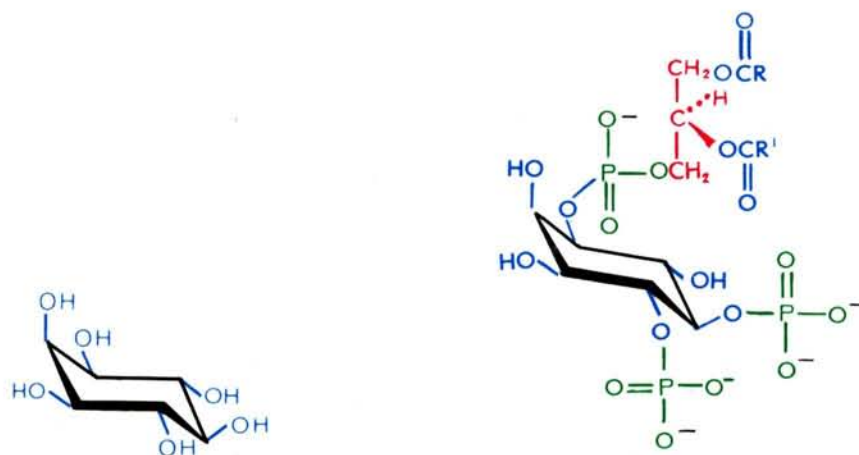
DADA

Биологическая роль пангамовой кислоты связана с активацией процесса переноса кислорода и дыхательных ферментов, благодаря чему увеличивается устойчивость человека и животных к кислородному голоданию. Она участвует также в реакциях метилирования, являясь донором метильных групп при биосинтезе холина, метионина, адреналина, креатина и стероидных гормонов. Это ее свойство тесно связано с липотропным действием, т. е. способностью нормализовать жировой обмен и препятствовать отложению холестерина на стенках сосудов. Пангамовая кислота в виде кальциевой соли (пангамат кальция) применяется при ишемической болезни сердца, атеросклерозе, инфаркте миокарда, гепатите, стенокардии и часто рекламируется как средство против быстрого старения. Известна также способность пангамовой кислоты оказывать детоксицирующее действие при отравлениях алкоголем, наркотиками и некоторыми лекарственными препаратами. Среди используемых в медицине синтетических аналогов витамина В₁₅ наиболее известен дихлорацетат диизопропиламина (дипромоний, или DADA). Строго говоря, не доказано, что пангамовая кислота является витамином, так как неизвестны последствия гипо- или авитами-

ноза В₁₅, но характер ее биологического действия определенно указывает на правомерность такого отнесения.

К другим витаминам группы В относят еще несколько веществ. Так, у некоторых насекомых роль витамина (витамин В_Т, «витамин роста») может играть L-карнитин (β-гидрокси-γ-триметилбутиробетаин). У млекопитающих он нормально участвует в липотропных процессах окисления жирных кислот как переносчик их активированных (в виде ацильных производных коэнзима А) форм через мембраны. В медицине карнитин применяется для лечения психических и неврологических расстройств и как анаболик.

Витамином В₈ (биос I, липотропный фактор) называют также *мезо*-инозит, широко распространенный в растительном и животном мире и необходимый для нормального развития животных: в частности, его недостаток вызывает у мышей алопецию — своеобразную форму плешивости, а также дисфункцию нервной системы и желудочно-кишечного тракта. Как и карнитин, он принимает участие в процессах окисления жирных кислот; в качестве одной из наиболее важных функций можно назвать его использование в организме для построения второго по значимости (после сАМР) внутриклеточного медиатора — фосфатидилинозитдифосфата. Суточная потребность человека в инозите составляет около 1 г.

Витамин В_ТВитамин В₈ (*мезо*-инозит)

Фосфатидилинозитдифосфат

К витаминам группы В относят также холин (холинхлорид), известный с прошлого века как составная часть фосфолипидов. Он также проявляет липотропное действие, входит, кроме того, в состав важнейшего нейромедиатора — ацетилхолина (см. с. 628), а после биохимического окисления до бетаина участвует в биосинтезе метионина, адреналина, креатина, нуклеиновых оснований и других биологически важных веществ как донор метильных групп. Симптомы холинавитаминоза проявляются в жировом перерождении печени, кровоизлияниях в почках и других органах и в измененной условнорефлекторной деятельности. Суточная потребность человека в холине 1—4 г.



Холин



Бетаин

Витамином В₄ в 1957 г. было названо известное с 1885 г. нуклеиновое основание аденин, который является биосинтетическим предшественником аденозина и его фосфатов, необходимых для огромного числа важнейших биохимических процессов.

Низкомолекулярные
биорегуляторы

Витамин С, известный также под названием аскорбиновой кислоты, антицинготного и антискорбутного витаминов, является, пожалуй, самым популярным. Исследования, которые предпринимали многие врачи и ученые со времени гибели от цинги в 1535 г. большей части морской экспедиции Ж. Кортъе на острове Ньюфаундленд, только в начале XX в. завершились выделением витамина сначала из лимона (С. Цильва, 1918—1925), а потом из капусты, надпочечников быка и сладкого перца (А. Сент-Дьёрдьи, 1928—1930). Затем, уже в 1933 г., его строение было выяснено П. Каррером и в том же году подтверждено синтезами Т. Рейхштейна и Е. Хёрста — В. Хеурса.

Витамин С представляет собой γ -лактон 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты. Он содержит группировку «редуктона» [$-\text{C}(\text{OH})=\text{C}(\text{OH})-\text{CO}$], способную легко окисляться с образованием дегидро-L-аскорбиновой кислоты, и имеет довольно необычную для углеводов L-конфигурацию хирального центра 5; интересно отметить, что D-аскорбиновая кислота не только не обладает витаминными свойствами, но и является антивитамином С.

Главными природными источниками витамина С являются свежие овощи и фрукты, но довольно много его и в животных тканях, так как большинство животных могут биосинтезировать этот витамин. Исключение составляют только некоторые птицы, морские свинки, обезьяны и человек, нуждающийся в ежедневном поступлении 25—75 мг аскорбиновой кислоты. В промышленности L-аскорбиновую кислоту получают химическим синтезом.

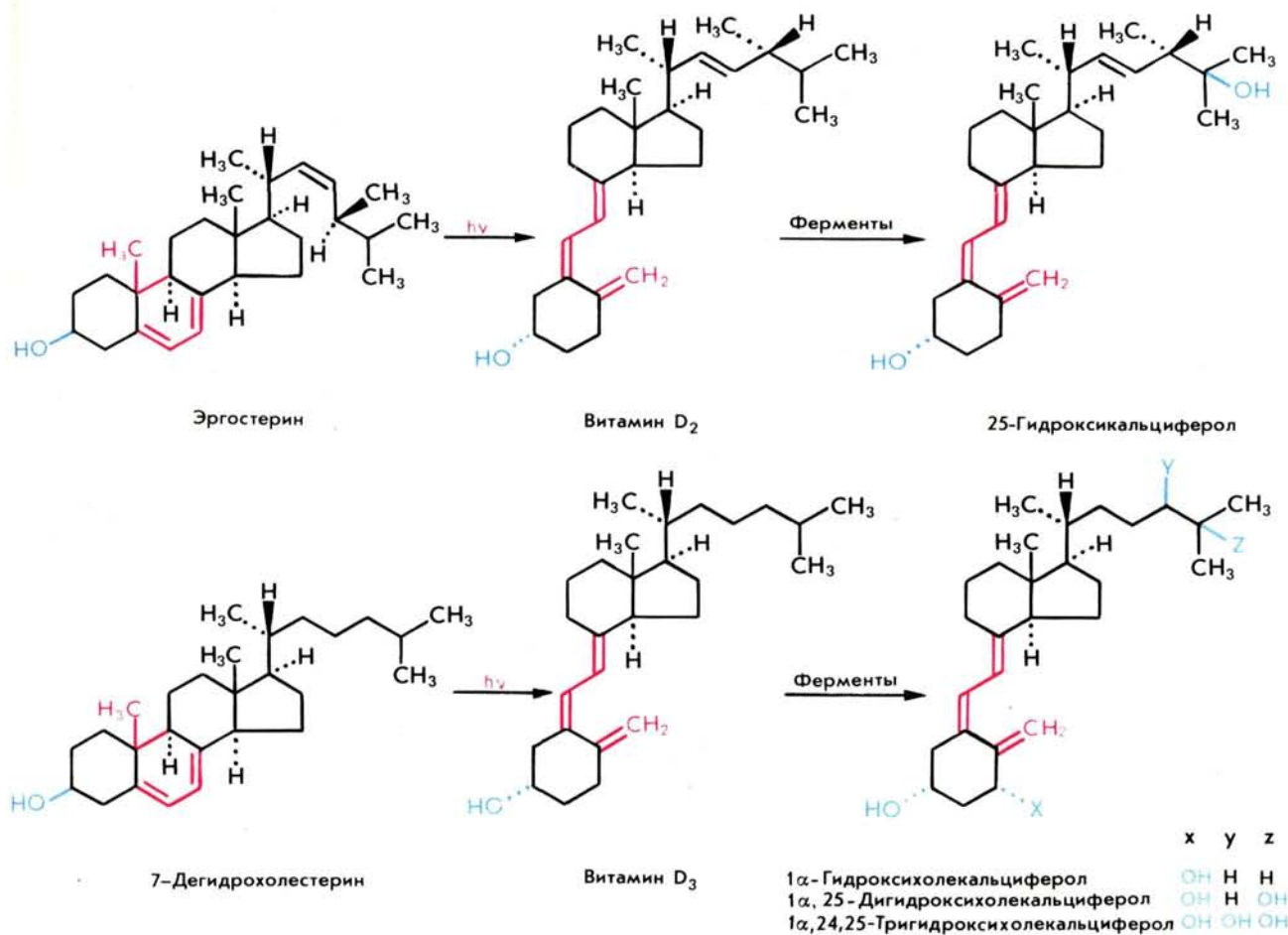
L-Аскорбиновая кислота, будучи самым сильным восстановителем живого организма, участвует во многих биохимических процессах транспорта электронов, а образуемая при этом дегидроаскорбиновая кислота легко восстанавливается обратно специальной редуктазой. Важными функциями аскорбиновой кислоты являются метаболическое расщепление тирозина и лизина и гидроксигирование остатков пролина в составе протоколлагена до остатков гидроксипролина, что необходимо для построения фибриллярного коллагена (см. с. 257). Она обеспечивает также гидроксигирование допамина до важнейшего гормона и нейромедиатора норадреналина, участвует в обмене липидов и ряде других реакций.

В медицине аскорбиновая кислота широко применяется не только для лечения цинги, но и при геморрагических диатезах, кровотечениях, в том числе вызванных лучевой болезнью, ряде инфекционных и иммунных заболеваний, для нормализации липидного обмена при атеросклерозе, усиленном физическом и умственном напряжении, простуде, а также в химиотерапии рака.

Витамины D

Заболевание детей рахитом (от греч. *ραχις* — спиной хребет) впервые описано в литературе в 1650 г., а в конце XVIII в. стало известно, что оно излечивается жиром печени рыб. К 1924 г. было также установлено, что облучение ультрафиолетовым светом детей, страдающих рахитом, предупреждает развитие болезни. Эти данные

позволили в 1930—1932 гг. Ф. Аскью и А. Виндаусу получить в своих лабораториях сначала неочищенный витамин D_1 и затем индивидуальный витамин D_2 (эргокальциферол) из облученного провитамина — эргостерина. Г. Брокман в 1936 г. выделил более универсальный природный витамин D_3 (холекальциферол) из жира печени тунца, а А. Виндаус получил его в том же году фотоизомеризацией провитамина — 7-дегидрохолестерина. Строение витаминов D_2 и D_3 было установлено А. Виндаусом и Дж. Хейлброном в 1936—1937 гг. и подтверждено рентгеноструктурным анализом (Д. Ходжкин, 1957). В настоящее время известно еще четыре витамина группы D (D_4 — D_7), но их активность значительно ниже.



Провитамин витамина D_3 — 7-дегидрохолестерин присутствует в кожных покровах людей, и для его превращения в холекальциферол достаточно солнечного облучения, так что суточная потребность взрослого человека (7—12 мкг) легко удовлетворяется. У детей суточная доза витамина D_3 составляет 12—25 мкг, и при гипо- или авитаминозе необходимо поступление витамина с жиром печени рыб, где его содержится больше всего, или со сливочным маслом, молоком, яйцами. В лечебных целях пригоден также вита-

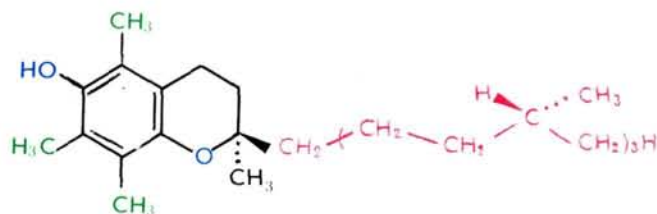
мин D₂ (синтетический витамин D), который готовится из эргостерина, получаемого обычно из дрожжей или в качестве побочного продукта производства антибиотиков. Витамины D широко применяются в животноводстве, но для некоторых животных и птиц, например цыплят-бройлеров, витамин D₂ малоактивен и непригоден как пищевая добавка.

В организме человека витамины D регулируют всасывание Ca²⁺ в кишечнике, гомеостаз Ca²⁺ в крови (для этого существует сложная система из нескольких белков, гормонов, АТФ, Na⁺ и фосфата) и метаболизм Ca²⁺ и фосфата, приводящий к построению нормальной костной и отчасти мышечной ткани. Большинство функций витамины D выполняют, однако, не сами, а в виде окисленных метаболитов: 25-гидроксикальциферола, 1α-гидроксикальциферола, 1α,25-дигидроксикальциферола и др. Эти метаболиты, открытые Г. де Лука в 1969—1971 гг., обладают значительно более высокой биологической активностью, чем исходные витамины, и проявляют все свойства истинных стероидных гормонов, вплоть до того, что их рецепторы расположены в клеточных ядрах, а вырабатываемые из витаминов D₂ и D₃ количества метаболитов строго контролируются в зависимости от уровня Ca²⁺ и витаминов D в крови и от других потребностей организма.

Витамины E

Витамин E, или α-токоферол (от греч. τοκοζ — роды и лат. рhео — носить), был открыт как антистерильный фактор. Отсутствие витамина нарушает у крыс нормальное развитие плода (самки) и сперматогенез (самцы); впервые он был выделен в чистом виде Г. Эвансом из зародышей пшеницы в 1936 г. Строение витамина E установлено в 1937 г., а первый синтез описан П. Каррером в 1938 г. Известно еще несколько витаминов E (токоферолов, или метилтоколов), имеющих меньшее количество метильных групп в ароматическом ядре, и их аналогов — токотриенолов с ненасыщенной боковой цепью, но все они проявляют значительно меньшую биологическую активность, чем α-токоферол.

Токоферолы синтезируются только в растениях. Они содержатся главным образом в семенах (зернах пшеницы и риса) и маслах (подсолнечном, кукурузном, хлопковом, соевом, рисовом, конопляном, пальмовом и др.), а также в зеленых частях растений (салат, шпинат). У животных недостаток токоферола приводит



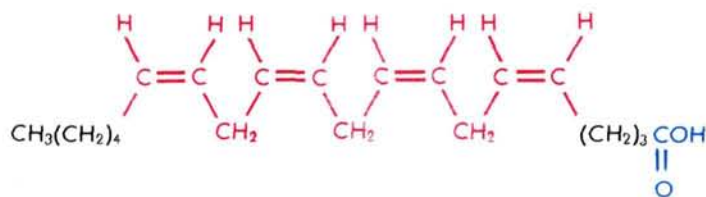
Витамин E (α-токоферол)

не только к бесплодию, но и к поражению миокарда и других мышечных тканей, сосудистой и нервной систем. Механизм его действия связывают как с антиоксидантным действием, направленным на предотвращение окисления остатков ненасыщенных жирных кислот в липидах мембран, так и с влиянием на биосинтез ферментов, особенно тех, которые участвуют в построении гема.

У людей гиповитаминоз Е проявляется редко, и суточная потребность (около 5 мг для детей и 10—25 мг для взрослых, особенно для беременных и кормящих матерей) легко удовлетворяется при нормальном питании.

Витамин F

Под таким названием условно объединяется группа ненасыщенных жирных кислот — олеиновой (см. с. 520), линолевой и линоленовой (см. с. 521) и арахидоновой (см. с. 520). Потребность



Арахидоновая кислота

животных (крыс) в этих кислотах, которые необходимы для построения клеточных мембран, впервые была установлена в 1929 г. Однако следует отметить, что арахидоновая кислота, в 10 раз более активная, чем другие кислоты группы, очевидно, необходима в основном для биосинтеза простагландинов (см. с. 756), тромбксана A_2 и лейкотриенов (см. с. 759).

Витамин Н (биотин, биос II)

В продолжение исследований, начатых еще в 70-х годах прошлого века Л. Пастером и Ю. Либихом и направленных на обнаружение специфических ростовых веществ для дрожжей («биос»), Ф. Кёгль в 1935 г. впервые выделил этот витамин из яичного желтка и назвал его биосом II или биотином. Независимые исследования по выделению фактора роста азотфиксирующих бактерий (коэнзима R) завершились в 1939 г. идентификацией этого фактора с биотином. Наконец, изучение причин дерматита у крыс, возникающего при

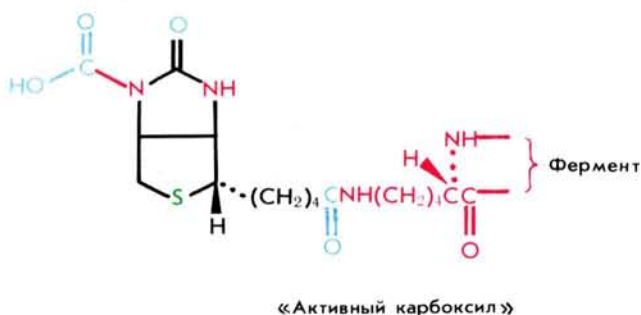


Витамин Н (биотин) R = H

N_5 -Карбоксибиотин R = COOH

скармливания им сырых яиц, привело к выделению в 1939 г. **витамина Н** (от нем. Haut — кожа); тождественность его биотину была доказана в 1940 г. Строение биотина выяснено В. дю Виньо в 1942 г., а первый синтез описан К. А. Фолкерсом с сотрудниками в 1944—1945 гг.

Биохимическую роль биотин выполняет в виде кофермента N_5 -карбоксибиотина, который связывается через ϵ -аминогруппу лизина с рядом ферментов (метилмалонил-CoA-транскарбоксилазой, ацетил-, пропионил-, метилкротонил- и пируваткарбоксилазами) в форме конъюгата (так называемого «активного карбоксила»), переносящего CO_2 в обратимых реакциях карбоксилирования — декарбоксилирования и транскарбоксилирования при биосинтезе липидов, аминокислот, углеводов, нуклеиновых кислот и других биологически важных веществ.



Недостаток биотина приводит к депигментации кожи и развитию специфического экзематозного дерматита, а также торможению роста и нервным расстройствам. У птиц происходит нарушение обмена веществ, плохое развитие оперения и снижение яйценоскости. Кроме того, биотин необходим растениям, микроорганизмам и вообще любым клеткам, а содержание его в клетках злокачественных опухолей всегда повышено. Природным антивитамином биотина является белок сырых яиц авидин, способный связывать витамин в нерастворимый комплекс. Потребность человека в витамине Н составляет 0,1—0,3 мг/сут и легко удовлетворяется за счет биосинтеза в микрофлоре кишечника.

Витамины К

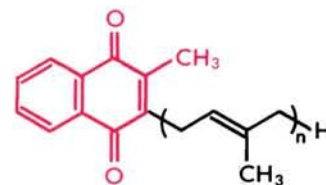
Витамины К — это большая группа витаминов коагуляции, или антигеморрагических витаминов (филлохинон и менахиноны).

Витамин К (от нем. Koagulationsvitamin) был открыт в 1929 г. датским ученым Г. Дамом как антигеморрагический фактор у цыплят. Геморрагия (от греч. αιμα — кровь, ρήγνυμι — прорыв) — заболевание, которое связано с нарушением целостности стенок кровеносных сосудов и подкожными и внутримышечными кровотечениями.

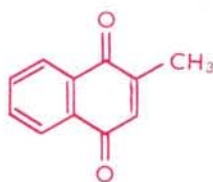
ниями, обусловленными низкой скоростью свертывания крови. Впервые витамин К, позднее названный витамином К₁ (филлохинон), был выделен из люцерны в лаборатории П. Каррера в 1939 г., и в том же году Л. Физером и Е. Дойси было установлено его строение. Из рыбной муки была выделена и охарактеризована группа витаминов К₂ (менахиноны), отличающихся величиной боковой цепи и обозначаемых либо по числу входящих в нее изопреноидных звеньев (менахинон-4, -6, -7, -8, -9), либо по количеству С-атомов цепи (витамины К₂₍₂₀₎, К₂₍₃₀₎, К₂₍₃₅₎, К₂₍₄₀₎ и К₂₍₄₅₎).

Витамины К₁ и К₂ необходимы человеку прежде всего для нормализации или ускорения процесса свертывания крови. Они участвуют не в самом акте свертывания и образования тромба, а в построении протромбина и факторов VII, IX и X этой сложной системы, точнее, в γ -карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты с образованием γ -карбоксизвеньев, необходимых для связывания ионов кальция (см. с. 233). Кроме того, менахиноны являются медиаторами некоторых биохимических окислительно-восстановительных превращений, в частности при фотосинтезе, окислительном фосфорилировании или окислении дигидрооротовой кислоты в оротовую.

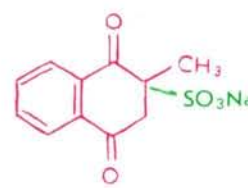
Кроме природных витаминов К₁ и К₂, известно большое количество их синтетических аналогов, часто обладающих более высокой биологической активностью. Среди них надо упомянуть: менадион (витамин К₃), который способен алкилироваться в организме до менахинона-4 (К₂₍₂₀₎) и рассматривается как промежуточный продукт метаболизма остальных витаминов К; соответствующий гидрохинон (витамин К₄); аминафтаолы (витамины К₅ и К₆) и диамин (витамин К₇); викасол — бисульфитное производное, полученное М. Муром (США) в 1941 г. и независимо в 1943—1944 гг. А. В. Палладиным и М. М. Шемякиным.

Витамин К₂

Витамин К ₂₍₂₀₎	n=4
Витамин К ₂₍₃₀₎	n=6
Витамин К ₂₍₃₅₎	n=7
Витамин К ₂₍₄₀₎	n=8
Витамин К ₂₍₄₅₎	n=9

Витамин К₁

	R ¹	R ²
Витамин К ₄	OH	OH
Витамин К ₅	NH ₂	OH
Витамин К ₆	OH	NH ₂
Витамин К ₇	NH ₂	NH ₂



Викасол

Витаминами К особенно богаты зеленые части растений, кроме того, они вырабатываются в достаточных количествах микрофлорой кишечника. Поэтому недостаток витаминов К бывает только у новорожденных, у взрослых людей он может быть обусловлен либо подавлением кишечных микробов сульфамидами или антибиотиками, либо плохим всасыванием из-за недостаточной выработки его эмульгатора — желчи.

При некоторых заболеваниях (инфаркт миокарда, тромбофлебит и т. п.), связанных с повышением свертываемости крови и образованием тромбов в сосудах, возникает необходимость в приме-



Хохлов Александр Степанович (р. 1916), советский химик, член-корреспондент АН СССР (1964). Окончил Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (1941), с 1959 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы посвящены химическому изучению природных биорегуляторов, в частности антибиотиков. Открыл и детально изучил А-фактор — первый представитель биорегуляторов нового типа у микроорганизмов.

нении антивитаминов К (антикоагулянтов). Наиболее известными из них являются дикумарол, его аналоги и производные, а также фенилин.



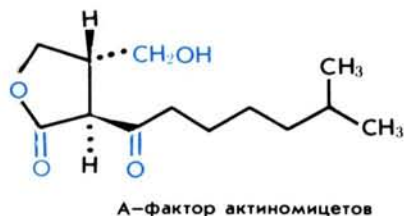
Витамин N

Витамин N (липовая, α -липовая, или тиоктовая, кислота), обнаруженный в 1951 г. как фактор роста дрожжей, ряда других микроорганизмов и простейших, содержится также во многих растительных и животных организмах и в форме ϵ -липоиллизина (связанного с белком) является коферментом мультиферментных



комплексов — пируватдегидрогеназы, α -кетоглутаратдегидрогеназы и др., осуществляющих окислительное декарбоксилирование α -кетокислот и построение ацильных производных кофермента А. Липовая кислота участвует также в тиол-дисульфидных превращениях различных белков, окислительном фосфорилировании, преобразовании арахидоновой кислоты в простагландин Н и прочих важных биохимических реакциях. Благодаря этому она находит широкое применение в медицине для нормализации липидного обмена, лечения некоторых болезней печени (например, цирроза, болезни Боткина), сахарного диабета, атеросклероза, некоторых отравлений, а также в педиатрии.

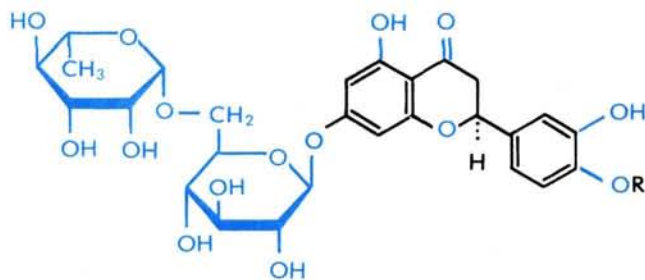
Среди веществ, которые, подобно липовой кислоте, оказывают большое влияние на развитие микроорганизмов и условно могут быть причислены к витаминам, можно упомянуть А-фактор актиномицетов, открытый А. С. Хохловым в 1967 г. и отвечающий за продуцирование стрептомицина и других антибиотиков и переход лучистых грибов в стадию споруляции.



Под этим названием известен комплекс флаваноидных соединений, способный, как было показано А. Сент-Дьёрды и группой немецких ученых в 1936 г., частично снимать остроту авитаминоза С, уменьшая проницаемость и ломкость капиллярных кровеносных сосудов (Р — от англ. permeability — проницаемость). Типичными представителями веществ с этой активностью являются гесперидин, открытый В. Б. Брукнером в 1936 г. и содержащийся в значительных количествах в цитрусовых (например, до 8% его находится в высушенных апельсиновых корках), эриодиктин, катехин, кверцетин (флаван желтых цветов) и его гликозид рутин. Они широко используются при гипо- и авитаминозе Р и лечении многих



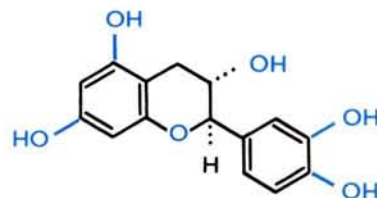
Брукнер [Bruckner] Виктор (1900—1980), венгерский химик-органик. Окончил Будапештский политехнический университет (1925), в 1950—1972 гг.— профессор Будапештского университета. Основные работы посвящены органическому синтезу. Изучал таутомерные системы с обратимой N-, O-миграцией ацильных групп. Получил в чистом виде гесперидин и эриодиктин, входящие в группу витамина Р (1936).



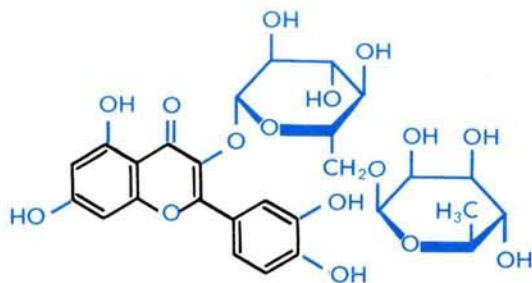
Гесперидин R=CH₃

Эриодиктин R=H

заболеваний кровеносных сосудов (например, «пурпуровой болезни» — тромбопенической пурпуры, геморрагических диатезов, кровоизлияний в сетчатку глаза, лучевой болезни), а также гипертонии, кори, скарлатины, сыпного тифа и т. д.



Катехин



Рутин



Кверцетин

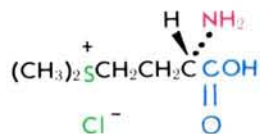
Низкомолекулярные
биорегуляторы

Витамины Q (коферменты Q, или убихиноны) открыты в 1957 г. независимо в лабораториях Р. Мортон и Ф. Крейна, а их строение расшифровано главным образом в работах К. А. Фолкерса (цифровой индекс означает количество изопреноидных звеньев в боковой цепи). Эти соединения синтезируются организмами животных, растениями и микроорганизмами и имеют повсеместное распространение (от лат. ubi-que — везде); благодаря своей липидоподобной гидрофобной структуре они концентрируются во внутренних мембранах митохондрий, микросомах, ядрах и аппарате Гольджи и вместе с менахинонами (витаминами K₂) участвуют в системе дыхания высших и микроорганизмов, обеспечивая поглощение кислорода, транспорт электронов и окислительное фосфорилирование в митохондриях. Необходимы они также для фотосинтеза в растениях и стабилизации мембран, в которых, подобно токоферолу, но, как правило, более эффективно, предотвращают перекисное окисление ненасыщенных липидов.

В нормальных условиях убихиноны биосинтезируются организмом человека в достаточных количествах, однако при белковой или калорийной недостаточности (голодании) у детей возникают анемия или изменения в костном мозге, которые снимаются введением витамина Q₁₀. Убихиноны необходимы также при развитии эмбриона, так как способствуют образованию эритроцитов, и широко применяются в медицине для стимуляции митохондрий миокарда при сердечно-сосудистых заболеваниях и мышечной дистрофии. Напротив, у раковых больных, имеющих повышенные концентрации витаминов Q, полезной оказывается терапия антрациклиновыми антибиотиками (см. с. 744), которые ведут себя как классические авитамины Q.

Витамин U

Витамин U (от лат. ulcus — язва), называемый также противоязвенным фактором и метилметионином, открыт в 1952 г. на основании наблюдений врачей, отметивших лечебное действие капустного сока при язвах желудка и двенадцатиперстной кишки. Большие количества витамина содержатся, кроме того, в спарже, петрушке, шпинате, сельдерее, томатах и молоке. В дозах 250—300 мг/сут он оказывает болеутоляющее действие и способствует эпителизации оболочки желудка и кишечника у язвенных больных. Механизм действия этого витамина, являющегося биохимическим донором метильных групп, связан, вероятно, с детоксикацией гистамина и усилением обмена тиамина и холина.



Витамин U (метилметионин)



Вагнер Егор Егорович (1849—1903), русский химик-органик. Окончил Казанский университет (1874); в 1882—1886 гг.— профессор Новоалександрийского института сельского хозяйства и лесоводства, а с 1886 г.— Варшавского университета. Основные работы — в области органического синтеза. Открыл реакцию получения вторичных и третичных спиртов действием на карбонильные соединения цинка и алкилгалогенидов (1875, совместно с А. М. Зайцевым) и реакцию окисления непредельных органических соединений раствором $KMnO_3$ в щелочной среде (1888, реакция Вагнера, или окисление по Вагнеру). Открыл камфеновую перегруппировку на примере перехода борнеола в камфен и обратно (1897, перегруппировка Вагнера — Меервейна).



Рис. 356. Лимон (*Citrus medica*).

что молекулы терпенов содержат $(C_5)_n$ -атомов (n — число изопреновых единиц) и построены из изопреновых C_5 -единиц; многие другие природные соединения, построенные аналогично, но потерявшие в ходе биосинтеза часть C-атомов, называют изопреноидами.

В зависимости от числа n терпены подразделяются на следующие группы: C_5 — гемитерпены, C_{10} — монотерпены, C_{15} — сесквитерпены, C_{20} — дитерпены, C_{25} — сестертерпены, C_{30} — тритерпены, C_{40} — тетратерпены и C_{50} и более — политерпены.

К классу терпенов относятся некоторые природные гликозиды (сапонины), желтые и оранжевые пигменты растений (каротиноиды, ксантофиллы), каучук, продукты живицы и ряд других веществ.

Исторический очерк. Благодаря бактериостатическому действию терпены известны с давних пор и использовались в Древнем Египте для бальзамирования. Летучие масла растений, получившие в тот период известное название *Quinta essentia* (аромат растений), обязаны своими замечательными парфюмерными свойствами присутствию в них соединений этого класса.

Парфюмерная промышленность, использующая в качестве душистых веществ главным образом терпены, возникла в России в 40-х годах прошлого столетия. Многие труды русских и советских ученых, в том числе Е. Е. Вагнера, Н. Д. Зелинского, А. Е. Фаворского, С. С. Намёткина, связанные с исследованиями терпенов и получившие мировое признание, развивались по нескольким основным направлениям: изучение состава эфирных масел, выделение и установление строения их отдельных компонентов, изучение химических превращений терпенов и их синтез.

Химия и биохимия терпенов своими успехами в значительной степени обязана работам Л. Ружички (Швейцария), Д. Бартона (Великобритания), К. Джерасси, П. де Майо (США), В. Клайна, В. Хюккеля (Германия), А. Бёрча (Австралия) и других исследователей. К крупным достижениям в области терпенов по праву могут быть также отнесены синтез камфоры из α -пинена (В. Е. Тищенко), термическая изомеризация α -пинена в аллооцимен (А. Е. и Б. А. Арбузовы), синтезы витамина А (Н. А. Преображенский, И. Н. Назаров) и др.

В последние годы наиболее интенсивно развиваются исследования в области сесквитерпенов. Так, если до 1964 г. было известно около 200 сесквитерпенов, относящихся к 40 типам углеродного скелета, то уже к 1984 г. было изучено свыше 2500 соединений 75 типов.

Монотерпены

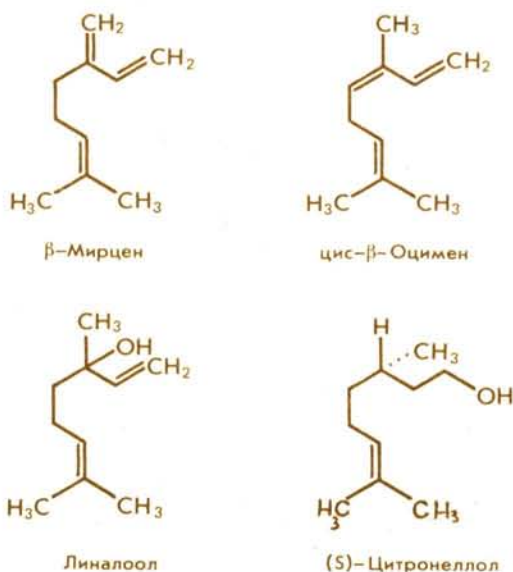
Главные источники монотерпенов — эфирные масла ароматических растений, полученные перегонкой с водяным паром, экстракцией с помощью растворителей или жиров. Для монотерпенов характерен обширный набор структур, обладающих широким спектром биологического действия. Наиболее известным представителем монотерпенов является камфора — средство, усиливающее сердечную деятельность. Синтез камфоры из шавелевой кислоты и диэтилового эфира диметилглутаровой кислоты осуществил в 1889 г. Г. Комппа, однако до начала XX столетия камфору получали главным образом из камфорного дерева *Laurus camphora* L., расту-

шего в тропических странах и Японии, а в СССР — в Абхазии и Аджарии. В настоящее время в мире развито производство синтетической камфоры.



К монотерпенам относятся: ментол, входящий в состав мятного масла и широко используемый в медицине, парфюмерии, кондитерской промышленности; гераниол — монотерпеновый спирт, выделенный из розового и лавандового масел; цитраль — альдегид, входящий в состав масла цитрусовых, и другие соединения. Эфирные масла растений, а также цедра лимона (рис. 356) и других цитрусовых содержат, как правило, сложные смеси монотерпенов.

Монотерпены нектара цветов служат обычно веществами, привлекающими насекомых (аттрактанты). Так, в масле хмеля обнаружены мирцен и оцимен, в лавандовом масле — изомер гераниола линалоол и его ацетат. Оба терпеноида обладают приятным запахом ландыша. В эфирных маслах розы (рис. 357) и герани обнаружено ценное душистое вещество — (S)-цитронеллол. В нектаре цветков шиповника содержатся гераниол и нерол.



Зелинский Николай Дмитриевич (1861—1953), советский химик-органик, один из основоположников органического катализа и нефтехимии, академик АН СССР (1929). Окончил Новороссийский университет в Одессе (1884); с 1893 г. — профессор Московского университета, одновременно с 1935 г. работал в Институте органической химии АН СССР (с 1953 г. — ИОХ имени Н. Д. Зелинского). Основные труды посвящены химии углеводородов нефти и их каталитическим превращениям. Герой Социалистического Труда (1945), лауреат премии им. В. И. Ленина (1934), Государственных премий СССР (1942, 1946, 1948).

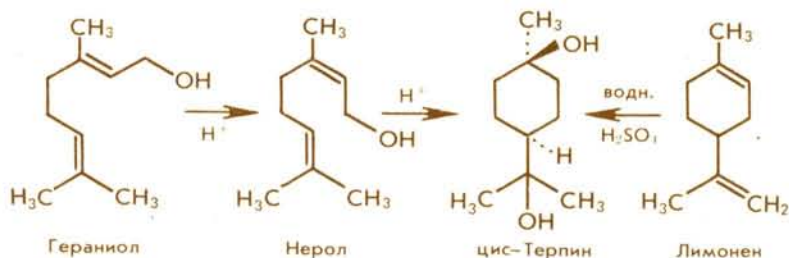


Рис. 357. Шиповник (*Rosa gallica*).



Намёткин Сергей Семенович (1876—1950), советский химик-органик, академик АН СССР (1939). Окончил Московский университет (1902), с 1938 г. — профессор Московского университета. Исследовал углеводороды различных классов, установил структуру многих бициклических углеводородов (1911—1916); открыл камфеновую перегруппировку II рода (1925, перегруппировка Намёткина). Автор фундаментальных работ по химии и технологии нефти, синтезу душистых веществ, стимуляторов роста. Лауреат Государственных премий СССР (1943, 1949).

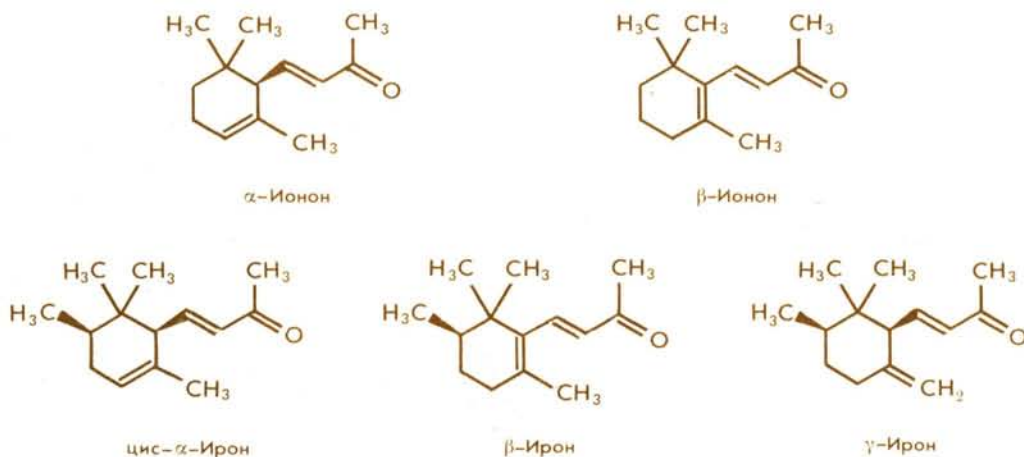
Алифатические монотерпены легко циклизируются под влиянием кислот. Так, гераниол сначала изомеризуется в монотерпен нерол, который далее циклизуется в дигидроксипроизводное терпин. По-



следний может быть получен и при кислотной гидратации лимонена, содержащегося в скипидаре и многих эфирных маслах, например в масле, полученном из лимонной цедры.

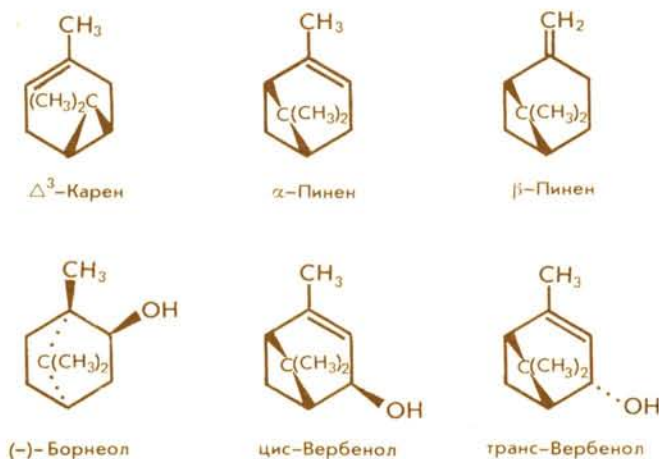
В эфирных маслах фиалки и кедра присутствуют циклические монотерпеноиды α -ионон и β -ионон, а в масле ириса — родственные им кетоны — α -, β - и γ -ироны.

Терпеновые непредельные углеводороды легко образуют внутри- и межмолекулярные перекиси. Так, например, углеводород α -терпинен переходит во внутримолекулярную перекись — аскаридол (см. с. 663), используемую в химических трансформациях как инициатор цепных реакций.



Свойство терпеновых углеводородов образовывать межмолекулярные перекиси позволяет применять их для приготовления высококачественных красок, используемых в живописи.

Широкое применение в химии, технике и медицине получили скипидар и сосновое масло. Из этих источников дробной разгонкой выделяют такие важные полупродукты, как Δ^3 -карен, α -пинен и β -пинен. Δ^3 -Карен используется для получения оптически активных пиретроидов (см. с. 789), пинены — для получения *цис*- и *транс*-вербенолов, обладающих приятным камфорным запахом и являющихся агрегационными феромонами короеда-типографа *Ips tyrographus* (рис. 358). Из α -пинена легко образуется монотерпеновый спирт (—)-борнеол (содержащийся также в хвое пихты сибирской в виде ацетата), окислением которого получают (—)-камфору.



Арбузов Борис Александрович (р. 1903), советский химик, академик АН СССР (1953). Окончил Казанский институт сельского хозяйства и лесоводства (1926), в 1965—1977 гг. — директор Института органической и физической химии АН СССР. Основные работы посвящены химии терпенов, диеновых и фосфорорганических соединений. Совместно с А. Е. Арбузовым открыл реакцию образования свободных радикалов триарилметанового ряда из триарилбромметана (1929). Герой Социалистического Труда (1969), лауреат Ленинской (1978) и Государственной (1951) премий СССР.

Сесквитерпены

Развитие химии сесквитерпеноидов в значительной степени связано с трудами швейцарских ученых Л. Ружички, А. Эшенмозера и особенно Х. Шинца, а позднее Ф. Больмана. Сесквитерпеноиды содержатся в различных эфирных маслах растений и смолах (бальзамах). Основным биогенетическим предшественником сесквитерпеноидов и родственных им природных соединений является фарнезилпирофосфат. Соответствующий ему сесквитерпеновый спирт фарнезол обнаружен в свободном виде в эфирном масле цветущей липы. К сесквитерпенам, например, относятся ювенильные гормоны 0—III, ювабион (см. с. 779), влияющие на метаморфоз насекомых; душистое вещество дендролазин; растительный антифидант глауколид А (высокотоксичный для совки *Spodoptera ornithogallii*). В масле ириса обнаружен бициклический дикетон — акорон, обладающий парфюмерными свойствами и использующийся для создания редких композиций французских духов.

В эту же группу терпенов входят высокоактивные соединения, такие, как фитоалексины, защищающие растения от болезней, ихтиотоксины, обладающие высокой токсичностью для рыб, а также многочисленные сесквитерпеновые лактоны, сходные, например, с глауколидом или сантонином (см. с. 663), проявляющие широ-

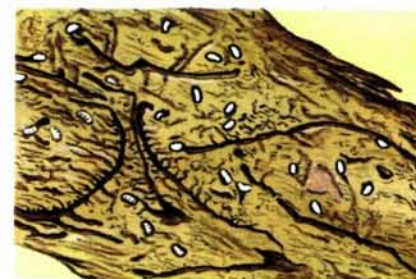
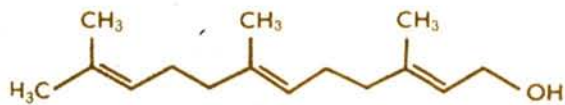
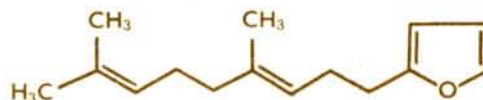


Рис. 358. Вредитель хвойных пород деревьев короед-типограф; в древесине под корой прогрызает ходы и брачные камеры.

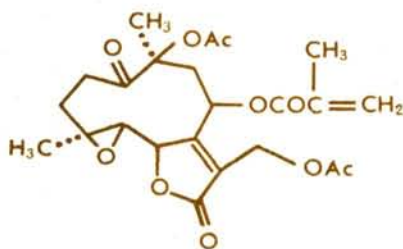
кий спектр биологической активности. Некоторые из сесквитерпенов (аналогично ди- и тритерпенам) в качестве биохимических маркеров нефти используются для прогнозирования нефтяных запасов в недрах Земли.



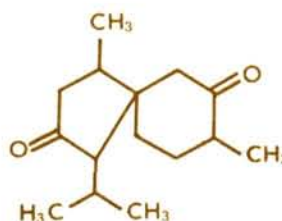
Фарнезол



Дендролазин



Глауколид А



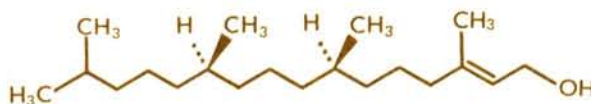
Акорон

Дитерпены

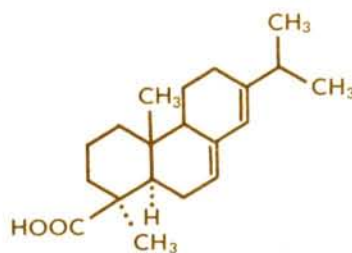
Дитерпены широко распространены в природе и выделяются обычно из высококипящих фракций эфирных масел растений. Дитерпенами являются: фитол, входящий в состав молекул хлорофилла и токоферолов (см. с. 686), витамин А (см. с. 669), смоляные кислоты (например, абиетиновая кислота), гибберелловые кислоты (см. с. 717), инсектицид *цис*-озовая кислота и другие соединения.



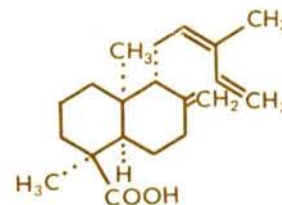
Бёрч (Birch) Артур (р. 1915), австралийский химик-органик, иностранный член АН СССР (1976). Образование получил в Сиднейском и Оксфордском университетах, с 1970 г. — профессор Австралийского национального университета в Канберре. В 1976—1986 гг. — президент Австралийской Академии наук. Основные научные исследования посвящены синтезу природных соединений. Открыл реакцию селективного восстановления ароматических соединений действием натрия и спирта в жидком аммиаке (1949, восстановление по Бёрчу).



Фитол

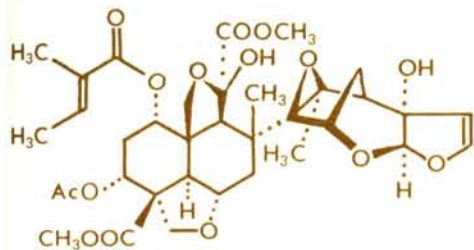


Абиетиновая кислота

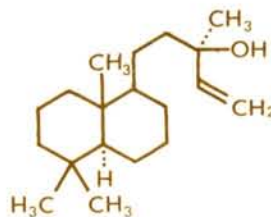


цис-Озовая кислота

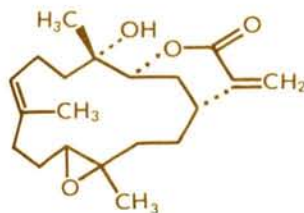
В 1975 г. К. Наканиси (США) из африканского растения *Azadirachta indica* выделил дитерпеноид азодирахтин, защищающий растение от пустынной саранчи *Schistocerca gregaria*.



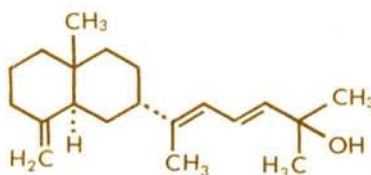
Азадирахтин



Маноол



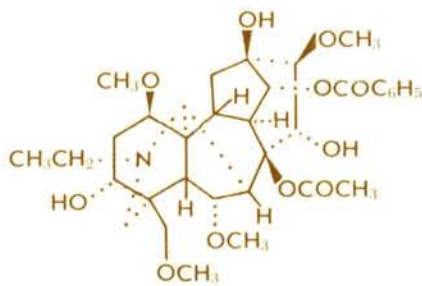
Флексибилид



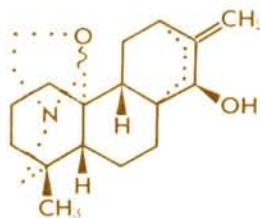
FN-45

Природные дитерпеноиды — ценные лекарственные препараты, например противовирусный препарат — маноол; некоторые из них, как и сесквитерпены, являются ихтиотоксинами (флексибилид).

Недавно установлено (Дж. Колль, Австралия, 1984), что дитерпен FN-45, продуцируемый мягким кораллом *Gambusia officinis*, высокотоксичен в малых концентрациях для других видов кораллов, что позволяет ему вытеснить их из зоны обитания.



Аконитин



Атизин

К группе дитерпеноидов относятся и некоторые природные алкалоиды аконита (аконитин, атизин и др.).

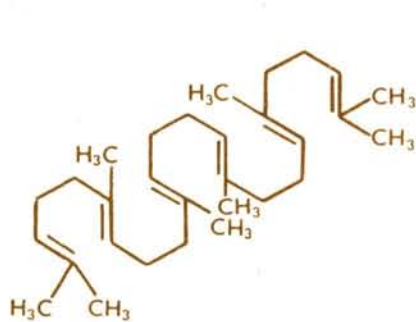


Назаров Иван Николаевич (1906—1957), советский химик-органик, академик АН СССР (1953). Окончил Сельскохозяйственную академию им. К. А. Тимирязева (1931), с 1935 г. — заведующий лабораторией Института органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР. Основные работы посвящены химии ацетилена и его производных, а также синтезу ряда физиологически активных соединений (стероидные гормоны, промедол, витамин А и другие). Лауреат Государственных премий СССР (1942, 1946).

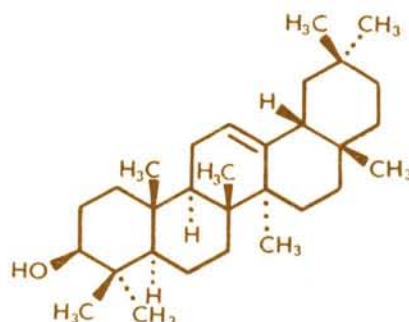


Комппа [Котрра] Густав (1867—1949), финский химик-органик. Окончил Политехнический институт в Хельсинки (1890), с 1892 г. работал в Цюрихе с Л. Гольдшмидтом. Занимался исследованиями в области синтетической органической и аналитической химии, внес значительный вклад в изучение кислородсодержащих производных терпенов, в частности осуществил синтез камфоры (1889).

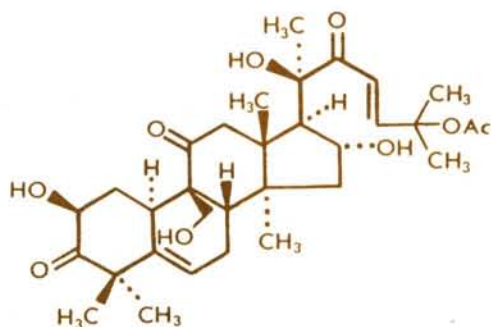
Эти довольно сложные в структурном отношении природные терпены построены из 6 изопреновых единиц. Тритерпены содержатся в большинстве растений как в свободном виде, так и в виде гликозидов (сапонины). Среди тритерпенов, обнаруженных в животных организмах, в первую очередь следует упомянуть сквален и ланостерин, а также тритерпены морских беспозвоночных. Структуры многих тритерпенов было установлено благодаря исследованиям Л. Ружички, О. Егера (Швейцария), К. Блоха, К. Джерасси (США) и др.



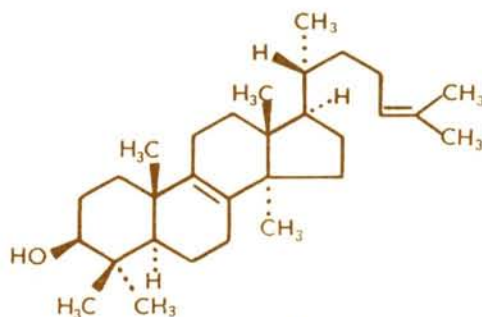
Сквален



β-Амирин



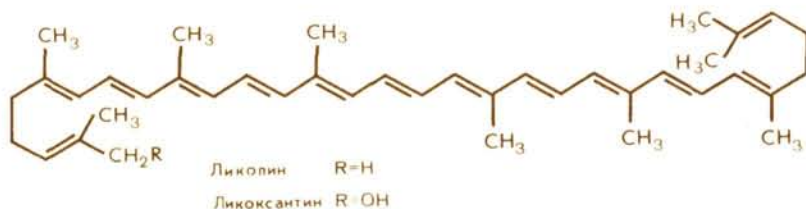
Кукурбитацин А



Ланостерин

Широко распространенные природные тритерпены представляют собой производные класса амиринов, или олеананов. Гликозиды амиринов входят в состав тонизирующего активного начала женьшеня и лимонника китайского. Бахчевые культуры содержат большую группу (до 50 соединений) тритерпенов (известных под общим названием кукурбитацины), обладающих горьким, неприятным вкусом.

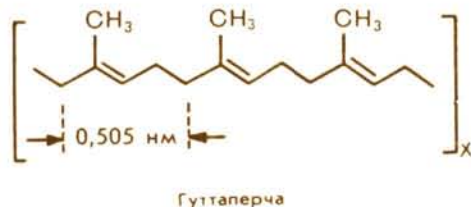
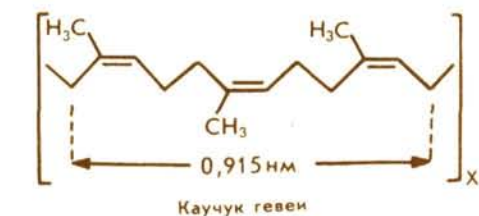
Желтые и красные пигменты растений и животных представляют собой в основном тетратерпены. Благодаря работам швейцарских ученых Л. Цехмайстера, О. Ислера, П. Каррера они были подробно изучены и некоторые из них синтезированы. Среди тетратерпенов наиболее известны каротины (провитамины А) (см. с. 670), ксантофиллы, ликопины и ксантины, используемые в качестве красителей в пищевой промышленности.



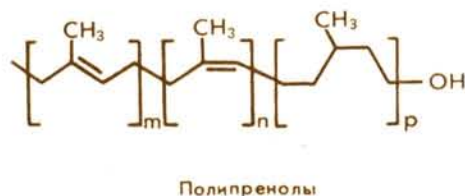
Джерасси [Djerassi] Карл (р. 1923), американский химик. Окончил Висконсинский университет (1945), с 1959 г.— профессор Стэнфордского университета. Основные работы посвящены химии природных соединений, изучению их строения с помощью физических методов. Синтезировал гормон кортизон, разработал способы получения гормонов эстрона и эстрадиола.

Политерпены

К терпенам этой группы относятся такие природные соединения, как каучук (*цис*-1, 4-полиизопрен), гуттаперча (*транс*-1, 4-полиизопрен) и полипренолы.



x = 1000 - 5000



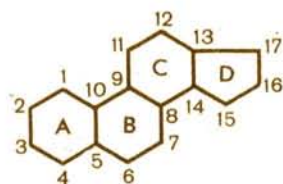
m = 3 - 5, n = 3 - 6,
p = 0 - 4



Ружичка [Ruzicka] Леопольд Стефан (1887—1976), швейцарский химик-органик, иностранный член АН СССР (1958). Окончил Высшую техническую школу в Карлсруэ (1910), в 1923—1925 гг. и 1929—1957 гг.— профессор Высшей технической школы в Цюрихе. Основные работы — по изучению биосинтеза и строения терпенов. Предложил способ определения углеродного скелета сесквитерпенов (1921). Осуществил синтез алициклических кетонов с числом углеродных атомов от 8 до 34 (1920—1934), гормонов андростерона и тестостерона (1934—1935); определил структуру сантониона (1930), абиединовой кислоты (1932). Лауреат Нобелевской премии по химии (1939).

Практическая значимость природных каучуков общеизвестна. Полипренолы же обнаружены и изучены сравнительно недавно. Оказалось, что они играют существенную роль в биосинтезе полисахаридов клеточных стенок, являясь мембраноактивными участниками транспорта углеводов.

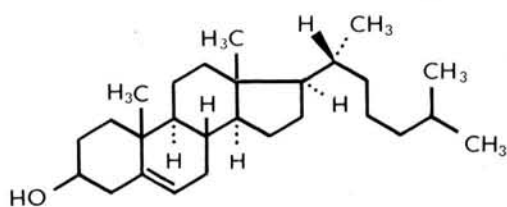
Стероиды



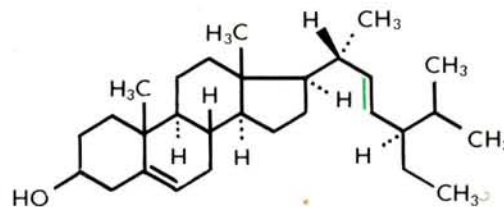
Эстран
(пергидроциклопентао-
фенантрен)

К стероидам относится большая группа биологически важных соединений, в основе структуры которых лежит скелет пергидроциклопентанофенантрена. Среди стероидов — половые гормоны, сердечные гликозиды, желчные кислоты, витамины, алкалоиды, регуляторы роста растений. Сотни физиологически активных соединений стероидного типа, нашедшие применение в медицинской практике, получены в настоящее время синтетически. Химия стероидов — одно из классических направлений биоорганической химии.

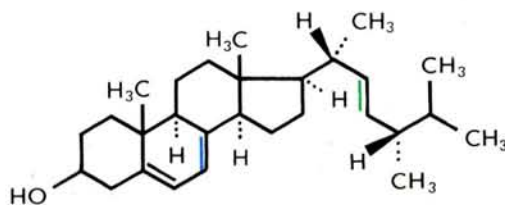
Свое начало стероиды берут от стеринов — алициклических липидоподобных веществ природного происхождения. Как правило, стерины представляют собой кристаллические одноатомные спирты, выделенные из неомыляемой фракции липидов. Различают зоостерины (из животных), фитостерины (из растений), микостерины (из грибов) и стерины микроорганизмов. Наиболее известный среди стеринов — холестерин, содержащийся почти во всех тканях животного организма. Особенно много холестерина в центральной и периферической нервных системах, кожном сале, почках и т. п.; так называемые желчные камни иногда на 90% состоят из холестерина (от греч. *χολη* — желчь и *στερεος* — твердый). Метаболизм холестерина играет важную роль в организме — при некоторых патологических отклонениях, например при атеросклерозе, холестерин откладывается на стенках кровеносных сосудов. Много холестерина содержится в молоке, сливочном масле, яичном желтке.



Холестерин

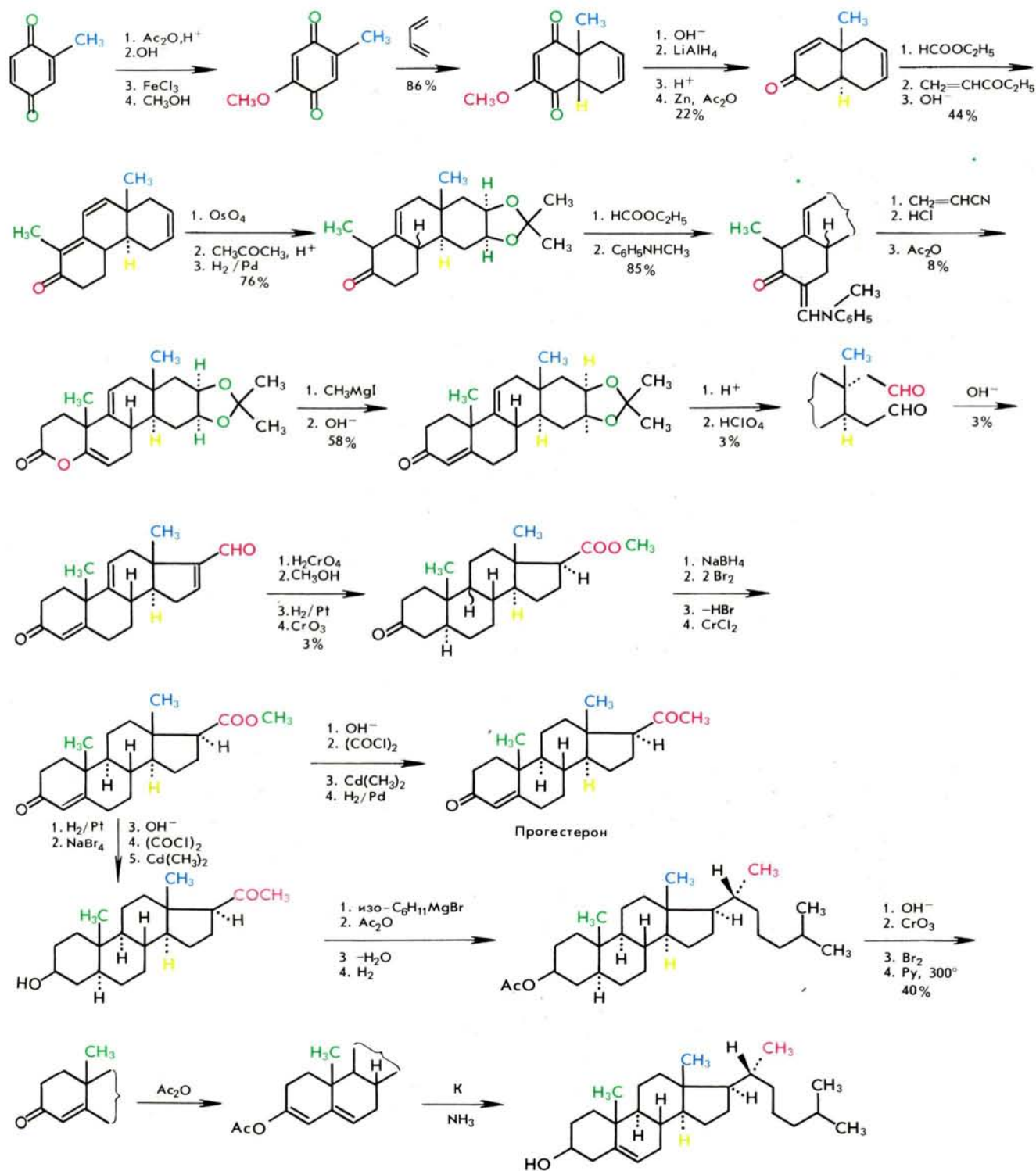


Стигмастерин



Эргостерин

Полный синтез холестерина





Бутенандт [Butenandt] Адольф Фридрих (р. 1903), немецкий химик и биохимик. Окончил Гёттингенский университет (1927); в 1956—1972 гг. — профессор Мюнхенского университета, в 1936—1966 гг. — директор Института биохимии Общества М. Планка. Основные работы посвящены химии половых гормонов и разработке методов их синтеза. Установил структуру и синтезировал эстрон (1929), андростерон (1931), прогестерон (1934) и тестостерон (1939). Выделил феромон тутового шелкопряда бомбикол, установил химическое строение и осуществил его синтез (1961). Разработал метод получения кортизона. Лауреат Нобелевской премии по химии (1939, совместно с Л. Ружичкой).

Среди других стероидов следует упомянуть стигмастерин, имеющий растительное происхождение (калабарские соевые бобы), а также выделенный из дрожжей эргостерин — предшественник витамина D.

Холестерин открыт М. Э. Шверёлем в 1815 г. Как установлено в настоящее время, биосинтез холестерина проходит теми же основными путями, что и биосинтез тритерпенов (см. с. 693). Установление строения холестерина потребовало свыше столетия работы многих поколений химиков и было закончено лишь в 1934 г.; окончательно подтверждено химическим синтезом холестерина, явившимся одним из первых полных синтезов веществ стероидной природы, осуществленным Р. Б. Вудвордом в 1951 г.

Половые гормоны

Важнейшие среди стероидных гормонов — женские (эстрогены, гестагены) и мужские (андрогены) половые гормоны, необходимые для нормального развития и функционирования половых органов, развития вторичных половых признаков и продолжения жизни.

Эстрогены объединяют группу производных циклопентанооктагидрофенантрена, имеющих ароматическое кольцо А. Впервые эстрогены обнаружены Б. Зондеком (Германия) в моче беременных женщин в 1927 г. Позднее в 1929—1932 гг. А. Бутенандт (Германия) выделил в кристаллическом состоянии гормон, названный им эстроном (от англ. oestrus — течка), и установил его строение. В этот же период Е. А. Дойзи (США) выделил два других эстрогена — эстриол и эстрадиол. Впоследствии было установлено, что наиболее активным из них является эстрадиол.

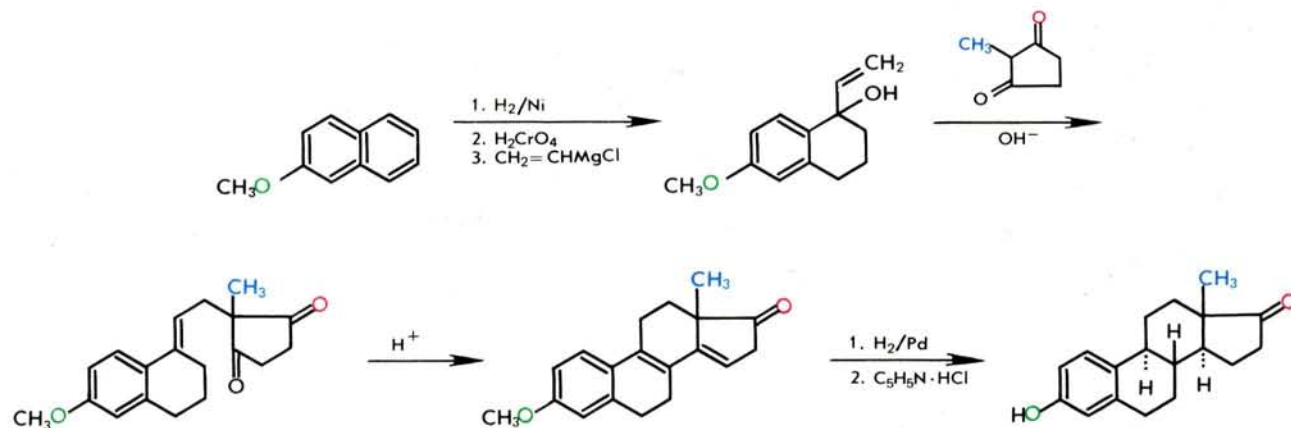
Эстрон и другие эстрогены используются для лечения половой недостаточности, при климактерических расстройствах, гипертонии, онкологических и других заболеваниях.

Интересно, что эстрогены содержатся и в растениях — кокосовых орехах, цветках ивы и т. п.



Первый полный синтез эстрогена осуществлен в 1948 г. Г. Аннером и К. Мишером (Швейцария). В настоящее время для медицинских целей эстрогены получают в промышленных условиях химическим синтезом. Простой синтез эстрогена был предложен И. В. Торговым (СССР, 1962).

Полный синтез эстрогена по И. В. Торгову



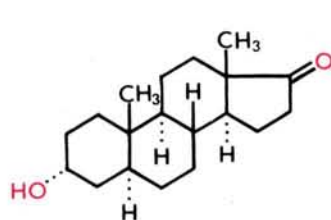
Стероидные гормоны, известные под названием андрогены (от греч. $\alpha\nu\delta\rho\zeta$ — мужской, $\gamma\rho\epsilon\nu\zeta$ — образовывать), наряду с влиянием на эндокринную систему человека, обладают сильным анаболическим эффектом. Их недостаток приводит к нарушениям азотистого и фосфорного обменов, атрофии скелетной мускулатуры и другим расстройствам.

В 1931 г. А. Бутенандт из мочи человека выделил первый андроген, названный им андростероном. Позднее в 1935 г. Э. Лакье (Германия) показал, что это соединение является метаболитом, а истинный мужской половой гормон — тестостерон, содержащийся в тестикулах.

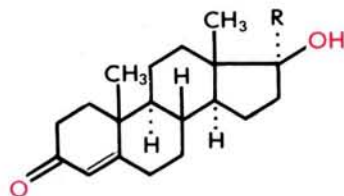
Введение таких гормонов (или просто пересадка семенников) кастрированным петушкам приводит к восстановлению вторичных половых признаков — отрастают гребешок и борода, и они вновь начинают проявлять половую активность.



Торгов Игорь Владимирович (р. 1912), советский химик-биоорганик, член-корреспондент АН СССР (1972). Окончил Казанский химико-технологический институт (1937), с 1959 г. работает в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР. Основные работы посвящены химии стероидов. Открыл реакцию конденсации винилкарбинолов с β -дикетонами (реакция Торгова), которая была положена в основу промышленного способа получения стероидных гормонов.



Андростерон



Тестостерон R=H

17 α -Метилтестостерон R=CH₃



Рейхштейн [Reichstein] Тадеуш (р. 1897), швейцарский химик-органик. Окончил Высшую техническую школу в Цюрихе (1922), с 1934 г. — в Базельском университете. Исследовал гормоны коры надпочечников. Выделил кортизон и установил его химическое строение (1936—1940). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1950, совместно с Э. Кендаллом и Ф. Хенчем).

Первые синтетические работы в области андрогенов выполнил в 1934 г. Л. Ружичка (Швейцария). Ему удалось получить высокоактивный 17α -метилтестостерон — первый искусственный гормон, широко используемый в настоящее время в качестве орального андрогена, не разрушаемого ферментами желудочно-кишечного тракта.

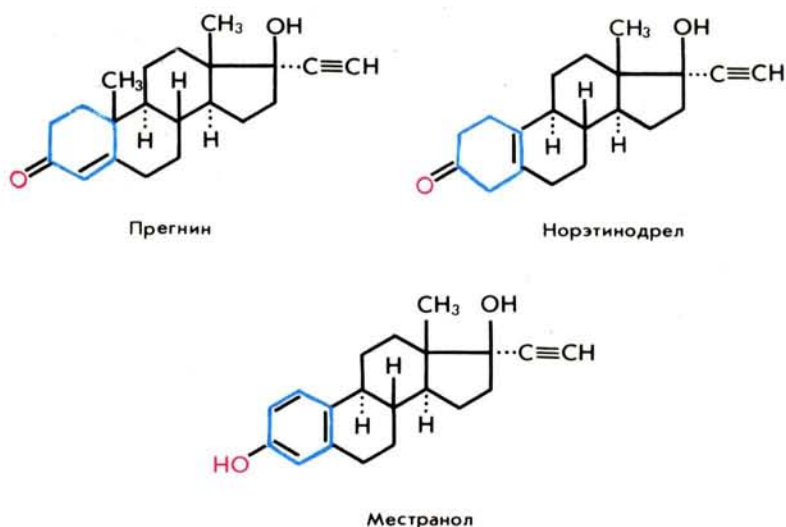
Промышленное получение андрогенов в качестве лекарственных препаратов осуществляется на основе частичного синтеза из природного стероидного алкалоида соласодина или агликона одного из сапонинов — диосгенина.

Гестагены — стероидные гормоны, связанные с функцией яичников, в которых находятся граафовы пузырьки, наполненные фолликулярной жидкостью. С наступлением половой зрелости эти пузырьки постепенно лопаются, освобождая яйцеклетку (овуляция). Оставшаяся часть фолликулы разрастается, образует так называемое желтое тело (*corpus luteum*), представляющее собой своего рода железу внутренней секреции, которая сохраняется на протяжении беременности и продуцирует гормон прогестерон. Этот гормон обнаружен в 1928 г. В. М. Алленом (США), а строение его установлено А. Бутенандтом в 1934 г. частичным синтезом из стигмастерина.

Прогестерон, а также его физиологически активный метаболит 5α -прегнандиол препятствуют созреванию новых яйцеклеток; они вызывают изменения слизистой оболочки матки, подготавливая ее к имплантации оплодотворенной яйцеклетки, и предупреждают преждевременные роды.

Известен ряд синтетических аналогов прогестерона, проявляющих аналогичную активность. Характерным свойством этих лекарственных препаратов является способность оказывать терапевтическое действие при пероральном применении. Среди них следует в первую очередь назвать прегнин (этистерон), применяемый для прекращения патологических маточных кровотечений, норэтинодрел и местранол, входящие в состав пероральных контрацептивных средств и способные эффективно тормозить овуляцию.

Следует, однако, упомянуть, что бесконтрольное использование противозачаточных препаратов такого рода может вызвать ряд нежелательных последствий: заболевание диабетом, нарушения функций печени, изменение формулы крови.



Гормоны коры надпочечников (кортикоиды) — особая группа стероидных гормонов, имеющих прегнанный скелет. Факт их существования установлен в 1927—1930 гг. В последующие годы Е. К. Кендал (США, 1934—1937), О. Винтерштейнер (Германия, 1935—1937) и Т. Рейхштейн (Швейцария, 1935—1940) выделили и установили строение многих стероидных кортикоидов; среди них главными являются дезоксикортикостерон, кортизол, кортизон, кортикостерон. В 1953 г. С. А. Симпсон (Швейцария) из коры надпочечников выделил еще один высокоактивный кортикоид — альдостерон (электрокортин). К настоящему времени изучено около 40 природных кортикоидов.

Кортикоиды можно разделить на две большие группы. Первая участвует в регуляции углеводного обмена (глюкокортикоиды: кортизол, кортизон и др.), вторая регулирует водный и ионный обмен (минералокортикоиды: альдостерон, дезоксикортикостерон и др.). Кортикоиды крайне важны для жизнедеятельности человека и животных. После удаления надпочечников (адреноэктоми) животные погибают через несколько дней, а инъекция кортикоидных препаратов сохраняет им жизнь. Значительный вклад в исследование кортикоидов внес Д. Бартон.

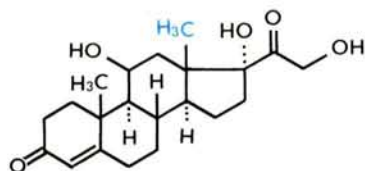
Нарушения функции коры надпочечников приводят к тяжелым заболеваниям: изменяется формула крови, развивается сахарный диабет, нарушаются обмен углеводов и отложение гликогена в печени.

Глюкокортикоиды обладают противовоспалительным, противошоковым, антиаллергическим действием. Для них характерна иммунодепрессивная активность, что важно при трансплантации органов с целью предупреждения их отторжения.

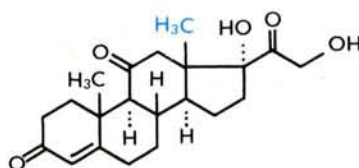
Кортикоиды широко используются при лечении бронхиальной астмы, экзем, болезни Аддисона, инфекционного гепатита, артритов, астении и других заболеваний. Их можно получать непосредственно из коркового слоя надпочечников крупного рогатого скота (около 100 мкг из одного животного) или синтетически. В частности, синтез кортизона осуществлен в 1948 г. Л. Сареттом (США).



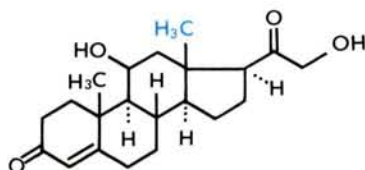
Бартон (Barton) Дерек Гаролд Ричард (р. 1918), английский химик. Окончил Королевский химический колледж в Лондоне (1940); с 1978 г. — директор Института химии природных веществ в Жиф-сюр-Ивет (Франция), с 1986 г. — в исследовательском центре Техасского университета (США). Основные работы посвящены органической химии и химии природных соединений. Создатель конформационного анализа. Открыл (1960) фотохимическую перегруппировку нитритов в нитрозосоединения и далее в оксимы (реакция Бартон), которая привела к простому синтезу альдостерона. Лауреат Нобелевской премии по химии (1969, совместно с О. Хасселем).



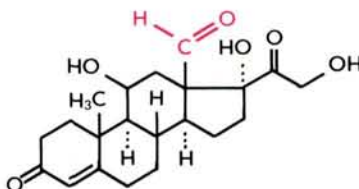
Кортизол



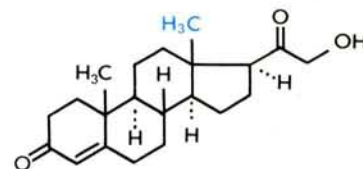
Кортизон



Кортикостерон

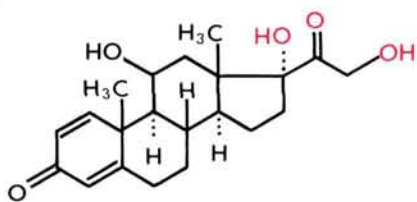


Альдостерон

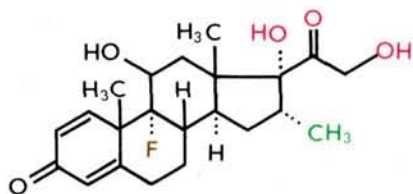


Дезоксикортикостерон

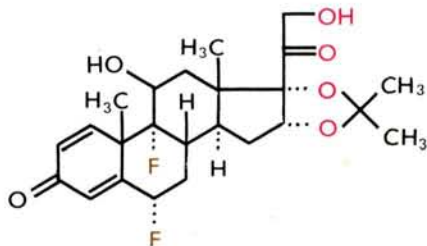
За последние 20—25 лет фармацевтическая промышленность освоила технологию получения различных кортикоидов из соласодина и диосгенина (см. с. 712—713) или родственных им природных соединений растительного происхождения, что позволило провести разнообразные модификации молекул кортикоидов и проверить биологическое действие полученных аналогов. В ряде случаев биологическая активность последних в сотни раз превышала активность природных соединений. Некоторые из аналогов нашли широкое применение в медицинской практике. Среди них следует упомянуть преднизолон, используемый при лечении полиартритов, нейродермитов, экземы; дексаметазон — противовоспалительный и противоаллергический препарат; синалар — препарат для лечения псориаза, воспалительных процессов кожи; локакортен,



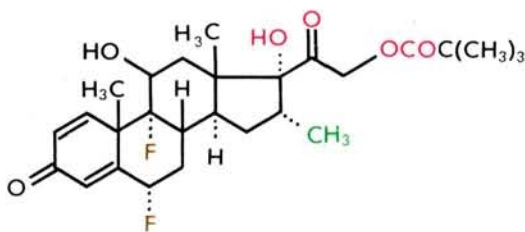
Преднизолон



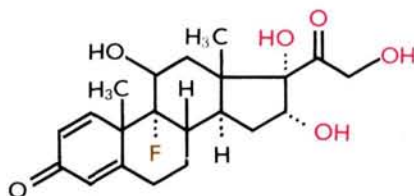
Дексаметазон



Синалар



Локакортен

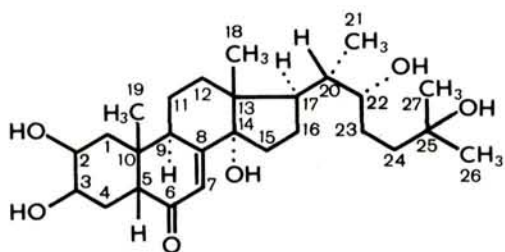


Триамцинолон

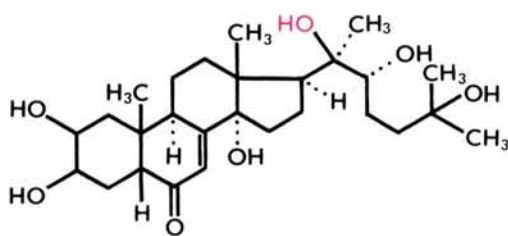
применяемый для лечения рожи и других дерматозов, триамцинолон — противовоспалительный и антиэкссудативный препарат и ряд других.

На примере этих модифицированных кортикоидов впервые показано, что введение атома фтора в молекулу природного соединения может привести к значительному повышению физиологической активности и устранению ряда побочных эффектов.

В 1954 г. А. Бутенандт и П. Карлсон выделили из коконов тутового шелкопряда стероидный гормон (α -экдизон), ответственный за линьку насекомого (25 мг из 500 кг коконов). Структура этого гормона, получившего название «экдизон» (от англ. ecdysis — линька), было окончательно установлено с помощью рентгеноструктурного анализа в 1965 г. Год спустя было показано, что этот гормон является родоначальником большой группы экдистероидов, контролирующей линьку членистоногих. Так, К. Наканиси выделил и установил строение другого гормона с аналогичной активностью — экдистерона (20-гидроксиэкдизона, или β -экдизона).



α -Экдизон



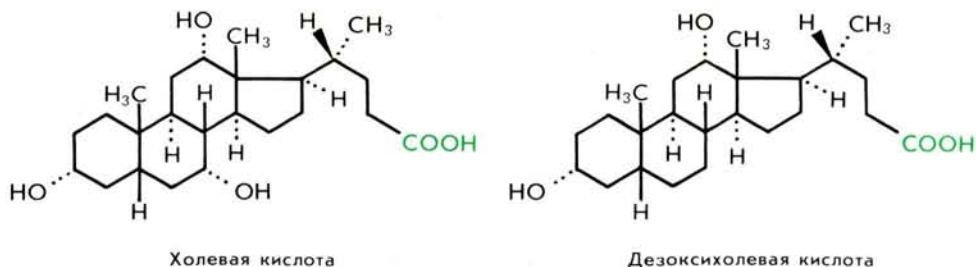
β -Экдизон (экдистерон)

Широкий поиск в других природных источниках привел к открытию поразительного факта: экдистероиды насекомых были найдены также в различных растениях и морских членистоногих. В соответствии с этим экдистероиды делят на две большие подгруппы: фито- и зооэкдистероиды, насчитывающие многие десятки соединений. Фитоэкдистероиды часто высокотоксичны для насекомых и вызывают у них метаморфоз, приводящий к появлению стерильных особей. В последние годы утвердилась точка зрения, что образование фитоэкдистероидов в растениях служит одним из способов их самозащиты от вредителей.

Содержание экдистероидов в растениях (например, в папоротнике, австралийском хвойном дереве *Podocarpus elatus* и ряде среднеазиатских растений) настолько высоко, что они могут быть получены для практического использования. Так, экдистерон, выделяемый из растений в количествах до нескольких килограммов, прошел уже широкие клинические испытания и вводится в медицинскую практику как сильный адаптоген.

Низкомолекулярные
биорегуляторы

Основной составной частью желчи, образующейся в печени животных и человека, являются натриевые соли желчных кислот. Среди них наиболее известны холевая, дезоксихолевая и гликохолевая кислоты.



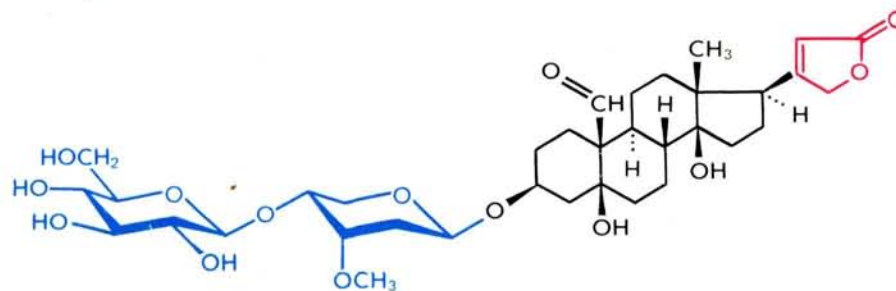
Виндаус [Windaus] Адольф Отто Рейнгольд (1876—1959), немецкий химик и биохимик. Образование получил в Берлинском и Фрейбургском университетах. Изучал структуру стероидов, установил строение желчных кислот и холестерина. Открыл образование витамина D из эргостерина. Лауреат Нобелевской премии по химии (1928).

Эти стероидные соединения обладают свойствами природных детергентов и могут переводить нерастворимые в воде вещества в растворимое или мелкодисперсное состояние, что способствует ускорению ресорбции жиров в кишечном тракте. Основным источником желчных кислот служит желчь крупного рогатого скота. Содержащаяся в ней холевая кислота является удобным исходным соединением для промышленного синтеза кортикоидов (например, кортизона). Натриевая соль дезоксихолевой кислоты вследствие своей уникальной способности давать с липидами, каротином и другими соединениями растворимые в воде комплексы (клатраты) нашла широкое применение в биохимических экспериментах.

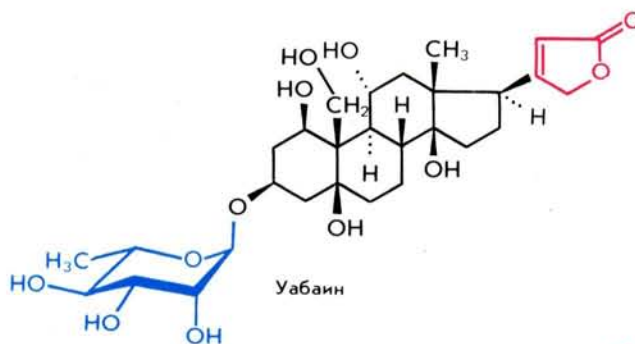
Сердечные гликозиды

Большая группа стероидных гликозидов растительного и животного происхождения объединена под общим названием — сердечно-активные, или кардиотонические, вещества. В малых концентрациях они нормализуют работу сердечной мышцы, а в больших дозах вызывают остановку сердца в систоле. Эти соединения содержатся

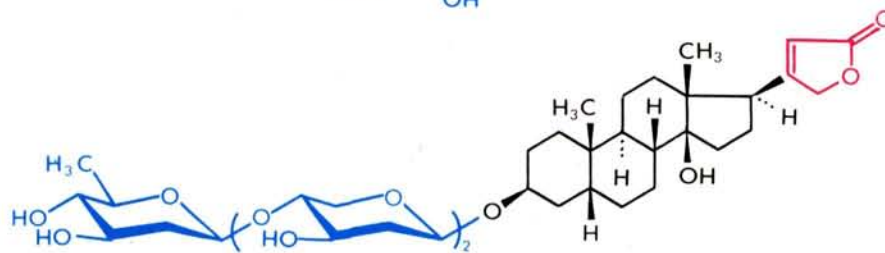
во многих растениях, распространенных по всему миру: в лютиковых (Ranunculaceae), норичковых (Scrophulariaceae), кутровых (Asteraceae), лилейных (Liliaceae), шелковице (Moraceae) и др. Ядовитые свойства некоторых растений известны давно: южно-африканские зулусы, например, использовали их в качестве яда для копий и стрел, а в средние века настойки пурпурной наперстянки (*Digitalis purpurea*) применяли для испытания «судом божьим».



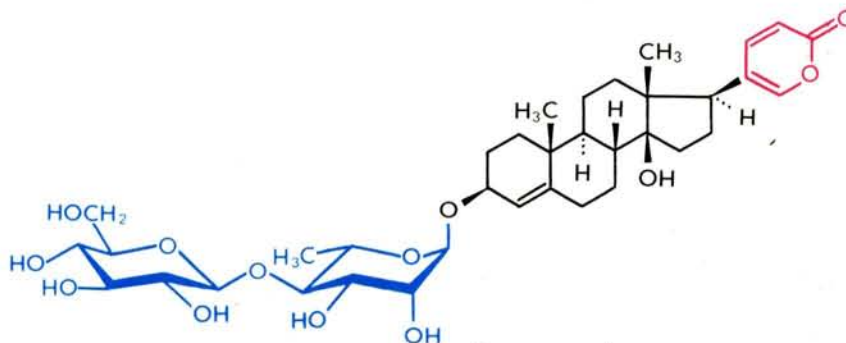
Строфантин



Убаин



Дигитоксин



Сцилларен А

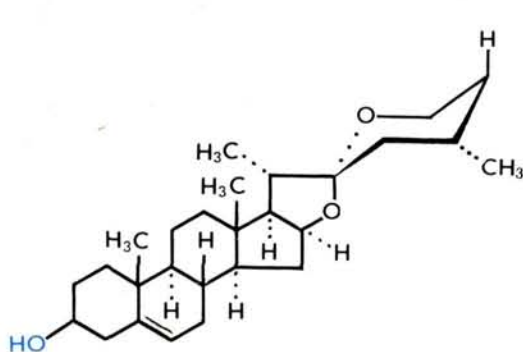
Выяснение строения сердечных гликозидов заняло около 30 лет (1910—1940), и наибольший вклад в решение этой проблемы внесли А. Виндаус, Т. Рейхштейн, Г. Килиани и А. Штолль.

Сердечные гликозиды представляют собой гликозилированные по гидроксилу в положении 3 ненасыщенные стероидные лактоны. Их агликоны содержат А/В и С/Д *цис*-сочлененные стероидные системы и пяти- (карденолиды) или шестичленные (буфадиенолиды) лактонные кольца, причем растительные буфадиенолиды структурно близки агликонам буфотоксинов (см. с. 763). В отличие от своих агликонов, которые обычно не намного менее токсичны, сердечные гликозиды концентрируются в сердечной мышце, и их содержание в ней в 10—40 раз выше, чем в других тканях организма.

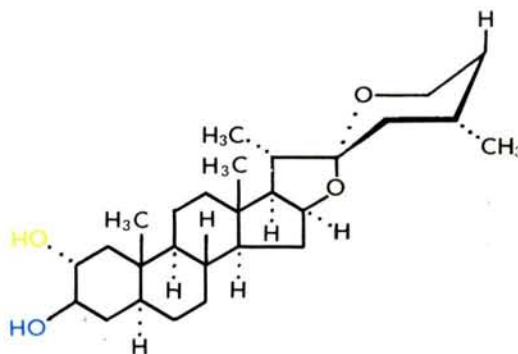
В качестве типичных представителей сердечных гликозидов с карденолидным агликоном можно назвать строфантин из различных видов строфанта (*Strophanthus*), дигитоксин из наперстянки пурпурной (*Digitalis purpurea*), а также уабаин из *S. gratus* и *Asokanthera ouabaio*, широко применяющийся и в нейрофизиологических исследованиях. Из сердечных гликозидов с буфадиенолидным агликоном следует упомянуть сцилларен А из морского лука (*Scilla maritima*), используемый для лечения сердечных и почечных заболеваний.

Стероидные сапонины

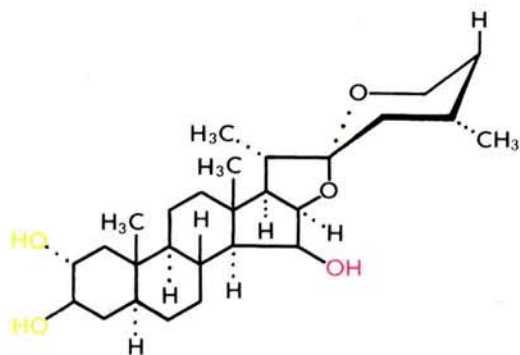
Ряд стероидных растительных гликозидов обладает свойствами сильных детергентов, образуя с водой устойчивую пену, в связи с чем они получили общее название — сапонины. Эти соединения используются в качестве пенообразователей (например, в огнетушителях). Наиболее распространенным является дигитонин (см. с. 561), его гликозид — сапогенин (дигитогенин) соединен с 5 остатками углеводов (2 глюкозы, 2 галактозы и ксилоза). Диосгенин и гитогенин, выделенные из дигиталисы, служат важными исходными соединениями для промышленного синтеза стероидных гормонов.



Диосгенин



Гитогенин

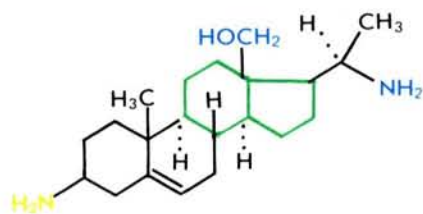


Дигитогенин

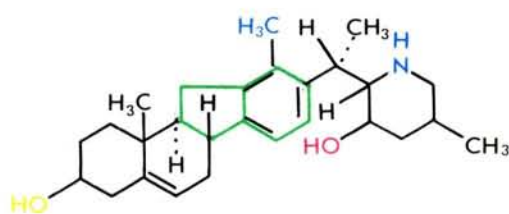
Стероидные алкалоиды

Представители этой группы (например, голарримин, вератрамин) в виде гликозидов встречаются в различных растениях. Особенно богаты ими растения семейства кутровых и пасленовых. В ряде стран культивируется птичий паслен (*Solanum aviculare*), содержащий значительные количества алкалоида соласодина, который является ценным сырьем для производства прогестерона и кортикостероидов.

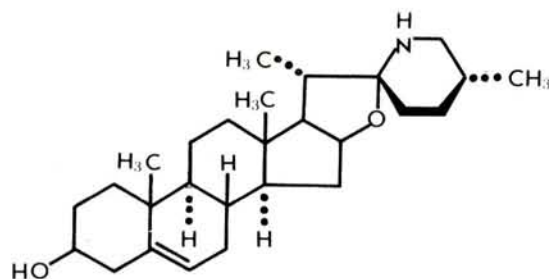
Недавно алкалоиды стероидной природы были обнаружены и в организмах животных (например, батрахотоксин, см. с. 761). К ним можно отнести и алкалоиды саламандры.



Голарримин



Вератрамин



Соласодин

Механизм действия стероидных гормонов

Хотя стероиды изучаются уже более полувека, механизм их биологического действия стал проясняться лишь в 80-х годах. Установлено, что они участвуют в регуляции биосинтеза белков на уровне транскрипции.

Образуясь в результате биосинтеза, стероидные гормоны позвоночных переносятся в крови с помощью специфических белков-переносчиков: транскортин (кортикостероиды), тестостеронсвязывающего глобулина (тестостерон и эстрадиол), специальных транспортных белков (прогестерон и кальцитриол) и т. п.

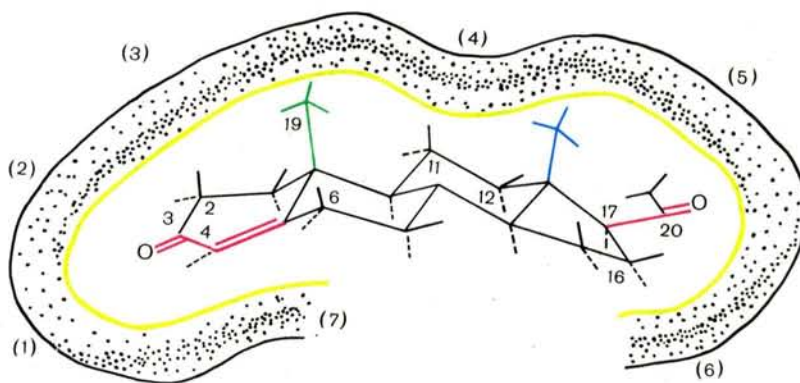
При взаимодействии с клеткой-мишенью стероидные гормоны, в отличие от пептидных гормонов, действующих на уровне мембран, входят внутрь клетки и в цитоплазме встречаются со своим специфическим рецептором.

Стероид-рецепторный комплекс, согласно У. Вестфалю и другим исследователям, стабилизируется за счет гидрофобных взаимодействий и водородных связей (рис. 359). Далее гормон-рецепторный комплекс проникает в ядро и связывается с хроматином, инициируя транскрипцию специфических генов. В последнее время в ряде лабораторий удалось выделить участки ДНК, содержащие области узнавания стероидных рецепторов (район промоторов), и определить их нуклеотидную последовательность.

Что касается самих рецепторов, то они представляют собой белки молекулярной массы 40 000—100 000 (клетка содержит до 10 000 рецепторов), которые связывают стероидный гормон с константой связывания порядка 10^{-10} M^{-1} и очень высокой специфичностью.

Образуемая в результате включения механизма транскрипции иРНК (точнее, ее предшественник) выходит в цитоплазму и стиму-

Рис. 359. Взаимодействие прогестеронсвязывающего белка и прогестерона: область гидрофобного и Н-донорного взаимодействия (1); области гидрофобных взаимодействий (2), (3), (6) и (7); области гидрофобных и Н-акцепторных взаимодействий (4) и (5).



лирует трансляцию специфических ферментов. Весь процесс называется индукцией ферментов с помощью стероидных гормонов. Этот механизм действия, впервые выясненный у насекомых П. Карлсоном в 1960 г., в настоящее время общепринят.

Регуляторы роста и развития растений

Низкомолекулярные продукты вторичного метаболизма растений длительное время рассматривались как балластные, ненужные для их жизнедеятельности вещества. Выделение и изучение их в XIX в. и в первой половине XX в. обуславливалось лишь тем, что они служили лекарственными и парфюмерными препаратами или просто таксономическими маркерами. Однако начиная с 30-х годов нашего столетия накоплен огромный фактический материал, указывающий на важную роль многих вторичных метаболитов как регуляторов роста и развития растительных организмов. Детальное их исследование не только открывает перспективу для понимания проблем эндогенной химической регуляции в целом, но и оказывает все возрастающее влияние на решение практических задач сельскохозяйственного производства.

Среди такого рода растительных биорегуляторов различают фитогормоны, природные стимуляторы и ингибиторы. К растительным гормонам, или фитогормонам, относятся ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и этилен. В отличие от многих других биологически активных соединений, фитогормоны — общие для всех растений биорегуляторы, которые синтезируются в активно делящихся клетках меристемы (верхушке побега, кончике корня, молодых листьях, семенах) и затем транспортируются в другие органы и ткани, где при низких концентрациях (10^{-5} — 10^{-11} М) осуществляют химический запуск физиологических программ. Существует четкая сбалансированность действия этих соединений в растительном организме, схематически показанная на рисунке 360. Молекулярные механизмы действия фитогормонов

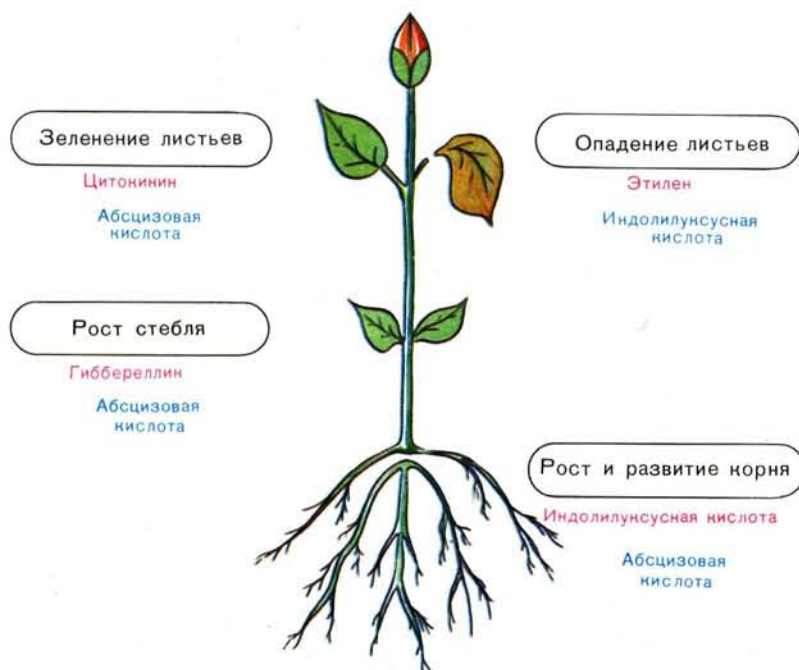


Рис. 360. Сбалансированное воздействие гормонов на отдельные процессы развития растения: красным цветом выделены стимулирующие, а синим — ингибирующие гормоны.

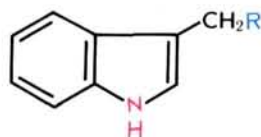


Дарвин (Darwin) Чарлз Роберт (1809—1882), английский естествоиспытатель, иностранный член Петербургской АН (1867). Окончил Кембриджский университет (1831); в 1831—1836 гг. совершил кругосветное путешествие на корабле «Бигл» в качестве натуралиста, все последующие годы из-за болезни жил в пригороде Лондона Дауне. Основные труды: «Происхождение видов путем естественного отбора» (1859), «Изменение домашних животных и культурных растений» (1868), «Происхождение человека и половой отбор» (1871). Изучил основные факторы эволюции органического мира, высказал гипотезу о происхождении человека от обезьяны.

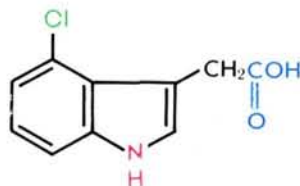
интенсивно изучаются в последние годы: по-видимому, аналогично другим гормонам, они действуют на уровне регуляции белкового синтеза, активности ферментов и транспорта через биологические мембраны.

Упоминание о химической регуляции морфогенеза у растений можно найти еще в работах Ч. Дарвина: в 1880 г. им было установлено, что в образовании фото- и геотропических изгибов корня (искривление под влиянием освещения или силы тяжести) каким-то образом принимают участие верхушка стебля и кончик корня. В то время не было возможности прямо доказать наличие в этих тканях специфических химических соединений, и лишь к 1935 г. было выяснено, что в них содержится индолилуксусная кислота, являющаяся регулятором роста. Термин «гормон роста» был предложен в 1925 г. Г. Зёдингом. Учение о природных регуляторах роста растений активно развивали Ю. Сакс, Ф. В. Вент и Н. Г. Холодный. В 30-е годы М. Х. Чайлахян разработал гормональную теорию развития растений и высказал предположение о существовании гормона цветения.

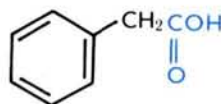
Индолилуксусная кислота является главным представителем **ауксинов** (от греч. *αύχων* — расту) — группы природных соединений, стимулирующих клеточное деление (митоз), корнеобразование, дыхание и синтез белка в растениях. Впервые она была выделена в 1931 г. Ф. Кёглем из мочи вегетарианцев и лишь позднее была обнаружена в растениях. Ф. Кёгель расшифровал и строение индолилуксусной кислоты. К настоящему времени из различных растений выделены также многочисленные производные индолилуксусной кислоты: амид и нитрил (цитрусовые), 3-индолилпировиноградная кислота (кукуруза), 3-индолилметанол и 3-индолилэтанол



3-Индолилуксусная кислота	R COOH
Амид 3-индолилуксусной кислоты	CONH_2
Нитрил 3-индолилуксусной кислоты	$\text{C}\equiv\text{N}$
3-Индолилпировиноградная кислота	COCOON
3-Индолилметанол	OH
3-Индолилэтанол	CH_2OH
3-Индолилпропионовая кислота	CH_2COOH
3-Индолилмасляная кислота	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$



4-Хлор-3-индолилуксусная кислота

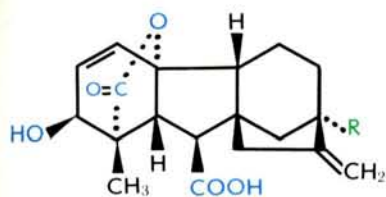


Фенилуксусная кислота

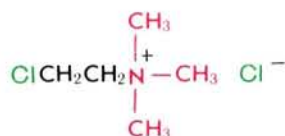
(огурцы), 3-индолилпропионовая, 3-индолилмасляная, 4-хлор-3-индолилуксусная кислоты и ряд других соединений. Весьма вероятно, что их биологическая активность связана с превращением в тканях растений в индолилуксусную кислоту, но наиболее вероятным ее биосинтетическим предшественником считается триптофан. Во многих растениях ауксином является фенилуксусная кислота или ее амид. Биологическая активность этих соединений существенно ниже, чем индолилуксусной кислоты, но содержание их в тканях значительно выше.

Ауксины и большое число их синтетических аналогов широко применяются в растениеводстве при пересадке деревьев, размножении посадочного материала путем черенкования и в других случаях.

Гиббереллины впервые обнаружены японским исследователем Е. Куросава в 1926 г. в культуре фитопатогенного гриба *Gibberella fujikuroi* как факторы, вызывающие резкое удлинение рисовых побегов («баканэ», или «бешеные всходы», «глупый рис»). В конце 50-х годов было доказано, что гиббереллины являются продуктами жизнедеятельности растений, и в настоящее время их известно более 90. Строение первого представителя гиббереллинов — гибберелловой кислоты, или гиббереллина А₃ (ГА₃), было установлено Б. Е. Кроссом и П. Дж. Кёртисом в 1954 г. Гиббереллины представляют собой тетрациклические моно-, ди- и трикарбоновые кислоты дитерпеноидной (С₁₉ и С₂₀) природы. Широкому и быстрому развитию исследований этой группы соединений в значительной мере способствовало применение метода хромато-масс-спектрометрии.



Гиббереллин А₃ R = OH
Гиббереллин А₇ R = H



Хлорхолинхлорид (хлорменват)



Кёгель [Kögl] Фриц (1897—1959), немецкий химик-органик. Окончил Высшую техническую школу в Мюнхене. Основное направление работ — химия природных соединений. Определил строение ряда природных красителей из грибов и бактерий. Выделил индолилуксусную кислоту (1934), определил ее структуру и показал, что она является гормоном роста растений. Открыл витамин Н (биотин).

Гиббереллины выделяют практически из всех частей растений; их запасные и транспортные формы представляют собой гликозиды и комплексы с белками. Место биосинтеза гиббереллинов — корни, верхушечные стеблевые почки и развивающиеся семена. Имеются данные, что гиббереллины синтезируются в побегах, затем транспортируются в корни, где трансформируются в активные формы, после чего снова возвращаются в побеги, где и проявляют стимулирующий эффект. Механизм их биологического действия исследован недостаточно. Известно лишь, что в зернах ячменя они изменяют свойства мембран и индуцируют синтез α-амилазы, а в тканях ряда других растений изменяют наборы РНК и функционирующих ферментов.

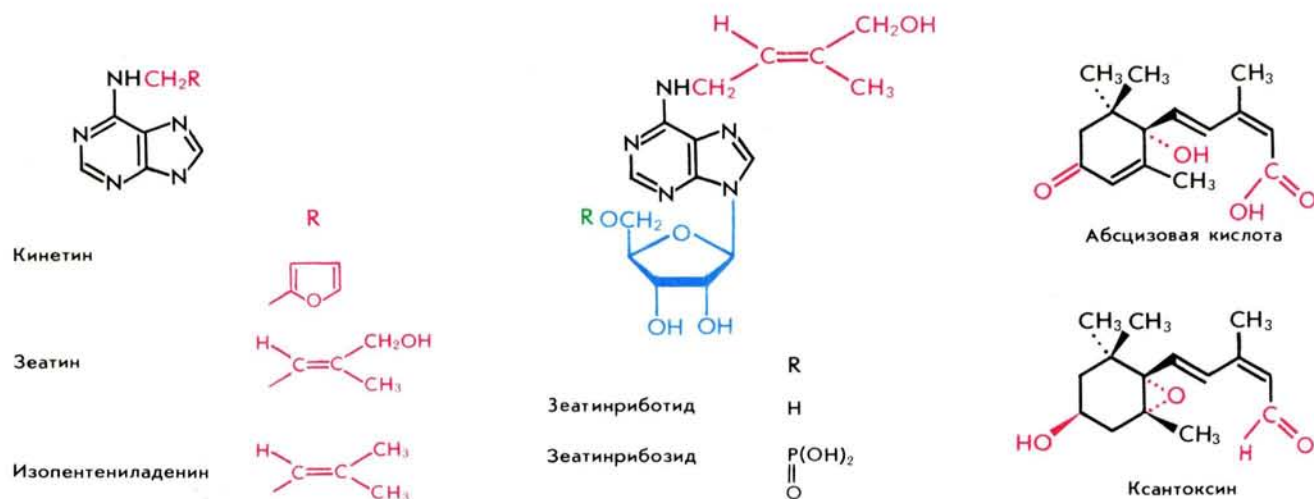
В основе практического использования гиббереллинов, среди которых наиболее активными являются гиббереллины ГА₃ и ГА₇, лежит способность стимулировать рост стебля, увеличивать размеры плодов, изменять форму и величину цветков, ускорять прорастание

семян, индуцировать партенокарпию (образование бессемянных плодов, в частности бескосточкового винограда) и т. п. Стимулирующий эффект гиббереллинов снимается ретардантами — синтетическими соединениями, нарушающими биосинтез гиббереллинов и тем самым вызывающими образование короткостебельных растений. Применение ретардантов имеет большое практическое значение в борьбе с полеганием злаков; одним из наиболее известных среди них является хлорхалинхлорид (ССС, хлормекват).

Цитокинины — вещества, стимулирующие клеточное деление (цитокнез), были открыты в период интенсивной разработки методов выращивания тканевых культур, когда выяснилось, что среды, помимо питательных веществ, должны содержать также некие дополнительные компоненты, такие, например, как дрожжевой экстракт или ростовой фактор из молока кокосовых орехов. В 1955 г. из препаратов ДНК дрожжевого экстракта и молока сельди Ф. Скугом было выделено в индивидуальном состоянии первое вещество с цитокининовой активностью — 6-(2-фурфуриметиламино)-пурин, или кинетин, а первый растительный цитокинин — зеатин был извлечен из кукурузы Д. С. Летамом в 1964 г. Другие природные представители этой группы фитогормонов также являются N₆-производными аденина, например изопентениладенин, а в растениях они часто встречаются в виде менее активных рибозидов и риботидов. Интересно, что цитокинины входят в качестве одной из составных частей в структуры некоторых транспортных РНК растений (сериновой и тирозиновой).

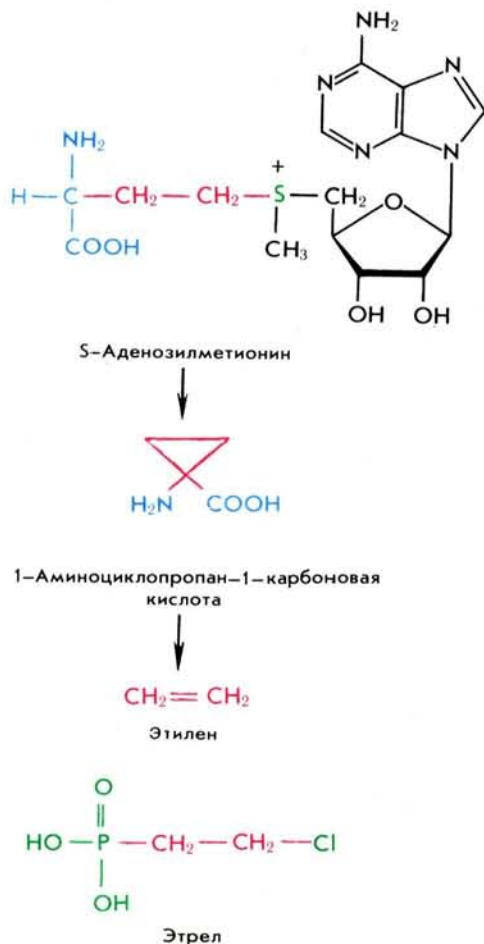
Цитокинины принимают участие в процессах роста и дифференциации клеток, поэтому их применяют для ускорения прорастания семян, стимуляции роста почек и плодов, задержки процессов увядания. Из исследований Д. Э. Фокса и О. Н. Кулаевой следует, что механизм их биологического действия связан, по-видимому, с усилением биосинтеза ДНК, РНК и белка, а также влиянием на функционирование биологических мембран.

Абсцизовая кислота (от англ. abscission — опадение, отнятие) — высокоспецифичный эндогенный ингибитор высших растений. Впервые выделена в 1963 г. из молодых плодов хлопчатника Ф. Т. Э. Эддикотом и К. Окумой, а спустя два года те же авторы определили ее строение как представителя сесквитерпеноидов. Из растений выделен ряд родственных соединений, среди которых наиболее известен ксантоксин, а также получены многочисленные синтетические аналоги абсцизовой кислоты.



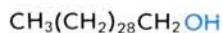
Абсцизовая кислота переводит растения в состояние покоя. При созревании плодов ее количество резко увеличивается (например, в созревающих грушах — в 10 раз); она вызывает опадение листьев и плодов, увядание. Важное свойство абсцизовой кислоты — влияние на устьичный аппарат растений: обработка растений абсцизовой кислотой (закрытие устьиц) помогает им противостоять засухе. С точки зрения физиологического действия абсцизовая кислота выступает как антагонист гиббереллинов, а цитокинины, в свою очередь, ослабляют ее действие.

Характерно, что всеми свойствами истинных фитогормонов обладает **этилен**. Он образуется главным образом во фруктах из S-аденозилметионина, причем этот процесс протекает через промежуточное образование 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и индуцируется индолилуксусной кислотой. Этилен регулирует старение различных органов растений, ускоряет опадение листьев, дозревание плодов, тормозит рост корней, побегов и потому используется на практике для ускорения дозревания фруктов и увеличения их сахаристости. Помимо этилена широко применяется также ряд синтетических соединений, способных разлагаться в растительных тканях с выделением этилена; наиболее известным среди них является хлорэтилфосоновая кислота, или этрел. Механизм биологического действия этилена, по-видимому, состоит во взаимодействии со специфическими белками клеточных мембран и в торможении биосинтеза индолилуксусной кислоты.

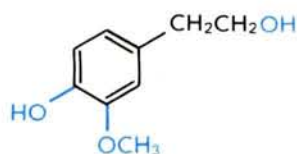


Недавно открыта новая группа фитогормонов олигосахаридной природы, названных олигосахаридами, изучение которых существенно расширило и изменило понимание некоторых аспектов проблемы химической регуляции растений. Олигосахариды, представляющие собой короткие, обычно семи-, восьмичленные разветвленные олигосахаридные цепочки из простых моносахаридных звеньев (например, глюкозы), оказались весьма специфичными регуляторами процессов роста, развития, размножения и включения различных защитных механизмов растений. В отличие от уже описанных фитогормонов, оказывающих многостороннее действие, каждый олигосахарид передает сигнал, регулирующий строго определенную функцию. Олигосахариды отщепляются от полисахаридов клеточной стенки растений под действием специфических ферментов самих растений или насекомых-вредителей, причем активаторами этих ферментов часто оказываются ауксины и гиббереллины.

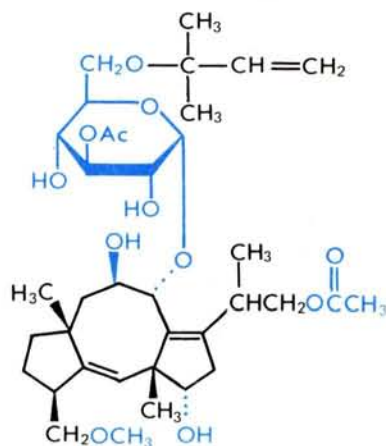
В последние годы из растений и паразитирующих на них микроорганизмов выделено много новых стимуляторов и ингибиторов роста. Их содержание в растительных организмах чрезвычайно мало, и поэтому успехи в выделении и выяснении строения этих соединений связаны прежде всего с использованием новейших физико-химических методов (высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии и т. п.). Поиски их активных синтетических аналогов, несомненно, приведут к новому поколению практически ценных препаратов.



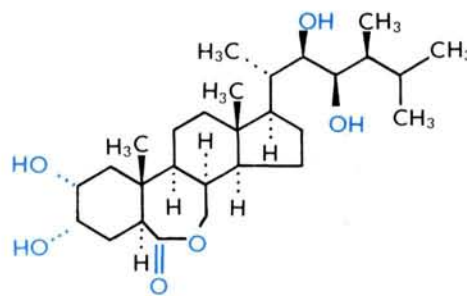
Триактанол



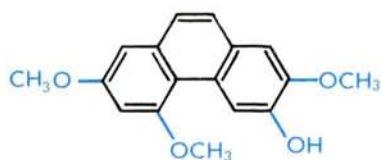
Дигидрокониферильный спирт



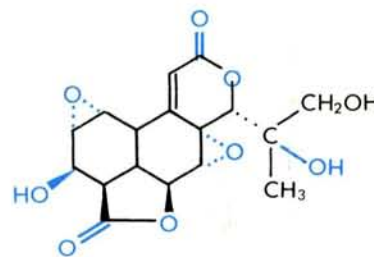
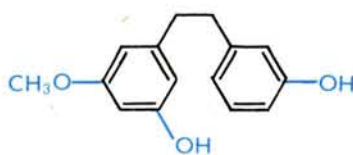
Фузикоцин



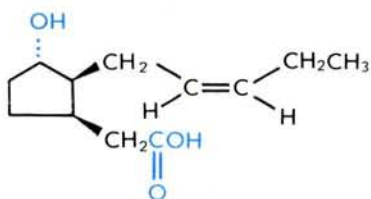
Брассинолид



Бататасины



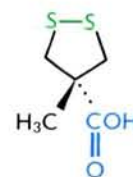
Подолактон



Кукурбиновая кислота



Вернолепин



Аспарагусовая кислота

К числу такого рода стимуляторов относится, например, триаконтанол — высший спирт, обнаруженный в люцерне. Интересно, что урожай томатов, ячменя, злаков или риса повышается на 10—40% при выращивании на участках, где до этого возделывалась люцерна, и аналогичный эффект дает внесение в почву измельченных растений люцерны. Сходное действие оказывают дигидрокониферилловый спирт и фузикоцин; последний выделен из культуры патогенных для персиков микроорганизмов и по активности напоминает гиббереллины. Стероидный полиол брассинолид, выделенный из пыльцы сурепки и семян рапса, в концентрациях 10^{-10} М является высокоэффективным стимулятором роста риса, рапса и чая.

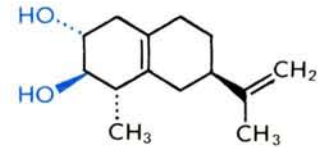
Среди многочисленных природных ингибиторов, которые в короткий срок приводят растения в состояние покоя и сдерживают принудительное прорастание семян, можно упомянуть бататасины, выделенные из зимующих почек диоскореи, а также подолактон и аналогичные дитерпеновые лактоны из различных видов *Podocarpus*, являющиеся ингибиторами митоза растительных клеток. Кроме того, весьма интересны аспарагусовая кислота, обнаруженная в спарже и близкая по структуре липоевой кислоте (см. с. 690), и вернолепин, не только ингибирующий формирование клеточной стенки, но и подавляющий рост опухолевых тканей. К этой же группе можно отнести кукурбиновую кислоту, подобную по строению простагландинам, и некоторые защитные вещества растений, обладающие высокой активностью по отношению к насекомым: антифиданты, фитозекдизоны, антиювенильные гормоны (прекоцены) и ряд аналогичных по действию соединений (см. с. 780).

Многие вторичные метаболиты растений (прежде всего фенольные вещества, флавоноиды, терпеноиды, кислоты) способны надежно защищать растения от поражения микроорганизмами, низшими грибами и вирусами. Собирая смолистые выделения почек (березы, тополя и некоторых других деревьев), пчелы, например, создают высокоэффективное средство защиты улья от микроорганизмов — прополис. В его состав входит большое число разнообразных соединений, каждое из которых не обладает высокой антимикробной активностью, но их комплекс обеспечивает стерильность улья.

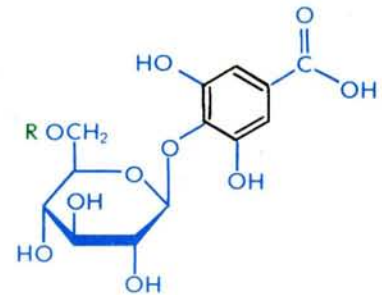
Некоторые защитные вещества синтезируются в растениях только в ответ на поражение, и их называют стрессовыми метаболитами, или фитоалексинами (от греч. *αλεξω* — защищаю). Систему выработки алексинов растениями иногда образно называют иммунной системой растений, и действительно, она играет важнейшую роль в природе и должна обязательно учитываться при селекции новых сортов сельскохозяйственных растений. В качестве примера можно упомянуть фитоалексин картофеля — ришитин. Выработка фитоалексина является конечным звеном довольно длинной цепи событий: вначале патогенный микроорганизм или пораженная клетка растений, вероятно, секретирует фермент, отщепляющий от клеточной стенки олигосахарин (см. с. 720), последний включает экспрессию набора генов, кодирующих ферменты, которые и осуществляют синтез фитоалексина.

Недавно стало известно (Г. Шильдкнехт, ФРГ) о новой группе регуляторов внутриклеточного давления (тургора), движений и деятельности устьичного аппарата растений. Эти вещества, названные тургоринами, представляют собой гликозиды галловой кислоты.

Фитогормоны оказывают определенное влияние и на формирование пола растений. Так, ауксины и этилен способствуют образованию женских цветков, а гиббереллины (за немногим исключением) — мужских. Проблема детерминации пола у растений относится к сравнительно мало изученным вопросам биологии. Вместе с тем ее исследование имеет важное практическое значение, в первую очередь для решения задач селекции.



Ришитин

Тургорины (R = H или SO₃H)

Антибиотики

Случаи антагонизма, т. е. угнетения развития одного микроорганизма другим (и соответствующий этому явлению термин «антибиоз»), были хорошо известны еще в прошлом веке. Однако термин «антибиотик» был введен З. А. Ваксманом лишь в 1942 г., а широкое развитие химии, биохимии, биологии и медицинского применения антибиотиков началось после второй мировой войны.

Антибиотиками в настоящее время называют природные вещества (как правило, микробного, но также растительного и животного происхождения) и продукты их химической модификации, способные в низких концентрациях (10^{-3} — 10^2 мкг/мл) подавлять развитие бактерий, низших грибов, простейших, вирусов или клеток злокачественных опухолей.

За последние 40 лет применение антибиотиков в медицине привело к практически полному искоренению губительных эпидемий и пандемий (например, чумы или холеры), в огромной мере снизило смертность при хирургических вмешательствах, родах, таких инфекционных заболеваниях, как туберкулез, менингит, сепсис, пневмония и др., причем не только в развитых странах, но и в большинстве развивающихся стран Азии, Африки и Латинской Америки. Это, в свою очередь, привело к радикальному снижению детской смертности, продлению средней продолжительности жизни.

Исследование антибиотиков оказало большое влияние и на собственно науку о живом. Изучение механизмов действия антибиотиков показало, что они являются тонкими инструментами, способными избирательно влиять на функционирование тех или иных систем клетки. С их помощью удалось лучше понять строение и функцию клеточных мишеней антибиотиков, что во многом определило сегодняшние успехи физико-химической биологии.

Исторический очерк. Еще в трудах Авиценны рекомендовалось использовать плесень при лечении гнойных заболеваний. Однако идея о борьбе за существование в мире микроорганизмов принадлежит Л. Пастеру, который в 1862—1868 гг. доказал факт гибели

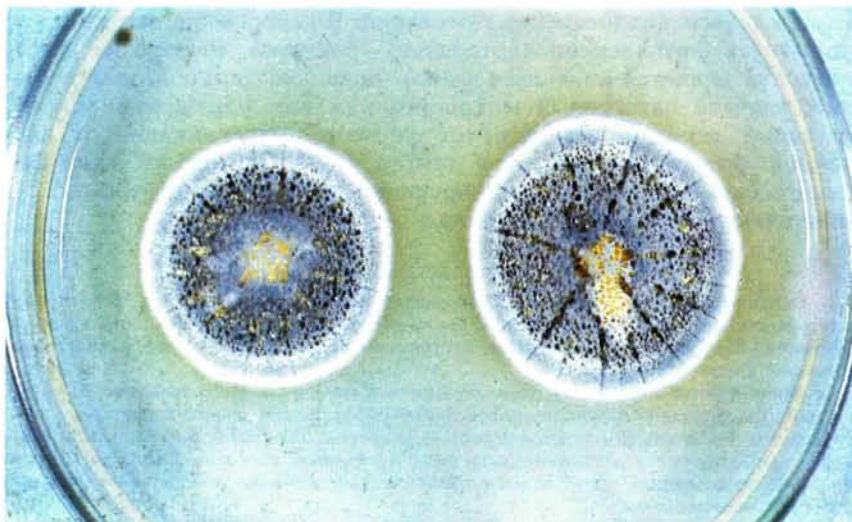


Рис. 361. Колонии пенициллов: слева — *Penicillium notatum*; справа — *Penicillium chrysogenum*.

талочек сибирской язвы в присутствии гнилостных микробов. В 1871 г. русские врачи В. А. Манассеин и А. Г. Полотебнов, изучавшие зеленую плесень *Penicillium*, предложили использовать ее для течения инфицированных ран, но тогда эти работы не получили должной оценки. В наиболее законченной форме концепция бактериотерапии сформулирована И. И. Мечниковым; в частности, он использовал молочнокислые бактерии (лактобациллин) для подавления гнилостных бактерий в кишечнике человека.

Главная заслуга в открытии первого антибиотика — пеницилина (1928) принадлежит британскому ученому А. Флемингу, который заметил, что плесневый гриб *Penicillium notatum* вызывает застворение (лизис) колоний *Staphylococcus aureus*. Однако в течение последующих 10 лет прогресс в изучении пенициллина, который оказался очень неустойчивым и продуцировался грибом в незначительных количествах, был довольно медленным. Вторая мировая война, стимулировавшая поиск безопасного антибактериального вещества для обработки глубоких ран, заставила ускорить эти исследования. Х. Флори и Э. Чейн (Великобритания) получили в 1940 г. левоциклический, содержащий около 1% антибиотика, но высокоактивный препарат пенициллина и провели его широкие клинические испытания. Позднее в результате объединенных усилий 39 лабораторий Великобритании и США были обнаружены приблизительно в 1000 раз более производительные штаммы *P. notatum* и *P. chrysogenum* (рис. 361), разработаны методы их выращивания, а также выделения и медицинского применения пеницилинов. Аналогичные исследования были проведены в годы войны и в СССР З. В. Ермольевой и сотр. Структурное изучение пеницилинов завершилось в 1945 г. установлением с помощью химических методов и рентгеноструктурного анализа формулы бензилпенициллина и яда других антибиотиков этой группы (Р. Вудворд, Д. Ходжкин, П. Робинсон).

Позднее изучение антибиотиков стало развиваться все возрастающими темпами. Большой вклад в эту область внес З. А. Ваксман. Он не только выделил и очистил такие важнейшие антибиотики, как актиномицин, стрептотрицин, стрептомицин, но и разработал методы скрининга и испытания антибиотиков, широко применявшиеся вплоть до последнего времени. В 1948—1950 гг. открыты клорамфеникол и тетрациклины, в 1952—1954 гг. ряд полиеновых



Ваксман (Waksman) Зельман Абрахам (1888—1973), американский микробиолог и химик, родился в России. Окончил Рутгерский университет (1915, США), с 1949 г. — директор Института микробиологии при этом университете. Выделил и очистил актиномицин (1940), стрептотрицин (1942), открыл стрептомицин (1944), неомицин (1948), кандицидин и многие другие антибиотики. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1952).

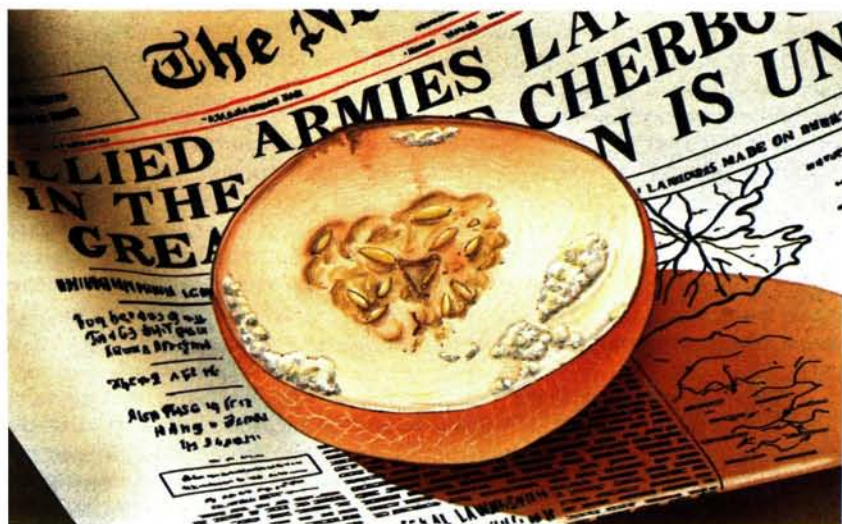


Рис. 362. Заплесневевшая дыня, из которой был выделен в США высокопроизводительный продуцент пеницилина (в газете, на которой она лежит, сообщается об открытии второго фронта).

и все основные макролидные антибиотики, а в 60-х годах стали известны почти все типы основных практически важных антибиотиков. В 1950 г. было описано около 150, к 1960 г.— около 1200 и к 1970 г.— более 2000 антибиотиков. В настоящее время поиск и выделение новых антибиотиков несколько замедлились, хотя по-прежнему за год описывается более 50 новых веществ. Однако немногие среди них находят практическое применение. Сейчас в медицине широко используется, по-видимому, от 50 до 100 антибиотиков, и основную долю среди них (до 60—65% по стоимости на международном рынке) продолжают составлять пенициллины и цефалоспорины.

В биохимических исследованиях основное внимание уделяется сегодня изучению механизмов действия и микробиологической инактивации применяемых антибиотиков в связи со все более широким распространением резистентных штаммов патогенных микроорганизмов. На основе этих знаний химики создают синтетические и полусинтетические аналоги и производные известных веществ, обладающие большей активностью и устойчивостью.

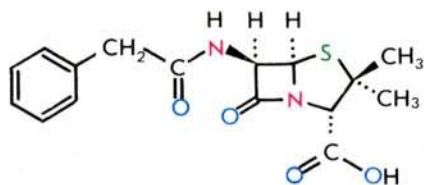
По механизму действия антибиотики можно разделить на 4 основных типа: ингибиторы синтеза бактериальной клеточной стенки, ингибиторы матричного (рибосомального) синтеза белка, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот и ингибиторы функционирования цитоплазматической мембраны.

Пенициллины, цефалоспорины и родственные антибиотики

Пенициллины обладают широким спектром антибактериального действия, проявляя как бактериостатическую, так и бактерицидную активность в отношении многих грамположительных микроорганизмов (стафилококков, пневмококков, стрептококков), некоторых грамотрицательных кокков (гонококков, менингококков), палочек сибирской язвы, клостридий, спирохет и некоторых грибов. Широкое медицинское применение пенициллинов связано с их относительно низкой токсичностью для теплокровных, хотя в ряде случаев эти антибиотики вызывают аллергические заболевания и анафилактический шок.

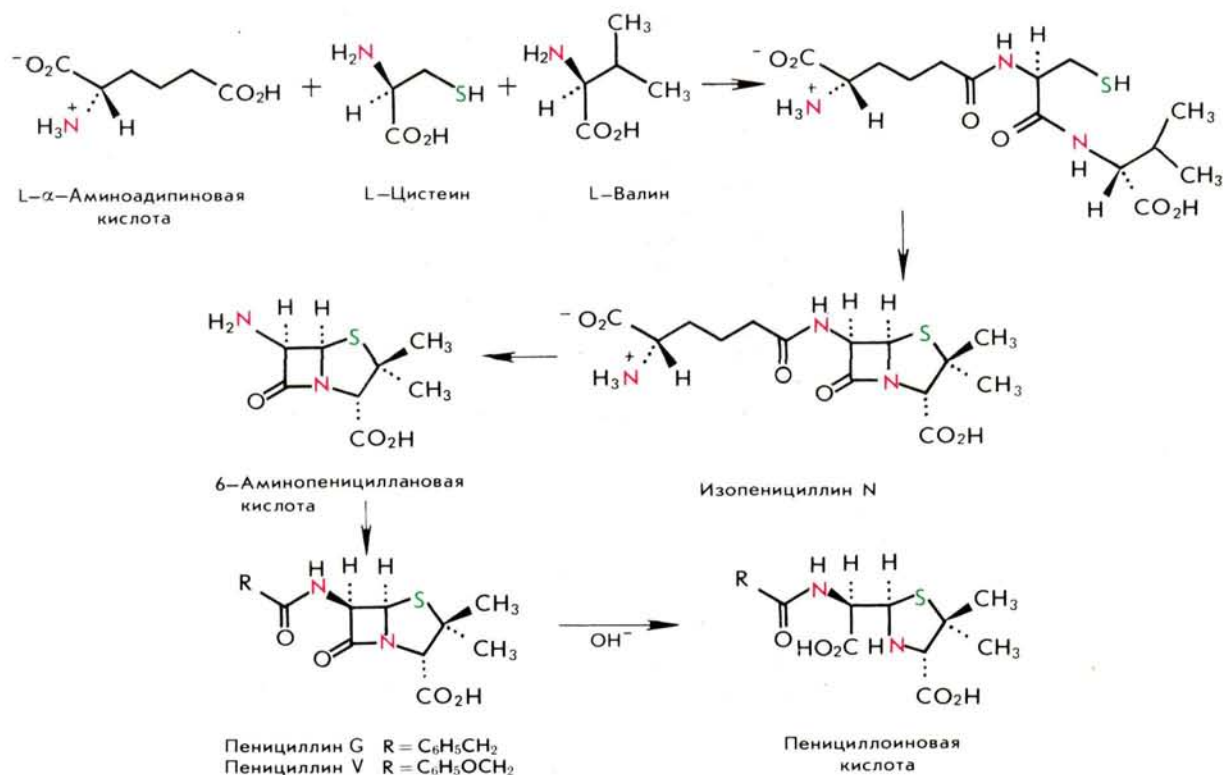
Молекула пенициллина содержит β -лактам-тиазолидиновую бициклическую систему пенама и имеет строго необходимую для проявления биологической активности конфигурацию. Биосинтез пенициллинов протекает следующим образом. Конденсация L- α -аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина с одновременным обращением конфигурации последнего приводит к трипептиду; дальнейшее замыкание β -лактамного и тиазолидинового колец дает изопенициллин N, в результате гидролиза которого под действием пенициллинацилазы образуется 6-аминопенициллановая кислота.

Прямая ферментация последней в присутствии фенилуксусной кислоты приводит к образованию пенициллина G (бензилпенициллина), а в присутствии феноксиуксусной кислоты образуется пенициллин V (феноксиметилпенициллин); оба антибиотика широко применялись в течение многих лет.



Пенициллин G
(бензилпенициллин)

Пенициллины — довольно нестабильные вещества. В щелочной среде, например, они быстро претерпевают расщепление β -лактамного кольца с образованием биологически неактивных пенициллоиновых кислот; эта же реакция протекает при действии β -лактамаз, устойчивых к пенициллинам штаммов микроорганизмов.



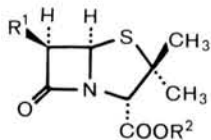
Проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам является весьма актуальной. Резистентность может быть вызвана, например, отсутствием у микроорганизма биохимической мишени антибиотика — тогда обычно говорят о его невосприимчивости. Другой фактор заключается в изменении проницаемости клеточной стенки для антибиотика. Основной же, наиболее распространенный путь инактивации антибиотиков состоит в их химической модификации специфическими ферментами устойчивых микроорганизмов: пептидазами, гидролизующими пептидные связи (например, β -лактамазами), а также ацетилтрансферазами, фосфотрансферазами и аденилтрансферазами, инактивирующими антибиотики путем ацилирования или алкилирования. Выработка устойчивости микроорганизма к антибиотику происходит путем мутаций и последующего отбора устойчивых штаммов. При этом скорость создания резистентности увеличивается за счет передачи генетической информации от устойчивых клеток к чувствительным посредством трансдукции (переноса фрагментов ДНК с помощью фагов). Более распространенной является внехромосомная устойчивость, связанная с R-факторами (плазмидами) (см. с. 410), которыми клетки могут обмениваться путем конъюгации — прямого переноса предварительно реплицированных плазмид через временно образующийся в их стенках канал. Следует отметить, что изучение этого механизма явилось важнейшей предпосылкой появления современной геной инженерии (см. с. 426).

В связи с распространением резистентных штаммов микроорганизмов пенициллины G и V в 70-х годах утратили свое практическое значение. К этому времени были разработаны методы ферментативного и химического расщепления бензилпенициллина до 6-амино-

пенициллановой кислоты. Путем ее ацилирования было получено значительное число различных полусинтетических пенициллинов, имеющих бóльшую активность и устойчивость к β -лактазам и более широкий спектр действия. Некоторые из наиболее практически важных пенициллинов приведены в таблице 26.

Таблица 26.

Практически важные пенициллины

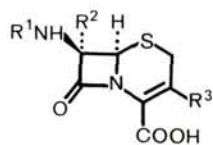


Название	R ¹	R ²
Пенициллин G	$C_6H_5CH_2CONH$	H
Пенициллин V	$C_6H_5OCH_2CONH$	H
Ампициллин	$\begin{array}{c} NH_2 \\ \\ C_6H_5 - C - CONH \\ \\ H \end{array}$	H
Пивампициллин	$\begin{array}{c} NH_2 \\ \\ C_6H_5 - C - CONH \\ \\ H \end{array}$	$(CH_3)_3CCOOCH_2$
Диклосациллин		H
Пиперациллин		H
Мециллиам		H
Пивмециллиам		$(CH_3)_3CCOOCH_2$

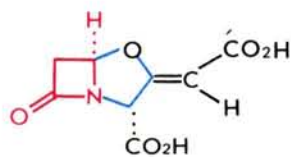
В 1961 г. из экстракта микроорганизма *Cephalosporium acremonium* E. Абрахам и Г. Ньютон наряду с пеницилинами N выделили новый антибиотик — *цефалоспорин С* (табл. 27). Этот антибиотик не нашел широкого применения, но на его основе был синтезирован ряд производных, обладающих активностью по отношению к рези-

Таблица 27.

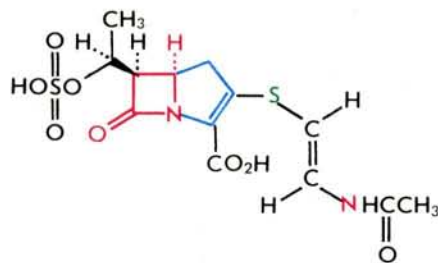
Важнейшие цефалоспорины и цефамицины



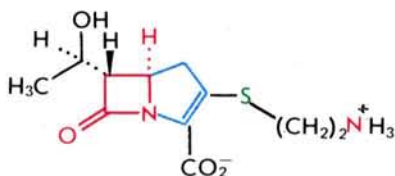
Название	R ¹	R ²	R ³
Цефалоспорин С		H	
Цефазолин		H	
Цефазетрил	$N \equiv CCH_2CO$	H	
Цефаклор		H	Cl
Цефамицин С		OCH ₃	
Цефакситин		OCH ₃	



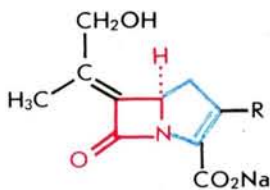
Клавулановая кислота



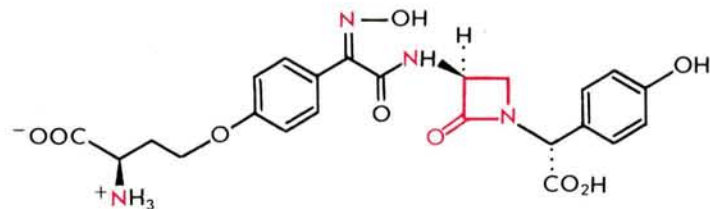
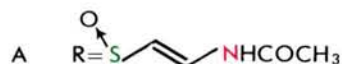
Оливановая кислота



Тиенамицин



Аспареномицины



Нокардицин А



Сульфазецин

стентным для пенициллинов штаммам грамположительных и «трудных» грамотрицательных бактерий; среди них наиболее интересны цефазолин, цефакетрил и цефаклор.

В первой половине 70-х годов из актиномицетов рода *Streptomyces* выделены 7-метоксицефалоспорины, цефамицины, наиболее ценными из которых являются цефамицин С и его производное — цефакситин.

Кроме ставших уже классическими β -лактамов антибиотиков, содержащих бициклические системы пенама и цефема, в середине 70-х годов в результате использования для скрининга суперчувствительных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *E. coli* был обнаружен ряд принципиально новых антибиотиков этого типа. А. Браун выделил клавулановую и оливановую кислоты, а Д. Кахан из *S. cattleya* — новый высокоактивный антибиотик широкого спектра действия тиенамицин, имеющий, как и оливановая кислота, вне цикла атом серы и противоположную пенициллином хиральность центра б. Японские исследователи описали высокоактивные антибиотики аспареномицины А — С из *S. tokunonensis*.

Наконец, выяснилось, что и наличие бициклической системы не обязательно для проявления β -лактамами соединениями биологической активности: так, в 1975 г. был описан антибиотик нокардицин А и в 1981 г. — монобактамы, например сульфазецин.

Механизм действия β -лактамов антибиотиков состоит в подавлении синтеза бактериальной клеточной стенки.

Клеточная стенка бактерий — это жесткая структура, предохраняющая их от разрушения высоким внутренним осмотическим давлением. Ее основным компонентом является пептидогликан (муреин) (см. с. 508), многослойный у грамположительных и однослойный у грамотрицательных бактерий. Формально грамположительные и грамотрицательные бактерии отличаются друг от друга различным окрашиванием по методике немецкого врача прошлого века Грама. Фактически же они отличаются в основном структурой клеточной стенки, более плотной и сложной у грамотрицательных бактерий. Первая стадия биосинтеза пептидогликана, механизм которого выяснен главным образом работами Дж. Стрёминджера и Д. Типпера, начинается с построения моносахаридных компонентов, производных N-ацетилглюкозамина (NAG) и его 3-гликолильного эфира — N-ацетилмурамовой кислоты (NAM). Затем к уридиндифосфомурамовой кислоте (UDP-NAM) достраивается 5 аминокислотных остатков, причем три из них имеют D-конфигурацию, два последних вводятся в виде дипептида D-Ala-D-Ala, а D-аланин образуется, в свою очередь, путем рацемизации L-аланина. На второй стадии действием связанного с мембраной ундекапре-



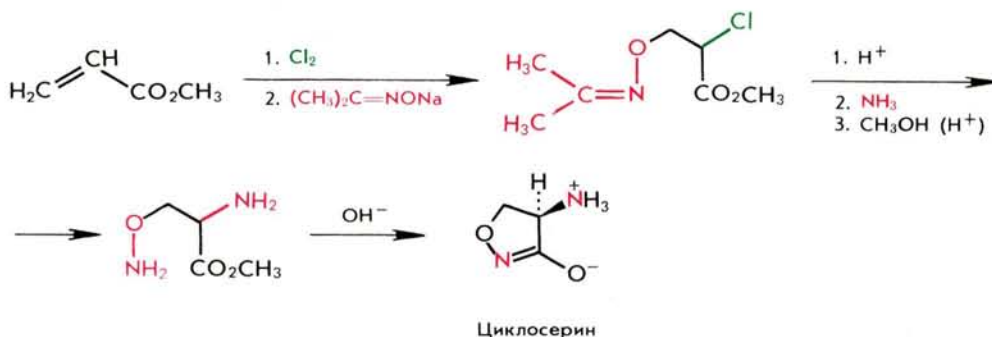
Стрёминджер [Strominger] Джек (р. 1925), американский биохимик. Образование получил в Гарвардском и Йельском университетах, с 1968 г. — профессор Гарвардского университета. Известен работами в области химии углеводов и иммунохимии. Изучал структуру и биосинтез пептидогликана клеточной стенки бактерий, внес большой вклад в исследование структуры антигенов гистосовместимости человека.

нилфосфата концевой фосфат образовавшегося пептапептида (а) в случае *S. aureus* или (б) у *E. coli* алкилируется и благодаря этому вводится в мембрану. Затем происходит дальнейшее гликозилирование UDP-N-ацетилглюкозамино (UDP-NAG), а в случае *S. aureus* также амидирование α -COOH остатка глутаминовой кислоты и достраивание к ϵ -NH₂ лизина пяти глициновых остатков. На этой же стадии ферменты частично гидролизуют готовый пептидогликан, что делает возможным переход к третьей стадии, т. е. встраиванию в него дисахаридного звена с одновременным отщеплением ундекапренилфосфата и образованию поперечных сшивок, которое происходит с отщеплением от пента- или декапептида одного из остатков D-аланина. В результате образуется трехмерная структура пептидогликана, например (в) у *S. aureus* и (г) у *E. coli*. Заключительные стадии синтеза пептидогликана клеточной стенки бактерий связаны с действием двух ферментов: карбоксипептидазы и транспептидазы. Установлено, что β -лактамы антибиотики в первую очередь необратимо ингибируют транспептидазу, по-видимому, благодаря их структурному соответствию одной из конформаций фрагмента — D-Ala-D-AlaOH. В результате образуется ослабленная клеточная стенка, которая затем разрушается после увеличения массы клетки.

Циклосерин

Этот антибиотик был впервые выделен в 1955 г. из *Streptomyces orchidaceus* и некоторых других актиномицетов. Он обладает довольно широким антибактериальным спектром и относительно низкой токсичностью для животных, но у людей часто вызывает нарушения деятельности центральной нервной системы. Поэтому циклосерин применяется в клинике довольно редко и только для лечения тяжелых и хронических форм туберкулеза легких, когда употребление других препаратов оказывается безуспешным.

Строение циклосерина установлено химическими методами и подтверждено рентгеноструктурным анализом. Один из первых синтезов циклосерина осуществлен в 1956 г. Н. К. Кочетковым, М. Я. Карпейским и Р. М. Хомутовым.



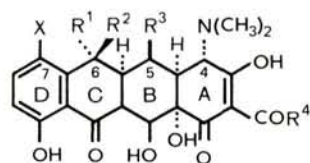
В настоящее время доказано, что циклосерин подавляет активность двух ферментов, участвующих в синтезе пептидогликана клеточной стенки — аланинацемазы и D-аланил-D-аланинсинтетазы.

Тетрациклиновые антибиотики занимают второе место после β -лактамов по широте клинического применения. Они высокоактивны против грамположительных и большинства грамотрицательных бактерий, риккетсий и микоплазмы и применяются для борьбы с пневмонией, дизентерией, коклюшем, гонореей, бруцеллезом, туляремией, сыпным и возвратным тифом, холециститом, менингитом и другими инфекционными заболеваниями, а также гнойными осложнениями в хирургии.

Первый тетрациклиновый антибиотик хлортетрациклин (ауреомицин) выделен Б. Даггером в 1948 г. из *Streptomyces aureofaciens*, в 1950 г. описан окситетрациклин (террамицин) из *S. rimosus*, а позднее получен (как каталитическим восстановлением хлортетрациклина, так и биосинтезом) тетрациклин и остальные 6 природных тетрациклинов (табл. 28).

Важнейшие тетрациклины

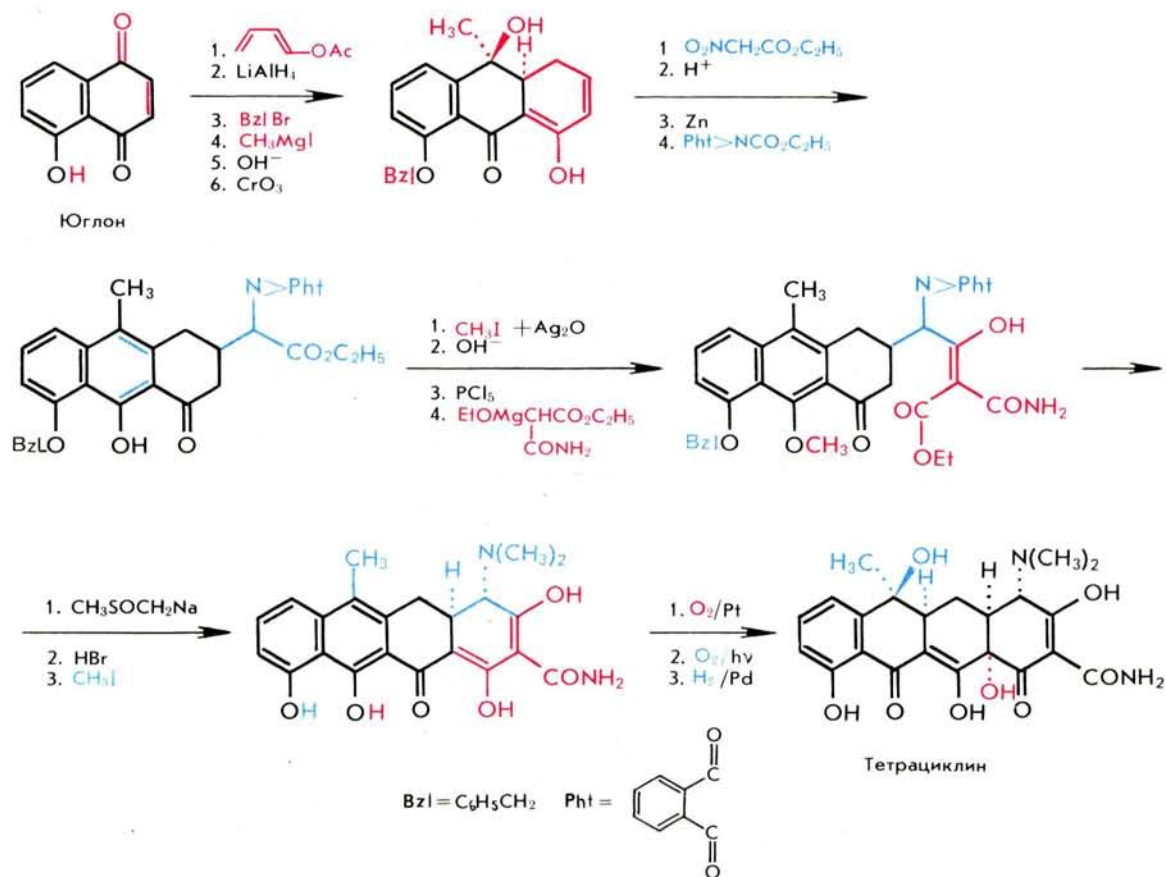
Таблица 28.



Название	X	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Природные тетрациклины					
Тетрациклин	H	CH ₃	OH	H	NH ₂
Хлортетрациклин (ауреомицин)	Cl	CH ₃	OH	H	NH ₂
Окситетрациклин (террамицин)	H	CH ₃	OH	OH	NH ₂
7-Бромтетрациклин	Br	CH ₃	OH	H	NH ₂
6-Деметилтетрациклин	H	H	OH	H	NH ₂
7-Хлор-6-деметилтетрациклин	Cl	H	OH	H	NH ₂
2-Декарбоксамидо-2-ацетилтетрациклин	H	CH ₃	OH	H	CH ₃
7-Хлор-2-декарбоксамидо-2-ацетилтетрациклин	Cl	CH ₃	OH	H	CH ₃
5-Окси-2-декарбоксамидо-2-ацетилтетрациклин	H	CH ₃	OH	OH	CH ₃
Полусинтетические тетрациклины					
Ролитетрациклин	H	CH ₃	OH	H	NHCH ₂ N 
Метациклин	H	CH ₂	H	H	NH ₂
Миноциклин	N(CH ₃) ₂	H	H	H	NH ₂

В отличие от β -лактамовых антибиотиков, поиск полусинтетических аналогов тетрациклинов оказался малопродуктивным, и в настоящее время ограниченное применение находят только некоторые соединения, из них наиболее интересен миноциклин (табл. 28).

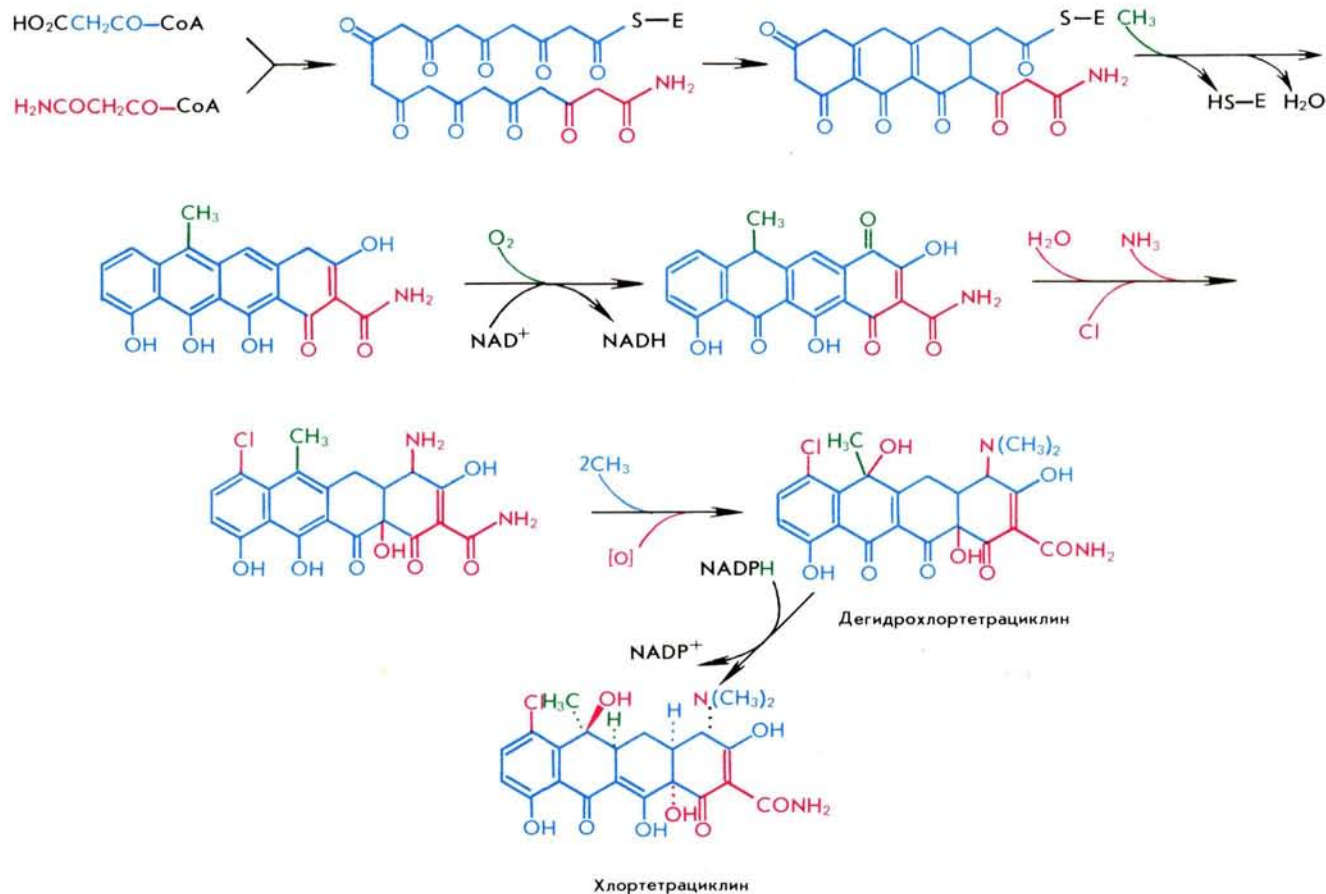
Строение первых тетрациклинов — ауреомицина и тетрациклина установлено в 1952 г. в результате сложных химических исследований, выполненных большой группой американских ученых во главе с Р. Б. Вудвордом. Позднее полная стереохимия этих антибиотиков и подтверждение их строения получены рентгеноструктурным анализом.



Усилия многих химиков были направлены на осуществление полного синтеза тетрациклинов. Первый синтез тетрациклина выполнен в СССР под руководством М. М. Шемякина и М. Н. Колосова в 1967 г. Исходным веществом послужил юглон, превращенный диеновой конденсацией и дальнейшей модификацией за 6 стадий в диендиолон. Конденсация последнего с нитроуксусным эфиром, дегидратация, восстановление и защита аминогруппы привели к соответствующему эфиру, который после метилирования фенольного гидроксила и омыления был ацилирован. После циклизации полученного соединения, снятия защитных групп, метилирования, последующих каталитического и фотохимического окисления и гидрирования образовался рацемический тетрациклин.

Механизм биосинтеза тетрациклинов установлен благодаря исследованиям групп Д. Маккоррика (США) и З. Ванека (ЧССР). В соответствии со схемой З. Ванека биосинтез хлортетрациклина, как и в случае многих других фенольных соединений, начинается с образования поликететида из малонил-СoА и стартерного малонамоил-СoА, причем последний, в свою очередь, вероятно, образуется из аспарагина.

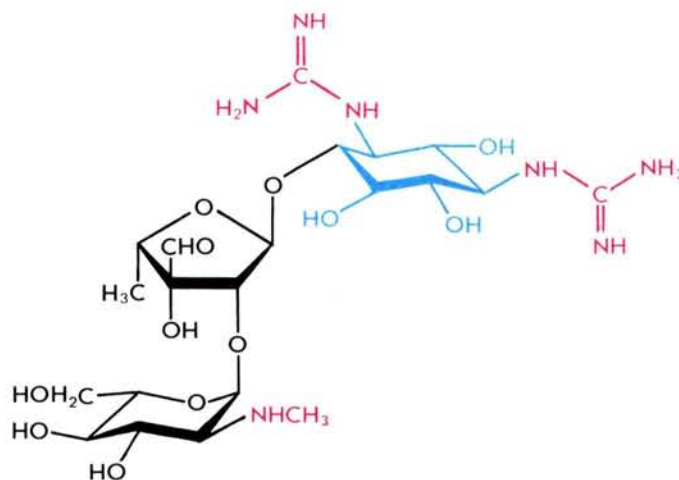
Циклизация поликететида до трициклического амида, дальнейшее метилирование последнего с участием S-аденозилметионина, замыкание кольца А и дегидратация приводят к ключевому продукту биосинтеза — 6-метилпрететрамиду. Последующие превращения дают дегидрохлортетрациклин, восстановление которого в хлортетрациклин происходит при действии NADPH.



Механизм антибиотического действия тетрациклинов до настоящего времени окончательно не установлен. Уже в 1950 г. было показано, что хлортетрациклин является специфическим ингибитором синтеза белка у *Staphylococcus aureus*. В настоящее время известно, что тетрациклины в присутствии ионов калия и магния образуют прочные комплексы (1:1) как с 70S рибосомами прокариотов, так и с 80S рибосомами эукариотов и полностью блокируют синтез белка. Конкретные мишени действия тетрациклинов — 30S и 40S субчастицы рибосом, а точнее — их участки акцепторного связывания аминоксил-тРНК (А-центры) (см. с. 425). Взаимодействие тетрациклинов с рибосомами (и полисомами) обратимо, и это обуславливает бактериостатический характер их активности.

Стрептомицин и другие аминогликозидные антибиотики

По широте клинического применения группа антибиотиков-аминогликозидов занимает четвертое место после β -лактамов, тетрациклинов и неполиеновых макролидов. Стрептомицин, обнаруженный в результате тщательно спланированной программы поиска препаратов, активных против грамотрицательных бактерий, оказался первым эффективным антибиотиком для лечения туберкулеза; наряду с другими аминогликозидами он используется также для борьбы с заболеваниями, вызываемыми различными видами *Pseudomonas* и *Proteus*, а иногда также *Streptomyces* и *Staphylococcus*.



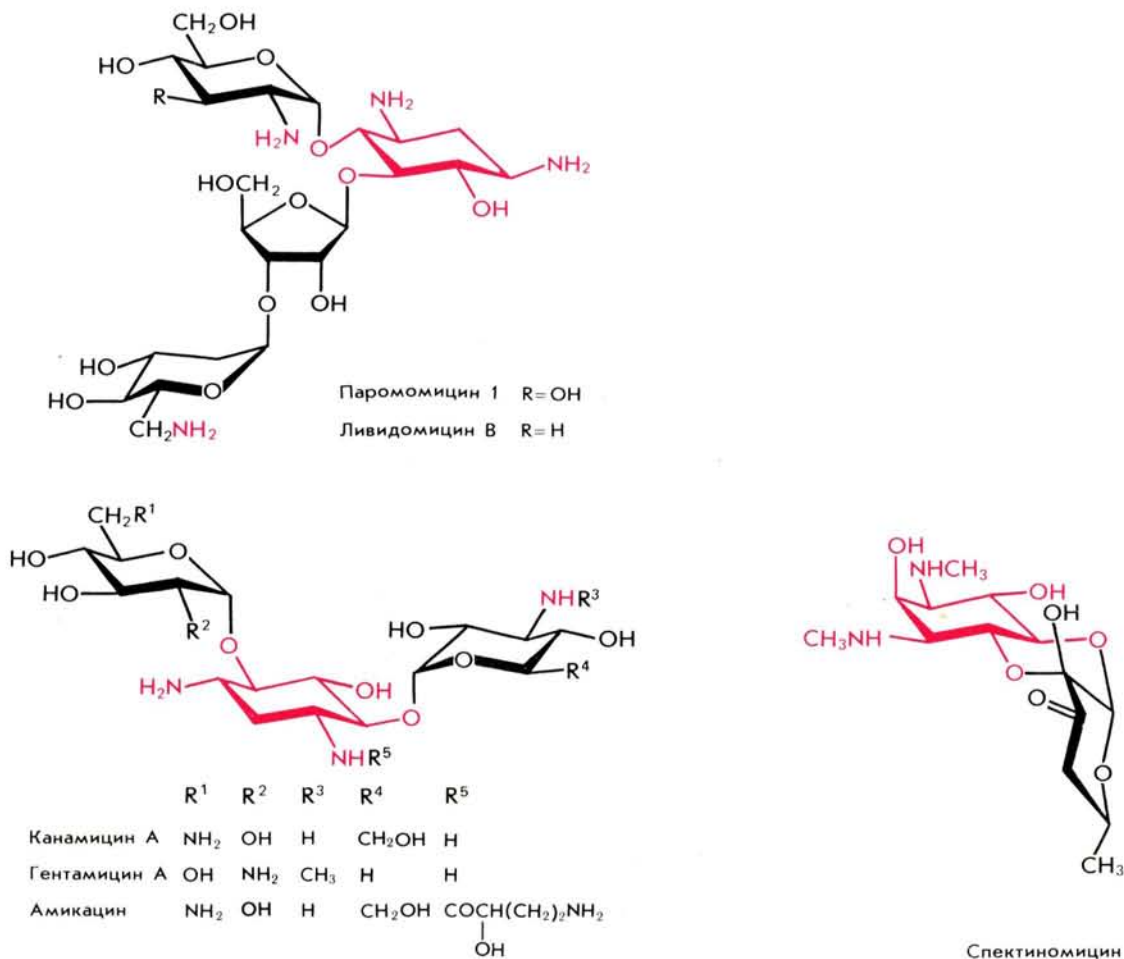
Стрептомицин

Аминогликозиды — многочисленное семейство антибиотиков, охватывающее более 100 природных соединений, продуцируемых микроорганизмами родов *Streptomyces*, *Micromonospora* и *Bacillus*, а также большое число полусинтетических аналогов. Их объединяет наличие в молекуле одного из шестичленных карбоциклических аминспиртов (аминоинозитов), гликозилированных одним или несколькими обычными или специфическими аминсахарами. На следующей странице приведены некоторые аминогликозидные антибиотики, используемые в настоящее время.

Несмотря на интенсивное изучение, механизм действия аминогликозидных антибиотиков полностью не установлен. Стрептомицин в присутствии ионов магния прочно связывается с 30S субчастицами рибосом прокариотов и совсем не действует на рибосомы эукариотов. Его мишень — рибосомальный белок S12, а в процессе связывания участвуют белки S3, S5, S7 и S14 (см. с. 401). В результате взаимодействия стрептомицина с рибосомой происходит ингибирование инициации полипептидной цепи в образовавшихся инициаторных комплексах. В бесклеточных системах обнаружена также способность стрептомицина индуцировать «ошибочное считывание» генетического кода (главным образом пириимидиновых оснований на 5'-конце и в середине кодона), но этот эффект, по-видимому, не связан с его бактерицидным действием. Для других аминогликозидов (например, канамицинов, неомицинов и гентамицинов) показано существование по крайней мере двух участков связывания,

один из которых захватывает белок L6 50S субчастиц *E. coli*, а также способность вызывать ошибочное считывание, особенно терминирующих кодонов. Спектиномицин, вероятно, ингибирует один из первых этапов транслокации, чем существенно отличается от других аминогликозидов.

Для проявления активности аминогликозидов важен также механизм их проникновения в клетки-мишени. Будучи заряженными и очень гидрофильными, антибиотики не могут проходить через мембраны путем диффузии. Поэтому они «научились» индуцировать систему транспорта полиаминов, необходимую для нормального функционирования грамотрицательных бактерий, и проникают в клетки с помощью пермеаз спермидина и путресцина в результате активного транспорта.



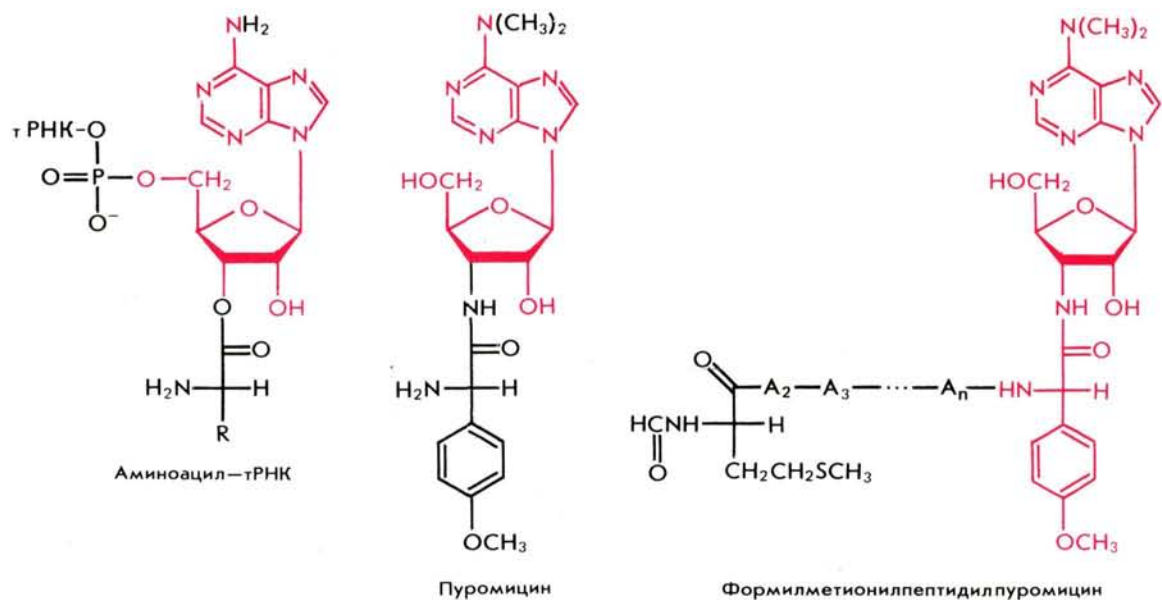
Применению аминогликозидов препятствуют три главных обстоятельства. Во-первых, они очень гидрофильны и плохо всасываются при приеме внутрь, вследствие чего пригодны в основном только для парентерального применения. Во-вторых, они сильные аллергены, а также обладают повышенной нейротоксичностью, и их применение часто приводит к нарушению вестибулярного аппарата

и глухоте. В-третьих, имеют место широкое распространение и высокая частота появления устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов.

Пурамицин

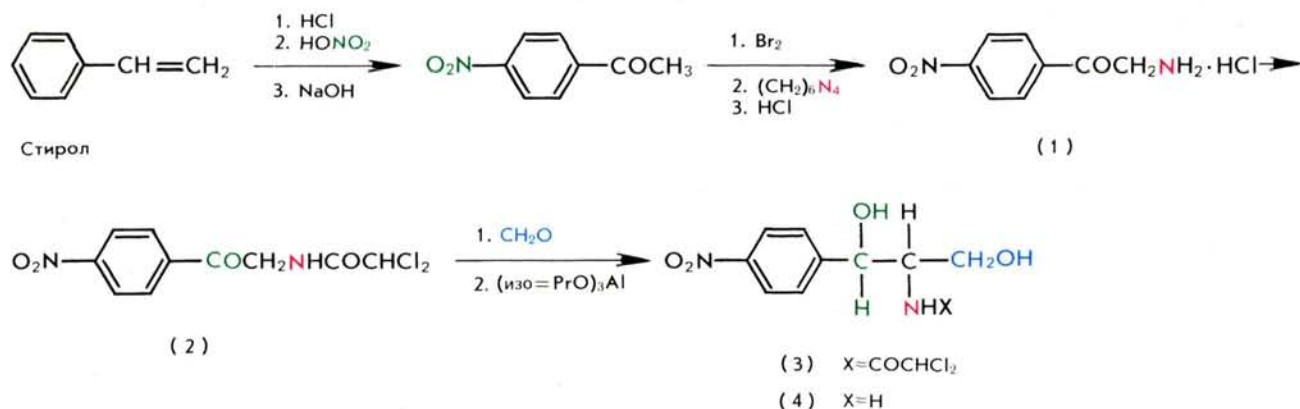
Среди ингибиторов рибосомальной синтеза белка особого внимания заслуживает антибиотик пурамицин, выделенный в 1952 г. из культуральной жидкости *Streptomyces albo-niger*. Пурамицин активен против ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, простейших, остриц, ленточных глистов и некоторых злокачественных опухолей. Были предприняты попытки использования его для лечения трипаносомиаза, амебиоза и опухолей, но, по-видимому, он слишком токсичен для широкого клинического применения.

Пурамицин представляет собой 3'-дезоксигуанидин-3'-амино-N-диметил-аденозин, ацилированный по 3'-аминогруппе остатком O-метилтирозина. Структурно он очень близок концевому фрагменту аминоктил-тРНК, но благодаря значительно меньшему объему быстрее связывается с аминоктилным (акцепторным) участком 50S (или 60S) субчастицы рибосомы. После ацилирования связанного пурамицина по аминокгруппе пептидилтрансферазой образующийся формилметионилпептидилпурамицин из-за отсутствия кодон-антикодонного взаимодействия мгновенно отщепляется от рибосомы. «Пурамициновая реакция» открыта Р. Траутом и Р. Монро в 1964 г. и чрезвычайно широко используется в биохимии. Для ее протекания необходимо наличие у аналогов пурамицина L-конфигурации и ароматического кольца в боковой цепи. Отсутствие избирательности пурамицина по отношению к рибосомам про- и эукариотов, очевидно, объясняет его довольно высокую токсичность.



Этот антибиотик впервые выделен из культуральной жидкости *Streptomyces venezuelae* в 1947 г., через два года установлено его строение, а химический синтез осуществлен почти одновременно в США и СССР (1949—1950). Он представляет собой *D-трео*-(*p*-нитрофенил)-2-дихлорацетиламино-1,3-пропандиол, и все три его возможных изомера практически полностью лишены антибиотических свойств. Хлорамфеникол оказался первым препаратом, активным против риккетсий. Он подавляет также многие грамотрицательные и некоторые грамположительные бактерии и эффективен при лечении брюшного тифа и инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, спирохетами и сальмонеллами, в особенности устойчивыми к другим антибиотикам. Терапевтическое использование хлорамфеникола ограничивают аллергические реакции и редкие, происходящие только у одного из 20 000—600 000 больных, случаи нарушения эритропоеза в костном мозге, которые при высокой концентрации антибиотика в крови в течение 1—2 недель могут привести к смерти.

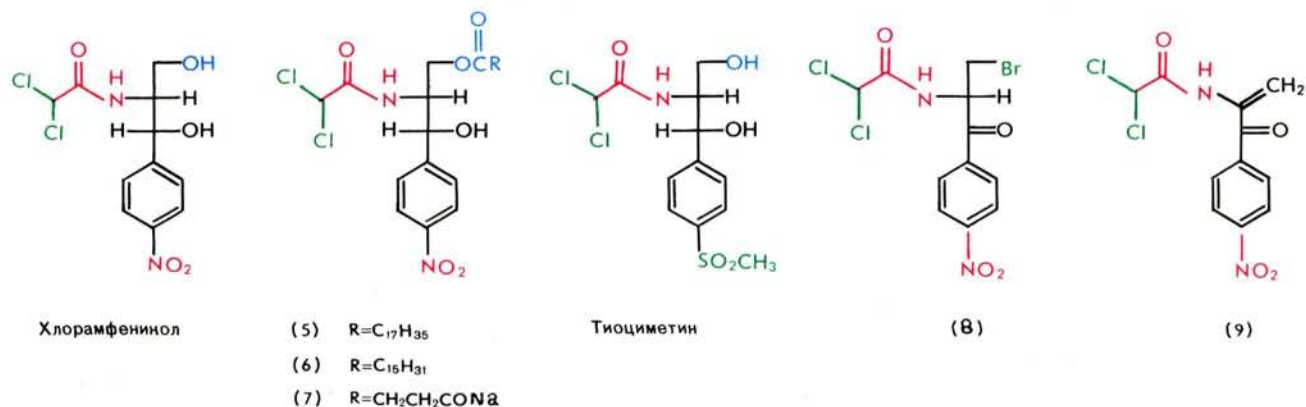
Благодаря относительной простоте строения хлорамфеникол, в отличие от всех других практически важных антибиотиков, производится в промышленных масштабах полным химическим синтезом. По одной из используемых схем стирол переводят в ключевое соединение — *p*-нитроацетофенон, который бромруют и далее действием уротропина превращают в амин (1). Полученный из него ациламин (2) гидроксиметилируют и восстанавливают по Меервей-



ну — Понндорфу — Верлею до рацемического соединения (3), последнее либо прямо используют (под названием синтомицин для наружного применения), либо гидролизуют до амина (4), разделяют на антиподы и оптически активный *D-трео*-амин вновь ацилируют дихлоруксусной кислотой до хлорамфеникола.

К 60-м годам было синтезировано несколько сотен различных аналогов хлорамфеникола и изучена зависимость их активности от строения (М. М. Шемякин и сотр.). Хотя более активных, чем хлорамфеникол, веществ не было обнаружено, эти исследования оказались полезными при установлении механизма биологического

действия антибиотика. В последующие годы получено несколько высокоактивных аналогов хлорамфеникола, среди которых сейчас находят применение его стеарат (5) и пальмитат (6), лишенные горького вкуса и гидролизующиеся в организме до исходного антибиотика, Na-соль сукцината (7), пригодная для инъекций, и тиамфеникол (тиоциметин).



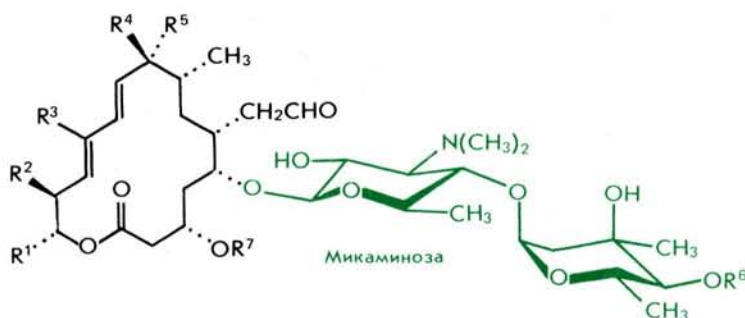
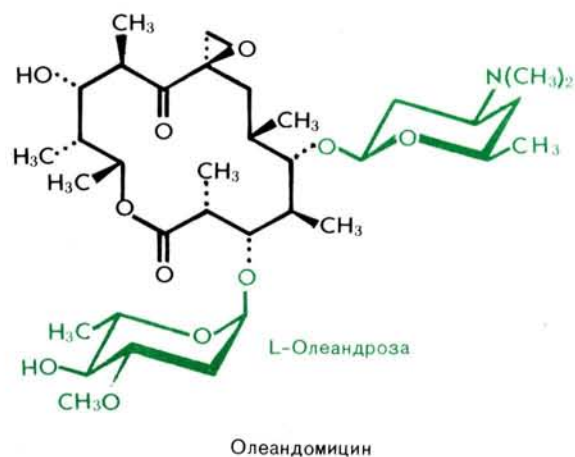
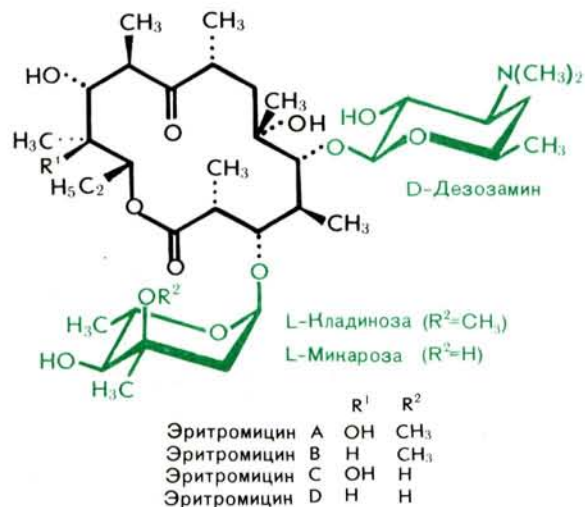
Особый интерес вызывают также два недавно полученных кето-аналога (8) и (9): во-первых, они сохраняют высокую активность вопреки отсутствию в молекулах считавшейся ранее обязательной *D-трео*-конфигурации, а во-вторых, лишены гидроксильных групп, благодаря чему резистентные к хлорамфениколу штаммы микроорганизмов не могут их инактивировать посредством *O*-ацетилирования.


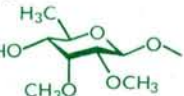

Основная мишень действия хлорамфеникола — белок L16, компонент пептидилтрансферазной части акцепторного участка 50S субъединицы рибосомы, а также близлежащие белки L2 и L27, принадлежащие пептидилтрансферазному Р-центру, и белки L24 и S6 (по другим данным — белки S6, L3, L6, L14, L25, L26 и L27). Будучи связанным, хлорамфеникол препятствует взаимодействию последних двух или трех нуклеотидов аминоконца тРНК с рибосомой и тем самым подавляет ее пептидилтрансферазную активность. Действие антибиотика на 70S рибосому обратимо, а причина избирательной токсичности заключается в полной неактивности по отношению к 80S рибосомам. В то же время хлорамфеникол способен затрагивать рибосомы митохондрий и хлоропластов, что, вероятно, является одной из причин его токсичности для млекопитающих.

Эритромицин и другие макролиды

В настоящее время известно несколько групп антибиотиков, содержащих в своих молекулах макроциклическое лактонное кольцо. Среди них — неполиеновые макролиды, занимающие одно из первых мест в мире по широте клинического применения. Они продуцируются лучистыми грибами *Streptomyces*, проявляют актив-

ность против грамположительных бактерий и микоплазмы и практически неактивны против грамтрицательных бактерий. Известно более 70 антибиотиков этой группы. Как правило, они продуцируются в виде сложноразделяемых комплексов, содержащих до 10 компонентов. Со структурной точки зрения макролидные антибиотики — 12-, 14- или 16-членные лактоны, содержащие ряд алкильных и гидроксигрупп, причем часть последних гликозилирована. В медицине наиболее широко используются 14-членные макролиды: эритромицины А—D и олеандомицин — и 16-членные: лейкомицины, спирамицины и тилозин.

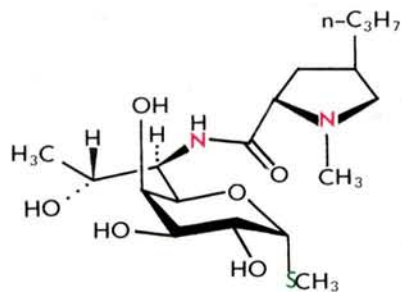


	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7
Лейкомицины	CH_3	Н	Н	ОН	Н	$\text{CO}_2\text{H}^i, \text{CO}_2\text{Pr}^n, \text{CO}_2\text{Et}$ или Ас	Н или Ас Н, Ас или COC_2H_5
Спирамицины	CH_3	Н	Н		Н	Н	
Тилозин	C_2H_5		CH_3		Н	Н	Н

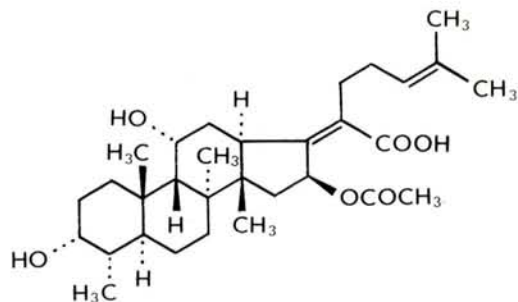
Термин «макролиды» был предложен Р. Б. Вудвордом (1957). Установление структуры и стереохимии первых макролидов выполнено в 50—60-х годах классическими приемами органической химии. Успех работы в значительной мере связан с исследованиями П. Уайли (эритромицины), К. Джерасси (эритромицины, метимицин), Р. Поля и С. Челищева (спирамицины), В. Целмера (олеандомицин), В. Прелога (карбомицины) и особенно Р. Б. Вудворда (олеандомицин, магнамицин). Позднее структуры большинства макролидов были подтверждены рентгеноструктурным анализом. В последние годы не только продолжается выделение и структурное изучение новых макролидов, но и разрабатываются полные стереоспецифические синтезы этих стереохимически чрезвычайно сложных соединений.

Антибактериальные макролиды обладают бактериостатическим действием, хотя при больших концентрациях и могут вызывать гибель чувствительных клеток. Все они связываются с 50S субчастицами 70S рибосом в соотношении 1:1 и совершенно не реагируют с 80S рибосомами эукариотов. Участки связывания эритромицина и хлорамфеникола частично перекрываются. Детальные исследования показали, что эритромицин, по-видимому, взаимодействует с белком L15, который находится на Р-центре рибосомы и модулирует пептидилтрансферазную активность белка L16, способного специфически связываться с хлорамфениколом. Вероятно, эритромицин препятствует правильному взаимодействию пептидил-тРНК с донорным участком во время транслокации. Он обычно связывается с рибосомами, содержащими короткие пептиды или уже освободившимися от них, и буквально «замораживает» полисомы, останавливая биосинтез белка.

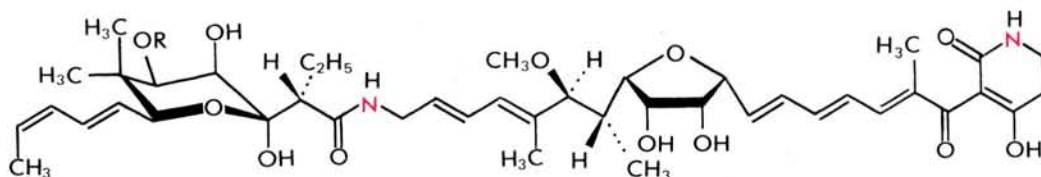
В завершение описания ингибиторов матричного синтеза белка необходимо упомянуть также некоторые менее известные антибиотики, являющиеся интересными инструментами изучения функций рибосом: линкомицин, блокирующий транспепти-



Линкомицин



Фузидиевая кислота



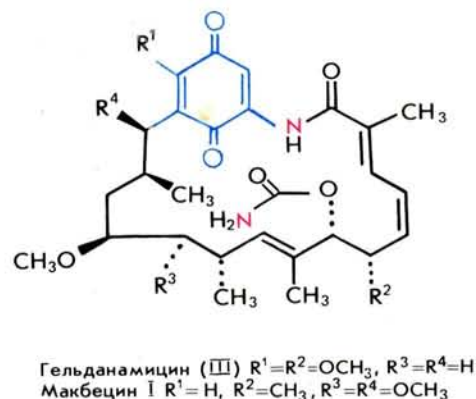
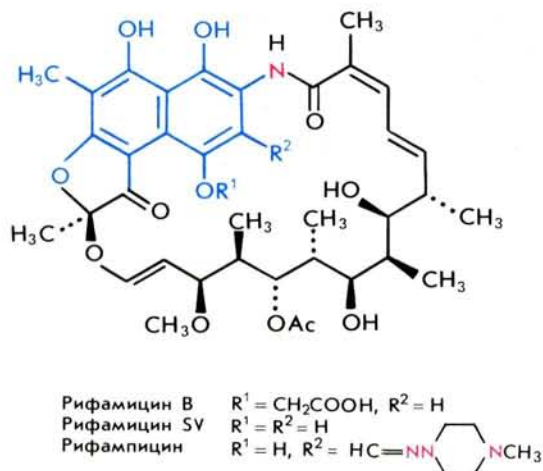
Кирромицин R=H

Ауродокс R=CH₃

дацию и соответственно элонгацию пептидной цепи на рибосомах грамположительных бактерий; стероидный антибиотик фузидиевую кислоту, блокирующую транслокацию пептидил-гРНК путем нарушения функций фактора элонгации EF-G; кирромицины, ауродокс и родственные антибиотики, подавляющие фактор элонгации EF-Tu (см. с. 423).

Ансамacroлиды

У этой группы антибиотиков биологическая активность связана с подавлением биосинтеза нуклеиновых кислот. Характерной чертой химического строения ансамacroлидов является наличие алифатической лактамной цепи, которая, как ручка корзины (от лат. *ansa* — ручка), связывает два несмежных положения нафталинового или бензольного кольца. Наиболее важные представители первой, нафталиновой группы — рифамицины В и SV, а также полусинтетический рифампицин. Во вторую группу входят гельданамицин из *S.hydroscopicus* var. *geldanus* и макбецин I из *Nocardia* sp.



Первые рифамицины получены в Италии в 1959 г., а их структурное изучение, включая стереохимию, завершено в 1973 г. В. Опольцером и В. Прелогом, которые и предложили термин «ансамacroлиды». Строение основных ансамacroлидов подтверждено рентгеноструктурным анализом. Ансамacroлиды нафталиновой группы обладают высокой активностью против грамположительных бактерий и *Mycobacterium tuberculosis*, а рифампицин является в настоящее время наиболее эффективным антибиотиком для лечения туберкулеза.

Гельданамицин и макбецин I подавляют рост бактерий, грибов и простейших, а для других бензольных ансамacroлидов характерна высокая противоопухолевая активность.

Механизм действия ансамacroлидов уникален. Они подавляют активность ДНК-зависимых РНК-полимераз из клеток бактерий

и совершенно не взаимодействуют с РНК-полимеразами млекопитающих. Конкретная мишень нафталиновых ансамакролидов — β -субъединицы фермента, с которыми они образуют очень прочные нековалентные комплексы, из-за чего нарушается образование второй и третьей фосфодиэфирных связей в РНК.

Бензолные ансамакролиды не проявляют избирательной токсичности в отношении бактерий, но являются перспективными лекарственными препаратами против простейших и злокачественных опухолей.

Интересно отметить, что в β -субъединице РНК-полимеразы имеется также участок связывания другого специфического антибиотика-ингибитора — стрептолидигина, в присутствии которого образуется тройной комплекс фермент — матрица — антибиотик и скорость синтеза РНК резко замедляется. Однако *in vivo* на



Стрептолидигин

интактных клетках *E. coli* стрептолидигин не замедляет элонгации цепей РНК, а ускоряет их терминацию, дестабилизуя транскрипционный комплекс.

Актиномицин D

Изучение актиномицинов началось еще в 1940 г., когда З. А. Вакман и Г. Вудруфф выделили из *Streptomyces antibioticus* первый из них, названный впоследствии актиномицином А. Актиномицины продуцируются в виде трудноразделимых смесей, и выделение индивидуальных соединений (всего их описано около 100) сопряжено с большими трудностями. Структура первого актиномицина расшифрована Г. Брокманом в 1956 г., а строение актиномицина D — Э. Буллоком и А. Джонсоном в 1957 г.

В настоящее время промышленность выпускает более 20 антибиотических препаратов актиномицинов в виде смесей, в которых обычно все же преобладает один компонент. Они высокоактивны против грамположительных и грамотрицательных бактерий, но большая токсичность препятствует их использованию в качестве антибактериальных агентов. Актиномицины ограниченно применяются только в химиотерапии опухолей, в частности при лечении опухолей почек (опухолей Уилмса) у детей.

Наибольший интерес к актиномицину D проявляют биохимики, и среди антибиотиков — ингибиторов биосинтеза нуклеиновых кислот он сейчас едва ли не самый изученный с точки зрения механизма действия. Актиномицин D — специфический ингибитор ДНК-зависимого синтеза РНК в различных типах клеток — наряду с



Актиномицин D

этидийбромидом (см. с. 341) широко используется в биохимических исследованиях. Антибиотик замедляет элонгацию цепи РНК, но практически не влияет на ее инициацию. Можно, по-видимому, считать доказанным, что свою активность актиномицин D проявляет в результате интеркаляции, т. е. встраивания плоской гетероциклической (феноксазиновой) части молекулы между параллельными плоскостями пар оснований ДНК, находящейся в В-форме. Конкретно антибиотик располагается между двумя антипараллельными последовательностями dGpC и dCpG в узкой бороздке за счет образования водородных связей, более прочной из которых является связь 2-NH₂ гуанина и СО треонинового остатка, а менее прочной — связь 3-N атомов гуанина с NH-группами треонина. Стабильность образуемого комплекса увеличивают пептидные лактоны, которые располагаются в малой бороздке спирали на протяжении приблизительно 6 пар оснований и обеспечивают точное наложение остатков дезоксирибозы и изопропилных групп остатков N-метилвалина в антибиотике, обеспечивая дополнительное гидрофобное связывание. В результате интеркаляции, модель которой предложена Г. М. Собеллом и др., актиномицин D, как и этидийбромид, вызывает частичное раскручивание спирали (на ~12°) (рис. 363), что вместе с кинетически медленной диссоциацией комплекса антибиотик — ДНК обеспечивает замедление транскрипции.

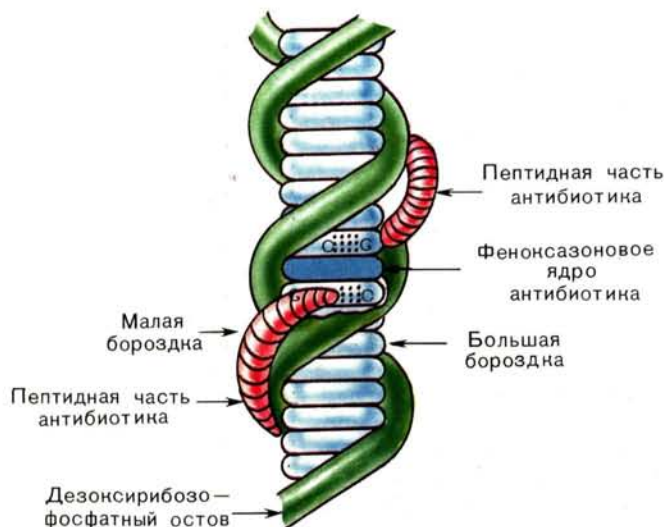


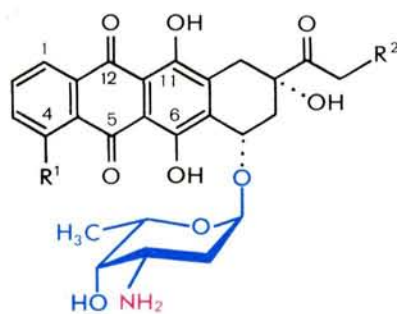
Рис. 363. Интеркаляция актиномицина D в молекуле ДНК.

Антрациклины — важнейшая группа антибиотиков, использующихся в химиотерапии злокачественных опухолей. Они активны также в отношении грамположительных бактерий, грибов и вирусов, но обладают слишком большой токсичностью, в особенности кумулятивной кардиотоксичностью, которая исключает их применение в химиотерапии инфекционных заболеваний.

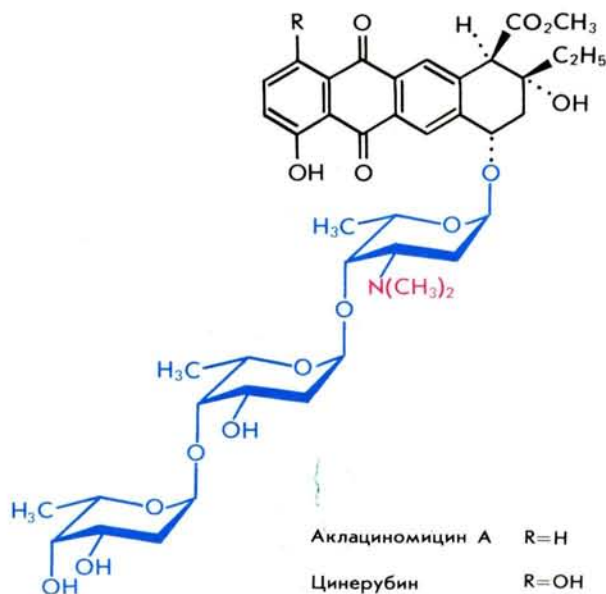
Антрациклины представляют собой сочлененные с карбоциклическим кольцом антрахиноны, несущие различное количество заместителей и гидроксильных групп, одна из которых гликозилирована специфическим моносахаридом или трисахаридом. Наиболее широкое применение в клинической практике находят три антрациклина: дауномицин (даунорубин, в СССР выпускается под названием рубомицин), адриамицин (доксорубин) и карминомицин. Большая часть антрациклинов, продуцируемых различными видами *Streptomyces*, открыта в 1956—1964 гг., а в их химическое изучение наибольший вклад внесли Г. Брокман, которому и принадлежит термин «антрациклины» (1963), В. Прелог и другие исследователи.

В последние годы интенсивно ведется поиск антрациклинов, обладающих более высокой активностью и/или пониженной кардиотоксичностью. С этой точки зрения внимание исследователей привлекают и некоторые природные антрациклины, например аклациномицин А, более активный, чем цинерубин А, а также их синтетические аналоги; из них наиболее известны 4-деметоксипроизводные дауномицина и адриамицина, в несколько раз более активные, чем природные антибиотики, 11-дезокси- и 13-дезоксиантрациклины и различные производные с модифицированным остатком моносахарида. Опубликовано большое число полных стереоспецифических синтезов природных антибиотиков этой группы.

По механизму действия антрациклины близки актиномицину D: подавляют ДНК-зависимый синтез РНК (ее элонгацию) и гораздо



	R ¹	R ²
Дауномицин	OCH ₃	H
Адриамицин	OCH ₃	OH
Карминомицин	H	H

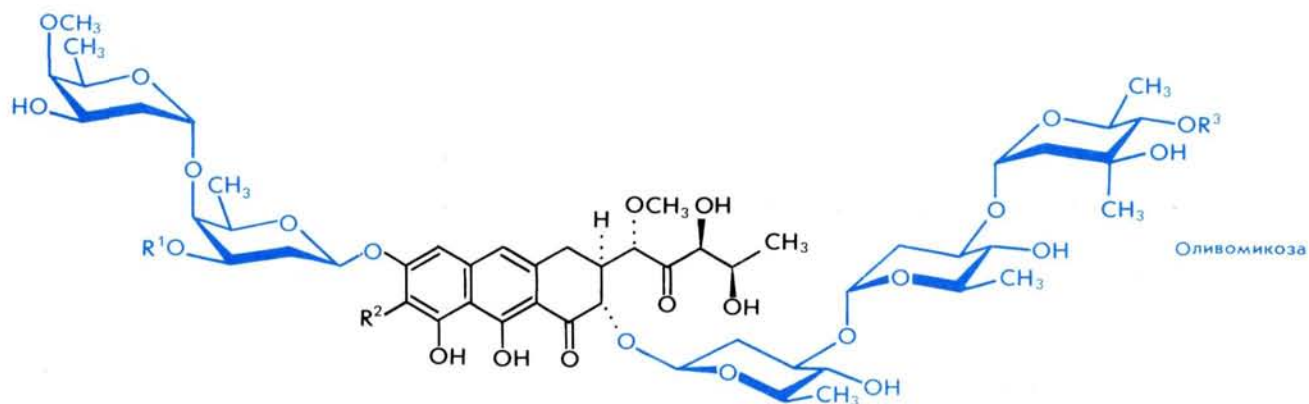


Аклациномицин А	R=H
Цинерубин	R=OH

слабее влияют на репликацию. Ингибирование ДНК также, по-видимому, происходит путем интеркаляции, причем в связывании принимает участие аминогруппа моносахаридного остатка, а степень связывания возрастает с увеличением отношения $G+C/A+T$ и в оптимальных условиях может достигать одной молекулы антибиотика на 4—5 пар оснований. В действительности, вероятно, процессы, протекающие в клетках под влиянием антрациклинов, сложнее, чем их описывает простая модель интеркаляции, и больше зависят от структуры антибиотиков. В литературе имеются сведения, что некоторые аналоги дауномицина проявляют высокую противоопухолевую активность, ингибируют синтез РНК, не образуя комплексов с ДНК.

Оливомицины, хромомицины и ауреоловая кислота

Эти антибиотики, продуцируемые различными видами стрептомицетов, находят применение для лечения некоторых видов злокачественных опухолей. Ауреоловая кислота открыта американскими исследователями в 1953 г., в 1960 г. японские исследователи описали хромомицины, а в 1962 г. в СССР были обнаружены оливомицины. Строение хромомицинов изучалось группами К. Наканиси (Япония) и Н. Бхакки (США), оливомицинов—группой М. Н. Колосова (СССР). Окончательные формулы оливомицинов А—D и хромомицинов А₂—А₄ предложены М. Н. Колосовым и др. Из антибиотиков этой группы наибольшей активностью обладает оливомицин А₁, у которого соотношение терапевтической дозы и LD₅₀ составляет 12,5.



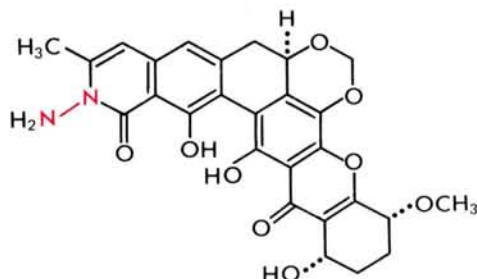
	R ¹	R ²	R ³
Оливомицин А	CH ₃ CO	H	изо-C ₃ H ₇ CO
Оливомицин В	CH ₃ CO	H	CH ₃ CO
Оливомицин С	H	H	изо-C ₃ H ₇ CO
Оливомицин D	CH ₃ CO	H	остатка оливомикозы нет
Хромомицин А ₂	CH ₃ CO	CH ₃	изо-C ₃ H ₇ CO
Хромомицин А ₃	CH ₃ CO	CH ₃	CH ₃ CO
Хромомицин А ₄	CH ₃ CO	CH ₃	остатка оливомикозы нет



Наканиси [Nakanishi] Койи (р. 1925), американский химик-биоорганик. Окончил Нагойский университет (1954); с 1958 г. — профессор Токийского университета, а с 1969 г. — Колумбийского университета (США), одновременно (с 1979) является директором Института биоорганических исследований в Осаке (Япония). Широко известен работами по выделению и установлению строения биологически активных природных веществ; выполнил оригинальные исследования по изучению механизма функционирования бактериородопсина и животного родопсина.

По механизму действия оливо- и хромомицины схожи с актиномицином D и антрациклинами. Они эффективно подавляют элонгацию при матричном синтезе РНК и в меньшей степени влияют на репликацию. Связывание их с двуспиральной ДНК в присутствии Mg^{2+} оказывается очень прочным, и активность РНК-полимеразы может ингибировать уже одна молекула антибиотика на несколько сотен пар оснований, хотя в оптимальных условиях может связаться до одной молекулы на 4—5 пар. Для связывания с ДНК необходима ее свободный 3'-конец или разрывы цепи, около которых содержатся остатки гуанина. Скорость диссоциации комплекса антибиотик — ДНК зависит от строения антибиотика; так, у соединений с меньшим числом остатков моносахаридов она оказывается значительно выше, соответственно падает и биологическая активность.

Способность к интеркаляции и, следовательно, к подавлению матричного синтеза РНК, и в меньшей степени ДНК, проявляют также многие другие антибиотики. Среди них можно упомянуть эхиномицин (см. с. 290) и другие хиноксалиновые антибиотики, у которых интеркалируют сразу оба ароматических кольца (моноароматические аналоги неактивны). Интересным действием обладает изученный М. Н. Колосовым и др. (СССР) антибиотик альбофунгин (канчаномидин), для которого характерно образование тройного комплекса ДНК — антибиотик — РНК-полимеразы.



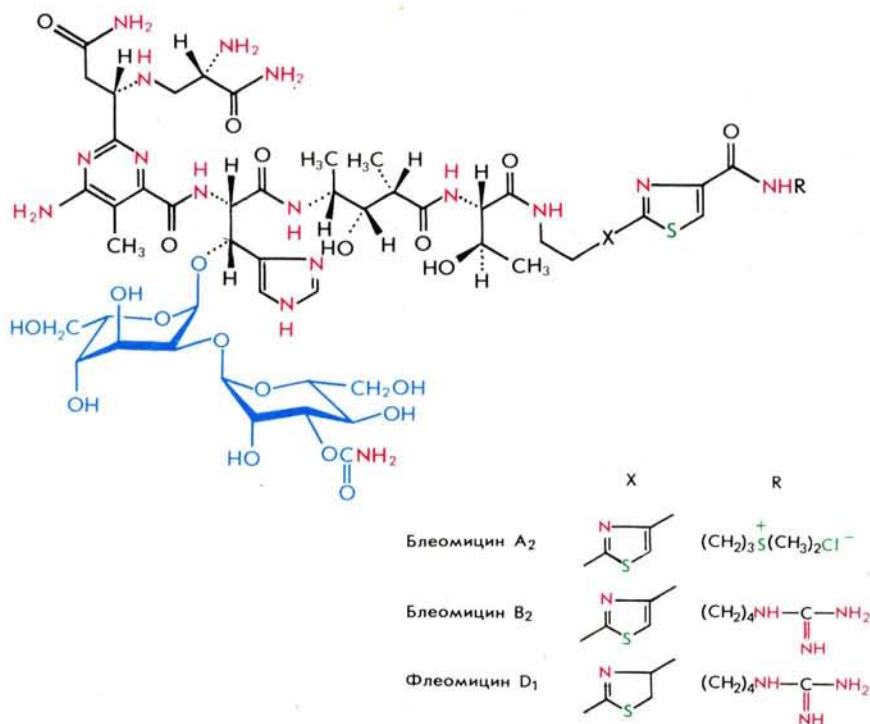
Альбофунгин

Блеомицины

Клинически важные противоопухолевые антибиотики из стрептомицетов — блеомицины (в особенности блеомицины A_2 и B_2), а также структурно родственные им флеомицины (например, флеомицин D_1) представляют большой интерес и как инструменты для исследования ДНК. Впервые флеомицины обнаружены в 1956 г. в виде медных комплексов, металл из которых легко удалялся при обработке 8-гидроксихинолином. Они оказались специфически активными в отношении *Mycobacterium phlei*, в связи с чем и получили свое название.

Одним из интереснейших аспектов действия флео- и блеомицинов является их способность вызывать интенсивный распад ДНК в результате одиночных и двойных ее разрывов. Такому распаду подвергаются ДНК вирусов, бактерий и клеток млекопитающих (но не РНК). Однако антибиотики проявляют и некоторую

специфичность к ДНК в зависимости от фазы клеточного цикла. Выдвинуто несколько теорий, объясняющих механизм образования блеомицинами разрывов в ДНК. Наиболее привлекательная из них состоит в том, что антибиотики в присутствии некоторых катионов могут вызывать специфическую модификацию оснований, в частности тимина, что приводит затем к щелочному расщеплению ДНК *in vitro* (антибиотик действует только при pH 7,0; оптимальный pH 9,0) или ферментативному гидролизу эндонуклеазами.

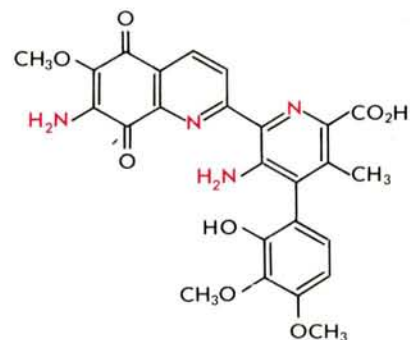


Биман (Viemann) Клаус (р. 1926), американский химик-органик. Окончил Инсбрукский университет (1951), с 1955 г. работает в Массачусетском технологическом институте. Один из первых исследователей, применивший (1957) масс-спектрометрию для определения строения природных веществ (алкалоидов, аминокислот, пептидов, углеводов и др.).

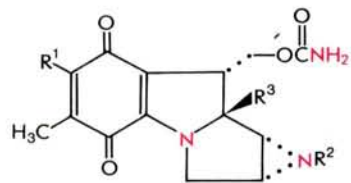
Стрептонигрин

Этот антибиотик широкого спектра действия из *Streptomyces flocculus* описан в 1959—1960 гг. К. Рао и В. Кулленом, а затем выделен и введен в онкологическую практику под названием брунеомицина или рубихромомицина. Строение антибиотика установлено в 1963 г. К. Рао, К. Биманом и Р. Б. Вудвордом.

Антибиотик вызывает одиночные разрывы в ДНК. Он связывается с ней как в хинолинхинонной, так и в восстановленной форме, образуя два типа комплексов — диализуемых и недиализуемых, причем последние содержат одну молекулу антибиотика на 2000 п. о. Механизм его действия, вероятно, состоит в том, что он восстанавливается NADH до гидрохинона и далее окисляется в семихинон кислородом воздуха с одновременным образованием супероксидных радикалов ($^+\text{O}-\text{O}^-$), которые и вызывают гибель клеток.



Стрептонигрин

Низкомолекулярные
биорегуляторы

	R ¹	R ²	R ³
Митомицин А	OCH ₃	H	OCH ₃
Митомицин В	NH ₂	H	OCH ₃
Митомицин С	NH ₂	CH ₃	OCH ₃
Порфирамицин	OCH ₃	CH ₃	ОН

Митомицины А, В и С, а также порфирамицин представляют собой комплекс противоопухолевых антибиотиков, продуцируемых несколькими видами *Streptomyces*. Впервые они обнаружены японскими исследователями в 1956 г., а их строение определено химическим и рентгеноструктурным анализом в 1962—1976 гг. Описаны полные синтезы митомицинов и множества их производных и аналогов. Из них ряд соединений проявляет большую активность против отдельных видов опухолей (лейкопения) и меньшую токсичность. Наиболее поразительной чертой химического строения митомицинов является присутствие в молекулах азиридинового цикла, редко встречающегося среди природных соединений.

Митомицины — быстродействующие бактерицидные и цитотоксичные реагенты, и устойчивость к ним клеток некоторых бактерий может быть объяснена только барьерами проницаемости. Мишенью действия митомицинов является ДНК — они быстро подавляют репликацию и вызывают разрушение существующей ДНК двумя путями: во-первых, образованием модифицированных пуриновых звеньев (одно звено на 200—300 пар оснований) и, во-вторых, бифункциональным связыванием двух комплементарных цепей ДНК (одна «сшивка» на 2000—5000 пар оснований). Интересно, что вирусная ДНК, в отличие от ДНК клеток хозяина, митомицинами почти не разрушается. Обязательным условием действия митомицинов является их предварительное восстановление с помощью NADH *in vivo*.

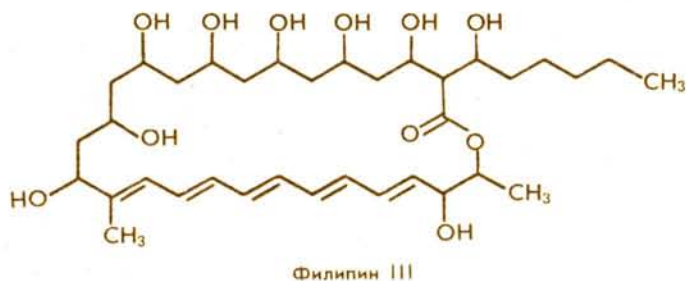
Полиеновые макролидные антибиотики

Широкое применение антибиотиков, сопровождающееся подавлением нормальной бактериальной микрофлоры, привело в конце 50-х — начале 60-х годов к участвовавшим случаям грибковых заболеваний, в особенности микозов желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей. Это стимулировало изучение и внедрение в практику антифунгальных антибиотиков. Среди них наиболее важную группу составляют полиеновые макролиды. В СССР в настоящее время промышленность выпускает 4 антибиотика этой группы: амфотерицин В, нистатин, леворин и трихомицин; в мире употребляются в основном первые два из них и кандицидин, главный компонент которого идентичен леворину А₂.

Для полиеновых макролидов характерно наличие в молекуле сопряженной системы двойных связей, по количеству которых их классифицируют как три-, тетра-, пента-, гекса- или гептаены. Благодаря сильному и специфичному поглощению из-за наличия полиенового хромофора обнаружение этих антибиотиков сравнительно несложно, однако их выделение, очистка, разделение на компоненты и характеристика сильно затруднены. В настоящее время известно около 70 антибиотиков этого типа.

В химическое изучение полиеновых макролидов большой вклад внесли такие известные ученые, как А. Коуп, О. Цедер, А. Бёрч и К. Джерасси, а в последние годы — Ю. Д. Шенин и особенно польские исследователи Э. Боровский и др., благодаря усилиям которых стали известны структуры всех основных антибиотиков такого типа, а в случае амфотерицина В (см. с. 601) и полная

антибиотиков этой группы (гептаенов или нистатина) в мембране образуются отверстия (поры) радиусом порядка 0,4 нм, через которые из клетки свободно выходят ионы одновалентных металлов, некоторые анионы и небольшие нейтральные молекулы, например глюкоза (см. с. 601). Более мелкие полиеновые макролиды, например филипин III, в цитоплазматических мембранах клеток образуют еще более крупные отверстия.



Помимо полиеновых макролидов, способностью изменять проницаемость мембран обладает еще одна большая и разнородная в химическом отношении группа антибиотиков — ионофоры (см. с. 590).

Гризеофульвин



Из антифунгальных антибиотиков других типов особого внимания заслуживает гризеофульвин. Первоначальные данные о низкой фунгистатической активности долго препятствовали его применению, и только с 1958 г. он стал употребляться для системного лечения трихофитий и других тяжелых поражений нитчатыми грибами.

Гризеофульвин выделен из *Penicillium griseofulvum* еще в 1939 г., а его строение установлено в 1952 г. Гризеофульвин вызывает искривление и скручивание гифов грибов. Механизм его действия не вполне ясен. По-видимому, он связывается с белками, участвующими в сборке тубулина в микротрубочки, подавляя образование микротрубочек и расхождение хромосом в митозе.

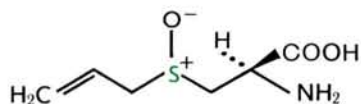
Фитонциды

Хотя все вышеописанные практически важные антибиотики имеют микробное происхождение, вещества с антибиотической активностью были найдены и у растений. По предложению Б. П. Токина (СССР), проводившего такого рода работы уже в 1928—1929 гг.,

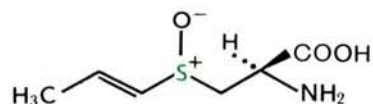
эти вещества были названы фитонцидами. Фитонциды выделены, в частности, из сока чеснока и лука, а позднее обнаружены в летучих фракциях, полученных из листьев березы, черемухи, желтой акации и других растений, из древесины различных видов кедра, корней сложноцветных и т. д.

В широком смысле слова фитонциды — вторичные метаболиты растений, относящиеся к соединениям различных классов (терпеноиды, флавоноиды, фенольные вещества и т. д.). В виде смесей они нередко проявляют заметное бактерицидное или фунгицидное действие. Поэтому понятно утверждение, что лес создает мощную «фитонцидную зону» (летом 1 га лиственного леса выделяет до 2 кг летучих веществ в сутки) и лесной воздух содержит в 200—250 раз меньше микробов, чем городской.

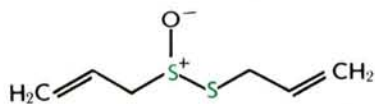
Фитонциды усиливают защитные силы как организма-хозяина, так и организма человека. Так, фитонциды чеснока и лука влияют ингибирующим образом на рост брюшнотифозных, холерных и дизентерийных бактерий. Основные биологически активные компоненты чеснока и лука — соответственно аллицин и так называемый лакриматорный фактор — образуются из неактивных предшественников (аллиина у чеснока и лакриматорного предшественника у лука) при повреждении клеток растений под влиянием пиридоксаль-содержащих ферментов — аллииназ. При конденсации трех молекул аллиина образуются также ахоены, например 6-цис-ахоен, обладающие сильной антитромботической активностью.



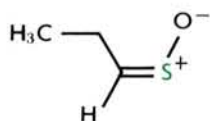
Аллиин



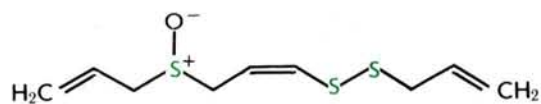
Лакриматорный предшественник



Аллицин



Лакриматорный фактор лука



6-цис-Ахоен

В заключение этого раздела следует остановиться на двух аспектах. Применению антибиотиков, которое полностью изменило характер химиотерапии, альтернативы пока нет, хотя оно и привело к ряду неприятных побочных последствий, в частности к увеличению числа и тяжести аллергических заболеваний. В то же время массированное использование антибиотиков многие ученые рассматривают как один из самых широкомасштабных генетических экспериментов в истории Земли. Действительно, распространение резистентных штаммов микроорганизмов приобрело небывалый размах, и для борьбы с ними необходимы все возрастающие усилия микро-

биологов и химиков, направленные на изыскание новых и модификацию старых антибиотиков. Поэтому внимание к изучению и производству антибиотиков не ослабевает, а производство антибиотиков стало одной из ведущих отраслей биотехнологии (рис. 364).



Рис. 364. Пилотная установка для получения антибиотиков.



фон Эйлер [von Euler] Ульф (р. 1905), шведский физиолог. Окончил Каролинский институт в Стокгольме (1930), с 1939 г.— профессор Каролинского института физиологии в Стокгольме. Основные работы связаны с выяснением механизма действия химических медиаторов в нервных окончаниях. Открыл простагландины (1934—1935) и норадреналин (1946—1948). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1970).

Простагландины и тромбоксаны. Лейкотриены

Простагландины и тромбоксаны

Простагландины и тромбоксаны — биорегуляторы липидной природы, представляющие собой оксигенированные производные полиеновых жирных кислот, содержащих в углеводородной цепи пяти- или шестичленные циклы. Они обнаружены практически во всех тканях млекопитающих и обладают исключительно высокой и разносторонней физиологической активностью. Как правило, простагландины не накапливаются в тканях и органах в свободном виде, а синтезируются внутриклеточными ферментами в ответ на биологический стимул и оказывают свое действие главным образом в непосредственной близости от места образования. Исследования

простагландинов, где тесно переплелись химические, биологические, фармакологические, медицинские и даже сельскохозяйственные аспекты, наглядно продемонстрировали возможности биоорганической химии в изучении сложных явлений живой природы.

Исторический очерк. В 30-х годах нашего столетия гинеколог Р. Курцрок и фармаколог Ч. Либ (США) обнаружили, что в семенной жидкости человека присутствует фактор, способный вызвать сильное сокращение или расслабление гладких мышц матки, а несколько позже У. фон Эйлер (Швеция) и М. Гольдблатт (Великобритания) нашли, что при инъекции животным он не только стимулирует гладкую мускулатуру, но и влияет на артериальное давление. Исследовав химическую природу нового фактора, У. фон Эйлер отнес его к классу липидов и предложил название «простагландин» (PG), так как считал, что он образуется в предстательной железе (от лат. prostata). Успехи в исследовании структуры простагландинов во многом связаны с именем шведского ученого С. Бергстрёма. Благодаря использованию таких методов, как противоточное распределение, хроматография на бумаге, газовая хроматография и масс-спектрометрия, С. Бергстрёму уже к концу 50-х годов удалось выделить индивидуальные соединения, а в 1962 г. установить строение первых трех простагландинов, которое было подтверждено в 1963 г. С. Абрахамсоном с помощью рентгеноструктурного анализа.

В 1965 г. группами С. Бергстрёма (Швеция) и Д. ван Дорпа (Нидерланды) было установлено, что простагландины образуются в результате ферментативного окисления арахидоновой кислоты. Благодаря этому открытию простагландины, препаративно получаемые путем биосинтеза, стали легкодоступны для биологических испытаний, что позволило изучить разнообразные аспекты их физиологического действия. Одновременно начались работы по химическому синтезу простагландинов, значительный вклад в которые внес Э. Кори (США).

В 1976 г. группами Дж. Вейна (Великобритания) и Б. Самуэльсона (Швеция) были обнаружены новые метаболиты арахидоновой кислоты — простациклин (PGI₂) и тромбоксан A₂ (TXA₂), также обладающие высокой биологической активностью.

В настоящее время известно 10 типов простагландинов (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) и 2 типа тромбоксанов (A и B). Все простагландины имеют циклопентановое кольцо, несущее кислородсодержащие функциональные группы. Для тромбоксанов характерен тетрагидропирановый цикл. Простагландины и тромбоксаны — карбоновые кислоты, содержащие в положении 15 аллильную гидроксильную группу. В зависимости от числа двойных связей в молекуле они подразделяются на три серии, обозначаемые подстрочными индексами 1, 2 и 3. Для простагландинов F в подстрочном индексе дополнительно указывается конфигурация (α или β) гидроксильной группы при C—9 (рис. 365).

Простагландины и тромбоксаны — весьма реакционноспособные соединения. Некоторые из них, например PGA₂, PGH₂, TXA₂, реагируют с компонентами плазмы крови, в частности с альбумином, теряя при этом биологическую активность. Напротив, PGI₂ стабилизируется альбумином. Химическая нестабильность простагландинов и тромбоксанов связана с наличием в них аллильной гидроксильной группы, которая сравнительно легко эпимеризуется, окисляется или отщепляется, что приводит к потере активности содержащих простагландины лекарственных препаратов.

Синтез простагландинов с природной конфигурацией всех хиральных центров молекулы является сложной задачей. В первых работах получались рацемические соединения, но впоследствии были разработаны стереоспецифические схемы синтеза, приводящие



Бергстрём [Bergström] Суне (р. 1916), шведский биохимик, иностранный член АН СССР (1976). Окончил Каролинский институт в Стокгольме (1943), в 1970—1983 гг. — ректор этого института. Основные работы посвящены изучению структуры и функции простагландинов. Изучал биосинтез и обмен желчных кислот, холестерина, простагландинов. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, совместно с Б. Самуэльсоном и Дж. Вейном).

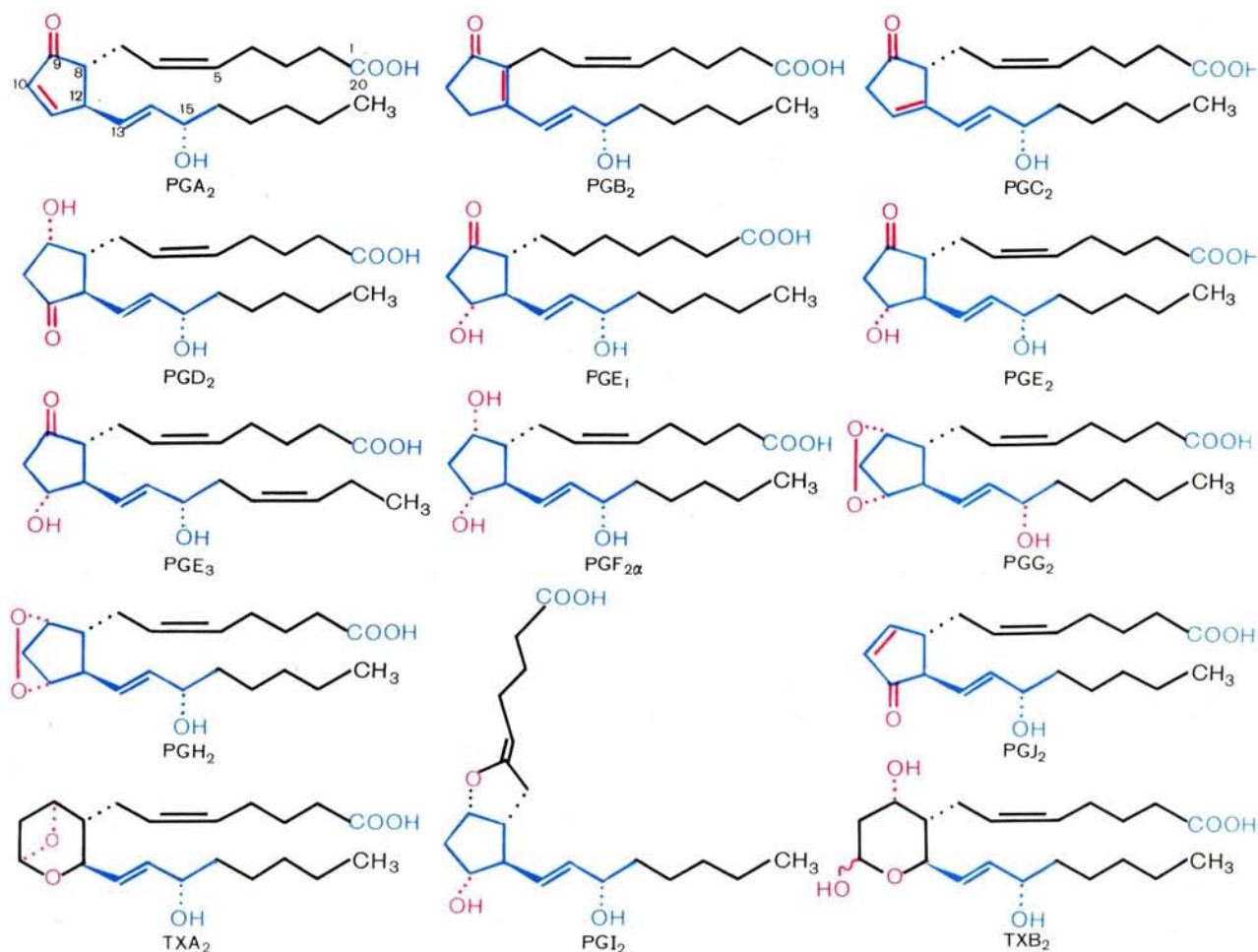


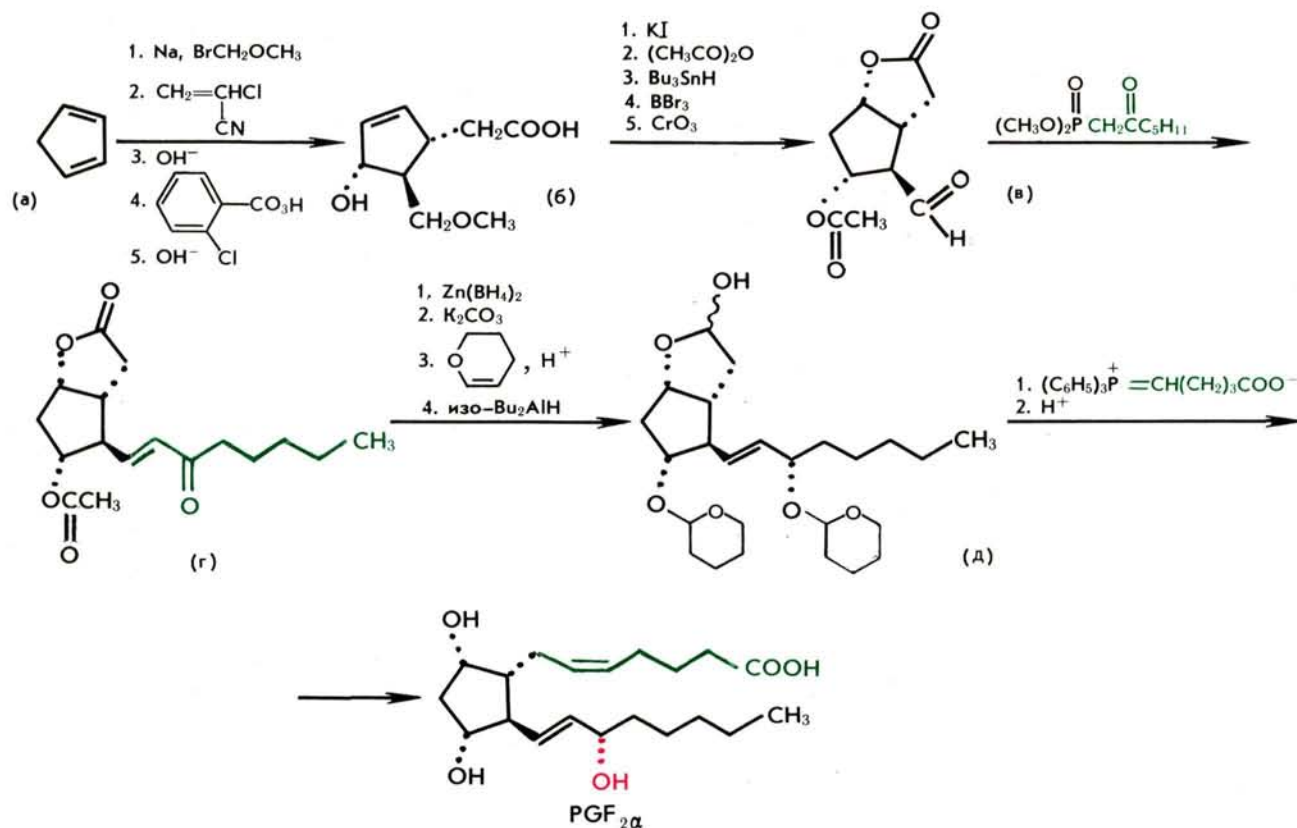
Самуэльсон [Samuelsson] Бенгт Ингмар (р. 1934), шведский биохимик. Окончил Каролинский институт в Стокгольме (1961); с 1973 г. — профессор, а с 1983 г. — ректор этого же института. Известен работами в области изучения простагландинов. Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, совместно с С. Бергстрёмом и Дж. Вейном).

к оптически активным простагландинам, например осуществленный Э. Кори синтез $\text{PGF}_{2\alpha}$, имеющего 5 хиральных центров. Из цикlopentадиена (а) конструируется циклическая часть молекулы, которая содержит функциональные заместители, характерные для $\text{PGF}_{2\alpha}$, и реакционноспособные группы, необходимые для наращивания боковых цепей. При этом строго контролируется конфигурация создаваемых хиральных центров. Образовавшиеся антиподы разделяются кристаллизацией с (+)-эфедринном. Синтон (б) (т. е. ключевое промежуточное соединение, в котором созданы реакционноспособные группировки, необходимые для последующих химических превращений) с природной конфигурацией хиральных центров превращается в альдегидолактон (в), и по реакции Виттига в него вводится одна из двух алифатических цепей с образованием кетона (г). В лактоне (д) с 15S-конфигурацией гидроксильной группы по реакции Виттига достраивается вторая цепь и затем удаляются защитные группы.

Ключевая стадия другого подхода к синтезу простагландинов — конденсация цикlopентенонового синтона (а), содержащего готовую верхнюю цепь, с медь-органическим реагентом, вводящим нижнюю цепь. По этой схеме в СССР синтезируется препарат «Допростон», представляющий собой стабильный аналог PGE_1 (Я. Ф. Фрейманис, К. К. Пивницкий).

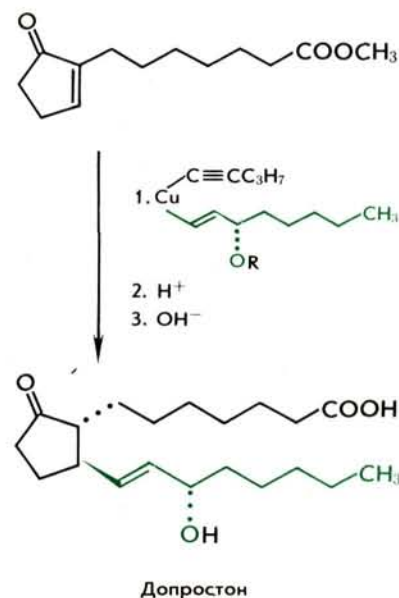
Рис. 365. Строение важнейших простагландинов и тромбоксанов.

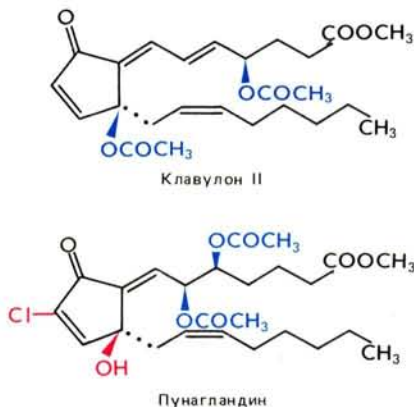




Таким образом, полный химический синтез не только позволяет подтвердить структуру простагландинов и делает их коммерчески доступными, но также открывает широкие возможности для получения аналогов.

Простагландины широко распространены в животном мире. У млекопитающих они синтезируются практически во всех клетках, за исключением эритроцитов. Неожиданностью было обнаружение в 1969 г. большого количества метилового эфира ацетата простагландина A₂ в горгониевых кораллах *Plexaura homomalla* (А. Вайнхаймер и Р. Спраггинс). При автолизе биомассы эстеразы кораллов быстро гидролизуют этот диэфир. Образующийся PGA₂ является весьма ценным исходным продуктом для получения природных простагландинов и их аналогов. Высказано предположение, что PGA₂ и его производные защищают коралловые полипы *P. homomalla* от поедания хищниками. Простагландины найдены и у других морских обитателей. Так, в желудочно-кишечном тракте кошачьей акулы (*Triakis scyllia*) содержание PGE₂ составляет 2,5 мкг/г сырой ткани. В морских беспозвоночных были обнаружены простагландиноподобные соединения, также синтезируемые из арахидоновой кислоты: в кораллах *Clavularia viridis* найдены клавулоны (1982—1983), в *Telesto riisei* — пунагландины (1985).





Виттиг [Wittig] Георг (р. 1897), немецкий химик-органик. Образование получил в Тюбингенском и Марбургском университетах, с 1956 г. — профессор Гейдельбергского университета. Синтезировал различные литийорганические соединения (1938), пентафенилфосфор (1952), фенантрены (1953). Открыл трансформацию простых эфиров в спирты под действием фениллития (1942), реакцию получения олефинов из карбонильных соединений и алкилиденфосфоранов (1954, реакция Виттига). Лауреат Нобелевской премии по химии (1979, совместно с Г. Брауном).

Сведения о наличии простагландинов в растениях противоречивы, и возможно, что в растениях роль регуляторов такого типа выполняют другие гидроксипроизводные жирных кислот.

Простагландины и тромбоксаны синтезируются в организме животных и человека из полиненасыщенных жирных кислот с длиной цепи 20 углеродных атомов (эйкозаполиеновых). Биосинтетический предшественник важнейших простагландинов — арахидоновая кислота (см. с. 687), она входит в состав фосфолипидов и в свободном виде практически не встречается. Биосинтез простагландинов начинается с гидролиза фосфолипидов, содержащих арахидоновую кислоту, под действием мембранной фосфолипазы A_2 . Эту стадию можно полностью блокировать глюкокортикоидами. Фермент циклооксигеназа катализирует далее стереоспецифическое присоединение пероксидных радикалов по положениям 11 и 15 арахидоновой кислоты с образованием 9,11-пероксидного мостика и циклизацией по положениям 8 и 12. Образующийся крайне неустойчивый PGG_2 восстанавливается пероксидазой до более стабильного PGH_2 . Циклооксигеназную и пероксидазную активность проявляет, по-видимому, один и тот же фермент — PGH_2 -синтаза. Он локализован, как правило, в микросомальных мембранах и представляет собой гемсодержащий гликопротеид с молекулярной массой приблизительно 70 000. PGH_2 -Синтазой активируется липидными перекисями; для ее нормального функционирования необходимы восстанавливающие кофакторы, например глутатион. Нестероидные противовоспалительные агенты типа индометацина, салицилатов и др. ингибируют PGH_2 -синтазу, причем аспирин действует необратимо за счет ацетилирования остатка серина в активном центре фермента.

Простагландины и тромбоксаны участвуют в регуляции многих функций организма. В некоторых случаях они действуют как синергисты (так, PGI_2 , PGE_1 и PGD_2 ингибируют агрегацию тромбоцитов), в других — являются антагонистами (PGI_2 расслабляет артерии, а TXA_2 сокращает).

Простагландины обеспечивают нормальное течение физиологических процессов. Так, гемостаз зависит от соотношения между тромбоцитарным TXA_2 и эндотелиальным PGI_2 . Простагландины E_1 и E_2 важны для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы плода во время беременности. Эндогенный синтез простагландинов играет существенную роль при родах. PGE_1 и PGE_2 подавляют секрецию желудочного сока и, по-видимому, служат природными цитопротекторами. Простагландины регулируют тонус гладких мышц, в том числе сосудов, играют важную роль в поддержании иммунного статуса организма и могут блокировать функции некоторых иммунокомпетентных клеток.

Развитие многих патологических состояний организма также связано с действием простагландинов. Воспаления, бронхиальная астма, опухолевый рост — процессы, где простагландины являются одними из главных эффекторов. Так, PGE_2 обладает мощным пирогенным действием. Предполагается, что он же действует как модулятор метастазирования раковых клеток, стимулируя процесс.

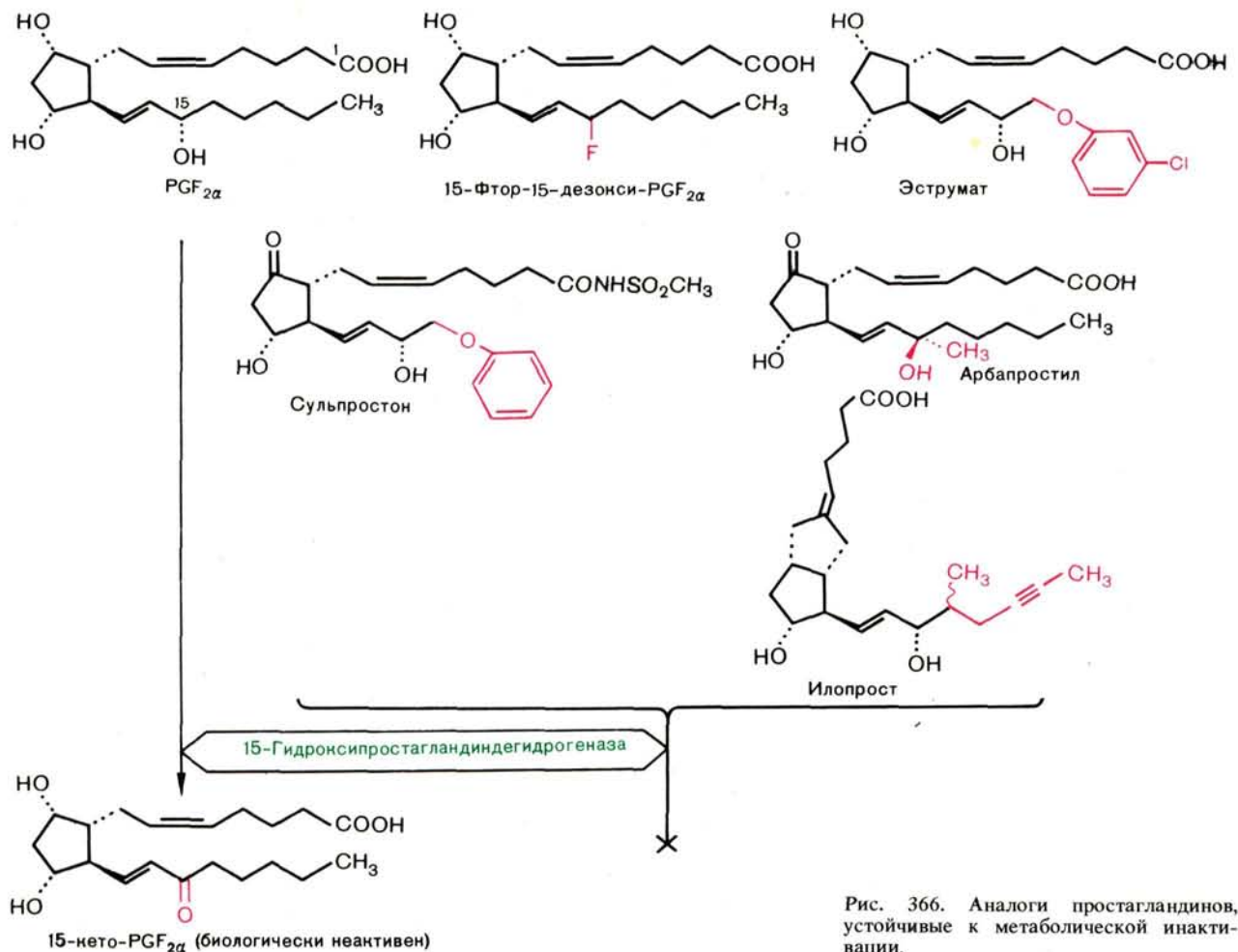
Все, что известно сейчас о простагландинах и тромбоксанах, позволяет считать их «сверхгормонами». Это подтверждается весьма высокой активностью, зарегистрированной в опытах *in vitro*. Простагландины вызывают высокоспецифичные эффекты в концентрациях 10^{-13} — 10^{-15} М, что на несколько порядков ниже их содержания в биологических жидкостях. Способность простагландинов оказывать действие в столь низких концентрациях дает основание рассматривать их не просто как локальные биорегуляторы, но и как циркулирующие гормоны, необходимые, вероятно, для регуляции функций всего организма или его отдельных органов и тканей.

Количественный анализ простагландинов в биологических образцах представляет собой очень непростую задачу из-за их низкого содержания (1—100 пг/мл). Наиболее часто используются методы радиоиммунного анализа и хромато-масс-спектрометрии. Последний метод требует предварительной, нередко очень трудоемкой подготовки образца с целью получения летучих, легко детектируе-

мых производных, однако обеспечивает требуемую точность и высокую надежность идентификации простагландинов.

Поиск новых аналогов простагландинов с улучшенными фармакологическими свойствами — одна из важнейших задач биоорганической химии, поскольку простагландины все шире используются как эффективные препараты в медицине и сельском хозяйстве. Для практического применения необходимы химически и метаболически устойчивые аналоги простагландинов. Например, от действия 15-гидроксипростагландиндегидрогеназы — фермента, инициирующего метаболическую инактивацию простагландинов, хорошую защиту дает введение заместителей (CH_3 или F) в положения 15 или 16, а также замена концевого алкильного остатка на фенокси-группу (рис. 366). Сегодня для практики доступны препараты не только природных простагландинов: PGE_1 (алпростади́л), PGE_2 (простено́н), $\text{PGF}_{2\alpha}$ (энзапро́ст), PGI_2 (эпопростено́л натрия), но и их синтетических аналогов (сульпро́стон, арбапро́стил, эструма́т, илопро́ст и т. д.).

Простагландины оказались чрезвычайно полезными в акушерстве и гинекологии: с их помощью можно вызвать аборт на любой стадии беременности, а также стимулировать роды в случае патологических отклонений. Простациклин, как мощный ингибитор агре-



гации тромбоцитов, используется для проведения операций с искусственным кровообращением и при гемосорбции. Простагландины начинают применяться для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы, терапии язвы желудка и двенадцатиперстной кишки и др.

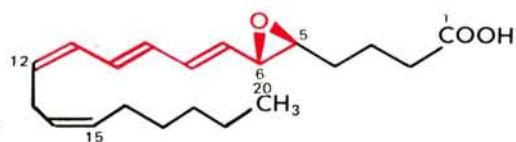
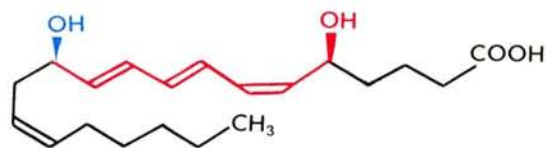
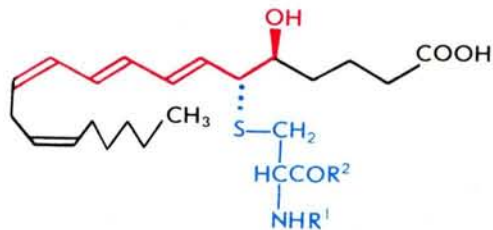
В животноводстве простагландины и их аналоги используются для синхронизации полового цикла животных, что имеет решающее значение для повышения результативности искусственного осеменения. Они незаменимы как диагностические средства для выявления скрытых форм заболеваний крупного рогатого скота.

Лейкотриены

Лейкотриены объединяют группу липидных биорегуляторов, образующихся из эйкозаполиеновых кислот в результате окисления липоксигеназами. Происхождение термина «лейкотриен» (LT) связано с первоначальным обнаружением этих соединений в лейкоцитах (1979), а также с тем, что в их молекулах имеется характерная система из трех сопряженных двойных связей. Подобно простагландинам, лейкотриены обладают высокой физиологической активностью и синтезируются в организме в ответ на определенный стимул.

Лейкотриены — важные медиаторы воспалительных реакций и анафилаксии (болезненной аллергической реакции немедленного типа, возникающей в ответ на введение аллергена).

Различают 6 типов лейкотриенов (A, B, C, D, E, F), причем четыре из них (C—F) содержат остаток цистеина или цистеинил-

LTA₄LTB₄

R¹ R²

LTC ₄	Glu	Gly
LTD ₄	H	Gly
LTE ₄	H	OH
LTF ₄	Glu	OH

пептида. Кроме того, недавно были обнаружены изомеры лейкотриенов, содержащие заместители в положениях 14, 15. Для них предложено название «липотриены». Наконец, в 1984 г. открыта новая серия метаболитов арахидоновой кислоты в лейкоцитах человека; эти соединения, названные липоксинами (LX), имеют в своей структуре систему из четырех сопряженных двойных связей.

Как и многие другие биорегуляторы липидной природы, лейкотриены долгое время оставались химически неидентифицированными. В 1938 г. В. Фельдберг и Г. Келлауэй заметили, что при перфузии изолированного легкого морской свинки раствором, содержащим яд кобры, образуется какое-то вещество, вызывающее сокращение тонкой кишки. Этот эффект, в отличие от действия гистамина, развивается во времени значительно медленнее. Отсюда произошло название «медленно реагирующее вещество» (от англ. slow-reacting substance, SRS). В начале 50-х годов В. Брокхест установил, что во время анафилаксии образуется сходное вещество — SRS-A. В 60-е годы удалось выяснить, что SRS-A — полярный липид, отличающийся от простагландинов; однако из-за недостаточного количества материала для исследования его структура осталась невыясненной и было лишь определено, что SRS-A имеет молекулярную массу около 500 и содержит серу.

Примерно в то же время Б. Самуэльсон, изучавший продукты метаболизма арахидоновой кислоты в полиморфоядерных лейкоцитах кролика, обнаружил новое дигидроксипроизводное, содержащее триеновый хромофор. Далее удалось показать, что это производное, названное позднее лейкотриеном V_4 , образуется из другого, менее стабильного, но биологически весьма активного вещества. В результате работы исследовательских групп Б. Самуэльсона и Э. Кори была установлена структура LTA_4 — нестабильного промежуточного соединения в биосинтезе LTB_4 и осуществлен его химический синтез, который позволил сделать окончательный выбор между несколькими стереомерными структурами.

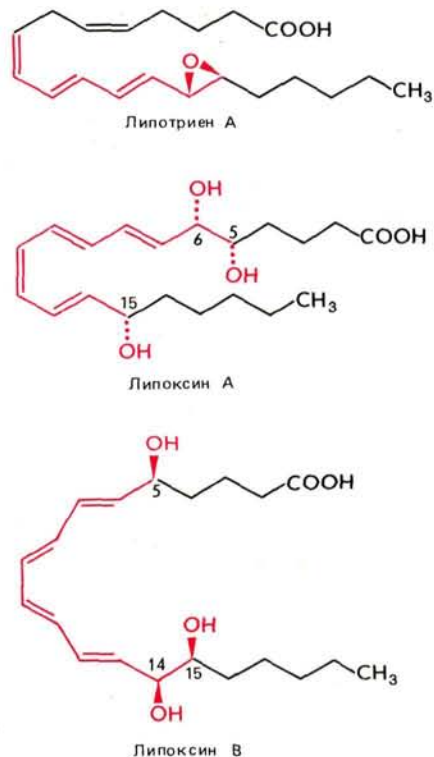
В 1979 г. Б. Самуэльсон сообщил, что SRS-A представляет собой смесь пептидных лейкотриенов, образующихся при реакции LTA_4 с цистеином и цистеин-содержащими пептидами. Структура пептидных лейкотриенов (LTC_4 — LTF_4) была подтверждена стереоспецифическим синтезом (Э. Кори и Дж. Рокач).

Сульфидопептидные лейкотриены найдены в различных клетках и тканях млекопитающих: полиморфоядерных лейкоцитах, моноцитах, макрофагах, легких, брюшной полости. Они синтезируются и некоторыми трансформированными клетками, например клетками базофильной лейкемии крыс. Более распространены лейкотриены, не содержащие пептидных фрагментов. Они найдены не только у животных, но и в растениях. Так, LTA_4 и LTB_4 обнаружены в клубнях картофеля.

Лейкотриены и родственные им соединения стали доступны для широких биологических испытаний только после разработки метода их химического синтеза. Пептидные лейкотриены получают из синтетического LTA_4 и соответствующего пептида, т. е. по схеме, аналогичной биосинтезу этих соединений; сам LTA_4 можно получить как полным химическим синтезом, так и путем химической трансформации арахидоновой кислоты.

По биологической активности лейкотриены значительно превосходят другие известные биорегуляторы, например гистамин. Они играют существенную роль в развитии различных патологических состояний. Миотропные пептидные лейкотриены (LTC_4 и LTD_4) влияют на процесс дыхания. Лейкотриены активно сокращают гладкие мышцы желудочно-кишечного тракта, действуют и на сердце, вызывая сильное сокращение коронарных сосудов; возможно, они участвуют в развитии ишемии миокарда. Наряду с липоксинами и простагландинами лейкотриены служат также важными регуляторами иммунной системы.

Таким образом, существуют два главных пути метаболизма арахидоновой кислоты: циклооксигеназный — до простагландинов и тромбоксанов и липоксигеназный — до лейкотриенов и липоксинов. Вместе с другими реакциями окисления они входят в общую сеть процессов метаболизма, называемую «каскадом арахидоновой кислоты» (рис. 367). Как правило, в клетках и тканях экспрессированы не все ферменты каскада, поэтому состав метаболитов ара-



хидоновой кислоты может служить характеристикой функционального состояния клеток. Активность многих широко применяемых лекарственных препаратов системного типа (например, аспирина) связана с их воздействием на одну или несколько ступеней этого каскада.

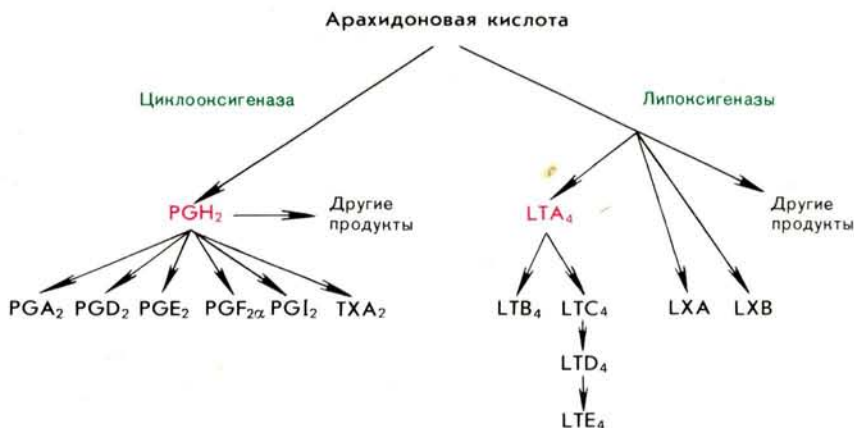


Рис. 367. Каскад арахидоновой кислоты.

Яды и токсины

Термином «яд» обозначаются любые вещества или смеси веществ, попадание небольших количеств которых в живые организмы приводит к их заболеванию или гибели. Токсинами обычно называются яды, выделяемые живыми организмами, хотя для токсинов позвоночных термин «яд» употребляется столь же часто.

Яды и токсины — это, как правило, вещества высочайшей биологической активности и исключительной селективности. Внимание к ним в повседневной жизни связано с опасностью отравления, и не удивительно, что тест на токсичность является обязательным для пищевых продуктов, кормов, всех лекарственных, косметических и парфюмерных средств, пестицидов и т. д. В принципе, любое вещество обладает той или иной степенью токсичности для каждого организма. Еще Т. Парацельс подчеркивал: «Все есть яд, ничто не лишено ядовитости, одна лишь доза делает яд незаметным». Яды известны человеку с древнейших времен, но только в последние десятилетия начато их систематическое изучение.

Многие яды в минимальных дозах широко применяются в медицинской практике. Наиболее известными примерами являются алкалоиды (стрихнин, тубокурарин, морфин, эргоалкалоиды и др.), антибиотики, стероидные гликозиды, змеиный и пчелиный яды и т. п. Токсины и яды широко используются сегодня в лабораториях биохимиков и физиологов в качестве уникальных инструментов исследования. Специфически блокируя различные процессы в организме (передачу нервного импульса, дыхание, сердечную деятельность и т. п.), они способствуют идентификации и выделению соответствующих компонентов клетки и во многом определяют успех при их изучении.

В таблице 29 приведены летальные дозы для мышей некоторых широко известных токсинов и ядов. Наиболее токсичным веществом из известных в природе является ботулинический токсин —



Виткоп (Witkop) Бернхард (р. 1917), американский химик. Окончил Мюнхенский университет (1938), с 1957 г. — заведующий лабораторией химии Национальных институтов здоровья в Бетесде (США). Основные работы посвящены биоорганической химии низкомолекулярных веществ (алкалоиды, токсины, фармакологически активные амины) и биополимеров (нуклеиновые кислоты и белки). Разработал метод расщепления пептидов бромцианом (совместно с Э. Гроссом).

Активность некоторых токсинов

Токсин	Источник	Летальная доза, мкг/кг
Ботулинический, тип В (белок)	Микроорганизм	$1 \cdot 10^{-5}$
Дифтерийный (белок)	Микроорганизм	0,3
Тайпоксин (белок)	Змея	2
Абрин (гликопротеин)	Растение	20
Рицин (белок)	Растение	10
Майтотоксин (строение неизвестно)	Микроводоросль	0,2
Палитоксин	Мягкий коралл	0,45
Батрахотоксин	Лягушка	2
Сакситоксин	Микроводоросль	8
Стрихнин (алкалоид)	Растение	500
Тубокурарин (алкалоид)	Растение	200
Диизопропилфторфосфат	Синтетическое вещество	$3 \cdot 10^3$
Цианид натрия		$1 \cdot 10^4$

белок из *Clostridium botulinum*; среди небелковых токсинов наиболее активны майтотоксин и палитоксин, а известный яд цианид натрия слабее этих токсинов в 10^5 — 10^9 раз.

Яды амфибий и рыб

Впервые применение индейцами-охотниками Колумбии выделений кожных желез ядовитых лягушек в качестве яда для стрел описал английский путешественник Ч. С. Кочрейн в 1824 г. В 1969 г., выделив яд из 8000 лягушек *Phyllobates aurotaenia*, американские ученые Б. Виткоп, Дж. Дэли и Т. Токуяма установили строение основного компонента яда этих лягушек — батрахотоксина (рис. 368). В основе структуры батрахотоксина лежит стероидное ядро с *цис*-сочленением колец А/В и С/Д. Токсин имеет необычную полукетальную группировку в положении 3, семичленный гете-



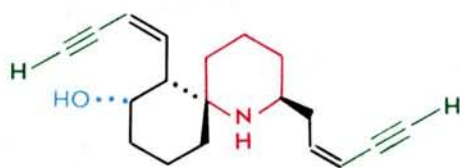
Рис. 368. Ядовитые колумбийские лягушки: вверху — древолаз маленький (*Dendrobates pumilio*); внизу — листолаз двуцветный (*Phyllobates bicolor*).

роцикл (положения 13, 14) и ацилирован диметилпирролкарбоновой кислотой по гидроксигруппе 20. Интересно отметить, что полусинтетический супербатрахотоксин, содержащий остаток триметилпирролкарбоновой кислоты, вдвое активнее природного соединения.

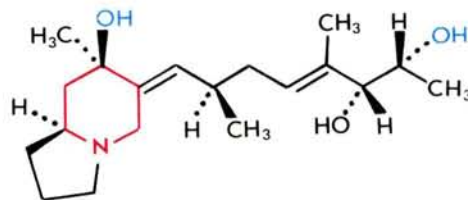
Мишенью действия батрахотоксинов являются натриевые каналы нервных клеток и мышечных волокон. Связывание токсина с рецептором переводит каналы в открытое состояние, что необратимо деполяризует мембрану клетки, прерывает поток нервных импульсов и в случае, например, сердечной мышцы приводит к аритмии, фибрилляции и остановке сердца.

Систематическое изучение южно- и центрально-американских ядовитых лягушек показало, что ядовито более 50 видов лягушек рода *Dendrobates* и пять видов *Phyllobates* (сем. *Dendrobatidae*) и что, помимо батрахотоксина и его аналогов, они производят токсины четырех основных типов. Эти токсины, как и батрахотоксин, обычно называют алкалоидами амфибий. Главными их представителями являются гистрионикотоксин, пумилиотоксины В и С и гефиротоксин; все они содержат пиперидиновое кольцо, сопряженное с алициклическими кольцами, и, вероятно, образуются из общего биогенетического предшественника. Хотя биологическая активность пиперидиновых токсинов лягушек значительно слабее, чем батрахотоксинов, они сразу же привлекли внимание физиологов, фармакологов и биохимиков, которые применяют их для изучения ацетилхолиновых рецепторов мышечных клеток. Для гистрионикотоксина характерно также блокирование тока ионов калия через мембраны нервных клеток, а пумилиотоксин В высвобождает ионы кальция из их резервуаров в нервных и мышечных волокнах, усиливая силу и длительность сокращений сердечных и скелетных мышц.

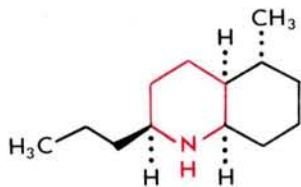
Источником другого класса токсинов являются жабы, яд которых известен с древнейших времен (рис. 369). Так, для прекращения зубной боли и кровоточивости десен препараты из жаб *Bufo bufo gargarizans* применялись в Китае («ч'ан-су») и в Японии («сенсо»). Яды жаб обладают дигиталисоподобным действием на сердце и очень токсичны для млекопитающих. Работы по выделению и структурному изучению этих ядов продолжались свыше 60 лет (1910—



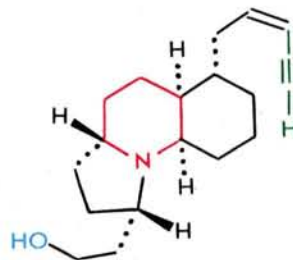
Гистрионикотоксин



Пумилиотоксин В



Пумилиотоксин С



Гефиротоксин

1970), наибольший вклад в исследования внесли Г. Виланд, Д. Абель и др. Типичными представителями являются буфоталин и его субериларгининовый эфир буфотоксин, выделенные из обычной европейской жабы (*Bufo vulgaris*, или *Bufo bufo bufo*). Другие яды жаб также представляют собой стероидные ненасыщенные лактоны с *цис*-сочленением колец А/В и С/Д и β -гидроксильной группой. Соединения этого типа в малых дозах стимулируют сердечную деятельность, а в больших — приводят к остановке сердца в систоле (сердечная контрактура) (см. с. 710).

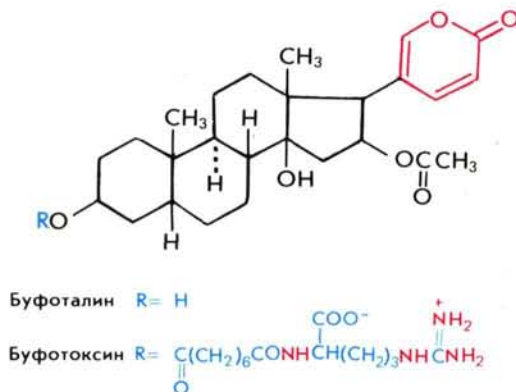
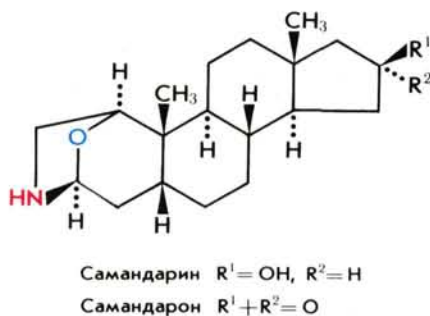


Рис. 369. Жаба серая (*Bufo bufo bufo*).



Ядовитость саламандр известна человечеству с древнейших времен и описывалась еще в античные времена Никандром из Колофона и Плинием Старшим (рис. 370). Выделение яда из кожи европейских видов саламандр (*Salamandra maculosa maculosa* и *S. maculosa taeniata*) впервые описано Лаурентиусом в 1768 г., а строение



основных ядовитых веществ самандарина и самандарона выяснено главным образом в результате работ К. Шёпфа. По токсичности самандарин лишь втрое уступает стрихнину. Он действует на центральную нервную систему и спинной мозг, вызывая сильные конвульсии и смерть от остановки дыхания.

Среди токсинов рыб самым известным является тетродотоксин. Наиболее богатым его источником являются рыбы иглобрюхи

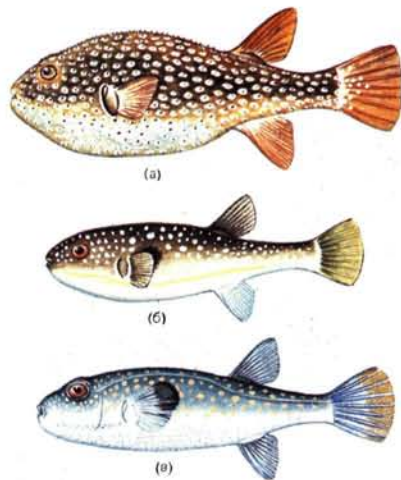
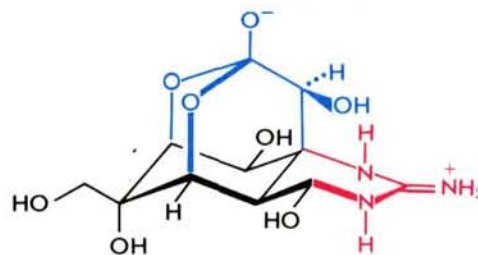


Рис. 371. Наиболее токсичные виды рыбы фугу (кузовка): *Fugu rosillo potum* (а), *Fugu niphobles* (б, в), содержащие тетродотоксин в икре, печени, коже, брюшине и мускульной ткани.

(кузовки) семейства Tetraodontidae, в особенности различные виды *Fugu*, которые в Японии считаются деликатесной едой (рис. 371). Соблюдение процесса приготовления этих рыб, т. е. удаление ядовитых частей (молоки, печень, кожа), контролируется государством, но тем не менее число несчастных случаев, которые часто кончаются смертью, достигает в некоторые годы сотен человек. Впервые тетродотоксин выделил Й. Тахара в 1909 г. В 1930 г. обнаружена ядовитость калифорнийского тритона *Taricha torosa*, токсин которого (тарихатоксин) оказался идентичным тетродотоксину (Г. С. Мошер, 1964). Уникальная структура тетродотоксина, представляющего собой полициклическую внутреннюю соль гуанидиновой и ортоэфирной группировок, была установлена в 60-х годах уси-



Тетродотоксин

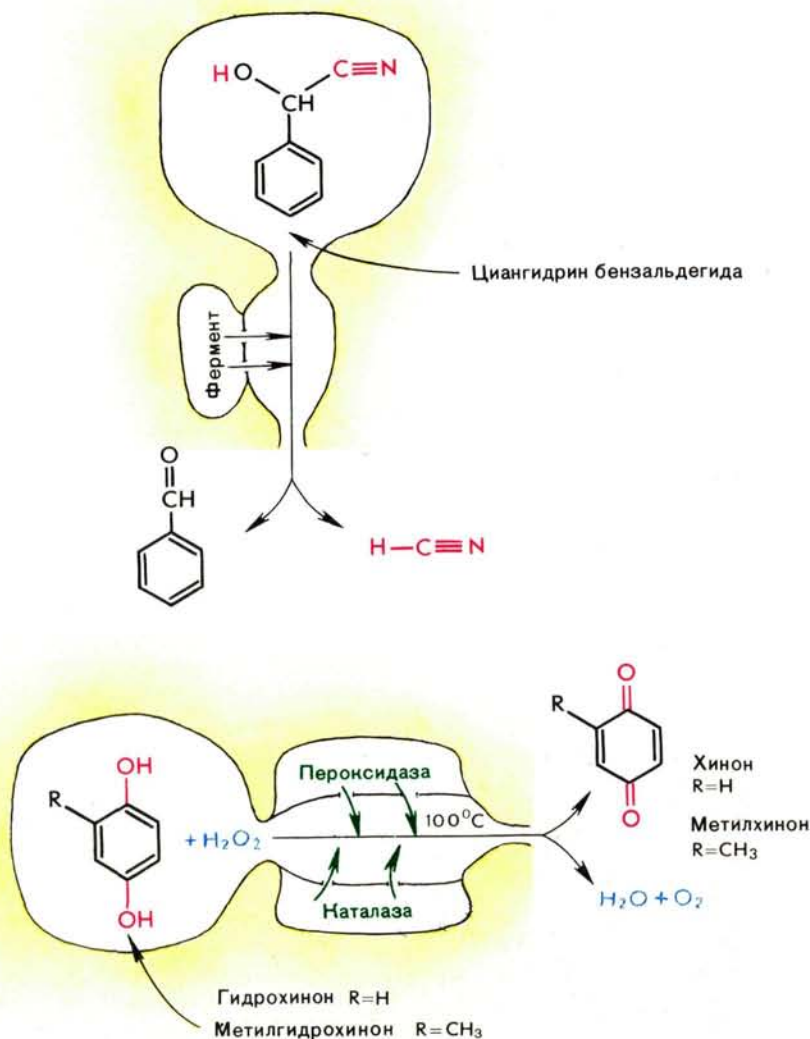
лиями трех групп исследователей, возглавляемых Р. Б. Вудвордом, К. Тсуда и Й. Хирата. Токсин встречается также у ряда бычковых рыб (*Gobiidae*), в коже и яйцах коста-риканских лягушек рода *Atelopus*, в тканях краба *Atergatis floridis* и других животных. Широкое распространение тетродотоксина среди позвоночных и беспозвоночных, а также сезонные вариации в его содержании позволили выдвинуть гипотезу, что действительным продуцентом токсина является какой-то симбионтный микроорганизм. Действительно, в 1986 г. группе японских ученых удалось выделить бактерию-вибрион, присутствие которой обуславливает токсичность крабов *A. floridis*. Тетродотоксин является типичным нейротоксином, блокатором натриевых каналов, и по структуре и действию он близок сакситоксину (см. с. 771). У млекопитающих токсин вызывает паралич скелетной мускулатуры, падение кровяного давления и смерть от остановки дыхания. Летальная доза для взрослых людей (массой около 70 кг) составляет 0,5 мг.



Рис. 370. Саламандра пятнистая, или огненная (*Salamandra salamandra*).

В процессе эволюции многие членистоногие выработали действенные химические средства защиты и нападения. Достаточно назвать пчел, ос, шершней, пауков, скорпионов. Большинство известных токсинов членистоногих имеет белковую или пептидную природу.

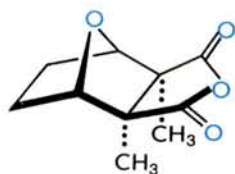
Некоторые плоские тысячножки (*Apheloria corrugata*, *Pseudopolydesmus serratus*) в качестве оборонительного средства вырабатывают синильную кислоту, причем она может выделяться у них свыше 30 мин и в довольно значительных количествах (более 500 мкг). Токсичное действие синильной кислоты связано с угнетением цитохромоксидазы, которое ведет к ингибированию тканевого дыхания и, как следствие, к нарушению работы сердца, судорогам, параличу и гибели от удушья. Система для синтеза и выделения синильной кислоты устроена у этих насекомых по типу, ана-



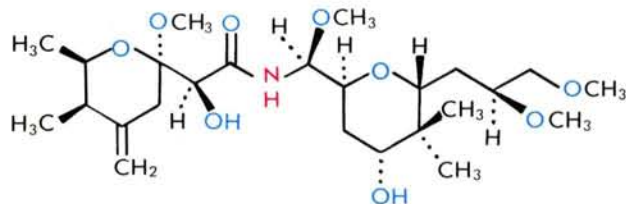
логичному для печально известных в настоящее время бинарных химических боезарядов: в хранилище находится циангидрин бензальдегида, который через мышечный клапан подается в реакционную камеру, где обрабатывается специальным ферментом, превращающим его в смесь бензальдегида и синильной кислоты. Аналогичную защиту применяет жук-бомбардир *Brachynus crepitans*, который в хранилище содержит смесь гидрохинона, метилгидрохинона и пероксида водорода, а в «реакторе» обрабатывает ее ферментами каталазой и пероксидазой, в результате чего образующиеся хиноны со взрывом выбрасываются в сторону противника.

Многие виды муравьев при укусе выделяют органические кислоты, например *Formica rufa* — муравьиную, а *Murgicaria natalensis* — смесь уксусной, изовалериановой и пропионовой кислот. Единичный укус вызывает у человека лишь болезненное ощущение, укусы же большого количества муравьев могут привести к смерти. Общеизвестно, что массовые миграции муравьев в тропических районах Африки и Южной Америки сопровождаются гибелью не только насекомых, но также птиц и грызунов.

Восточно-африканский жук-хищник *Paederus fuscipes* выделяет наиболее сложный токсин насекомых — педерин. Нанесение его на переднюю часть головы мыши в дозе 20 мкг/кг массы вызывает дерматоз с последующими некрозом, отеком головы и гибелью животного. У человека педерин поражает первый слой эпидермиса, а в значительных дозах приводит к хроническому шелушению кожи. Он обладает необычным механизмом действия — сначала блокирует синтез белка, а затем ДНК (но не РНК); токсин ингибирует также деление хромосом в опухолевых клетках.



Кантаридин



Педерин

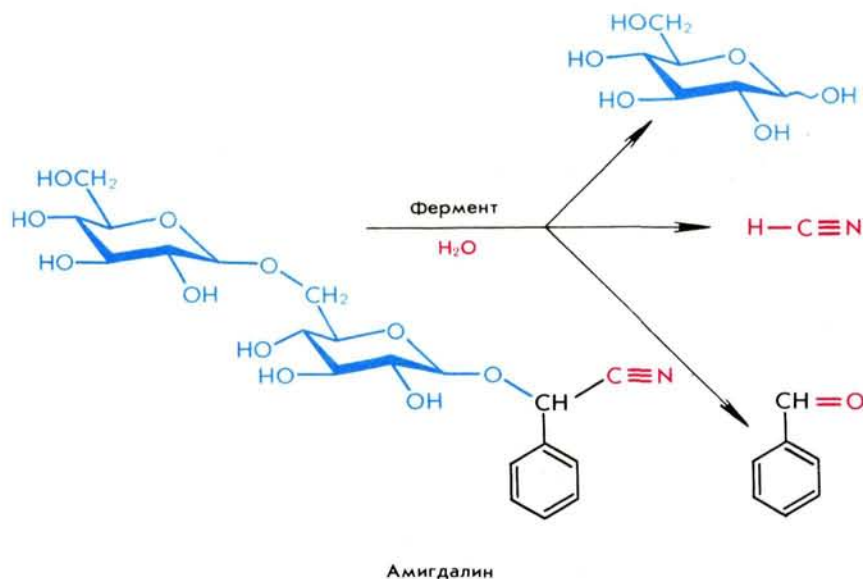
Жуки-нарывники сем. *Meloidae* и шпанские мушки (*Cantharis vesicatoria*) продуцируют кантаридин, обладающий кожно-нарывным и в то же время афродизиаческим действием; доза в 10 мг, однако, может оказаться смертельной для человека.

Токсины высших растений

Хорошо известными токсинами многих растений являются алкалоиды (см. с. 638). Ранее описаны также лектины — высокотоксичные белки или гликопротеины, выделяемые главным образом из семян некоторых растений; среди них наиболее яркими представителями являются ризин и абрин (см. с. 472). Однако растения могут

производить и ряд токсичных низкомолекулярных веществ других типов.

Простейшим токсином высших растений является синильная кислота, присутствующая в связанной форме цианогенных гликозидов. Все они построены по единому принципу и высвобождают синильную кислоту в процессе ферментативного гидролиза после повреждения клеток растений. Типичным представителем таких гликозидов является амигдалин, присутствующий в ядрышках абрикосовых косточек. Употребление в пищу около 100 г ядрышек (около 1 г амигдалина) смертельно.



Еще одним простейшим токсином, кстати довольно ядовитым для человека (смертельная доза — 2—5 мг/кг), является монофторуксусная кислота FCH_2COOH — вторичный метаболит опасного южно-африканского растения *Dichapetalum sumosum*. Имитируя уксусную кислоту, она включается в цикл Кребса, где на одной из стадий распознается ферментом аконитазой, вследствие чего дыхательный цикл прерывается.

В период бурного роста астрагала (*Astragalus miser*) в США часто наблюдается хронический паралич и затруднение дыхания или даже падеж овец и крупного рогатого скота. Причиной отравления является мизеротоксин — β -гликозид нитропропанола, токсическое действие которого обусловлено, вероятно, гидролизом

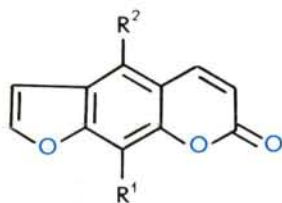
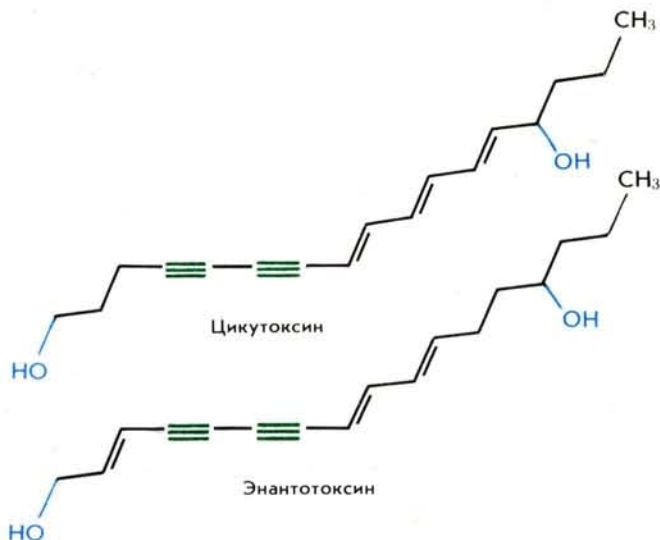




до 3-нитропропилового спирта, поражающего в головном мозге центры, ответственные за дыхание и мышечное сокращение.

Вначале в меде, собранном пчелами с цветов рододендронов в Альпах, а затем также в листьях, корнях и других частях этих растений обнаружено целое семейство грайанотоксинов — дитерпенов, которые также часто вызывают гибель скота. Среди них наиболее известным является грайанотоксин III, который, как и ранее рассмотренный батрахотоксин, вызывает повышение проницаемости мембран нервно-мышечной ткани для ионов натрия и используется в нейрофизиологических и нейрофармакологических исследованиях.

Ядовитые свойства зонтичных — цикуты (*Cicuta virosa*) и лабазника (*Oenanthe crocata*), названного за свою ядовитость «пятипалой смертью», известны с глубокой древности; по преданию, настоем одного из этих растений был отравлен Сократ. Токсичные ацилиновые диолы этих растений — цикутоксин и энантотоксин также влияют на натриевые каналы хемовозбудимых мембран и находят применение в нейрофизиологии. Симптомы отравления ацилиновыми и грайанотоксинами сходны — они вызывают понижение давления, конвульсии, опухание тела и смерть от удушья.

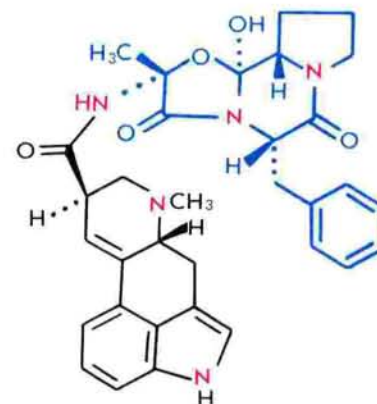


	R ¹	R ²
Псорален	H	H
Ксантотоксин	OCH ₃	H
Бергаптен	H	OCH ₃

Весьма необычным действием на людей и сельскохозяйственных животных обладают полициклический хинон гиперин из зверобоя пронзеннолистного (*Hypericum perforatum*) и фурукумарины псорален, ксантотоксин и бергаптен, встречающиеся в растениях семейств *Aurantiodiaae*, *Rutaceae*, *Umbelliferae*, *Leguminosae* и *Moraceae*. Эти токсины накапливаются в наружных тканях организма и коже, делая их чувствительными не только к ультрафиолетовому, но и более длинноволновому облучению. В результате на солнечном свете образуются ожоги, дерматиты и некроз кожи, а также вторичные инфекции, что может приводить даже к гибели животных. У людей псорален и ксантотоксин используются для лечения витилиго, псориаза и некоторых микозов.

С социальной точки зрения, пожалуй, наиболее опасными для человека являются микотоксины. Сам этот термин введен М. Моссом только в 1972 г., опасность микотоксинов по-настоящему осознана в 1960 г. (после массового поражения индюшек на фермах Англии), но вредное действие некоторых микотоксинов — эргоалкалоидов было известно европейцам еще в средние века.

Эргоалкалоиды, среди которых преобладающим является эрготамин, представляют собой частично циклизованные тетрапептиды, построенные из остатков лизергиновой кислоты и трех из числа следующих аминокислот: аланина, пролина, фенилаланина, валина, лейцина, α -аминомасляной кислоты или аминoproпанола. Они продуцируются спорыньей — нитчатым грибом *Claviceps purpurea* (см. с. 649), паразитирующим на зерновых культурах (чаще всего на ржи), и выделяются из зрелой формы гриба — так называемых склероций. Заболевания от употребления зараженного зерна в пищу — эпилептические конвульсии («злая корча») и гангрена конечностей («антонов огонь») — в средние века носили массовый, эпидемический характер. В настоящее время успехи агротехники очистили поля от спорыньи, но ее стали разводить искусственно, так как эргоалкалоиды оказались ценными лечебными средствами: они вызывают сокращения матки и широко применяются при родах и для прерывания беременности, а также успокаивают нервную систему, уменьшают тахикардию, лечат мигрень и т. д. Эргометрин также применяется в медицине, а его ближайший аналог — диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД₂₅) является одним из самых мощных галлюциногенов и поэтому принадлежит к числу опаснейших наркотиков (см. с. 649).



Эрготамин



Лизергиновая кислота R = OH

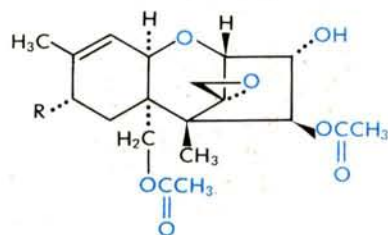
Эргометрин R = NHCH(CH₃)(CH₂OH)

Диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД₂₅) R = N(C₂H₅)₂

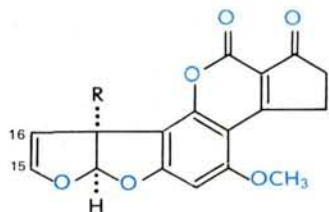
Хотя бурное развитие исследований по микотоксинам началось сравнительно недавно (с 60-х годов), в настоящее время известно уже более 300 таких соединений, принадлежащих к 25 различным типам и продуцируемых примерно 350 видами плесеней. В небольших дозах микотоксины оказывают разнообразные токсические эффекты на людей и животных, приводят к деградации печени, геморрагии и карциноме. Разработка гигиенических критериев состояния окружающей среды в отношении заражения микотоксинами и контроль заражения относятся к важнейшим задачам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

Опаснейшую группу микотоксинов представляют собой трихотецены, продуцируемые главным образом токсичными грибами рода *Fusarium*. Среди них наиболее ядовиты диацетоксисцирпенол и токсин Т-2 (LD₅₀ для крыс соответственно 0,75 и 3,8 мг/кг). Как и спорынья, продуценты трихотеценов поражают в основном зерно, а у потребляющих его животных токсины вызывают разрушения кожи, сепсис, некроз слизистых оболочек кишечника, почек, лимфатических узлов и костного мозга; причиной этих нарушений является, по-видимому, угнетение биосинтеза белка. У людей действие трихотеценов связывают со вспышками алиментарной токсической алейкии, основными симптомами которой являются некроз тканей пищевого тракта и лейкопения. Эти вспышки наблюдались главным образом в 1931—1943 гг., одна из них произошла, например, на Южном Урале в 1943 г.; последние вспышки имели место в Лаосе и Кампучии совсем недавно.

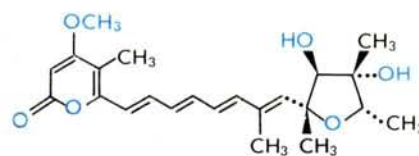
В качестве главных по опасности микотоксинов сейчас рассматривают группу метаболитов *Aspergillus flavus* — афлатоксинов, из которых наиболее коварны афлатоксин В₁ и продукт его метаболического окисления в организмах коров, проникающий в молоко, — афлатоксин М₁. Доказано, что они являются причиной рака печени



Диацетоксисцирпенол R=H
Токсин T-2 R=(CH₃)₂CHCH₂CO



Афлатоксин В₁ R=H
Афлатоксин М₁ R=OH



Цитреовиридин

(Африка) и цирроза печени у детей (Индия). Механизм действия афлатоксинов состоит в том, что они после 15, 16-эпоксилирования цитохромом Р-450 связываются с РНК, ингибируя затем синтез белка.

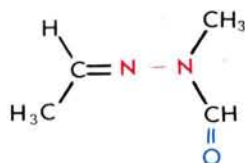
Среди эпидемических микотоксикозов надо упомянуть также «сердечную бери-бери» — болезнь, сходную по симптомам с В₁-авитаминозом, которая в 1908 г., например, унесла в Японии 10 тыс. жизней. Причиной заболевания является поражающий рис токсин грибов *Penicillium citreoviride* и *Aspergillus terreus* — цитреовиридин. Механизм действия этого токсина состоит в ингибировании митохондриального синтеза АТФ.

Ряд других известных микотоксинов поражает сельскохозяйственных животных, что приводит к значительным экономическим потерям. Основная опасность микотоксинов связана с заражением ими продуктов питания, а поскольку они устойчивы в условиях хранения и приготовления пищи и очистку зараженных продуктов организовать невозможно, то ежегодно, по данным ВОЗ, приходится уничтожать до 10% мирового урожая.

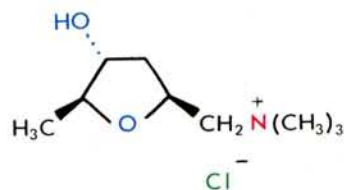
Хорошо известно, что некоторые высшие грибы также содержат весьма опасные ядовитые вещества. Циклопептидные токсины бледной поганки были уже описаны выше (см. с. 276). Ряд ложных сморчков (*Helvella underwoodii*, *H. esculenta* и др.) содержит довольно простое соединение — гиометрин, симптомы отравления которым аналогичны действию яда бледной поганки.

Мухоморы *Amanita muscaria* и некоторые виды *Inocybe* содержат мускарин — известный имитатор ацетилхолина по отношению к парасимпатическим постганглионарным синапсам (мускариночувствительным, или м-холинорецепторам). Применение мускарина, его изомеров и аналогов оказало большое влияние на изучение ацетилхолиновых рецепторов. У человека мускарин сильно снижает кровяное давление, амплитуду и частоту сердечных сокращений, а в больших дозах может привести к конвульсиям, коме и смерти через несколько часов.

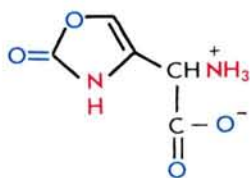
Другой метаболит *A. muscaria* — мусказон воздействует на психику человека, вызывая потерю памяти, ориентировки и расстройство зрения.



Гиометрин



Мускарин



Мусказон

Последние два-три десятилетия характеризуются интенсивным поиском и изучением токсинов из этих объектов. Результатом явилось выделение и установление строения многих необычных природных соединений новых типов, и, судя по нарастающему интересу к такого рода исследованиям, водные и морские организмы еще долго будут богатым источником новых веществ с самыми разнообразными биологическими свойствами.

Первое классическое описание «красных приливов» находится в Библии: «И вся вода в реке превратилась в кровь. И рыба в реке вымерла, и река восмердела, и Египтяне не могли пить воду из реки; и была кровь по всей Земле Египетской...». Причина этого явления, обычно развивающегося в эстуариях рек, на мелководных участках моря или вблизи побережий, впервые установлена в 1928 г. Г. Соммером. Она заключается в массовом размножении токсичных микроводорослей — динофлагеллат, главным образом родов *Gonyaulax*, *Glenodinium*, *Peridinium*, *Gyrodinium*, *Noctiluca* и *Gymnodinium*, в результате чего вода оказывается зараженной их токсином и почти все остальные морские обитатели гибнут или спасаются бегством (рис. 372). Выживают при этом только немногие рыбы и некоторые моллюски-фильтраторы, которые, накапливая токсины, становятся причиной отравления или даже гибели прибрежных жителей. Токсин *Gonyaulax catenella*, или *G. tamarensis*, названный сакситоксином, впервые выделен из аляскинского моллюска *Saxidomus giganteus* Э. Шанцем в 1957 г., а структура его окончательно установлена рентгеноструктурным анализом в 1975 г. независимо группами Э. Шанца и Г. Рапопорта (США). Позднее сакситоксин был обнаружен также в пресноводных сине-зеленых водорослях *Aphanizomenon flos-aquae*, а его аналоги — неосакситоксин, сульфированные производные гониатоксины I, II и др. — в ряде морских микроводорослей, встречающихся главным образом в Северной Атлантике, северной части Тихого океана и у берегов Японии. Сакситоксин представляет собой дигуанидиновое производное с жестким трициклическим скелетом, уретановой функцией и гидратированной 12-карбонильной группой в пирролидиновом кольце и напоминает тетродотоксин (см. с. 764). По биологическому действию он полностью ему аналогичен, являясь блокатором натриевых каналов электровозбудимых мембран нервных и мышечных клеток.

Другой динофлагеллат, вызывающий массовую гибель рыбы и интоксикацию людей у берегов Флориды и в Мексиканском зали-

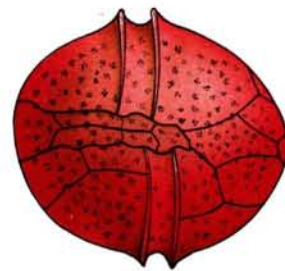
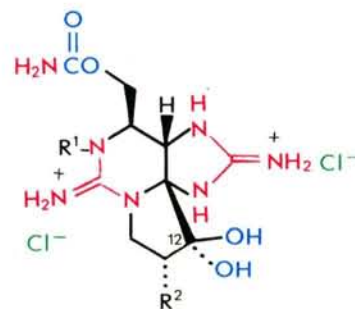
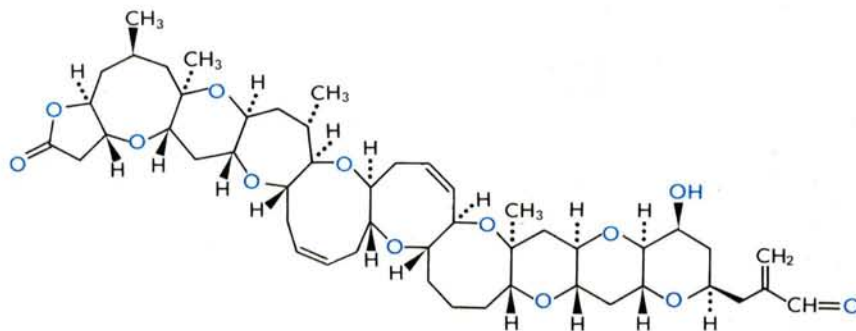


Рис. 372. Динофлагеллат *Gonyaulax tamarensis*.



	R ¹	R ²
Сакситоксин	H	H
Неосакситоксин	OH	H
Гониатоксин I	H	OSO ₃ ⁻
Гониатоксин II	OH	OSO ₃ ⁻



Бrevetоксин А

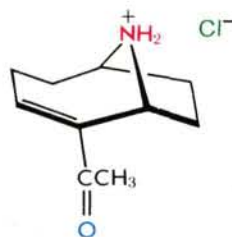


Шойер [Scheuer] Пауль (р. 1915), американский химик-органик. Образование получил в Северо-восточном университете в Бостоне и Гарвардском университете, с 1961 г. — профессор Гавайского университета. Известен работами по изучению токсинов.

ве, — *Ptychodiscus* (*Gymnodinium*) *breve*; он продуцирует целую группу липофильных бреветоксинов, из которых наиболее активным является бреветоксин А. Основной вклад в исследование этих токсинов внесли группы К. Наканиси и Дж. Кларди (США), а структура бреветоксина А установлена в 1986 г. группами Ю. Шимицу (Канада) и Дж. Кларди (США). Бреветоксины — необычные полиэфирные соединения, состоящие из 10—11 насыщенных кислородсодержащих циклов разной величины. Их токсичность обусловлена блокированием нервно-мышечной передачи.

Третий токсичный динофлагеллат, который привлекает сейчас внимание исследователей, — *Gambierdiscus toxicus*; он продуцирует сразу два мощных токсина: липофильный сигуатоксин, являющийся причиной многих пищевых отравлений в тропических регионах со времен эпохи Великих географических открытий, и самый сильный из известных небелковых токсинов — майтотоксин; строение их пока не известно.

Среди токсичных пресноводных сине-зеленых водорослей печально известна *Anabaena flos-aquae*, токсичный штамм которой явился, например, причиной гибели скота в Канаде в 1961 г. В 1966 г. из нее был выделен анатоксин А, строение которого установлено



Анатоксин А

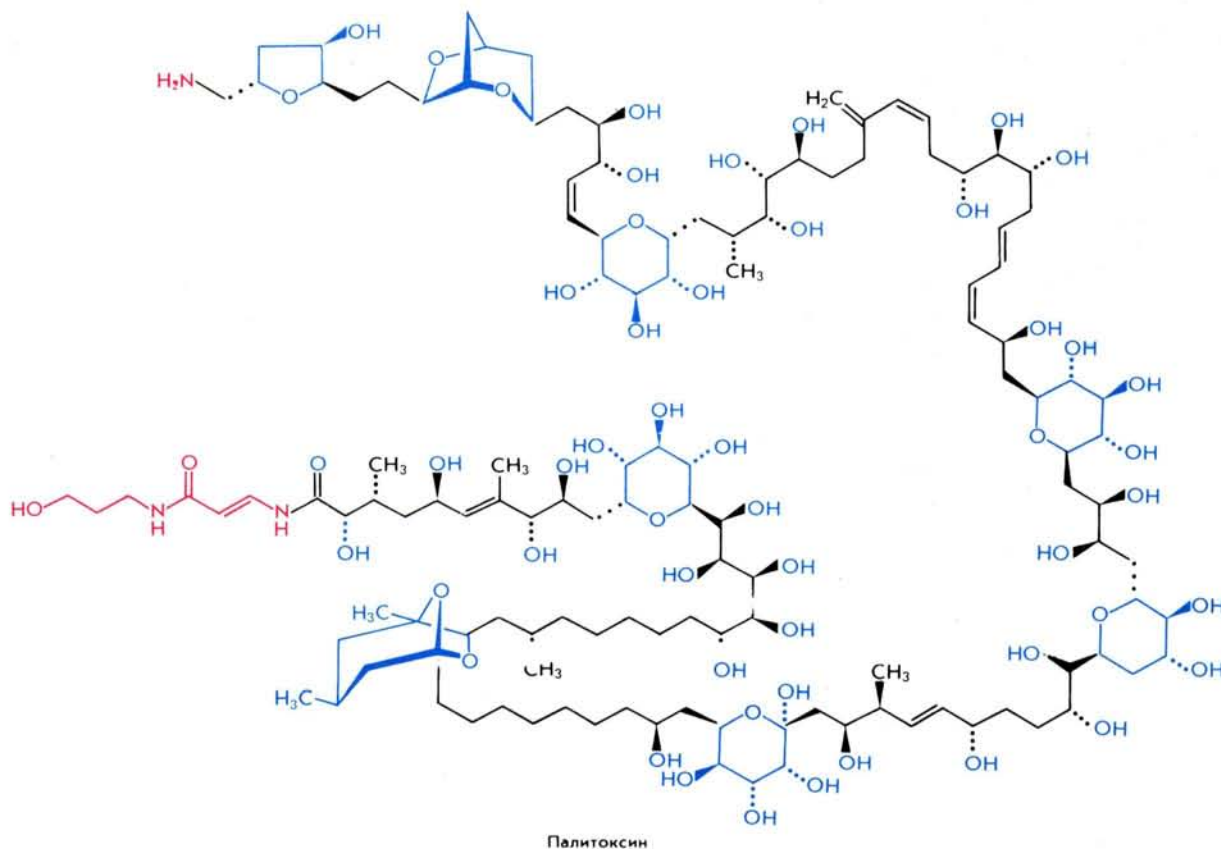
в 1972 г. рентгеноструктурным анализом (рис. 373). Анатоксин А является сильным нейротоксином, вызывающим в летальных дозах смерть в течение 2—7 мин. Он находит широкое применение при изучении процессов нервно-мышечной передачи.

Самым сложным по структуре и вторым по активности (токсичности) небелковым токсином является палитоксин, впервые выделенный Р. Муром и П. Шойером (США) в 1971 г. из мягких кораллов *Paluethoa toxica*, найденных на Гавайских островах. Установление его строения и стереохимии, завершенное в 1981 г. объединенными группами Й. Хирата и Й. Киши, явилось выдающимся событием в биоорганической химии. Молекула палитоксина представляет собой уникальную структуру, длинная цепь которой построена из ди-, три- и тетрагидрокситетрагидропирановых и фурановых циклов, соединенных насыщенными и ненасыщенными цепями полиолов, на его N-конце находится первичная аминогруппа, а C-конец ацилирован остатком β-аминоакриламинопропанола. Палитоксин обладает мощным действием: при внутривенном введении мышам его LD₅₀ составляет 0,15 мкг/кг, при внутривенном — 0,4 мкг/кг, а для обезьян он еще токсичнее — LD₅₀ 0,078 мкг/кг. Летальный исход наступает через 5—30 мин в результате сужения сосудов, аритмии, коронарных спазмов и остановки дыхания. Интересно, что в сублетальных дозах палитоксин проявляет высокую противоопухолевую активность. Механизм действия палитоксина не



Рис. 373. Ядовитая пресноводная сине-зеленая водоросль *Anabaena*.

вполне ясен, хотя тоже является необычным: он, аналогично убаину, но значительно сильнее, связывается с Na^+ , K^+ -АТФазами чувствительных клеток (нервной ткани, сердца, эритроцитов) и образует в местах связывания поры в цитоплазматических мембранах, в результате чего клетки теряют ионы K^+ и Ca^{2+} и погибают.



Феромоны и ювенильные гормоны насекомых

Феромоны насекомых

Большое значение в жизни и поведении насекомых, их общении друг с другом играют низкомолекулярные вещества, выделяемые эндокринными железами и используемые насекомыми как средство внутривидовой передачи информации. Среди них имеются соединения, вызывающие состояние тревоги или агрессии, регулирующие поведение общественных насекомых (пчел, термитов, муравьев),



Рис. 374. Бабочка *Platysamia secropia*; антенны-усики несут развитую систему рецепторов запаха.



Рис. 375. Бабочка бражник «мертвая голова» (*Acherontia atropos*).

вещества-метчики (для ограничения территории обитания, следовые метки и др.), вызывающие большие скопления насекомых на ограниченных территориях. Некоторые из таких веществ, выделяемые самками насекомых, привлекают самцов.

Эту группу биорегуляторов обычно объединяют под общим названием «феромоны», образованным от двух греческих слов: *φέρειν* (переносить) и *ἵρμακν* (возбуждать). Впервые данное понятие было предложено Р. Карлсоном (Великобритания) в 1959 г., который дал ему следующее определение: «Феромоны — это вещества, вырабатываемые и выделяемые в окружающую среду живыми организмами (часто с помощью специализированных желез) и вызывающие специфическую ответную реакцию (характерное поведение или характерный процесс развития) у воспринимающих их особей того же биологического вида». Другими словами, эта специфическая ответная реакция возникает на расстоянии за счет распространения феромонов в среде обитания (по воздуху, в воде или почвенном слое). Есть сведения о наличии феромонов у многих видов животных, но наиболее детально они изучены у насекомых.

О существовании внутри- и межвидовой хеморецепторной связи догадывались давно. Еще в середине прошлого столетия было установлено (Дж. Сиболд, Великобритания, 1837), что самки насекомых испускают запах, который привлекает самцов, причем на этот запах самцы реагируют только в половозрелой стадии и при наличии достаточного количества корма. Столетие спустя проблемой заинтересовался А. Бутенандт, выделивший в конце 50-х годов из пахучих желез самок тутового шелкопряда первый феромон, названный бомбиколом. Для идентификации феромона А. Бутенандту понадобилось около 20 лет и приблизительно 500 тыс. половозрелых самок тутового шелкопряда.

С тех пор в разных странах интенсивно начали развиваться работы по выделению и идентификации феромонов, влияющих на поведение насекомых, и особенно половых феромонов, число которых к 1983 г. достигло 600. По своей химической природе феромоны относятся к самым различным классам органических веществ: углеводородам, алифатическим и ароматическим спиртам, альдегидам, сложным эфирам, соединениям карбоциклической и гетероциклической природы и др.

За миллионы лет своего развития насекомые выработали совершенный механизм восприятия (хеморецепции) запаха, в том числе и феромонов. Антенны-усики насекомых содержат многочисленные концевые органы — сенсиллы, высокочувствительные к запахам, переносимым потоками воздуха (рис. 374). Механизм такой хеморецепции еще не вполне ясен, однако установлено, что специфический сигнал химического соединения, воспринимаемый сенсиллами, трансформируется в электрический, воспринимаемый затем уже мозгом. Часто для появления сигнала достаточно попадания лишь одной молекулы феромона на рецепторную систему насекомого. Минимальная концентрация феромона бомбикола, вызывающая ответную реакцию у 50% испытуемых самцов тутового шелкопряда, составляет 10^{-12} мкг/мл. У тараканов порог восприятия еще выше (10^{-14} мкг/мл, т. е. 25 молекул феромона в 1 мл воздуха).

Большинство природных феромонов — многокомпонентные смеси соединений с различной активностью. Причем иногда высокоактивные компоненты находятся в минорных количествах, а отсутствие их в искусственно созданных композициях может изменить видовую специфичность препарата.

Изучение сверхмалых количеств феромонов является весьма дорогостоящим, так как требует применения совершенных методов экстракции, разделения и физико-химического структурного ана-

лиза. Комплексное применение таких методов привело к большим успехам в установлении строения многих феромонов, и практически все они теперь получены синтетически. Значительный интерес представляют исследования практического использования феромонов как средств, регулирующих численность популяций насекомых — вредителей сельского хозяйства.

К настоящему времени наиболее хорошо изучены феромоны бабочек чешуекрылых (Lepidoptera). Почти все они имеют строение непредельных алифатических спиртов, их ацетатов или альдегидов общей формулы:



где R = OH, OCOCH₃ или CHO и различаются по длине углеводородной цепи (в основном C₁₂—C₁₆), положению и числу двойных связей, а также по конфигурации двойной связи (Z- или E-изомеры). К такому ряду относятся феромоны мельничной огневки (*Cadra cautella*), хлопковой совки (*Heliotis virescens*), тутового шелкопряда (*Bombyx mori*), яблонной плодовой яблони (*Laspeyresia pomonella*) и бражника «мертвая голова» (*Acherontia atropos*) (рис. 375). Все они представляют собой ахиральные соединения, биосинтез которых протекает по общему с липидами пути.



(9Z)-Тетрадеценилацетат

Мельничная огневка
(*Cadra cautella*)Бражник «мертвая голова»
(*Acherontia atropos*)(10E, 12Z)-Гексадекадиенол
(бомбикол)Тутовый шелкопряд
(*Bombyx mori*)

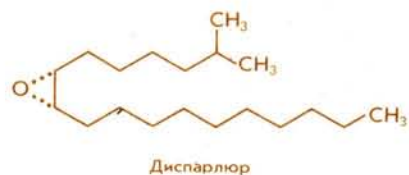
(9Z)-Тетрадеценаль

Хлопковая совка
(*Heliotis virescens*)

(8E, 10E)-Додекадиенол

Яблонная плодовая яблони
(*Laspeyresia pomonella*)

Недавно обнаружена большая группа феромонов, в молекулах которых присутствует один или несколько хиральных центров. Так, непарный шелкопряд *Lymatria* (*Porthetria*) *dispar* (Lepidoptera), например, выделяет феромон, известный под названием «диспарлюр»; половым феромоном бабочки *Danaus chrysippus* (Lepidoptera) является (E)-3,7-диметил-2-октен-1,8-диол. Недавно было установлено, что феромон фасоловой зерновки представляет собой смесь (E)-3,7-диметил-2-октен-1,8-диовой кислоты (каллобрухузовой кислоты) и ряда 3-метилзамещенных углеводородов с 25—33 C-атомами.



Диспарлюр

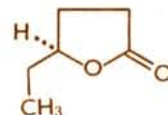


(E)-3,7-Диметил-2-октен-1,8-диол

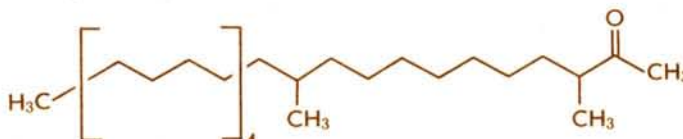
В многокомпонентном феромоне жука-кожееда *Trogoderma glabrum* (Coleoptera, Dermestidae) обнаружен оптически активный 5-этилбутанолид, а феромоном таракана-прусака *Blattella germanica* (Blattodea) является 3,11-диметил-2-нонакозанон.



(E)-3,7-Диметил-2-октен-1,8-диовая
кислота



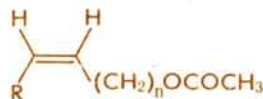
5-Этилбутанолид



3,11-Диметил-2-нонакозанон

Помимо феромонов, существуют и природные антиферомоны, или дисраптанты, ингибирующие восприятие феромонов хеморецепторными органами насекомых. Такие соединения обычно близки по строению самим феромонам, но отличаются от последних степенью ненасыщенности, геометрией двойной цепи, функциональной группировкой на конце алифатической цепи или размерами самой цепи.

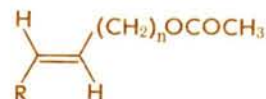
Установлено, что половой феромон бабочки соснового побеговьяна *Rhyacionia buoliana* — (9E)-додеценилацетат, однако применение синтетического феромона в полевых условиях показало, что он практически неактивен для вредителя из-за содержания в нем примеси (Z)-изомера (1,1%). В то же время чистый (Z)-изомер 8-додеценилацетата — компонент полового феромона фруктовой моли *Grapholitha molesta* неактивен, но добавление к нему 7% (E)-изомера приводит к активации феромона.



(8Z)-Додеценилацетат



(9Z)-Додеценилацетат



(8E)-Додеценилацетат



(9E)-Додеценилацетат



Эти данные показывают, насколько высокостереоспецифичными должны быть синтезы феромонов. Такие синтезы в последние годы удалось осуществить на основе совершенно новой методологии, дающей каждый раз специфически только один из возможных изо-

меров; это позволило из чистых веществ создавать необходимые композиции, высокоаттрактивные для насекомых.

Наиболее ранний синтез феромонов основан на алкилировании практически малодоступных монозамещенных ацетиленов согласно общей схеме:

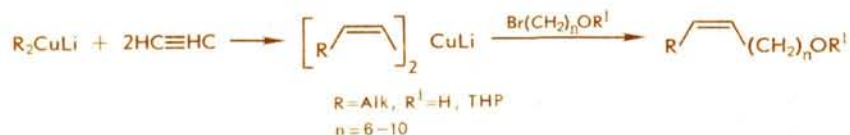


$\text{R} = \text{Alk}$, $\text{R}^1 = \text{H}$, ТНР (тетрагидропиранил)

$n = 6-10$

Такой синтез позволил получить ряд соединений и даже испытать их в поле, но оказался недостаточно технологичным для промышленного получения феромонов из-за трудности стереоспецифичного восстановления дизамещенных ацетиленовых соединений. В настоящее время существуют катализаторы, пригодные для этой цели, но необходимость использования водорода, повышенных давлений и недостаточная избирательность восстановления тройной связи до (Z)- или (E)-олефинов часто сводят на нет преимущества промышленного синтеза феромонов.

Более перспективным является синтез феромонов, предложенный французским ученым Ж. Ф. Норманом, в котором полностью исключена стадия гидрирования тройной связи. Этот путь синтеза состоит в стереоспецифичном присоединении доступных диалкилли-



тйкупратов к ацетилену. Последующее алкилирование образующегося металлоорганического соединения позволяет получать (Z)-олефины с чистотой до 99,95%.

Феромоны нашли практическое использование для защиты растений от насекомых-вредителей. Одним из таких методов является метод создания «самцового вакуума», который сводится к отлову самцов с помощью феромонных ловушек, что позволяет снизить численность последующей генерации вредителей. Однако этот способ требует значительных экономических затрат.

Другой метод применения феромонов основан на дезориентации насекомых и состоит в том, что на обрабатываемом участке поля создается такое высокое и равномерное распределение феромона, при котором самцы данного вида либо перестают воспринимать его, либо не способны обнаружить источник феромона. В результате происходит нарушение естественной феромонной связи.

Для привлечения самцов сливовой плодовой жоржки *Grapholita molesta* вполне достаточно для одной ловушки 12×10^{-5} мг феромона [смесь (8Z)-додеценилацетата, (8E)-додеценилацетата, (8Z)-додеценола и додеканола], известного под названием «аценол». Применение его в СССР в 1983 г. обеспечило высокий эффект дезориентации насекомых, и в результате удалось сохранить до 98% урожая яблок и груш и полностью исключить химическую обработку.



Комбинация феромонов с инсектицидами, использованная на Марианских островах, привела к уничтожению на 90% тропической дынной мухи *Dacus cucurbitae*, а также восточной плодовой мухи *Dacus dorsalis*. Кроме того, феромоны, как сигнальное средство определения срока выпуска инсектофага трихограмы, применяются для защиты хлопковых полей.

В 1981 г. на хлопковых полях в долине Нила был применен феромон госсиплюр [смесь (7Z, 11Z)- и (7Z, 11E)-гексадеценилацетатов], который в капсулированном виде разбрасывался на полях (норма расхода 10 микрокапсул на 1 га); это привело к значительному снижению численности розового коробочного червя *Pectinophora gossypiella* благодаря эффекту дезориентации. На соседних полях против этого же вредителя применяли аэрозоли такого сильного пестицида, как фенвалерат (см. с. 792). Результаты сравнительных исследований позволили полностью отказаться от использования фенвалерата и других пестицидов.

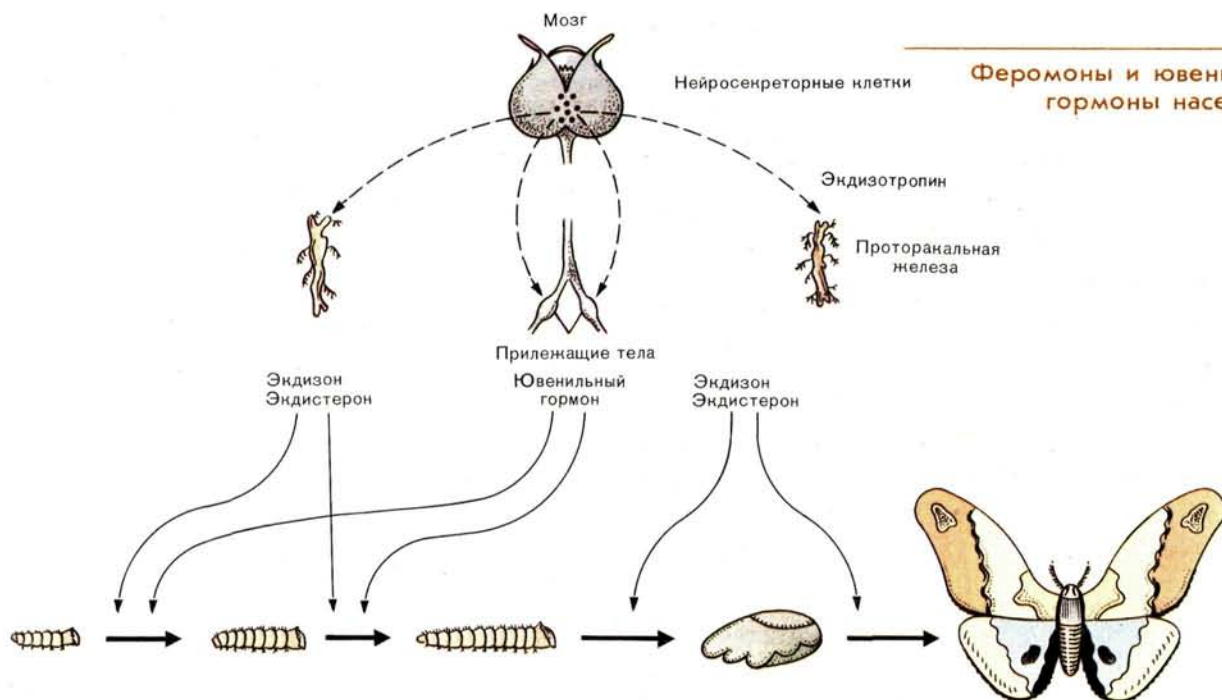
Большое значение имеет дальнейший поиск новых половых и агрегационных феромонов, феромонов следа, тревоги, обороны, антиферомонов и т. д. Поиск в этом направлении позволит эффективнее регулировать экологическое равновесие в природе, поднять уровень сельскохозяйственного производства, разработать меры защиты технических сооружений от вредных насекомых, а также повысить действенность борьбы с насекомыми-паразитами в быту.

Ювенильные гормоны насекомых

Жизненный цикл развития насекомых проходит ряд стадий: развитие яйца, превращение его в личинку, переход последней в куколку и затем во взрослое насекомое. Весь этот метаморфоз протекает при участии биорегуляторов, выделяющихся нейросекреторными железами.

Гормональная регуляция жизненных процессов насекомых впервые обнаружена В. Б. Уиглсвортом (Великобритания) в 1934 г. Им было установлено, что нейросекреторные клетки, проторакальные железы и прилежащие тела выделяют секреты, оказывающие влияние на рост и метаморфоз насекомых. Впоследствии было выяснено, что развитие насекомых регулируется двумя антагонистическими гормональными системами. Одна из них (прилежащие тела) секретирует гормоны сесквитерпеновой природы, объединенные под общим названием «ювенильные гормоны» (от англ. juvenile — молодой). Как видно из названия, гормоны этого типа контролируют развитие насекомого лишь на ранних стадиях и по мере накопления останавливают рост насекомого на стадии личинки. Позже начинают образовываться экдизоны, ингибирующие биологическое действие ювенильных гормонов и контролирующие линьку и развитие органов взрослой особи. Секреция гормона линьки из проторакальной железы проходит под влиянием пептидного гормона, называемого активационным или экдизотропином, который вырабатывается нейросекреторными клетками мозга насекомого. Такое взаимодействие различных гормонов насекомых между собой в процессе онтогенеза представлено на рисунке 376.

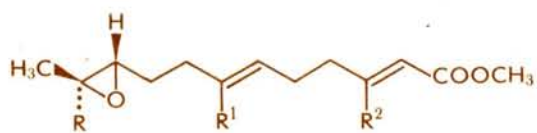
В 1956 г. выделен первый ювенильный гормон (гормон 0) из брюшка самцов бабочки *Hyalophora cecropia* (К. М. Вильямс, США). Позднее из различных насекомых были выделены еще три



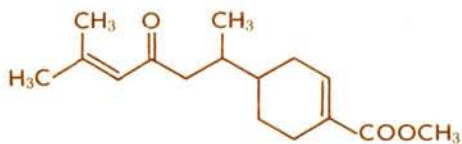
ювенильного гормона (I—III), обладающих высокой биологической активностью.

Рис. 376. Взаимодействие гормонов насекомых и их влияние на онтогенез.

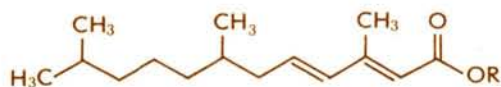
В растениях обнаружить ювенильные гормоны такого строения не удалось. Однако из канадской пихты (*Abies grandis*) выделено другое сесквитерпеновое соединение — ювабион, который препятствует превращению личинок насекомых во взрослые особи. Синтетические аналоги природных гормонов, такие, как гидропрен, мето-



- Ювенильные гормоны
- (0) $R=R^1=R^2=C_2H_5$
 - (I) $R=R^1=C_2H_5, R^2=CH_3$
 - (II) $R=R^2=CH_3, R^1=C_2H_5$
 - (III) $R=R^1=R^2=CH_3$



Ювабион



- Гидропрен $R=C_2H_5$
Кинопрен $R=CH_2C\equiv CH$

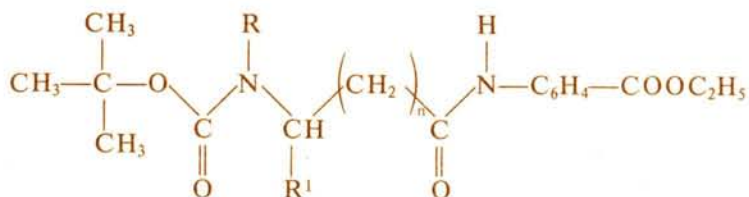
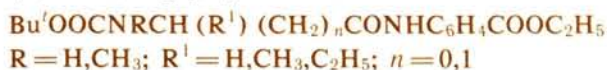


Метопрен

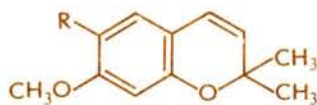
преп и кинопреп, широко используются для борьбы с сельскохозяйственными вредителями. Оказалось также, что некоторые пептиды способны оказывать эффект ювенильных гормонов. Так, например, препарат 5392 задерживает на ранних стадиях развитие



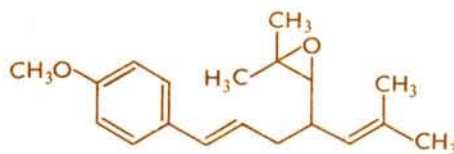
красноклопа (Pyrrhocoridae), вызывая атрофию ротового аппарата, что приводит к его гибели. Аналогичным эффектом обладают пептиды общей формулы:



В 1976 г. В. С. Бауэрсом (США) было установлено, что производные хромена — прекоцен I и прекоцен II, выделенные из индийского растения агератум (*Ageratum conyzoides*), являются мощными антагонистами ювенильных гормонов. При контакте с прекоценом II личинки колорадского жука прекращают развиваться (состояние диапаузы). Антиювенильные гормоны оказывают антифидантный эффект, вызывают дегенерацию яичников и в результате наступает массовая гибель вредителя.



Прекоцен I $\text{R} = \text{H}$
Прекоцен II $\text{R} = \text{OCH}_3$



Ювооцимен II

Недавно из базилика камфорного (*Ocimum basilicum*) выделен и другой антиювенильный гормон — ювооцимен II, который в дозах 10 пг вызывает аналогичные изменения у колорадского жука и вредной черепашки.

Пестицидами называют химические средства защиты растений, применяющиеся в сельском хозяйстве. К ним принадлежат гербициды (борьба с сорняками), фунгициды (борьба с грибами) и инсектициды (борьба с вредными насекомыми). Сюда же относят препараты, используемые для борьбы с клещами (акарициды), нематодами и моллюсками, а также средства борьбы с грызунами (зооциды), бактериями и вирусами растений (бактерициды и антивирусные препараты).

Ежегодные потери мирового урожая от вредителей превышают 30%. В борьбе с потерями сельскохозяйственной продукции химический метод в настоящее время является основным. Естественно, существенную роль играют различные агротехнические приемы, а также биологические методы защиты, но их эффективность оказывается недостаточной. Поэтому применение пестицидов — одно из главных направлений в химизации сельского хозяйства, во многом определяющее уровень сельскохозяйственного производства. Сегодня в мире производится более 500 различных пестицидов, общий тоннаж которых достигает 2 млн. т, и это направление научно-технического прогресса продолжает быстро развиваться. Оно базируется на самых последних достижениях тонкой органической химии, успехах физиологии животных, растений и микроорганизмов.

В наши дни нередко расширение применения пестицидов в сельском хозяйстве истолковывается лишь с позиций защиты окружающей среды. Бесспорно, человек и живая природа, их судьбы на планете всегда должны быть в центре внимания и каждый новый акт вмешательства в природное равновесие должен тщательно оцениваться с экологических позиций. Но человечество должно обеспечить себя продуктами питания, а это возможно лишь на базе самого передового сельскохозяйственного производства. Интенсивное сельское хозяйство само по себе неизбежно связано с нарушением существующего в данном регионе экологического равновесия. В этих условиях применение пестицидов составляет лишь малую долю общих объемов химизации (внесение органических и минеральных удобрений, известкование почв и т. п.) и не может рассматриваться изолированно. Нельзя утверждать, что пестициды не наносят урона окружающей среде, но всю проблему следует оценивать комплексно, одновременно рассматривая вопросы социологии, экономики, демографии и экологии.

Современные пестициды качественно отличаются от ядохимикатов, использовавшихся в сельском хозяйстве два-три десятилетия назад. Сейчас главными, обязательными требованиями, предъявляемыми к ним, являются высочайшая биологическая активность, снижающая нормы расхода в десятки и сотни раз, предельная селективность действия на организм данного вредителя, нетоксичность для человека и животных, быстрая инактивация под влиянием почвенных микроорганизмов (биodeградация) и т. п. Такого рода препараты уже имеются, но путь к ним требует максимальной мобилизации сил и достижений передовой науки.

Исторический очерк. Потери урожая из-за заболеваний культурных растений и комбинированных действий разнообразных вредителей с давних времен являются одной из серьезнейших проблем в сельском хозяйстве многих стран и народов. Известно, что еще древние римляне во время ритуальных праздников урожая, называемых «робигалиа», обращали свои мольбы к божественным покровителям, призывая их уберечь посевы от страшных болезней (вероятно, имелась в виду «ржавчина»). В своем знаменитом труде «Естественная история» Плиний Старший (I в. н. э.) предлагает ряд конкретных мероприятий против заболеваний сельскохозяйственных культур.

Истинные причины губительных эпифитотий (массовых заболеваний) в мире возделываемых человеком растений стали известны, по существу, лишь во второй половине XIX столетия, когда были открыты фитопатогенные грибы, бактерии и вирусы. К этому времени удалось провести и первую, пусть не очень совершенную систематизацию более 5000 видов насекомых и сотен других организмов, являющихся вредителями сельскохозяйственных растений, а также идентифицировать основные типы сорняков, отнимающих у выращиваемой культуры пространство, свет, влагу и питательные вещества. К началу нашего века концепция защиты растений уже сформулировалась как мировая социально-экономическая, научная и агротехническая проблема. Стали более понятными пути и средства ее решения.

Именно этот период истории мирового земледелия приобрел весьма печальную известность. В первой половине прошлого века (1845—1846) Ирландия и Англия понесли громадный урон, когда вредителями был полностью уничтожен урожай картофеля. В 1858 г. завезенная из США «табачная плесень» свела на нет урожай табака в большинстве европейских стран. В 1870 г. «ржавчина» полностью погубила плантации кофе на Цейлоне, и с тех пор страна вынуждена была специализироваться на производстве чая. В этот же период разразилась катастрофа на знаменитых виноградниках Франции. На рубеже веков мексиканский жук по крайней мере наполовину уничтожил посевы хлопчатника в США. В начале 20-х годов нашего столетия карибские страны, в первую очередь Ямайка, потеряли свыше 50% урожая бананов из-за так называемой «панамской болезни» этих растений. Наконец, в канун первой мировой войны колорадский жук, перебравшийся из США на Европейский континент, начал свое опустошительное шествие по Франции, Германии и другим странам Старого Света. Этот перечень можно было бы дополнить и другими примерами. В настоящее время экономический урон от потерь сельскохозяйственной продукции в мире за счет болезней и вредителей растений составляет ежегодно несколько сотен миллиардов рублей.

Естественно, ведется летопись и химических средств защиты. Пожалуй, первыми упоминаются фунгициды, точнее вещества широкого спектра действия, проявляющие и фунгицидную активность. Еще в XVIII в. для этих целей использовали поваренную соль, соли меди и элементарную серу. Как ни парадоксально, они нередко используются и сегодня. В конце прошлого столетия для дезинфекции применяли формальдегид, а начиная с 1910 г. в качестве фунгицидов используют соли ртути и с 1930 г. различные ртуть-органические соединения. Перед второй мировой войной, наряду с производными алкил- и арилртути, нашли применение дитиокарбаматы и тиурам-дисульфиды, а впоследствии — трихлорметилсульфенилимиды, производные бензимидазола и пиримидина.

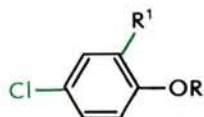
«Неорганический» период на первых порах прошли в своем развитии и гербициды. В самом начале столетия широко использовались сульфат железа, серная кислота и сульфат аммония, а позднее — окись мышьяка, арсениты, хлораты и бораты щелочных металлов. Первым органическим гербицидом следует считать натриевую соль 4,6-динитро-2-метилфенола (Германия, 1932).

Что касается инсектицидов, то уже с середины прошлого столетия были известны такие природные защитные средства, как табак (никотин), пиретрины и ротеноиды. Использовалась также нефть и некоторые продукты ее перегонки, а в ряде случаев — токсичные для окружающей среды препараты мышьяка и синильной кислоты. Примечательно, что уже с 1892 г. в Германии в качестве инсектицида применялся 4,6-динитро-2-метилфенол (антинонин), а позднее — производные родана, фенотиазина и нитрокарбазола. Новая эра, связанная с внедрением в практику современного поколения пестицидов, наступила в самом конце 30-х годов.

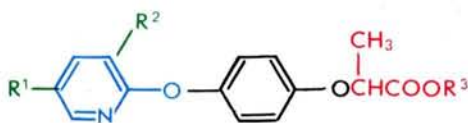
Сорные растения обычно лучше приспособлены к условиям выращивания, более устойчивы к неблагоприятным факторам и в то же время с биологической точки зрения, как правило, близки основной сельскохозяйственной культуре, что в значительной степени осложняет борьбу с ними. Если ранее методы избирательной борьбы с сорняками основывались исключительно на использовании различных агротехнических приемов, то в настоящее время широко и успешно применяют гербициды. Это коренным образом изменило производство, повысило урожайность и резко увеличило производительность сельскохозяйственного труда.

По механизму действия гербициды можно разделить на препараты регуляторного типа, аналогичные фитогормонам, и токсиканты — ингибиторы фотосинтеза.

Среди гербицидов регуляторного типа прежде всего нужно упомянуть известные с 1945 г. производные арилоксиалкилкарбоновых



Название	R ¹	R
2,4-Д	Cl	—CH ₂ COOH
2,4-ДМ	Cl	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH
2,4-ДП	Cl	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CHCOOH} \end{array}$
2М-4Х	CH ₃	—CH ₂ COOH
2М-4ХМ	CH ₃	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ COOH
2М-4ХП	CH ₃	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{—CHCOOH} \end{array}$



Название	R ¹	R ²	R ³
Галоксифоп-этоксизетил	CF ₃	Cl	CH ₂ CH ₂ OC ₂ H ₅
Флуазифоп-бутил	CF ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃
Дихлофоп-метил	Cl	Cl	CH ₃

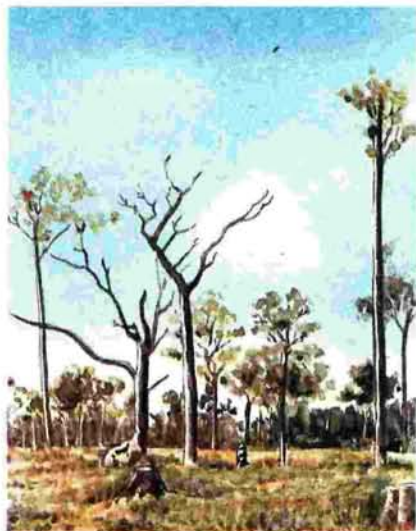


Рис. 377. Остатки тропических лесов (1982), пораженных гербицидами и диоксином в ходе войны США во Вьетнаме.

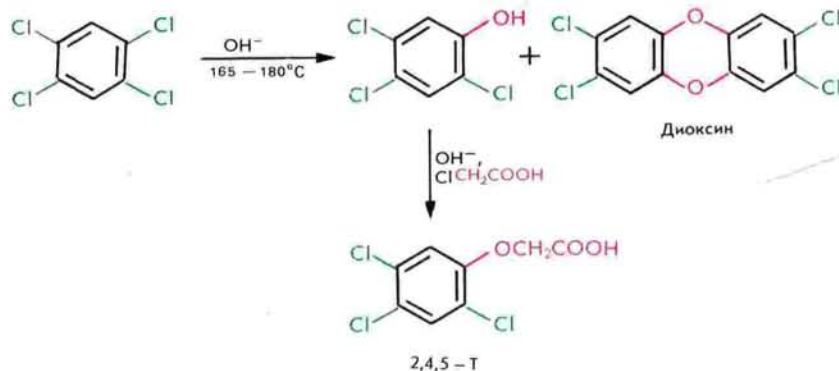


Рис. 378. Эффективность применения гербицида фюзилад против злаковых сорняков на посевах хлопчатника (с п р а в а — необработанные ряды).

кислот, которым свойственны те же гормональные функции, что и индолилуксусной кислоте (см. с. 716). Обработка растений достаточным количеством таких гормональных препаратов приводит к дисбалансу фитогормонов, ненормальному разрастанию растений, а затем гибели из-за недостатка влаги и питательных веществ. Важнейшими среди этих гербицидов являются производные 2,4-дихлорфенола или 2-метил-4-хлорфенола, а именно соединения, известные под шифрами 2,4-Д, 2,4-ДМ, 2,4-ДП, 2М-4Х, 2М-4ХМ и 2М-4ХП. Они содержат остатки уксусной, пропионовой и масляной кислот и практически нетоксичны для млекопитающих.

Среди остальных соединений группы следует отметить 2, 4, 5-трихлорфеноксиуксусную кислоту (2, 4, 5-Т) — гербицид, выпускавшийся ранее для уничтожения кустарниковой и древесной растительности, но ныне снятый с производства и применения в большинстве стран.

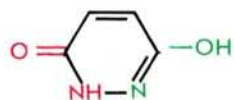
Схема промышленного синтеза 2, 4, 5-Т предусматривает частичный гидролиз тетрахлорбензола до 2, 4, 5-трихлорфенола. Однако в условиях реакции происходит также образование простых эфиров, в частности очень устойчивого в природных условиях и чрезвычайно токсичного 2, 3, 7, 8-тетрахлордифенил-п-диоксина, чаще называемого просто диоксином. В низких концентрациях диоксин вызывает у людей кожные заболевания, разрушение иммунной и кроветворной систем, печени и почек, а также раковые заболевания, аномалии беременности и тератогенный эффект, т. е. рождение детей с врожденными уродствами. Заражение растительности и почвы диоксином, содержащимся в старых, недостаточно очищенных препаратах 2, 4, 5-Т, представляет серьезную экологическую проблему для многих стран, применявших гербицид в 50—70-х годах. Однако особенно серьезна она для Вьетнама, где осуществлявшееся США уничтожение тропических джунглей (рис. 377) во время вьетнамской войны в 1961—1972 гг. с помощью гербицидов-дефолиантов на основе эфиров 2,4-Д и 2,4,5-Т (операция «Рэнч Хэнд») привело к накоплению в почвах страны огромных количеств этого сильного яда и вызвало многочисленные поражения людей, часто со смертельным исходом.



Вторая группа гербицидов регуляторного типа ингибирует транспорт ауксинов. Большинство таких соединений — это производные феноксифенокси- α -пропионовых кислот. Первый препарат данной группы — избирательный послевсходовый гербицид дихлофоп-метил по механизму биологического действия является антагонистом гормональных соединений. Наибольшей активностью и избирательностью обладают трифторметильные аналоги, в частности галок-

сифоп-этоксиэтил (норма расхода 60 г/га), а также флуазифоп-бутил (фюзилад) (рис. 378, 379).

Следующая группа регуляторных гербицидов-ретардантов вызывает ослабление вегетативного роста в результате подавления биосинтеза гиббереллинов. Представителями этой группы гербицидов являются гидразиды кислот, например малеиновой, или ониевые соли, среди которых наибольшее распространение получил хлорхолинхлорид; последний ингибирует один из ферментов в биосинтезе предшественника гиббереллинов — каурена.

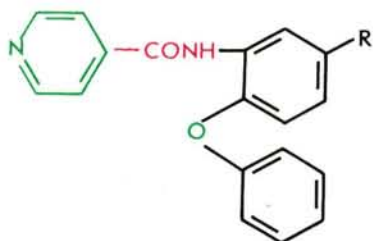


Гидразид малеиновой кислоты



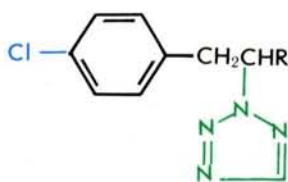
Хлорхолинхлорид

В настоящее время созданы новые перспективные ретарданты, в том числе амиды гетероциклических кислот (соединения CR-350 и CR-351), триазолзамещенные алкиларилкетоны, например строн и соответствующий спирт паклобутразол, которые воздействуют на биосинтез гиббереллинов. Паклобутразол, в частности, препятствует полеганию зерновых, повышает морозостойкость и засухоустойчивость фруктовых деревьев, улучшает качество их плодов.



CR-350 R=Cl

CR-351 R=Br



Строн R=COC(CH₃)₃

Паклобутразол R=CH(OH)C(CH₃)₃

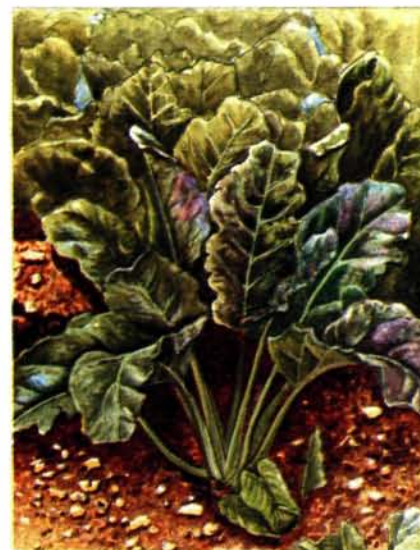
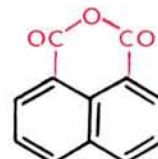


Рис. 379. Действие гербицида фюзилад против сорняков на посевах сахарной свеклы (вверху — необработанный участок).

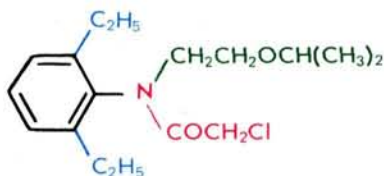
Биологическая активность гербицидов — ингибиторов биосинтеза гиббереллинов может быть снижена для определенных культур с помощью антидотов, которые входят в качестве составной части в гербицидные композиции этой группы. Основными представителями являются производные тиолкарбаматов (эптам) и хлорцетанилидов (претилахлор и метазахлор). Претилахлор избирательно подавляет сорняки в посевах риса, а метазахлор эффективен в посевах сахарной свеклы, сои и рапса. В качестве антидотов используются также для зерновых — ангидрид 1,8-нафталиндикарбоновой кислоты (протект), а для кукурузы и сорго — замещенный оксазолидин R-29148 и производное фенилацетонитрила CGA-92194.



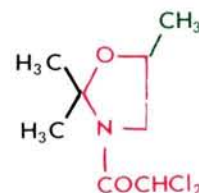
Эптам



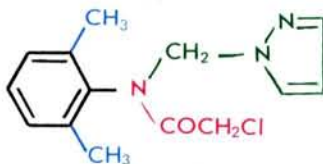
Протект



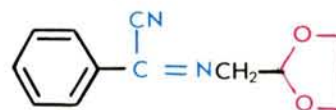
Претилахлор



R-29148

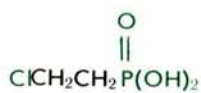


Метазаклор

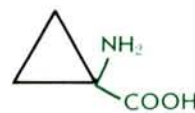
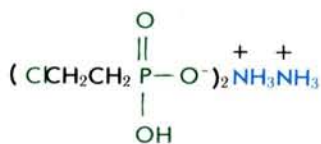


CGA-92194

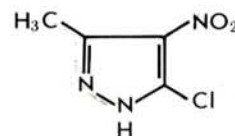
Еще одна группа гербицидов регуляторного типа — продукты этилена и соединения, контролирующие образование эндогенного этилена. Эти вещества применяются для сокращения сроков созревания плодов, что позволяет в несколько раз повысить эффективность и сократить сроки механизированного сбора урожая (см. с. 715). Первым продуктом этилена, нашедшим широкое приме-



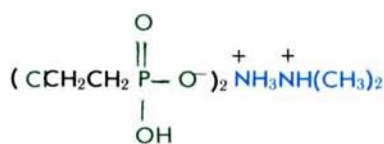
Этрел

1-Аминоциклопропанкарбоновая
кислота

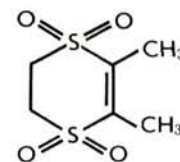
Гидрел



Релиз



Дигидрел



Диметипин

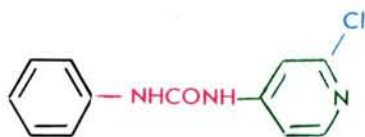
нение, является этрел — 2-хлорэтилфосфоновая кислота и его аналоги — гидрел и дигидрел, представляющие собой соответственно гидразиниевую и диметилгидразиниевую соли этрела. Разложение их протекает лишь при достаточно высокой температуре. Поэтому для районов с холодным климатом предложен эндогенный предшественник этилена в растениях — 1-аминоциклопропанкарбоновая кислота.

К препаратам, регулирующим образование эндогенного этилена, относятся релиз и диметипин. Они способны свободно перемещаться по растению, не повреждают незрелые плоды, не вызывают опадения цветов и применяются в весьма низких концентрациях (25—200 мг/л).

Особая группа регуляторных гербицидов — препараты цитокининподобного действия. Первые высокоактивные соединения такого рода найдены среди производных мочевины. В частности, N-(2-хлорпиридил-4)-N'-фенилмочевина не уступает по активности природному цитокинину зеатину (см. с. 718). К этому же типу относятся высокоэффективный дефолиант для хлопчатника (дропп), вызывающий опадение листьев. Еще бóльшую биологическую активность проявляют производные сульфонилмочевины, среди которых уникальным является гербицид хлорсульфурон. Его гербицидная и цитокининовая активности проявляются в концентрациях на два-три порядка ниже, чем концентрация 2,4-Д и природного цитокина — кинетина. Эффективная доза хлорсульфурана как гербицида избирательного действия в посевах зерновых составляет всего 7—40 г/га.

Следует упомянуть также ряд 4-замещенных 2,6-нитроанилинов, в частности дибутамин, обладающий мощным рострегулирующим свойством, и его трифторметильный аналог — трифлуралин, весьма эффективный для защиты от сорняков посевов сои и хлопчатника и применяемый столь же широко, как 2,4-Д.

Наконец, очень интересна группа соединений, ингибирующих биосинтез каротиноидов и хлорофилла, например препараты пирозолат и флухлоридон, сильно отличающиеся по избирательности



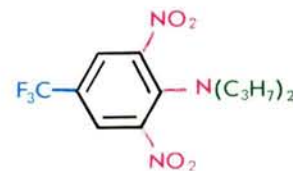
N-(2-Хлорпиридил-4)-N'-фенилмочевина



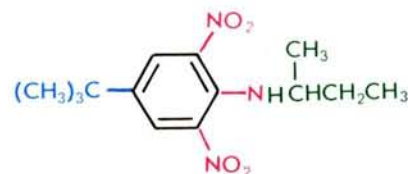
Дропп



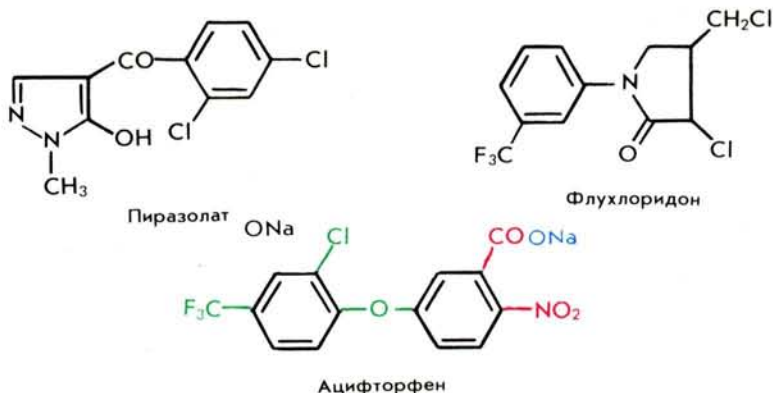
Хлорсульфурон



Трифлуралин

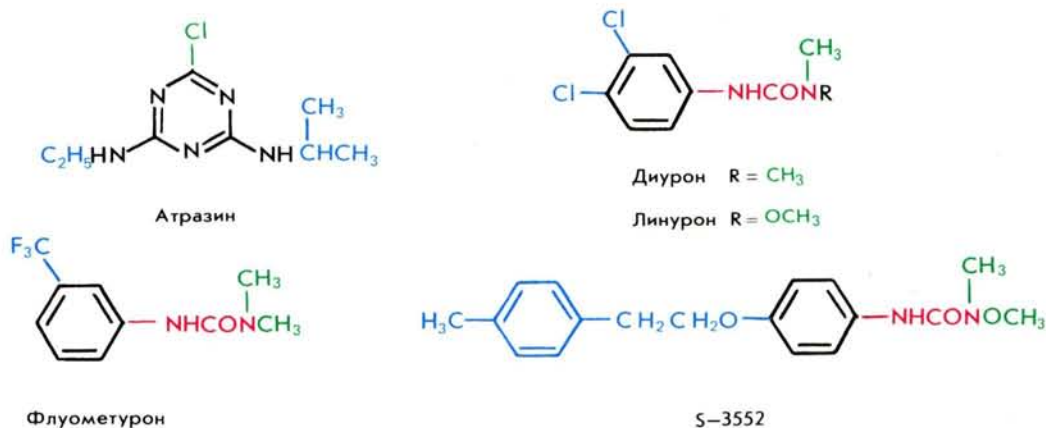


Дибутамин



действия: первый из них эффективен против широколистных сорняков, а второй токсичен для овсяга и других сорных трав. В эту группу регуляторов входит и аналог арилоксиарилокси- α -пропионовых кислот — препарат ацифторфен.

В течение длительного времени (более 25 лет) основными гербицидами, применявшимися в сельском хозяйстве, были ингибиторы фотосинтеза. К ним относятся в первую очередь производные триазина и замещенные мочевины. Среди первых наибольшее значение имеет препарат атразин, а из многочисленных производных фенилзамещенных мочевины широкое применение находят диурон, флуометурон, линурон и препарат S-3552.



Инсектициды

Насекомыми и клещами уничтожается около 20% сельскохозяйственной продукции. Разнообразие видов, высокая приспособляемость и плодовитость этих вредителей сильно усложняют борьбу с ними. Общая стратегия борьбы состоит в сочетании химических и биологических методов. Основным методом является химический,

с помощью которого численность популяции вредителей сокращается до уровня, не приносящего существенного экономического ущерба, а в дальнейшем этот уровень поддерживается биологическим методом. Такой подход в значительной степени устраняет возможность возникновения резистентных видов насекомых, однако предполагает применение инсектицидов избирательного действия. В окружающей среде они не должны накапливаться до опасных концентраций, и сочетание их высокой активности с достаточно большой скоростью естественной деградации является общим требованием. Не менее важна безопасность применения препаратов.

Среди известных инсектицидов перечисленным требованиям в наибольшей степени удовлетворяет группа пиретроидных соединений. Однако практическое значение сохранили и фосфорорганические препараты, хотя они обладают меньшей избирательностью и большей токсичностью. Препараты первого поколения инсектицидов — хлорорганические производные и карбаматы — уступают пиретроидам и фосфорорганическим соединениям прежде всего из-за устойчивости к естественной деградации в полевых условиях; несмотря на это, отдельные представители еще находят достаточно широкое применение.

Важнейшим хлорорганическим инсектицидом длительное время был дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Его токсичность для насекомых была обнаружена в 1939 г. П. Мюллером (Швейцария). ДДТ быстро вытеснил применявшиеся ранее соединения мышьяка и сыграл огромную роль в предотвращении эпидемий сыпного тифа в годы второй мировой войны, а также ликвидации эпидемий малярии и сонной болезни (муха цеце).

По механизму действия, установленному в настоящее время, ДДТ оказался близким к природным пиретроидам, причем его токсичность для теплокровных незначительна. Однако высокая устойчивость препарата к деградации способствовала накоплению его до опасных концентраций в различных продуктах сельского хозяйства. Поэтому применение ДДТ в развитых странах запрещено.

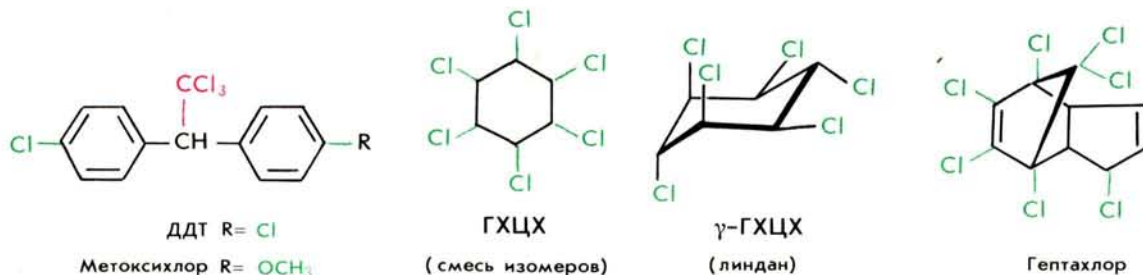
Из числа аналогов ДДТ наибольшее значение имеет препарат метоксихлор, который несколько уступает по активности ДДТ, но гораздо легче разрушается ферментными системами, что позволило использовать его для защиты коров от насекомых, не опасаясь попадания в молоко.

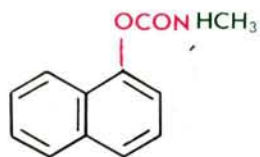
Другой тип хлорорганических соединений — это частично или полностью хлорированные углеводороды. Примером таких препаратов является гексахлорциклогексан (гексахлоран). Инсектицидную активность проявляет только один γ -стереоизомер гексахлорциклогексана (γ -ГХЦГ, или линдан), у которого три соседних атома хлора ориентированы аксиально, а три других — экваториально. По характеру и месту действия препарат близок к ДДТ, но чувствительность насекомых к обоим препаратам различна.

Препараты этой группы очень токсичны и обладают кумулятивными свойствами, и неосторожное использование их приводило к гибели животных, что в первое время вызвало отрицательное отношение к пестицидам вообще. Хотя некоторые препараты, например гептахлор, еще находят применение для обработки семян, по-видимому, в ближайшем будущем эта группа хлорированных углеводородов потеряет свое практическое значение.

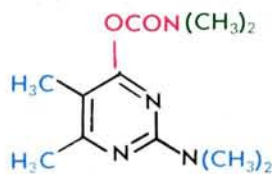


Мюллер (Müller) Пауль Герман (1899—1965), швейцарский химик. Окончил Базельский университет (1925), с 1925 г. работал в исследовательской лаборатории фирмы «Гейги» в Базеле. Основные работы посвящены вопросам применения химических средств защиты растений. Обнаружил инсектицидные свойства 4,4-дихлордифенилтрихлорметана (ДДТ, 1937). Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине (1948).





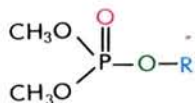
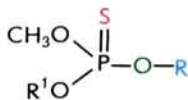
Карбарил



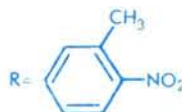
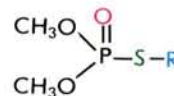
Пиримикарб

Большую группу инсектицидов составляют карбаматы, относящиеся в основном к пестицидам первого поколения. К сожалению, карбаматы медленно разрушаются в почве (до 2 лет), что ограничивает их применение. Наиболее распространены карбарил (севин) и пиримикарб.

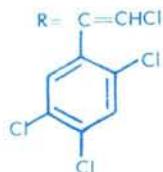
Создание группы фосфорорганических инсектицидов связано с поиском боевых отравляющих веществ в годы второй мировой войны; тогда же были найдены первые фосфорорганические инсектициды (Г. Шрадер). Для таких соединений характерна эффективность действия в низких концентрациях, быстрота инактивации в окружающей среде и простота получения. Единственный, но существенный их недостаток — отсутствие избирательности действия. Однако этот недостаток в определенной степени удалось преодолеть и снизить токсичность препаратов для теплокровных. В настоящее время рекомендовано для практического применения более 50 препаратов группы, суммарное производство которых составляет около 40% от общего количества всех инсектицидов. Эти вещества являются смешанными эфирами фосфорной кислоты или ее производных — тиофосфорной и дитиофосфорной. Механизм их действия одинаков и заключается в блокировании гидролиза ацетилхолина. К высокотоксичным соединениям относится дихлорфос, а к малотоксичным — гардона. Производные тио- и дитиофосфорных кислот (Н. Н. Мельников) — вещества средней токсичности, в их числе метилнитрофос, трихлорметафос-3, карбофос и фосфамид. Среди других фосфорорганических соединений следует отметить производное фосфоновой кислоты — хлорофос и тиольные производные — этафос и протиофос.

Дихлорфос $R = \text{CH}=\text{CCl}_2$ 

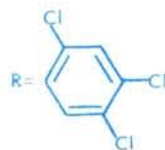
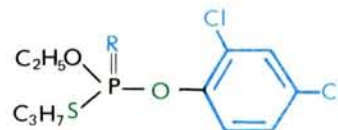
Метилнитрофос

 $R^1 = \text{CH}_3$ Карбофос $R = \text{CH}(\text{CHCOOC}_2\text{H}_5)\text{COOC}_2\text{H}_5$ Хлорофос $R = \text{CH}(\text{OH})\text{CCl}_3$ Фосфамид $R = \text{CH}_2\text{CONHCH}_3$

Гардона



Трихлорметафос-3

 $R^1 = \text{C}_2\text{H}_5$ Этафос $R = \text{O}$
Протиофос $R = \text{S}$

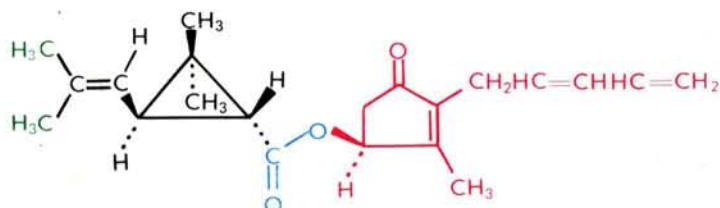
Важнейшую группу инсектицидов нового поколения составляют пиретроиды природного происхождения и их синтетические аналоги. Известно несколько близких по строению и инсектицидной активности природных соединений, которые входят в состав экстрактов некоторых видов ромашки. В таких многокомпонентных смесях, получивших название «пиретрум», наибольшей активностью обладает пиретрин I.

По инсектицидным свойствам пиретрин I, являющийся производным хризантемовой кислоты, немного превосходит ДДТ, но сильно уступает ему по стабильности: период полураспада пиретрина I при солнечной радиации составляет несколько часов, что исключает его применение в полевых условиях. Тем не менее промышленное производство пиретрума, сосредоточенное прежде всего в европейских странах и Японии, не потеряло своего значения и составляет более 20 тыс. т ежегодно. Пиретрум безопасен для теплокровных, в этом заключается его основное преимущество перед другими, например фосфорорганическими, инсектицидами.

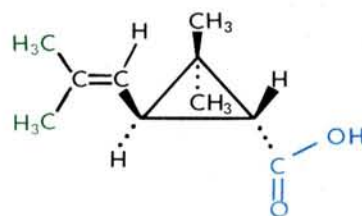
Поиски синтетических аналогов, направленные на создание фотостабильных препаратов, увенчались успехом в 1973 г., когда открытым М. Эллиоттом (Великобритания) препарат перметрин оказался не только фотостабильным, но и более активным инсектицидом избирательного действия (рис. 381). Вскоре были синтезированы и аналоги перметрина — циперметрин и декаметрин (дельтаметрин, или дельсис), которые значительно превосходят пиретрин I по инсектицидным свойствам: так, оптически активный декаметрин активнее природного пиретрина I в 900 раз. Исследование токсичности и путей метаболической деградации пиретроидов в организме



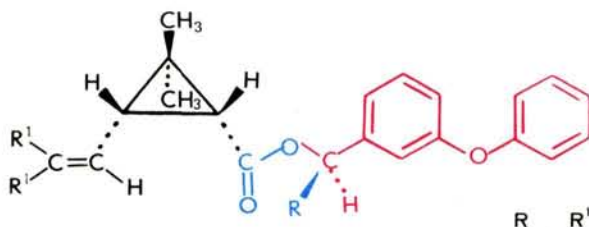
Мельников Николай Николаевич (р. 1908), советский химик-органик, член-корреспондент АН СССР (1979). Окончил 2-й Московский химико-технологический институт (1932), с 1963 г. — во ВНИИ химических средств защиты растений. Основные работы посвящены синтезу физиологически активных органических соединений. Автор фундаментальных трудов в области химии пестицидов, один из основателей промышленного производства пестицидов в СССР. Лауреат Государственной премии СССР (1951).



Пиретрин I



транс-Хризантемовая кислота



	R	R'
Декаметрин	CN	Br
Перметрин	H	Cl
Циперметрин	CN	Cl

млекопитающих и в почве (Дж. Касида) показало, что при эффективных концентрациях они достаточно малотоксичны для человека и животных. Среди многочисленных производных перметрина некоторые инсектициды практически потеряли все характерные структурные элементы пиретрина 1, хотя по механизму действия они близки синтетическим пиретроидам. Эту группу соединений представляет открытый в 1974 г. в Японии препарат фенвалерат.

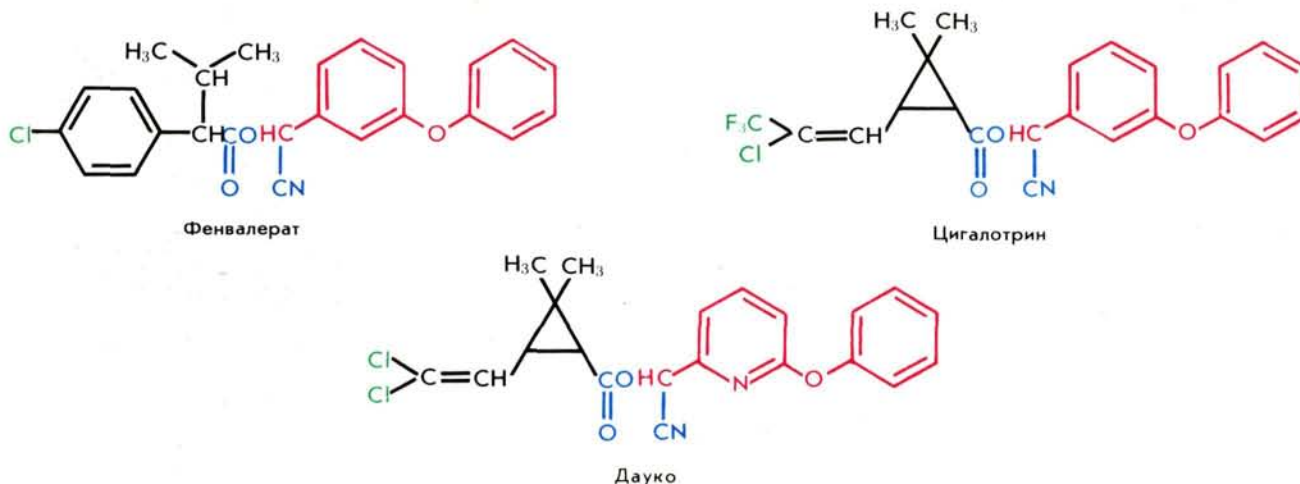


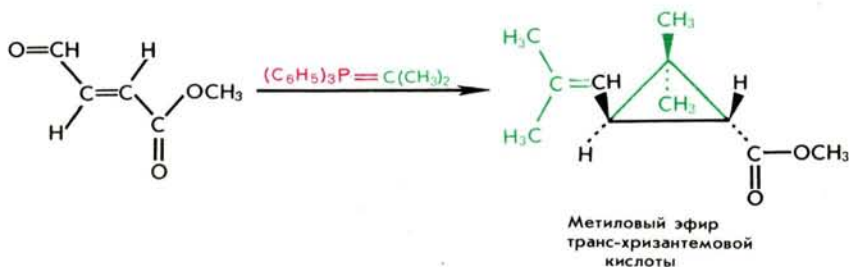
Рис. 380. Пиретроидные инсектициды используются для борьбы с вредителями хлопчатника *Spodoptera littoralis* (вверху) и *Pectinophora gossypiella* (внизу).

Все перечисленные пиретроиды в настоящее время производятся в промышленном масштабе и быстро вытесняют другие, например хлорорганические, инсектициды. Из числа экспериментальных препаратов можно выделить трифторметильный аналог перметрина — цигалотрин, который активнее декаметрина в 2,5 раза. Интересен препарат дауко, спиртовая компонента которого является производным пиридина.

По инсектицидной активности модифицированные пиретроиды на порядок превосходят фосфорорганические соединения. Например, нормы расхода перметрина и циперметрина составляют 15—100 г/га, а декаметрина — от 5 до 20 г/га.

Механизм биологического действия пиретроидов связан с деполаризацией натриевых каналов нервных мембран и специфическим выключением мембранных АТФаз.

Среди разнообразных способов получения природных пиретроидов следует отметить удобный препаративный синтез хризантемовой кислоты, основанный на присоединении реагента Виттига сразу к карбонильной группе и активированной двойной связи метилового эфира *транс*-4-оксо-бут-2-ен-1-карбоновой кислоты, когда в одну стадию образуется метиловый эфир *транс*-хризантемовой кислоты.



Работы в области пиретроидов проводятся в настоящее время весьма интенсивно, и общее число синтезированных препаратов насчитывает несколько тысяч. Установлено, что высокой активностью обладают оптически активные формы многих соединений этой группы.

Фунгициды

По современным представлениям фунгициды подразделяются на две группы — соединения контактного и системного действия. Вещества первого типа не проникают в растение, а остаются на его поверхности. Как правило, такие фунгициды обладают профилактическим действием и лишь в некоторых случаях могут излечивать растения от инфекций. Основная причина этого — отсутствие избирательности действия на систему растение — грибная популяция, поскольку биохимические процессы хозяина и паразита очень близки. Эффективность фунгицидов контактного действия существенно зависит от погоды, которую трудно прогнозировать, а вследствие фитотоксичности сроки их применения строго ограничены. К этой группе относятся соединения меди, сера и производные дитиокарбаминовой кислоты.

По масштабам потребления производные дитиокарбаминовой кислоты занимают первое место среди органических фунгицидов. Широкое применение препаратов этой группы началось с соединения, получившего название «тирам» и представляющего собой производное тиурамсульфидов. Препарат и сейчас используется как протравитель зерна. Другие препараты являются цинковыми, марганцевыми или медными солями N-замещенных дитиокарбаминовых кислот, а наиболее сильными защитными фунгицидами оказались цинеб и манеб, в которых два фрагмента дитиокарбаминовой кислоты соединены метиленовыми группами.

Фунгициды системного действия поглощаются растением и циркулируют по его сосудистой системе. При обычно применяемых концентрациях они не оказывают влияния на рост и развитие растений, а поражают исключительно фитопатогенный грибок. Так, малотоксичные препараты фенаримол и тримидал избирательно нарушают биосинтез эргостерина, необходимого грибам для построения клеточных мембран. Тримидал используется для защиты зерновых культур от одного из наиболее распространенных грибковых заболеваний — мучнистой росы. Норма расхода препарата очень низка (от 40 до 90 г/га), что свойственно и остальным фунгицидам регуляторного типа.

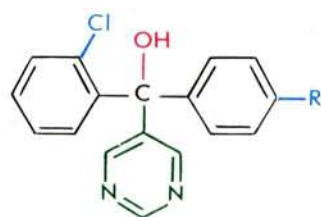


Касида (Casida) Джон Эдвард (р. 1929), американский биохимик. Окончил Висконсинский университет (1951), с 1964 г. — директор лаборатории химии и токсикологии пестицидов Калифорнийского университета в Беркли. Широко известен фундаментальными трудами по метаболизму и механизму действия природных и синтетических пиретринов, фосфорорганических пестицидов.

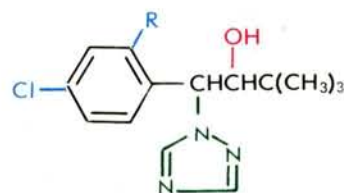


Рис. 381. Пиретроид перметрин применяется для борьбы с вредителем табака *Bemisia tabaci*.

Среди системных фунгицидов более многочисленны соединения триазола. Из них весьма эффективен дихлобутразол, особенно в одной из своих оптически активных форм. Триадименол (байтан) используется для предпосевной обработки семян зерновых с целью защиты их от многих заболеваний. Норма расхода составляет 100—300 г на тонну семян.

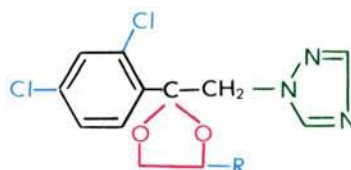


Фенаримол R — Cl
Триמידал R — F



Дихлобутразол R — Cl
Триадименол R — H

Среди триазолсодержащих фунгицидов интересны также производные 2,4-дихлорацетофенона — пропиконазол (тилт, рис. 382) и этаконазол, обладающие широким спектром действия. Нормы их применения очень низки, например, пропиконазолом обрабатывают виноградники с нормой расхода всего 25 г/га.

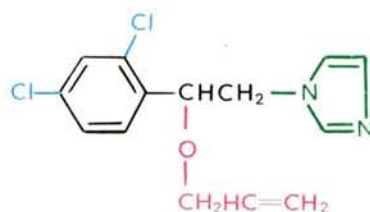


Пропиконазол R = C₃H₇
Этаконазол R = C₂H₅

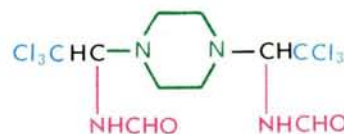


Рис. 382. Эффективность фунгицида тилт против фузариоза пшеницы (внизу — зерно из необработанных растений).

Группа фунгицидов с имидазольным циклом представлена препаратом имазалил, по биологической активности он не уступает фунгицидам с триазольным циклом, но менее токсичен.



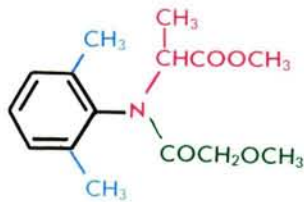
Имазалил



Трифорин

К производным пиперазина относится фунгицид трифорин, имеющий уникальную способность проникать в растение как из корней в листья, так и в обратном направлении. Таким образом, для защиты корневой системы растения достаточно обработать его наземную часть. Трифорин обладает низкой токсичностью, а нормы расхода препарата зависят от вида обрабатываемой культуры и колеблются от 100 до 400 г/га.

Большой интерес представляют фунгициды — ингибиторы биосинтеза белка. Большинство таких соединений действует на уровне РНК. Так, металаксил (ридомил, рис. 383), представляющий группу ацилаланинов, нарушает синтез одного из типов РНК-полимеразы и общее ингибирование синтеза РНК достигает 80%; фунгицид, способный перемещаться вверх по растению, обладает как профилактическим, так и лечущим действием. Токсичность препарата очень низка, а нормы расхода, например для картофеля, составляют 0,2 кг/га. К данной группе препаратов относят цимоксанил.



Металаксил (ридомил)

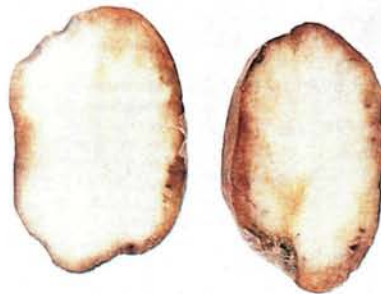


Цимоксанил

Таким образом, современные пестициды представляют собой сложные по структуре органические соединения, принадлежащие к самым различным классам. Использование последних достижений органической химии позволило разработать для большинства пестицидов экономичные и рациональные схемы промышленного синтеза. Нет сомнений, что создание новых, еще более мощных и избирательных химических средств защиты растений будет вносить все возрастающий вклад в решение мировой продовольственной проблемы.



а



б

Рис. 383. Фунгицид ридомил применяется для борьбы против грибкового поражения винограда милдью (а) и фитофтороза картофеля (б).

ИМЕННОЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абдулаев Н. Г. 613
 Акабори С. 40
 Анреп В. К. 645
 Антонов В. К. 196
 Анфинсен К. 103
 Арбер В. 314
 Арбузов Б. А. 697
 Астбери У. 90
- Баев А. А.** 330
 Байер А. 649
 Байер Э. 147
 Балтимор Д. 351
 Бантинг Ф. 249
 Барнард Э. 630
 Бартон Д. 707
 Белозерский А. Н. 299
 Берг П. 309
 Бергельсон Л. Д. 540
 Бергманн М. 127
 Бергстром С. 753
 Бернал Дж. 117
 Бернар К. 238
 Бернет Ф. 210
 Бертло П. 514
 Берцелиус Й. 176
 Бёрч А. 698
 Бест Ч. 246
 Бидл Дж. 300
 Биман К. 747
 Бландел Т. 275
 Блобел Г. 245
 Блоу Д. 197
 Блоут Э. 111
 Богатский А. В. 598
 Бойер П. 619
 Бойль Р. 21
 Бражникова М. Г. 285
 Браконно А. 23
 Брауницер Г. 63
 Браунштейн А. Е. 204
 Бреннер С. 407
 Брукнер В. 691
 Бутенандт А. 704
 Бутлеров А. М. 15
 Бухнер Э. 178
 Быстров В. Ф. 115
 Бэнгхем А. 576
- Вагнер Е. Е.** 694
 Ваксман З. А. 723
 Вальден П. 128
 Варбург О. Г. 673
 Вёлер Ф. 13
 Виланд Г. 276
 Виланд Т. 277
 Вильштеттер Р. 647
 Виндаус А. 710
 Виткоп Б. 760
 Виттиг Г. 756
 Воклен Л. 24
 Воскресенский А. А. 659
 Вудворд Р. Б. 678
 Вюнш Э. 275
 Вютрих К. 114
- Гален 8
 Гарвей У. 20
 Гаузе Г. Ф. 286
- Гей-Люссак Ж. 23
 Георгиев Г. П. 417
 Гилберт У. 327
 Гиппократ 8
 Гольдшмидт Г. 642
 Гортер Э. 581
 Готтшалк А. 508
 Грелл Э. 596
 Гросс Э. 46
 Гудмэн М. 174
- Дальтон Дж. 22
 Данилевский А. Я. 31
 Дарвин Ч. 716
 Джерасси К. 701
 Доссе Ж. 218
 Дьюар Дж. 667
 Дэви Э. 232
 Дю Виньо В. 263
 Дюма Ж. 27
- Евстигнеева Р. П.** 662
- Жакоб Ф.** 416
 Жардецкий О. 112
- Зелинский Н. Д.** 695
 Зервас Л. 127
- Ибн Сина (Авиценна)** 9
 Иванов В. Т. 269
- Йерне Н.** 214
- Кагава Я.** 621
 Карафоли Э. 628
 Каррер П. 670
 Касида Дж. 793
 Касперсон Т. 307
 Катсояннис П. 159
 Кендрью Дж. 102
 Кёгль Ф. 717
 Кёлер Дж. 218
 Кёнигс В. 449
 Кёссель А. 297
 Кишфалуди Л. 141
 Клуг А. 344
 Кнорре Д. Г. 359
 Кобата А. 466
 Колли А. А. 444
 Колосов М. Н. 382
 Комппа Г. 699
 Коппл К. 113
 Корана Г. 372
 Корнберг А. 348
 Кочетков Н. К. 468
 Кошланд Д. 170
 Крик Ф. 337
 Куатреказас П. 251
 Кун Р. 458
 Курциус Т. 126
- Лавуазье А. Л.** 13
 Ландштейнер К. 503
 Ларсен Р. 63
 Ледерберг Дж. 306
 Лелуар Л. 445
 Лемье Р. 478
 Ли Ч. Х. 252
 Либих Ю. 25
- Линдерстрём-Ланг К. У.** 32
 Липкин В. М. 81
 Липман Ф. 676
 Ломоносов М. В. 11
 Лунин Н. И. 669
 Луццати В. 562
 Лясковский Н. Э. 33
- Мажанди Ф.** 657
 Мак-Коннел Г. М. 569
 Мельников Н. Н. 791
 Менделеев Д. И. 16
 Меррифилд Р. 145
 Мечников И. И. 210
 Мирзабеков А. Д. 400
 Митчелл П. 618
 Михаэлис Л. 180
 Михель Х. 634
 Мишер Ф. 296
 Модянов Н. Н. 626
 Моно Ж. 185
 Мортон У. 648
 Мульдер Г. 24
 Мур С. 35
 Мюллер П. 789
- Назаров И. Н.** 699
 Наканиси К. 746
 Намёткин С. С. 696
 Натанс Д. 313
 Нейрат Г. 75
 Николсон Г. 585
 Ниман К. 643
 Ниренберг М. 419
 Нортроп Дж. 179
 Нума Ш. 81
- Овчинников Ю. А.** 4
 Орехов А. П. 651
 Остерхельт Д. 607
 Очоа С. 420
- Парацельс Т.** 12
 Пастер Л. 209
 Перкин У. Г. младший 693
 Перкин У. Г. старший 655
 Перутц М. 121
 Пикте А. 642
 Пирогов Н. И. 648
 Полинг Л. 92
 Прелог В. 654
 Преображенский Н. А. 661
 Пюльман А. 601
 Пюльман Б. 333
- Рамачандран Г.** 87
 Рейхштейн Т. 707
 Рич А. 342
 Робертсон Дж. 584
 Робинсон Р. 639
 Ружичка Л. 701
- Сабатини Д.** 245
 Сазерленд Э. 239
 Самнер Дж. 177
 Самуэльсон Б. 753
 Сведберг Т. 118
 Свездлов Е. Д. 413
 Сенгер Ф. 37
- Сент-Дьёрдьи А.** 672
 Сертюрнер Ф. 638
 Скоу Й. 623
 Скоффоне Э. 171
 Скулачёв В. П. 614
 Смит Х. 311
 Смит Э. 45
 Спириг А. С. 405
 Старлинг Э. 238
 Стейн У. 36
 Стоккениус В. 605
 Стрёминджер Дж. 730
- Тейтем Э.** 304
 Темин Г. 350
 Тодд А. 361
 Торгов И. В. 705
 Тостесон Д. 280
- Уилкинс М.** 335
 Уильямс Р. 671
 Уолш К. 78
 Уотсон Дж. 336
- Фёршт А.** 378
 Филлипс Д. 99
 Фишер Э. 125
 Фолкерс К. 674
 Фрутон Дж. 151
 Фуркруа А. Ф. 22
- Хакомори С.-И.** 460
 Хартли Б. 38
 Хейдон Д. 599
 Хендерсон Р. 606
 Хейорс У. 448
 Хиршман Р. 146
 Ходжкин Д. 99
 Ходкинс Ф. 668
 Хоппе-Зайлер Ф. 33
 Хорлин А. Я. 484
 Хофманн К. 265
 Хохлов А. С. 690
 Хубер Р. 634
 Худ Л. 66
- Цан Х.** 160
- Чаргафф Э.** 298
 Чепмен Д. 566
- Шанже Ж.-П.** 629
 Швицер Р. 264
 Шеврёль М. 515
 Шееле К. 514
 Шемякин М. М. 677
 Шизн Дж. 142
 Шойер П. 772
- Эдельман Дж.** 220
 Эдман П. 60
 Эдсгалл Дж. 253
 Эйзенман Дж. 597
 Эйлер У. 752
 Эйхорн А. 646
 Энгельгардт В. А. 253
 Эрлих П. 212
 Эрнстер Л. 620
 Эшенмозер А. 679

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абетиновая кислота 698
Абрин 22, 761, 766
Абсцидовая кислота 718, 719
Агаропектин 501
Агликон 461
Агонисты 239, 641
Аденилатциклаза 20, 239—242, 253, 264, 273
Аденилил-(3'→5')-цитидин 304
Аденоловая кислота 301
Аденин 296, 299, 303, 388, 390, 683, 718
S-Аденозилметионин 522, 719
Аденозин 299, 300, 304, 355, 387, 683
Аденозин-5'-трифосфат 240
Аденозин-3' (5')-фосфаты 301
Аденозин-2', 3' (3', 5')-циклофосфаты 240, 301
Адермин 677
Адреналин 239, 240, 653, 683
Адриамицин 744
2-Азидогликозилгалогениды 486
Азобензол-2-сульфенилбромид 163
Азодирахтин 699
Аконитин 632, 699
Акорон 697, 698
Акрихин 655, 656, 663
Акселерин 233
Аксерофтол 699
АКТГ (адреноркотрикопный гормон) 158, 265, 266, 271, 406
Актин 253, 255—257
Актинины 257
Актиномицины 84, 289, 290, 723, 742—744
Актомиозин 253
Актон 265
Аламетицин 598, 602—604
D-Аланил-D-аланинсинтетаза 730
Аланирацемаза 730
Аланин 28, 30, 42, 46, 83, 107, 110, 277, 293, 510, 728—730, 769
Алексины 220, 721
Алкалоиды 261, 262, 294, 638—667, 706, 708, 713, 760, 761, 766, см. также по названиям
Алкалоиды амфий 760—762
Алкалоиды стероидные 706, 708, 713
1-Алкил-2-ацетил-sn-глицеро-3-фосфохолин 525
Алкилирование 130, 134, 163—165, 167, 170, 322, 323, 388, 393, 458, 540, 643, 659, 693, 777
Аллиин 751
N-Аллилнорморфин (налорфин) 641
Аллицин 751
L-Аллогидроксипролин 277
D-Аллоза 447
Аллоцимен 694
Алпростадил 754, 756, 757
Альбофунгин 746
Альбумины 95, 185, 753
Альгиновые кислоты 494, 501
Альдимины 204, 610
Альдиты 453, 466, 494
D-Альдогексозы 477, 478
Альдозы 446, 447, 449—453
Альдолаза 253
Альдоновые кислоты 451, 453, 463, 495
Альдостерон 707
D-Альтроза 447
Аманитины 110, 276, 277
Аматоксины 277
Амелитин 269
Аметоптерин 679
Амигдалин 496, 767
Амидирование 490, 491
Амидопирин 643
Амикацин 735
Амилаза 176, 185, 717
Амилоза 500
Амилопектин 469, 479, 500
Аминазин 648
L-α-Аминоадипиновая кислота 724, 725
Аминоацетиладенилат 421
Аминоацил-тРНК 419, 421, 425, 735, 736
п-Аминобензойная кислота 644, 679
п-Аминобензолсульфамид 679
Аминогликозиды 734—736
2-Амино-2-дезоксид-D-глюкоза 449
2-Амино-2-дезоксид-D-гулопираноза 496
α-Аминоизомасляная кислота 602
Аминокислотная последовательность аспаратаминотрансферазы 77
белка натриевого канала 633
галактозидазы 78
глюкогенфосфоорилазы 78
инсулина 76
интерлейкина 2 228
α-интерферона 225
кальцитринов 274
методы определения 34, 38, 57—74, 76, 79
паратормона 252
пептидов 34
— гормонов 272, 274, 275
— мозга 261—263, 265, 266, 269, 270
— регуляторов иммунитета 292
— с вкусовыми качествами 292—294
— сигнальных 245—248
— токсинов 278, 281
— фибриновых 235
пролактина 251
родопсина 611, 612
соматотропинов 250, 251
субъединиц АТФаз 623—627
— ДНК-зависимой РНК-полимеразы 81
— холинорецептора 629, 630
Аминокислотные остатки 27, 32, 33
анализ 37—41, 67—70
трансформация, см. Химическая модификация
Аминокислоты 16, см. также по названиям
активация грамицидин-S-синтетазой 286, 287
активированные эфиры 141, 142, 147—149
анализаторы 35, 36, 75
ангидриды 140, 141, 146, 155
вкус 293
гидрофобные и гидрофильные 28—31, 61, 63, 66, 69, 89, 90
ДАБТГ-производные 61
десульфирование 52, 57, 164
ДНС-производные 37—39, 58—61
ДНФ-производные 37
идентификация 37—39, 58—61, 81
незаменимые 28—31, 668
остатки, см. Аминокислотные остатки
стереохимия 82—85
структура 28—31
ферментативное отщепление 68
ФТГ- и ФТК-производные 57—62, 65
химическая модификация 43, 44
Аминолиз 150, 151, 153
Аминомасляная кислота 675, 677, 769
Аминонафтолы 689
6-Аминопеницилламовая кислота 724—726
Аминопептидазы 38, 69, 70, 76
Аминоподистиролы 64
β-Аминопропионитрил 260
Аминоптерин 211, 679
Аминосакхара 469, 492, 493, 496, 498, 532
Аминотрансферазы 202, 205
п-Аминофенилгликозиды 490
1-Аминоциклопропан-1-карбоновая кислота 719, 786, 787
Аминоэтилирование 44, 163
S-(β-Аминоэтил)цистеин 44, 65
β-Амирин 700
Амитал 647, 648
Ампициллин 431, 434, 726
сАМР 240—242, 245, 659, 683
Амфетамин 653
Амфотерицин В 598, 601, 602, 748, 749
Анабазин 650
Анальгетики 639, 642, 643
Анальгин 643
Анаприлин 653
Анестетики 643, 644
Анатоксин А 772
Анатруксоний 652
1, 6-Ангидрогексозы 488
Ангиотензин 271—273
Ангиотензин-конвертаза 272
Ангиотензиноген 272
Андаксин 648
Андрогены 704—706
Андростерон 705
Аневрин (анейрин) 671, 672
Анилино-5-тиазолиноны 57, 58, 61
Ансамакролиды 741, 742
Антиамёбины 602
Антибиотики 289, 290, 294, 402, 403, 431, 434, 496, 601, 602, 654—656, 663, 667, 690, 722—751, см. также по названиям
Антибиотики
инактивация ферментами 725
ионофоры 590—598, 750
каналообразователи 598—604
пептиды 154—156, 285—291
Антивитамины 679, 684, 688
Антигельминтики 663, 664
Антигены 209—220, 265, 503, 504, 508, 579, 609, 610
Антикодоны 297, 419, 425
Антионинин 782
Антипептиды 406
Антителя 56, 58, 209—218, 228, 472, 579, 580, 609
Антитоксины 278
Антитромбин III 237
Антиферомоны 776
Антифиданты 721

- Антрациклины 744, 745
 Апамин 110, 279, 280
 Аполипопротеины 556, 557, 559
 Арабинан 489
 Арабинозы 444, 447, 449, 451, 475, 492, 495, 499
 Арахидоновая кислота 520, 521, 686, 753, 756, 759, 760
 Арбапростил 757
 Аргиназа 185
 Аргинин 29, 30, 32, 39, 42—45, 65, 90, 135, 668
 Ареколин 663
 Арилсульфохлориды 357, 359, 363
 АРСазы (аминоацил-тРНК-синтетазы) 404, 421, 422
 Аскаридол 663, 693
 Аскорбиновая кислота 684
 Аспарагин 29, 32, 34, 39, 293, 472, 475, 491
 Аспарагиновая кислота 30, 34, 35, 40, 46, 90, 106, 107, 165, 172, 680, 682
 Аспарагусовая кислота 720, 721
 Аспареномицины 728
 Аспартам 293
 Аспартатаминотрансфераза (ААТ) 77, 202—205
 Аспартат-транскарбамоилаза 121, 184, 185
 Аспартилгидроксаматы 50, 51
 L-Аспартил-L-фенилаланин 293
 Аспидиол 663
 Атебрин 655, 656
 Атизин 699
 Атразин 788
 Атропин 644—646, 660
 АТФ (аденозинтрифосфат) 121, 177, 226, 242, 253, 254, 309, 310, 312, 316, 317, 328
 Аттрактанты 695
 АТФазы (аденозинтрифосфатазы) 103, 613, 618—628
 Ауксины 715—717, 720, 721, 784
 Ауриоловая кислота 745, 746
 Ауриомицин 731, 732
 Ауродокс 740, 741
 Афлатоксины 769, 770
 «Аффинное мечение» 160, 187
 6-цис-Ахоен 751
 Ацедапсон 655, 656
 Ацебол 777
 N-Ацетилгалактозамин 229, 449, 474, 475, 493, 505, 534
 α-N-Ацетилгалактозаминидаза 466
 N-Ацетилглюкозамин 190, 449, 468, 472, 475, 493, 498, 501, 507, 508, 512, 534, 728—730
 β-N-Ацетилглюкозаминидаза 466
 Ацетилкоэнзим А 693
 N-Ацетилманнозамин 449
 N-Ацетилмурамовая кислота 190, 449, 468, 493, 508
 N-Ацетилнейраминная кислота 229, 449, 463, 473, 493, 505, 532, 534
 Ацетил-D-пролин, метиламид 110
 Ацетилсалициловая кислота (аспирин) 642, 643, 760
 N-Ацетилфукозамин 469
 Ацетилхолин 263, 645, 683, 770
 Ацетилхолиновый рецептор 81, 103, 281, 628—631, 645, 650, 651, 770
 Ацетилхолинэстераза 181
 Ацетоацетилкоэнзим А 693
 5-Ацетоксимеркуроиоуралл 387
 5-Ацетоксимеркуроцитозин 387
 Ацидолиз 129—131
 Ациламиноокислоты 140
 Ацилгалагенозы 481, 482
 Ацифторфен 788
 Аэрон 646
 Бактериородопсин 79, 605—610
 Бактериофаги 308, 330, 346, 351, 398, 399, 407, 410, 432, 433
 Бактериофеофитин б 634, 636
 Бактериохлорофилл б 634, 636
 Барбитураты 643, 648
 Бататасины 720, 721
 Батородопсин 613
 Батрахотоксины 632, 713, 761, 762, 768
 Бацитрацины 287, 288
 Бегеновая кислота 520
 Белки, см. также по названиям
 последовательность, см. Аминокислотная последовательность
 антитела 56, 58, 209—218, 228, 472, 579, 580, 609
 биосинтез, см. Биосинтез
 гены, см. Гены
 гидролиз 34, 35, 37, 38, 40, 51, 52
 — ферментами, см. Ферментативный гидролиз
 гидрофобные взаимодействия 89, 90, 102, 103
 гистоны 400, 402, 410, 411
 гликопротеины, см. Гликопротеины
 глобулярные 98, 226
 гормоны 238—253, 271
 денатурация и ренатурация 47, 48, 103—106
 домены 98, 102, 204, 212—214, 217, 218, 220
 защитные, см. Защитные белки
 интегральные 585, 635
 ионные каналы, см. Транспорт веществ и ионов
 источники 23
 комплексы с нуклеиновыми кислотами, см. Нуклеопротеиды
 комплемент 211, 220—224, 471
 M- 257
 межклеточных контактов 103
 мембранные 245, 579—586, 588, 589, 605—616, 627—636
 методы исследований, см. по названиям
 миеломные 212
 микрофибрилл 257
 мутантные 74
 мышц и соединительных тканей 253—261
 общее число типов 33
 периферические 585
 прогестеронсвязывающие 714
 расщепление 41—52
 регуляторные 291, 292, 399, 405, 414—417
 репрессоры 398, 399, 405, 415
 рецепторные 79, 605—615, 671; см. также Рецепторы
 рибосомные 401—404
 C- 257
 связи водородные 88, 89
 — солевые 90
 силы ван-дер-ваальсовы 90, 92
 солюбилизация 557, 558, 560, 561, 585
 структура
 — вторичная 91—98, 214, 215
 — первичная, см. Первичная структура
 — третичная 32, 98—117, 168
 — четвертичная 33, 117—123, 168
 структурные 32, 92, 93, 97, 98, 224, 257—261, 475
 субъединичный состав 118, 237, 240, 635, 636
 токсины 275—284, 760, 761, 766
 транспортные, см. Транспорт веществ и ионов
 углеводсвязывающие 471—476
 факторы трансляции 226, 422—426
 фибриллярные 32, 98, 257—261
 фотосинтетические 634—636
 химерные 382, 437
 химическая модификация 43, 44, 159—175
 химический синтез 124—159
 цветные реакции 32
 DCC-связывающие 620
 IGA (D, E, G, M) 214—218
 N- 240—243
 S- 194
 Белковая инженерия 379—381
 Бензилпенициллин 723—725
 Бенгли соединение 641
 Бергаптен 768
 Бесплеточные системы 246
 «Бессмысленные» кодоны 420
 Бетаин 683
 Бигумаль 655, 656
 Бимолекулярные мембраны 570—580, 584
 Биогели 54
 Биогенез мембран 586—589
 «Биологические насосы» 598, 606, 617, 622
 Биомембраны, см. Мембраны биологические
 Биополимеры 445, 470—476, 493, 508—512, 550, 638; см. также по названиям
 Биорегуляторы низкомолекулярные 229, 272, 314, 316—318, 638—795; см. также по названиям
 Биос 683, 687, 688
 Биосинтез
 белков 714
 — адапторная гипотеза 419, 420
 — ингибиторы 795
 — индукторы 414, 415
 — мембранных 588, 589
 — стадии, инициация 408, 410—412, 419, 423, 424
 — — терминация 410—413, 419, 426
 — — элонгация 409, 412, 419, 425
 гиббереллинов 717, 718, 785
 гормонов 245—253, 714
 ДНК 296—298, 348—353, 666
 3-индолуксусной кислоты 719
 коллагена 258
 нуклеиновых кислот 348—353, 367, 368, 678, 741—743
 пенициллинов 724
 полисахаридов 702
 простагландинов и лейкотриенов 521, 753, 756
 РНК, см. Транскрипция
 терпенов 693, 694
 тетрациклинов 733
 углеводов 445
 феромонов 775
 эргостерина 793
 Биотехнология 298
 Биотин, см. Витамин Н
 Бислои в мембранах 562—579, 581—585, 591, 599, 608
 Биуретовая реакция 32
 Блеомицины 746, 747
 БЛМ (бимолекулярные липидные мембраны) 570—575, 579
 Боверинин 593
 Бомбикол 774, 775
 (—)-Борнеол 697
 Брاديкинин 110, 146, 271—273

- Брассинолид 720, 721
Брауницера реактив 63
 Бреветоксины 771, 772
 Брожение 176
 Бромирование 33, 34, 48—50, 52, 64, 76, 167, 387, 639
 7-Бромтетрациклин 731
 Бромурал (бромизовал) 647, 648
 Бромциан 33, 34, 48, 49, 52, 76, 165, 268
 Брунеомицин 747
 Бруцин 657, 658
 α -Бунгаротоксин 281, 282
 Бутирофенон 648
 Буфадениолиды 712
 Буфотоксины 712, 763
 Буфоталин 763
 Буфотенин 648, 649
- Вазопрессин* 126, 242, 263—265
 Вакцины 208, 209
 Валидол 659
 Валин 28, 30, 84, 293, 591, 668, 724, 725, 769
 Валиномицин 591—594, 596
 Валиум 648
 Вальденовское обращение 126
 Варфарин 233
 Векторы 427, 430—433, 440—442
 Вератрамин 713
 Вератридин 632
 Вербенолы 697
 Вернолепин 720, 721
 Веронал 647, 648
 Вещество Р 269
 Викасол 689
Вильгельми метод 552
 Винбластин 666
 Винкристин 666
 Виноградный сахар 492
 Вирусы 404, 441
 Витамин(ы) 668—692, см. также по названиям
Виттига реактив 792
 Водородные связи, образование
 в агарозе 501
 — амфотерицине 601, 602
 — валиномицине 591, 592
 — нуклеиновых кислотах 335, 341, 343, 346
 — нуклеопротеидах 398
 — полипептидных цепях 88, 89, 93, 95, 96, 107, 111, 114
 — стероид-рецепторном комплексе 714
 при связывании субстрата
 — с лизоцимом 189, 191
 — с РНКазой 186, 187
 — с химотрипсином 198
- ВТМ (вирус табачной мозаики) 123
 Вторичная структура
 белков 91—96, 214, 215
 — суперспирализация 96—98
 нуклеиновых кислот 343, 344, 346, 389
 Высшие сахара 495
 ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) 54, 55
- Галактаны 492, 499
 Галактоза 229, 447, 449, 451, 454, 467, 472, 473, 475, 486, 487, 492, 496, 498
 β -Галактозидаза 78, 268, 414—415, 437, 466
 Галактозидпермеаза 414, 415
 D-Галакто-D-маннан 467
 D-Галактоновая кислота 453
 Галактоцереброзид 533
 D-Галактуроновая кислота 494, 495, 499
- Галантамин 660
 Галловая кислота 721
 Галлюциногены 648, 769
 Галоксифоп-этоксизил 784
 Галоперидол 648
 Ганглиоблокаторы 645, 650
 Ганглиозиды 496, 515, 534, 535, 539, 555
 Гаптены 402—404
 Гардона 790
 Гастрин 267, 274, 275
 Гедонал 646
 (7Z, 11E)- и (7Z, 11E)-Гексадекадиенил-ацетаты 778
 (10E, 12Z)-Гексадекадиенол 775
 Гексахлоран (гексахлорциклогексан) 789
 Гексенал 646, 647
 Гексозаминогликаны 469
 Гексозы 446, 449, 477, 478, 488, 494
 Гельданамицин 741
 Гель-фильтрация 54, 466, 467, 501, 576
 Гемитерпены 694
 Гемцеллюлозы 499
 Гемоглобин 95, 120, 205—207, 681
 Ген(ы) 81
 введение в растения 441, 442
 галактозидазы 268
 зонды, поиск 378—380
 иммуноглобулинов 216, 217
 интерферона 225, 226, 382—384
 медиаторы иммунного ответа 225—228
 перенос, см. Генная инженерия
 препроингомеланокортина 271
 проинсулина 380—382
 репликация 335, 337
 родопсина 611, 612
 сборка 371—376
 соматостатина 268, 269
 транскрипция 413—417
 экспрессия 377, 382
- Генетический код 297, 420
 Генная инженерия 249, 251, 269, 298, 350, 426—428, 725
 бактериофаги 432, 433
 клонирование, см. Клонирование
 метод специфических расщеплений ДНК 297, 321—326
 обратные транскриптазы 351
 плазмиды 430—432
 поиск рекомбинантных колоний 378
 растений 441, 442
 селекция 434, 435, 440
 соединение фрагментов ДНК 428—430
 трансфекция и трансформация 433, 434
 удаление концевых участков ДНК 314
 экспрессия чужеродных фрагментов ДНК 377, 382, 436—439
- Геномы 27, 216—218, 298
 Гентамицин А 735
 Генцианоаза 497
 β -Генциобиоза, октаацетат 483
 Гепарин 237, 405, 493, 494, 502, 510, 511
 Гептафтормасляная кислота 62
 Гептахлор 789
 Гераниол 695, 696
 Гербициды 783—788
 Героин (диацетилморфин) 641
 Гесперидин 691
 Гестагены 704, 706
 Гетразан 663
 Гефиротоксин 762, 763
 Гиалуроновая кислота 493, 494, 502
 Гиббереллины 715, 717, 718, 720, 721, 785
 Гибридная технология 211
 Гигрин 650
- Гидразиолиз 38, 39, 65, 128—130, 139, 147, 161
 Гидрел 786, 787
 25-Гидроксикальциферол 685, 686
 5-Гидроксизин 32, 258, 475
 5-Гидроксиметилцитозин 303
 Гидроксипролин 32, 84, 258, 475, 684
 15-Гидроксипростагландиндегидрогеназа 757
 N-Гидроксисукцинимидные эфиры 141
 1 α -Гидроксиколекальциферол 685, 686
 20-Гидроксизидонин 709
 Гидролазы 177, 178, 181, 471
 Гидролиз
 ацетилхолина 645
 белков и пептидов 34, 35, 37, 38, 40, 51, 52
 ДНК и РНК 307, 309—316, 318, 396
 нуклеиновых кислот 306, 396
 углеводов 463—466, 468, 469, 475
 уретановых групп 131
 ферментами, см. Ферментативный гидролиз
 D-Гидроксиизовалериановая кислота 591
 Гидропен 779
 Гидрофобные взаимодействия 89, 90, 102, 103, 341, 398, 405, 406, 515, 583, 714
 Гиосциамин 645
 Гиперицин 768
 Гиометрин 770
 8 α -(N-L-Гистидил)-FAD 673
 Гистидин 29, 30, 32, 106, 138, 165, 166, 170, 194—197, 206
 Гистоны 400, 401, 410, 411
 Гистрионикотоксин 762, 763
 Гитогенин 712
 Глауколид А 697, 698
 Гликаль 482
 Гликаны, см. Полисахариды
 Гликоген 239, 253, 479, 501
 Гликогенолиз 239, 240
 Гликогенфосфорилаза 78
 Гликозидазы 465, 466
 Гликозидные связи 330, 333, 346, 395, 460—476, 480—491, 505, 506
 Гликозиды 460, 461, 482
 алкалоиды 496
 аминопроизводные 490, 734—736
 аномеры 306, 307
 антибиотики 496
 галловой кислоты 721
 сердечные 494, 496, 702, 710—712
 синтез 480, 481
 цианогенные 496
 1,2-*транс*- 483—485
 1,2-*цис*- 485, 486
 Гликозилапарагиназа 475
 Гликозилгалогениды 445, 481, 482
 Гликозил-катион 484
 Гликозилирование 445, 482—484, 486—489
 синтез липидов 541, 546
 — углеводов 480—491
 Гликозилтрансферазы 471
 Гликокопьюгаты 445
 N-Гликолинейраминовая кислота 463, 473
 Гликолипиды 445, 494, 496, 514, 532—535, 538, 539, 541, 546, 606
 Гликопептиды 153, 508—510
 Гликопротеин(ы) 27, 444, 611
 гормоны 252, 471, 507
 групповые вещества крови 503, 504
 иммуноглобулины 503
 интерлейкин 2 229

- Гликопротеин(ы)
 интерфероны 225
 катаболизм 507
 муцины 503—507
 природные 471—476
 синтез 490, 491
 структура 475, 476
 токсины 761, 766
 фибронектин 236, 237
 холинорецептор 629—631
 Гликофинголипиды 533, 534, 538, 541, 546
 Гликофорин 474
 Гликолевая кислота 710
 Глифосат 442
 Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 181
 Глицериды 516, 517
 Глицерин 514, 516, 517, 523, 540, 680
 Глицериновый альдегид 83, 446, 447, 480
 Глицеринтеоховые кислоты 512
 Глицерогликолипиды 532, 533
 Глицеролипиды 516, 517
 Глицерофосфаты 185, 523
 Глицерофосфолипиды 523—530
 Глицилглицин 124, 125
 Глицин 28, 39, 258
 Глобулин 272, 714
 Глутамин 29, 34, 38, 58, 172
 Глутаминовая кислота 30, 34, 40, 90, 165, 636, 678, 680, 689
 Глутаминсинтаза 120, 121
 Глюкагон 239, 240, 242, 267, 274, 275
 Глюканы 467, 503
 D-Глюкаровая кислота 495
 Глюкоза 293, 444, 447, 449, 451, 452, 467, 475, 487, 492, 496, 498, 500, 512
 D-Глюкозамин 449, 467, 532, 533
 α-Глюкозидаза 185
 Глюкозидгидролазы 471
 Глюкозо-6-фосфат 274
 Глюкокортикоиды 707
 Глюкоманнаны 499
 Глюконовая кислота 451, 682
 D-Глюкопираноза 449, 450, 472, 500
 5-[α(β)-D-Глюкопиранозилгидроксиметил]-цитозины 303
 D-Глюкофенилозазон 452
 D-Глюкофураноза 450
 Глюкоцереброзиды 533
 Глюкуронидазы 496
 D-Глюкуроновая кислота 449, 494, 495, 499
 D-Глюцит 453
 ГМДП 510
 Голарримин 713
 D-Гомопантотеновая кислота 675
 Гомосерин 48, 49
 Гонадотропин 238, 471
 Гониадоксины 771
 Госсиплор 778
 Гормон(ы) 756
 адаптация 265
 адренокортикотропный (АКТГ) 265, 270
 анаболические 238, 249—251
 антиювенильные 721
 белки 238—253, 271
 биосинтез 245—253, 714
 гипофиза 265, 266, 271, 507
 гипоталамуса 266, 267, 269, 271
 кининовые 271—273
 коры надпочечников 707, 708
 лактогенные 251
 липотропные 270, 271
 лютеинизирующий (ЛГ) 252, 267
 меланоцитстимулирующие 265, 266, 270, 271
 механизм действия 242, 243, 264
 насекомых 709, 779
 пептиды 126, 156—158, 239, 240, 242, 252, 263—265, 267, 271—275, 292, 778—780
 половые 702, 704—706
 рецепторы 239—242, 245
 роста 238, 249—251, 267, 715—721
 стероидные 702—709, 714
 тимические 292
 тиротропный (ТСГ) 238, 252
 тканевые 271—273
 фолликулостимулирующий (ФСГ) 252
 ювенильные (ЮГ) 697, 778—780
 Гормональный сигнал, передача 242, 243
 Грайанотоксин III 768
 Грамицидин-5-синтаза 286, 287
 Грамицидины 84, 108, 109, 115, 117, 126, 285, 286, 598—602
 Гризеофульвин 750
 Групповые вещества крови 503, 504
 Гуаноин 299, 300, 322, 323, 334
 Гуанозинмонофосфат 245, 614, 615
 Гуанозинтетрафосфат 302
 D-Гулоза 447
 L-Гулоновая кислота 495
 D-Гулуруоновая кислота 494, 501
 Гуммиарабик 492
 Гуттаперча 701
 ГФТ (гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза) 211
 γ-ГХЦХ (линдан) 789

 ДАБИТЦ (4-N, N-диметиламиноазобензол-4'-изотиоцианат) 61
 Дансирование 37, 38, 161
 Дапсон 655, 656
 Дауко 792
 Дауномицин 744
 Даунорубицин 744
 ДАБТГ (4-N,N-диметиламиноазобензол-4'-тиогидантоины) 61
 ДДТ (п, п-дихлордифенилтрихлорэтан) 789, 791
 Дегидрогеназы 99, 102, 177, 181, 253, 673, 675
 2,3-Дегидро-L-гулоновая кислота, γ-лактон 684
 Дегидроретинол 671
 Дегидрохлортетрациклин 733
 D-Дезозамин 739
 Дезоксиаденозин 299, 300
 Дезоксиаденозин-5'-фосфат 301
 Дезоксигуанозин 290, 299, 300
 Дезоксикортекостерон 707, 708
 Дезоксимиоглобин 206
 Дезоксинуклеозид-3',5'-дифосфат 302
 Дезоксинуклеозидтрифосфаты 302, 348—352, 407
 Дезоксинуклеозид-3'-фосфат 301
 Дезоксинуклеозид-5'-фосфат 301
 Дезоксинуклеозид-3',5'-циклофосфат 301
 Дезоксинуклеотидилтрансфераза 351, 352
 2-Дезокси-D-рибоза 299, 306, 307, 444, 494
 Дезоксирибозиды 680
 Дезоксирибонуклеозиды 299, 300
 Дезоксирибонуклеотиды 306
 Дезоксисахара 494
 Дезоксиуридин 299, 300
 Дезоксихоловая кислота 710
 Дезоксицитидин 299, 300
 Декаметрин 791
 2-Декарбоксамидо-2-ацетилтетрациклин 731
 Дексаметазон 708
 Декстраны 479, 502, 503
 Декстроза 494
 Дельтаметрин 791, 792
 6-Деметилтетрациклин 731
 Денатурация
 белков 47, 48, 103—106, 185
 ДНК 342, 344
 Дендрозаин 697, 698
 Депсипептиды 153—156, 175
 Дерматансульфат 510, 511
 Дерморфины 262
 Десмозин 260, 261
 Детергенты 54, 104, 556, 560, 561, 584, 58, 712, 713
 Детерминанты антигенные 210—212, 21, 216, 265, 503, 504, 508, 609
 Децис 791
 Диазепам 648
 6-Диазо-5-оксо-L-норлейцин 172
 2,3-Диамино-2,3-дидезокси-D-маннуруоновая кислота 469
 мезо-2,6-Диаминопимелиновая кислота (ДАР) 729
 Диаминоуроновые кислоты 469
 Диастаза 176
 Диасетилморфин (героин) 641
 Диасетоксисцирпенол 769, 770
 Диацилглицерины 242—244, 524—527, 529, 530, 541—543, 553
 Диацилглицерофосфолипиды, см. Фосфолипиды
 Дибазол 641, 666
 Дибромдиенон-спиролактон 167
 α,α'-Дибром-п-ксилолсульфокислота 168
 Дибутамин 787
 Дигидрол 786, 787
 Дигидроксиэтиленгликоль 720, 721
 α,δ-Дигидрокси-L-лейцин 277
 1α,25-Дигидроксиголекальциферол 685, 686
 Дигидрооротовая кислота 689
 Дигитонин 104, 561
 Дигомо-γ-линолевая кислота 520, 521
 2,6-Дидезоксигектозы 494
 2',3'-Дидезоксинуклеозидтрифосфат 317
 Диизопропиламина дихлорацетат (DADA) 682
 Диизопропилфторфосфат (ДФФ) 181, 187, 197, 660, 761
 Дикаин 644
 2,2'-Дикарбоксо-4,4'-ди(иоацетамидо)-азобензол 168
 Диклоксациллин 726
 Дикумарол 233
 β,β-Диметиаллилпирофосфат 693
 5,6-Диметилбензимидазол 681
 1,7-Диметилгуанин 388
 3,11-Диметил-2-ионакозанол 776
 (E)-3,7-Диметил-2-октен-1,8-диовая кислота 776
 (E)-3,7-Диметил-2-октен-1,8-диол 775
 Диметипин 786, 787
 4,6-Динитро-2-метилфенол 782
 Динорфины 262, 263, 271
 Диоксин (2,3,7,8-тетрахлорбенз-п-диоксин) 784
 Диосгенин 706, 708, 712
 Дипептидазы 69, 70
 Диплацин 651, 652
 Дипразин 648
 Дискоидины I и II 508
 Диспарлор 775
 Диспартанты 776
 Дисульфидные связи
 в иммуноглобулинах 212, 213, 218
 — инсулине и его рецепторе 248, 249

- интерлейкинах 228, 229
- интерферонах 226
- комплемементе 224
- лизоциме 190
- нейротоксинах 280, 281, 283, 284
- окситоцине 264
- пептидах 153, 154
- тромбине 233
- фибриногене 234
- химотрипсине 197
- цистине 31, 34, 55, 75, 76, 104, 105, 164
- Дитерпены 694, 698, 699, 720, 721
- Дитилин 651, 652
- Дитиокарбаматы 782
- Дитиокарбаминовая кислота 793
- Дитиотреит 55, 104, 164
- Диурен 788
- Дихлорбутразол 794
- 2,4-Дихлорфеноксипропионовая кислота (2,4-ДП) 783, 784
- 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) 783, 784, 787
- Дихлорфос 790
- Дихлофоп-метил 784
- Дициклогексилкарбодимид (DCC) 133, 141—143, 146, 155, 357, 359, 620
- Дизтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД₂₅) 648, 649, 769
- 2,4-ДМ 783, 784
- ДНазы (деоксирибонуклеазы) I и II 310, 314, 316, 317
- ДНК (дезоксирибонуклеиновые кислоты) биосинтез 296—298, 348—353, 666
- внехромосомные 296
- гибридизация 343
- гидролиз 307, 309—316, 318
- двойная спираль 296, 297, 335—343, 346—348, 398, 399, 404, 406, 600, 601
- денатурация 342, 344
- дрожжевого экстракта 718
- интеркаляция в актиномицине D 743
- кинки, см. Кинки
- клонирование фрагментов 352, 371—376, 435, 436
- линкеры 377, 401
- нуклеотидная последовательность 79—81, 399, 405
- однопочечные 343
- операторы 399, 405
- плазмиды 296, 407
- промоторы 400, 405, 412—414, 714
- расщепляющие ферменты 297, 309—312, 314—316
- редкие компоненты 302, 303
- рекомбинантные, см. Генная инженерия
- релаксированные 341, 342
- ренатурация 342, 343
- репликация 297, 335, 338, 407—410, 655
- соединение элементов 428—430
- степень гидратации 338
- суперспирализация 341, 342, 410
- температура плавления 342
- терминаторы 412, 413
- трандукция 725
- удаление концевых участков 314
- удвоение, см. Репликация
- фосфорилирование 353
- форма (ы) А 338, 340
- В 336, 338, 340, 401
- RF-1 и RF-2 410
- Z 340, 341, 401
- фрагментация 321—328, 352, 353
- химико-ферментативный синтез фрагментов 370—372
- химическая модификация 321—326
- химический состав 296
- хроматин 400, 401
- хромосомные 296
- циклические 341, 342
- ДНК-гиразы 341, 410
- ДНК-зависимые РНК-полимеразы 81, 121, 122, 277, 297, 351, 409, 412—417
- ДНК-лигазы 298, 352, 353, 370, 371, 377, 379, 381, 408—411, 428
- ДНК-матрица 172, 173
- ДНК-полимераза (ы) 297, 316, 325, 327, 348—350, 352, 370, 371, 379
- бактериофага T₁ 351
- обратная транскриптаза 297, 309, 328, 351
- реплицирующей 407—411
- РНК-зависимые 297, 309, 328, 351
- фрагмент Кленова 328, 350
- ДНК-топоизомераза II, см. ДНК-гиразы
- T-ДНК 442
- ДНС-аминокислоты (дансиламинокислоты) 37—39, 58—61
- ДНС-Эдмана метод 60, 61, 76
- ДНФ-аминокислота (динитрофенильное производное аминокислоты) 37
- (8E, 10E)-Додекадиенол 775
- (8E, 9E)-Додецилацетаты 776, 777
- Доксорубин 744
- «Домино» метод 70
- Допамин 684
- Допростон 754, 755
- Дофамин 263, 653, 665
- Дроп 787
- Дурамицин 154
- Желатин (а) 261
- Желчные кислоты 556, 559, 585, 710
- Живца 694
- Жирные кислоты 514, 519—522, 531, 536, 538, 540, 554, 555, 693
- Жиры 514, 668
- Защитные белки 471
- антигены гистосовместимости 210, 218—220
- система иммунная 208—230
- комплемента 211, 220—224, 471
- свертывания крови 230—238
- фибринолиза 231, 236, 237
- Защитные группы, синтез
- липидов 541—546
- моносахаридов 450—460
- нуклеозидов и нуклеотидов 354—356
- пептидный, блокирование
- аминокислотных групп 128—131
- карбоксильной группы 131—133
- функциональных групп 133—138
- Зеатин 718
- Зеатинрибозид 718
- Зеатинрибозид 718
- Зимаза 176
- Зимогены 237
- Зонды для поиска генов 378—380
- Зоостерины 702
- Зоотоксины, см. Токсины
- Зооэкдистероиды 709
- D-Идоза 447, 477
- Изадрин 653
- β- и γ-Изгибы 93, 107, 108, 110, 113, 279, 294
- Изoleyцин 28, 30, 84, 89, 90
- Изомеразы 99, 101, 177, 341, 410
- Изониазид 677
- Изопельтерины 662, 663
- Изопенициллин 724, 725
- Изопентениладенин 718
- Изопентенилпирофосфат 693
- Изопреноиды 693, 694
- Изоферменты 178, 202
- Изохинолин 641
- Илопрост 757
- Имазалил 794
- Иммунитет 208, 209
- Иммунная электронная микроскопия 402—404
- Иммуноглобулиновая упаковка 218
- Иммуноглобулины 212—214, 216—218, 402, 404, 445, 471, 503
- Иммуносорбенты 55, 56, 58
- Ингибитор (ы)
- активации комплемента 223
- антибиотиков, см. Антибиотики
- биосинтеза белков 795
- гиббереллинов 785
- каротиноидов и хлорофилла 787, 788
- модификации белков 170
- роста и развития растений 715, 720, 721
- ферментов 182
- конкурентные и неконкурентные 182—184
- необратимые 181, 187, 197
- обратимые 181—184
- фотосинтеза 789
- химотрипсина 42
- 3-Индолилмасляная кислота 716, 717
- 3-Индолилметанол 716
- 3-Индолилпировиноградная кислота 716
- 3-Индолилпропионовая кислота 716, 717
- 3-Индолилуксусная кислота 715, 716, 719
- 3-Индолилэтанол 716
- Индометацин 643
- Индуктор 414
- «Индуктивное соответствие» фермента и субстрата 177, 188
- Инициация
- биосинтеза белков 408, 410—412, 419, 423, 424
- репликации 408, 410, 411
- транскрипции 412
- трансляции 226, 419, 424
- Инозин 304, 389
- Инозит 242, 243, 264, 523, 524, 683
- Инозит-1,4,5-трифосфат (IP₃) 242—244
- Инсектициды 638, 650, 788—793
- Инсулин 42, 76, 126, 151, 152, 157—159, 238, 245—250, 267, 380—382, 501
- Интеркалирующие красители 341, 342, 346, 348
- Интерлейкины (IL) 228, 229
- Интерфероны 224—227, 229, 382—384, 471
- Интроны 418, 440
- Информомеры 419
- Информосомы 404, 419
- Иодхлоргидроксихинолин 664
- Иононы 696
- Ионофоры 590—598, 750
- Иохимбан 665, 666
- Иохимбин 665, 666
- Ироны 696
- Казеин 294
- β-Казоморфин 262
- Каллидин 271—273
- Калликреин 231, 232, 237, 272
- Кальмодулин 244, 245
- Кальмицин (антибиотик А-23187) 594—596
- Кальцитонины 242, 252, 273, 274

- Кальцитриол 714
 Камедь 500
 Камфора 659, 694, 695, 697
 Канамицин А 735
 Кандидин 748
 Кантаридин 766
 Канчаномидин 746
 Карбарил 790
 Карбогидразы 177
 Карбодимиды 65, 133, 141—143, 146, 155, 357, 389, 620
 N-Карбоксиангидриды 126, 127, 143—145, 148, 149, 159
 Карбоксипептидазы 67—69, 74, 76, 185, 199—202
 4-Карбоксиурацил 682
 Карбомицины 740
 Карбофос 790
 Карденолиды 712
 Кардиолипиды 288, 530
 Δ^3 -Карен 697
 Карминомицин 744
 L-Карнитин 683
 Каротиноиды 549, 694, 787, 788
 Каротины 670, 701
 Карта (ы)
 генетическая бактериофага λ 432
 пептидные 53, 54, 76, 118
 Рамачандрана 87, 91
 электронной плотности
 — пурпурных мембран 606, 607
 — фотосинтетических белков 635, 636
 Катабатмофобин 269
 Катализаторы биологические, см. Ферменты
 Катепсины 69, 271
 Катехин 691
 Каурен 785
 Каучук 694, 701, 702
 Квадрол 62
 Кверцетин 691
 α -Кератин 95, 97, 98
 Кератинсульфат 510, 511
 Кетозы 446, 448, 451, 452
 Кефалины 509, 515
Кёнигса—*Кнорра* метод 445, 482, 483
 Т-Киллеры 210, 218
 Кинетин 718
 Кинин 231, 232
 Кининоген 231, 232, 237, 272
 Кинки 346—348, 567, 568
 Кинопрен 779
 Кинурин 676
 Кирромидин 740, 741
 Клавулановая кислота 728
 Клавулоны 755, 756
 L-Кладиноза 739
 «Клеверный лист» 343, 344
Клеланда реактив 164
Кленова фрагмент 328, 350
 Клонирование 111, 209, 352, 353, 371—376, 379, 381, 434—441
 Клострипаин 47
Кляйна правило 461
 Кобаламины 679—681
 Кобамамид 679—681
 Кобинамид 680, 681
 Кодеин 639—641
 Кодоны 297, 419, 420, 424
 Кокаин 643—646, 663
 Кокарбоксилаза 671, 672
 Коллаген 32, 97, 98, 224, 257—261, 475
 Коллагеназы 260
 Колхамин 667
 Колхицин 666, 667
 ES-Комплексы 179, 182, 187, 188
 F-Комплексы 141
 Комплемент 211, 220—224, 471
 Конвертазы 222, 223, 272
 Конинин 650, 662
 Конканавалин А 471, 472, 474
 Коннекторная техника 269, 429, 430
 Конотоксины 284
 Константа (коэффициент)
 диссоциации комплекса фермент-активатор 184
 ингибирования ферментов 181—184
 Михаэлиса 179—181
 седиментации компонентов комплекта 222
 сродства рецептора к гормону 239
 экстинкции 61, 335
 Конформация (и)
 аламетицина 603, 604
 апамина 279
 бактериородопсина 606
 белков и пептидов 48, 82—91, 99—102, 109—117, 119, 120, 174, 175
 валиномицина 591—593
 ганглиозидов 539
 граммидинов 108, 109, 115, 117, 599, 600
 β -изгибы 93
 липидов 536—539, 567, 568
 металамида ацетил-D-пролина 110
 моносахаридов 445—449, 476—478
 нейропептидов и морфина 641
 нейротоксинов 116, 117, 283
 неупорядоченная (клубок) 103, 111, 112
 нуклеиновых кислот 330—348
 окситоцина 264
 олигосахаридов 478—480
 полиэфирных антибиотиков 594
 родопсина 614
 спиральные 93—98
 β -структур 91—93
 тауматина I 293
 трансoidные 476, 477
 ферментов 177, 188
 ванна 477, 478
 гош- 331, 537, 538, 567, 568
 «конверт» 332
 кресло 477
 «твист» 332
 эхиномицина 290
 Кооперативные эффекты 184, 185
 Коразол 657, 658
 Кордиамин 657, 658
 Кордицепинтрифосфат 317
 Коррин 681
 Кортизол 707
 Кортизон 707, 710
 Кортикоиды 707, 708, 710
 Кортикостероиды 265, 713
 Кортикостерон 707
 Кортикотропин 110, 126, 158, 242, 265, 266, 270
 Кофакторы, см. Коферменты
 Кофеин 643, 658, 659
 Коферменты 105, 177, 202—205, 672—681, 688, 690, 692
 Коэнзим R 687
 Краун-эфир 597
 Крахмал 185, 500
 Креатин 683
 Креатинфосфат 683
 Крика гипотезы 419, 420
 Крипанды 597, 598
 Крипаты 597, 598
 Кристмас-фактор 231, 232, 234, 237
 Кротаин 281, 282
 Ксантин 658, 659, 701
 Ксантоксин 718
 Ксантотоксин 768
 Ксантофиллы 694, 701
 Ксиланы 492, 499
 Ксилит 293, 494
 Ксилоза 447, 449, 492
 Ксилопираноза 499
 D-Ксилулоза 448
 Кукурбиновая кислота 720, 721
 Кукурбитацин А 700
 Кураре 651
Курциуса метод 125, 139, 140
 Лавандовое масло 695
Лайнуивера — *Берка* уравнение 181
 β -Лактамаза 725, 726
 Лактатдегидрогеназа 99, 102
 Лактобациллин 723
 Лактобацилловая кислота 522
 Лактоза (молочный сахар) 462, 498
 Лактон (ы)
 альдоновых кислот 453, 454
 D-глюкуроновой кислоты 494
 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты 684
 дигтереновые 720, 721
 нонактивные 594, 595
 сесквитерпеновые 697, 698
 стероидные 496, 712
 уроновых кислот 494
 Лактопероксидаза 167
 Лакто-N-фукопентаоза 498
Лангерганса островки 248
 Ланостерин 700
 Лантионин 154
Ларсена метод 63
 Латеральная диффузия 568, 569, 584
 Латиризм 260
 Левоглюкозан 488
 Леворин А₂ 748, 749
 Лейкомицины 739
 Лейкотриены (LT) 521, 687, 758—760
Лейкса ангидриды 126, 143
 Лейцин 28, 30, 46, 84, 89, 90, 293, 668, 769
 Лейцинаминопептидаза (ЛАП) 69
Лейцин-энкефалин 372
 Лектины 471, 472, 474, 507, 508, 766
 Лерит 642
 Лецитин 514, 601
 Лиазы 177
 Либерины 266—269
 Либриум 648
 Ливидомицин В 735
 Лигазы 177, 348, 352, 353
 Лигноцериновая кислота 520, 531
 Лидол 642
 Лизергиновая кислота 649, 769
 Лизин 29, 30, 38, 42, 43, 45, 47, 61, 64, 85, 133, 160, 161
 Лизофосфолипиды 524
 Лизоцим 95, 188—193, 468
 Ликоксантин 701
 Ликопин 701
 D-Ликоза 447, 451
 Лимонен 696
 Лимфокины 210, 226, 228, 229
 Лимфотоксин 210, 229
 В-, пре-В, Т-Лимфоциты 209—211, 214, 215, 217, 228
 Линалоол 695
 Линдан 789
 Линкеры 377
 Линкомицин 740, 741

- Линурон 788
 Липаза 177, 542
 Липиды 513—546
 бимолекулярные мембраны на их основе 570—580, 584
 диольные 517
 жирные кислоты 514, 519—522
 как компоненты биомембран 549, 581, 606
 латеральная диффузия 568, 569, 584
 самосборка 550—569, 581, 585, 586
 топологическая асимметрия 569, 582, 585, 586
 флип-флоп 569, 586
 конформации 536—539, 567, 568
 на основе глицерина и сфингозина 516—518
 полярные 515, 516
 солюбилизация 557, 558, 560, 561, 585
 с углеводными фрагментами 532—535
 фосфатсодержащие, см. Фосфолипиды
 химический синтез 540—546
 Липоевая кислота 690, 721
 Липоксигеназы 759, 760
 Липоксины (LX) 759, 760
 Липопротенины 549, 558, 559, 581—583
 Липосомы 564, 565, 575—580
 Липотриены 758
 Липотропин 159, 238, 266, 271
 Лобелин 650, 662, 708
 Лобри де Брюина — Альберда ван Экенштейна реакция 452
 Луброл РХ 561
 Лэнгмюра метод 551, 552
 Люлиберины 267
 Люминал 647, 648
 Люмиродопсин 613
 Лютропин (ЛГ) 238, 242, 252, 266, 267
- Магнамицин 740
 Майтотоксин 761, 772
 Макбецин I 741
 Максама — Гилберга метод 321—326
 Макролипиды 601, 738—742, 748—750
 Макрофаги 210, 220, 229
 Манеб 793
 Маннаны 492, 499
 Манноза 444, 445, 447, 449, 451, 453, 467, 473, 475, 492, 496, 507
 Маннозидазы 466
 L-Манноновая кислота 451
 α-D-Маннопираноза 472
 D-Маннуриновая кислота 494, 501
 Маноол 699
 Масс-спектрометрия 70—74, 464, 465
 Мевалоновая кислота 693
 Медиаторы 210, 224—230, 525, 683
 Мезатон 653
 Мезитилсульфо-3-нитро-1,2,4-триазолид 362
 Мезитилсульфохлорид 360
 Мексаформ 664
 Меланин 265
 Меланотропины 110, 242, 266, 270, 271
 Меланоциты 265
 Меллецитоза 497
 Мелиттин 278, 279
 Мембранные белки, см. Белки мембранные
 Менадион 689
 Менакрил 655, 656
 Менахиноны 689, 692
 Ментол 659, 695
 Мембраны биологические
 биогенез 586—587
 в клетках 548—550, 586—589
 действие, влияние цитотоксинов 718
 динамика 568, 569, 584
 как липопротеиновые ансамбли 549
 липиды, см. Липиды
 модели, см. Модели биологических мембран
 плазматические 549
 пурпурные 605—610
 разборка и сборка 560
 структура молекулярная 580—586
 фоторецепторные 611—615
 фотосинтетические 634—636
 Мембраны искусственные, см. БЛМ, Липосомы, Монослои
 Мепротан (мепробамат) 648
 Меркурирование 387, 388
 Мескалин 648, 649
 Мессенджеры 242, 245, 264
 Местранол 706
 Метазакхлор 785, 786
 Металаксил 795
 Металлопротеины 27
 Метамфетамин (первитин) 653
 Метародопсины 613, 614
 N-Метиладенин 302, 303, 388
 Метил-α-D-галактопиранозид 459
 Метил-α-D-глюкозид 185, 454
 Метил-α (β)-D-глюкопиранозиды 455, 457, 460, 477
 Метил-α-D-глюкуронид 454
 7-Метилгуанин 388
 Метиленовый голубой 164, 655
 Метиленомицин А 440
 Метилизопельтьериин 662
 Метил-4,6-О-изопропилиден-α-D-альтропираниозид 459
 Метил-3,4(4,6)-О-изопропилиден-α-D-галактопиранозиды 459
 N-Метилмидазол 362, 363
 Метилмалонил-CoA-транскарбоксилаза 688
 Метил-6-О-мезил-α-D-глюкопиранозид 457
 Метилметонин 692
 Метилнитрофос 790
 Метилпропандиол 681
 17α-Метилтестостерон 705, 706
 Метил-2,3,4,6-тетра-О-мезил-α-D-глюкопиранозид 457
 Метилтоколы 686
 3-Метилуридин 303
 Метилцитозины 302, 303, 388
 Метимицин 740
 Метионин 28, 30, 46, 48, 49, 52, 76, 164, 171, 293, 668, 678, 683
 Метионинсульфон 68
 Метод(ы)
 «блуждающего пятна» 318—322
 «рН-весы» 143, 144
 генной инженерии, см. Генная инженерия
 «замораживание — скалывание» 583
 «замораживание — травление» 583
 иммунохимические 402—404, 438, 439
 картографические, см. Карта (ы)
 масс-спектрометрии 70—74, 464, 465
 микроскопии, см. Электронная микроскопия
 радиоактивные, см. Радиоактивные методы
 рентгеновские, см. Рентгеноструктурный анализ
 спектроскопии 111—117, 264, 461, 469, 470, 536, 537, 539
 специфических расщеплений 297, 321—326
 «сэндвич-принта» 318—322
 электрофореза, см. Электрофорез
- S-(п-Метокси)бензилцистеин 135
 Метоксифлуран 646, 647
 Метоксиклор 780
 7-Метоксицефалоспорины 728
 Метопрен 779
 Метотрексат 679
 Мециллинам 726
 Мизеротоксин 767, 768
 Микостерины 702
 Микотоксины 276—278, 769, 770
 Минералокортикоиды 707
 Миноциклин 731, 732
 Миоглобин 95, 205, 206
 Миозин 253—257
 Миоинозит 528, 529
 Миофибриллы 253, 254, 256
 β-Мирцен 695
 Митоммицины 748
 Митчелла гипотеза 619
 Михаэлиса комплекс 203, 204
 — уравнение и константа 179—181
 Мицеллы 117, 554—562, 583
 Мовсин 655
 Модели биологических мембран 582—586
 L-Молочная кислота 591
 Молочный сахар, см. Лактоза
 Монеллин 294
 Моносин 594—596
 Моноаминоксидаза 673
 Моноацилглицерины 541, 553
 Монобактамы 728
 Моноклины 210, 229
 Моноклональные антитела 56, 58, 211, 228, 609
 Мономицин 663
 Моносахариды 444, 492—495
 конформации 445—449, 476—478
 мутаротация 450
 окисление 454—456
 синтез
 — гликозидов 481, 482
 — неогликопротеинов 490, 491
 — олигосахаридов 481—488
 — полисахаридов 488—490
 простые эфиры 458—460
 реакции, группа (ы)
 — гидроксильные 456—460
 — карбонильная 448, 449
 — с цианидом натрия 451
 циклические формы и таутомерия 449, 450
 Монослои 550—554, 581, 586
 Монотерпены 694—697
 Монофторуксусная кислота 767
 Морриса метод 73
 Морфин 140, 261—263, 639—642, 644—646, 760
 Морфинизм 639
 Морфолин 129
 Моффига уравнение 111
 Мочевая кислота 658, 659
 МТП-кефалин 509
 Мукополисахариды (протеогликаны) 237, 405, 445, 493, 494, 501, 502, 508, 510—512, 589, 679
 Мурабутид 509
 Мурамилдипептид (МДП) 508—510
 Мурамовая кислота 508, 511
 Муреин 190, 468, 728—730
 Мусказон 770
 Мускарин 645, 661, 770
 Мускариновые рецепторы 628, 645

- Мутаротация 450
Муцины 471, 474, 476, 503—508
Мыла 514, 522, 523
Мятное масло 695
- Налидиксовая кислота** 664
Налоксон 263
Налорфин 641
Направленный мутагенез 160, 229, 379—381
Нарколан 646, 647
Наркотин 639, 641, 642
Натриевые мембранные каналы 632—634, 764
— насосы ионные 598, 606, 617, 622
Нафтизин 653
Нафтиридиновая кислота 664
Неграм 664
Нейраминидаза 466
Нейраминная кислота 475, 534
Нейролептики 648
Нейромодуляторы 263, 628—631, 645, 650, 651, 653, 665, 684, 770
Нейропептиды 261—271, 372, 641
Нейротоксины 95, 116, 117, 159, 279—284, 629, 632, 764, 772
Нембутал 648
Неогликопротеины 490, 491
Неосакситоксин 771
Неоэндофины 262, 271
Нерол 695, 696
Ниацин 675, 676
Ниацинамид 675
Нигерицин 594—596
Низентил 642
Низин 154
Никотин 628, 645, 650, 675—677
Никотинамид 675, 676
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 673, 675—677
Никотинамиддинуклеотидфосфат 675—677
Никотиновая кислота 650, 675—677
Никотиновые рецепторы 628—631, 645, 650, 651
Нингидриновый реактив 32, 35, 36, 53, 76, 146
Нистатин А, 748, 749
Нитроглицерин 659
2-Нитрозоглицозилгалогениды 486
Нитроксалин (5-НОК) 664
Нитронг 659
2-Нитро-5-тиоцианатобензойная кислота (НТЦБ) 52
п-Нитрофенил- α -D-галактопиранозид 460
Нитрофуран 664
Новокаин 644
Нокардин А 728
Ноксирон 647, 648
Нонактины 594—596
Нонидет 585
Норадrenalин 653, 665, 684
Норэтинодрел 706
Но-шпа 641
Нуклеазы 309, 314
Нуклеиново-белковые взаимодействия 405, 406
Нуклеиновые кислоты
алкилирование 388, 393, 394
ацилирование 389, 391—393
биосинтез 348—353, 367, 368, 678, 741—743
галогенирование 387
гетероциклические основания 209, 306, 333—335, 384—391
гибридизация 343
гидролиз 306, 396
двухпочечные 296, 297, 335—348, 385
денатурация 342, 344
интеркаляция 743, 745
репликация, см. Репликация
транскрипция, см. Транскрипция
трансляция, см. Трансляция
кинки, см. Кинки
комплексы с белками, см. Нуклеопротеиды
конформации 330—348
линейные 307
меркурирование 387, 388
однопочечные 343—345, 385
окисление 386, 394, 395
разрывы 746, 748
реакции с азотистой кислотой 391
— с альдегидами 389, 390
— с бисульфитом натрия 384, 385
— с гидразином 385, 386
— с гидроксиланином 385, 386
— с карбонимидом 389
— с карбонилами 394
редкие (минорные) компоненты 302—304, 370, 389
ренатурация 342, 343
синтез, методы
— ферментативные 348—353, 367, 368
— химико-ферментативные 370—376
— химические 354—366, 368—370
структура вторичная 343, 344, 346, 389
— первичная 298—330, см. также Нуклеотидная последовательность
— третичная 344, 345
«стэкинг»-взаимодействия 335, 341, 346
суперспирализация 341, 342
температура плавления 342, 344
торсионные углы 331, 332, 336, 337, 346
ферментативное расщепление 307—316
химическая модификация, см. Химическая модификация
циклические 341, 342
Нуклеозид-2'(3',5')-дифосфаты 302
Нуклеозидтрифосфаты 302, 317, 327, 328
Нуклеозид-2'(3' или 5')-фосфаты 301
Нуклеозид-2',3'(3',5')-циклофосфаты 301
Нуклеозиды 296, 299—301, 306, 332, 333, 354—366, 397, 460
Нуклеоиды 408
Нуклеопротеиды
комплексы операторы — репрессоры 398, 399, 405
нуклеосомы 400, 401, 410, 411
сборка 405, 406
хроматин 400, 401
Нуклеотидная последовательность 306—309, 316, 317
гена интерферона 225, 226, 382, 383
— препроингомеланокортина 271
ДНК 79—81, 405
определение, метод(ы)
— «блуждающего пятна» 318—322
— *Максама — Гилберта* 321—326
— *Сенгера* 325, 327, 328
— «сэнгерпринта» 318—321
Нуклеотидные единицы 331—333, 340, 341
Нуклеотидный состав 306
Нуклеотиды 296, 297, 301, 302, 306, 307, 318—321, 331—334, 340, 341, 409—411
Ньюмена формулы 476, 477
NAD (никотинамидадениндинуклеотид) 675—677
NADH (никотинамидадениндинуклеотид восстановленный) 676
NADP (никотинамидадениндинуклеотид-фосфат) 675—677
NADPH (никотинамидадениндинуклеотид-фосфат восстановленный) 676, 678, 733
NAG (N-ацетилглюкозамин) 190, 191, 728—730
NAM (N-ацетилмуравовая кислота) 190, 193
Оверхаузера эффект 114—117
Озозоны 452
цис-Озозовая кислота 699
Озонолиз 168
Оказки фрагменты нуклеотидов 409—411
Окисление
арахидоновой кислоты 753
в синтезе гетеродетных пептидов 153, 154
гетероциклических оснований 386, 387
гистидина 166
как метод расщепления пептидных связей 50, 51, 57
моносахаридов 454—456
нуклеиновых кислот 386, 387, 394, 395
остатков метионина 164
— цистина 163
— цистина 164
перодатное 306, 317, 454—456, 465, 468, 469
полисахаридов 454—456, 468, 469
 α -терпинена 663
углеводов 306, 454—456, 465, 468, 469
Оксазепам 648
Оксазолидин 785
Оксазолидиндионы 143
Оксазолиновый синтез 484, 485
Оксазолинолиз 38, 40
Оксазолы 38, 40, 143, 144
Оксигемоглобин 119, 120
Оксидазы 167, 673
5-Окси-2-декарбоксамидо-2-ацетилтетрациклин 731
Оксидоредуктазы 177, 675
Оксикобаламин 679—681
Окситетрациклин 731, 732
Окситоцин 126, 156—158, 263, 264
Олеаныны 700
Олеандомицин 739, 740
Оливановая кислота 728
Оливодицины 745, 746
2',5'-Олигоаденилатсинтетазы 226
2',5'-Олигоаденилаты 226
Олигонуклеотиды 304—309, 356
искусственные, применение 377—384
структура 316—319, 322—330, 332—335, 346—348
химический синтез, метод
— фосфитный 363—366
— фосфодифирный 354, 359—361
— фосфотриэфирный 354, 355, 361—364, 366
Олигорибонуклеотиды 367—370, 396
Олигосахариды 445, 446, 496—498, 720, 721
амидирование 490, 491
восстанавливающие 462—464, 490, 491, 493
гидролиз 189—193, 463—466
гликопротеинов 473, 475, 476, 498
конформации 478—480
метилирование 458, 463—465
невосстанавливающие 462, 464, 465
окисление 454—456
синтез, см. Гликозилирование
структура 189, 465, 466, 475, 476

- Омнопон 641**
 ипс-Оперон 620, 621
 Опероны, транскрипция 413—417
 Опий и препараты на его основе 639, 641
 Опленуэра метод 639, 640
 Опсин 613
 Орнитин 39, 65, 161
 Оротовая кислота 682, 689
 Ортоэферы сахаров 482, 483
 Осарсол 664
 ипс- β -Оцимен 695
- Павулон 652
 Паклобутразол 785
 Палитоксин 761, 772, 773
 Палюдрий (прогуанил) 655, 656
 Пангамат кальция 682
 Пангамовая кислота 682, 683
 Пантовая кислота 674
 D-Пантотеин 675
 Пантотен 674
 Пантотеновая кислота 674, 675
 D-Пантотенол 675
 Папаверин 639, 641
 Папаин 47, 181, 212, 219, 608
 Паратгормон (ПТГ) 242, 243, 247, 252, 253
 Паромомицин I 735
 Паули реакция 32
 Педерин 766
 Пектиновые вещества 469, 479, 494, 499—501
 Пектиновые кислоты 499
 Пектовые кислоты 499
 Пельтерины 662—664
 Пеницилинацилаза 724
 Пенициллины 723—728
 Пенициллоиновая кислота 725
 Пента-О-ацетил- α -D-глюкопираноза 481
 Пентазоцин 642
 Пентозы 446, 449, 492, 494
 Пентулозы 448
 Пепсин 47, 48, 104, 172, 177, 185
 Пептидазы 67—69, 74, 76, 185, 199—202, 246, 247, 272
 Пептидгидролазы 69
 Пептидилтрансфераза 425
 Пептидный синтез 131, 165
 блокирующие группы, см. Защитные группы
 блочный 127, 140, 151, 152, 156—159
 гетеродетных соединений 128, 153—156
 жидкофазный 147, 148
 классический в растворе 127, 138—145
 линейный 127, 159
 метод азидный 125, 139, 140
 — активированных эфиров 141, 142
 — ангидридов 140, 141, 155
 — «рН-весы» 143, 144
 — гидроксацильного включения 155, 156
 — имидазолидный 138, 155
 — карбодимидный 142, 143, 146, 155
 — карбоксиангидридный 126, 143—145, 159
 — хлорангидридный 125, 126, 139, 154, 155
 на полимерных носителях 127, 145—148, 156, 159
 полиаминокислот 126, 127, 148, 149
 полимерные реагенты 147, 148
 рацемизация 130, 138—140, 144, 145, 151
 твердофазный 127, 134, 140, 145—147, 156, 159
 ферментативный 128, 149—152
- частичный (полу- или семисинтез) 128, 151—153, 249
 циклических продуктов 128, 153
- Пептид(ы), см. также Белки, Полипептидные цепи и по названиям
 антибиотики 154—156, 285—291
 антитоксины 278
 аргининсодержащие 65
 бромциановые 33, 34, 48, 49, 64, 78
 гетеродетные 128, 153—156
 гидролиз 34, 35, 37, 38, 40, 51, 52
 гомодетные 153
 дансирование 37, 38, 161
 динитрофенилирование 37, 38, 56
 иммобилизация 55, 56, 64—66
 ионизация молекул 70—74
 карты 53, 54, 76, 118
 коннекторы 269
 конформация 82—91, 99—102, 109—117, 119, 120, 174, 175
 лизинсодержащие 64
 линейные 174, 175
 «ложные» 147
 метионинсодержащие 48, 49
 методы исследований, см. по названиям
 мозга, см. Нейропептиды
 опиоидные 261—263, 271
 оптически активные 126
 разделение 53—57
 регуляторные 291, 292, 399, 405, 414—417
 рецепторы 174, 175
 с вкусовыми качествами 292—294
 сигнальные 245—248, 271, 378
 синтезаторы 127, 146, 147
 сна (DSIP) 110, 269, 270
 тиол-дисульфидный обмен 55, 65, 75
 токсины 275—284, 770
 триптические 33, 34, 68, 69
 триптофансодержащие 49, 50
 фибриновые 235
 ФТК-производные 57, 58, 61, 65
 химическая модификация 43, 44, 111, 151, 159—175, 187
 циклические 106, 107, 109, 128, 138, 139, 148, 153, 174, 175, 276—278
 цистеинсодержащие 52, 55, 65
 цистинсодержащие 75, 76
 MCD 280
 S- и (S — S)- 153, 154, 194
- Пептидогликаны 153, 508—510, 728—730
 Пептоны 26
 Первитин 653
- Первичная структура
 бактериородопсина 607
 белков, см. также Аминокислотная последовательность
 разделение смеси пептидных фрагментов 53—56
 расщепление полипептидных цепей 41—52
 связи дисульфидные 31, 34, 55, 75, 76, 104, 105, 163, 164
 стратегия и тактика анализа 76—81
 сульфгидрильные группы 55, 74, 75, 163, 168, 172
 иммуноглобулинов 212—214
 кальмодулина 244, 245
 лизоцима 190
 нуклеиновых кислот 298—330
 паратгормона 252
 проинсулина 248
 пролактина 251, 252
 репрессоров 399
 РНКазы 192, 194, 195
 соматотропинов 251
- субъединиц АТФаз 623
 ферментов 178
- Пергидродиклопентанофанантрен 702
 Перметрин 791, 792
 Пестициды 638, 650, 778, 781—795
 Петроселиновая кислота 520
 Пивампицилин 726
 Пивмециллином 726
 Пигменты растений 694, 701
 Пилокарпин 661
 Пинены 694, 697
 Пиперацилин 726
 Пиразолат 787, 788
 Пирамидон 643
 Пиранозы 449, 450, 472, 476—478, 481, 499, 500
 Пиретрин 1 791, 792
 Пиретроиды 697, 789, 791, 792
 Пиретрум 791
 Пиридоксальный катализ 202—205
 Пиридоксаль 677
 Пиридоксаль-5'-фосфат 202—205, 677
 Пиридоксамин 677
 Пиридоксамин-5'-фосфат 677
 Пиридоксин 677
 Пириметамин 655, 656
 Пиримикарб 790
 Пировиноградная кислота 534, 672
 Пироглутаминовая кислота 58, 267
 Плазмалогены 523, 540
 Плазмиды 296, 341, 372, 373, 407, 410, 430—432, 439—442, 725
 Плазмин 231, 237
 Плазминоген 231, 237
 Плазмocyты 211
 Платифиллин 660, 661
 Плесса реактив 146
 Плодовый сахар 492
 Подолактон 720, 721
 Полиаминокислоты 126, 127, 148, 149
 Полибрен 63
 Полиизопрены 701
 Полиинозиновая кислота 405
 Полилизин 111, 112
 Полимеразы 348—352
 Полимерные носители, синтез олигонуклеотидов 364—366
 пептидный 127, 145—148, 156, 159
 Полимиксины 84, 288
 Полинуклеотидкиназы 316, 353, 370
 Полиорнитин 63
 Полипептидные цепи 27; см. также Пептидные связи, Пептиды
 взаимодействия невалентные 88—91, 93, 95, 96, 107, 111, 114
 — электростатические 63, 64, 90, 110, 111
 деградация по Эдману 57—67
 самосборка 105, 113, 122
 структура, см. также Белки
 — в кристаллах 99—102
 — β -изгибы 93, 107
 — неупорядоченная 103, 111, 112
 — сверхвторичная 96—98
 — α -спирали 93—98
 — субъединицы 33, 103, 117, 123
 — β -формы 91—93, 95, 96
 топохимическая модификация 175
 Полипренолы 701, 702
 Полипролины 95, 97
 Полисахариды 18, 444, 492—494, 498—500
 ацетоллиз 468

- Полисахариды
 бактериальные 189, 190, 469
 конформации 478—480
 метилирование 459, 468
 окисление 454—456, 468, 469
 синтез 488—490, 702
 структура 467—470
 сульфатированные 501
- Политерпены 694, 701, 702
- Полиурониды 494, 499
- Полиэтиленгликоль 147, 148, 561
- Половые гормоны, см. Гормоны половые
- Порфин 681
- Порфирины 549
- Порфироксин 671
- Порфиромидин 748
- Праймазы 408, 409
- Праймеры 407—409
- Препальбумин 99, 101
- 5 α -Прегнандиол 706
- Прегнин 706
- Прегормон 246
- Предион 646, 647
- Преднизолон 708
- Прекалликреин 231, 232, 237
- Прекоцены 721, 780
- Прелюмиродопсин 613
- Препроинсулин 246
- Препролактин 246
- Препромелиттин 279
- Препроопиомеланокортин 266, 270, 271, 507
- Препропаратгормон 246
- Претилахлор 785, 786
- Примахин 655, 656
- Проакселерин 231, 234, 237
- Провитамины 668, 670, 676, 685, 686, 701
- Прогестерон 252, 703, 706, 713, 714
- Прогуанил 655, 656
- Продинорфин 271
- Прозерин 660
- Проинсулин 247, 248, 380—382
- Прокаин 644
- Проколлаген 258, 259
- Проколлаген-пептидаза 258
- Проконвертин 233, 234, 237
- Пролактин 251, 252, 266, 267
- Пролин 28, 30, 38, 40, 42, 46, 82, 84, 85, 107, 111, 258
- Пропилотропин 247
- Промедол 642
- Промелиттин 279
- Промоторы 400—405, 412—414
- Проназа 47, 475
- Проопиомеланокортин 266, 270, 271
- Пропазин 648
- Пропанидид 646, 647
- Пропаратгормон 247
- Пропердин Р 223
- Пропионазол 794
- β -Пропиолактон 164
- Простагландины 229, 521, 642, 687, 690, 752—758
- Простациклин 753, 754, 756, 757
- Простенон 754—757, 760
- Протеин, теория 24, 25
- Протеиназы 45—47, 76, 152, 177, 181, 233, 237, 238, 272, 608, 609
- Протеинкиназы 226, 242, 244, 245
- Протект 785, 786
- Протеогликианы, см. Мукополисахариды
- Протеолиз 45—48, 212, 219, 234, 235, 260, 294, 475, 608, 609, 612, 627
- Протеолипосомы 575, 579
- Противомаларийные препараты 16, 654—656
- Протиофос 790
- Протоколлаген 259, 684
- Протоколлаген-гидроксилаза 259
- Протопорфирин 205, 206
- Протофибриллы 97, 98
- Протромбин 231, 233, 234, 237
- Проферменты 197, 199, 231, 237
- Процессинг 47, 210, 258, 271, 417—419
- Проэнкефалин 271
- Псевдопептидин 662, 663
- Псевдоуридин 303, 389
- D-Псилоза 448
- Псилоцибин 649
- Псилоцин 648, 649
- Псорален 768
- Пуберуловая кислота 667
- Пумилиотоксины 762, 763
- Пунагландины 755, 756
- Пуромицин 402, 403, 736
- Радиоавтография** 318—321, 325, 326
- Радиоактивные методы** 40, 54, 79, 160, 166, 167, 172, 239, 316—321, 325, 326, 328, 552, 553
- Рамачандрана* карты 87, 91
- Рамноза (G-дезоксиманноза) 494, 496
- Раунатин 665
- Рафинноза 497
- Рацемизация 130, 138—140, 144, 145, 151
- Реактивы (реагенты)**, см. также по названиям
- бифункциональные 168, 169
- нингидриновый 32, 35, 36, 53, 76, 146
- субстратоподобные 169—173
- фотоаффинные 172
- Реакция (и)**, см. также по названиям
- биуретовая 32
- пуромициновая 736
- «удвоения» 108, 109
- ферментативные, см. Ферментативные реакции
- цветные белков 32, 35, 36, 53, 76, 146
- Регуляторы**
- иммунитета 291, 292
- роста и развития растений 715—721
- Резерпин** 653, 665, 666
- Релиз** 786, 787
- Ренин** 272
- Рентгеноструктурный анализ** 187—192, 195, 197, 198, 200, 201, 274, 279, 281, 290, 332, 344, 536, 537, 576, 591, 594, 601, 685, 709, 723, 730, 732, 749, 771, 772
- Репликативная вилка** 407—410
- Репликация** 297, 335, 337, 338, 379, 400, 401, 405—411, 655
- Репликоны** 407, 430—433
- Репортерные группы** 160
- Репрессоры** 398, 399, 405, 415
- Рестриктазы** 297, 308—310, 315, 316, 372—375, 417, 428—432, 436
- Ретарданты** 718, 785
- Ретиналь** 606, 610, 613, 671
- Ретиновая кислота** 670, 671
- Ретинол** 669—670
- Рецептор (ы)**
- ацетилхолина 81, 103, 281, 628—631, 645, 651, 770
- гормонов 239—242, 245
- инсулина 249
- клеточных мембран 471
- лимфоцитов 209, 211, 215, 220
- морфина (опиатные) 261, 263, 641
- мускарина 628, 645
- никотина 628—631, 645, 650, 651
- норадреналина 653
- пептидов 174, 175
- стероидные 714
- Рибит** 494
- Рибиттейховые кислоты** 512
- Рибоза** 299, 306, 307, 385—387, 445, 447, 449, 492, 681
- Рибозиды и риботиды** 680, 718
- Рибонуклеозидтрифосфатаза** 412
- Рибонуклеозиды** 299, 300
- Рибонуклеопротеиды** 401—404
- Рибосомы** 245—247, 297, 401—404
- Риботимидин** 299, 300
- Рибофлавин** 672—674
- D-Рибулоза** 448
- Ридомил** 795
- Рилизинг-факторы** 266—269
- Рифамицины** 741
- Рифампицин** 741
- Рицин** 472, 761, 766
- Ришитин** 721
- РНК (рибонуклеиновые кислоты)**
- анализ последовательности 328—330
- биосинтез, см. Транскрипция
- гетерогенные ядерные 303, 307, 417, 418
- гидролиз 396
- изменение наборов 717
- «клеверный лист» 343, 344
- матричные 296, 297, 404, 416—418; см. также Трансляция
- процессинг 47, 210, 258, 271, 417—419
- расщепляющие ферменты 312—316
- редкие компоненты 303, 304
- рибосомные 296, 303, 308
- сериновые 718
- тирозиновые 718
- транспортные 296, 297, 303, 304, 308, 343—348, 404, 419—426, 718, 735, 736
- фага MS-2 308
- фосфорилирование 353
- РНКазы (рибонуклеазы)** 95, 105, 144, 154, 158, 159, 186, 187, 191, 192, 194—197, 226, 310, 312—317, 328—330, 367, 471
- РНК вируса табачной мозаики** 123
- РНК-зависимые ДНК-полимеразы** 297, 309, 328, 351
- РНК-лигаза** 317, 353, 367, 369
- РНК-полимеразы** 342, 412—417
- ДНК-зависимые 81, 121, 122, 277, 297, 351, 409, 412—417
- комплексы с промоторами ДНК 400, 405
- фотоаффинная модификация 172, 173
- РНК-содержащие вирусы** 123, 404
- гяРНК** 303, 307, 417, 418
- иРНК** 714
- мРНК** 296, 297, 404, 416—418; см. также Трансляция
- рРНК** 296, 303, 308
- тРНК** 296, 297, 303, 304, 308, 343—348, 404, 419—426, 718, 735, 736
- Родопсины** 20, 22, 557, 611—615, 671
- Ролитетрациклин** 731
- Рубихромомидин** 747
- Рубомицин** 744
- Рутин** 691
- Сайты** 372—376
- Саказучи реакция** 32, 53
- Сакситоксин** 632, 761, 771
- Самандарин** 763
- Самандарон** 763
- Санорин** 653
- Сантонины** 663, 698
- Сапоненины** 712, 713

- Сапонины 494, 496, 694, 700, 706, 712, 713
 Саркомер 254
 Саркоплазма 253
 Сахар (а), см. также Углеводы
 аминокислотные производные 469, 492, 493, 496, 498, 532
 виноградный 492
 высшие 495
 дезоксипроизводные 494
 ортоэферы 482, 483
 плодовой 492
 производство 496, 497
 структура 465, 466, 475
 терминальные 449, 463, 473, 475
 тростниковый 492
 Сахарные кислоты 495
 Сахароза 462, 492, 496, 497
Сведберга единица 403
 «Сверхгормоны» 756
 Седуксен 648
 Секретины 267, 274, 275
 Секреторный компонент 215
 Селекция клонов 209, 211, 434, 435, 440
Сенгера метод 325, 327, 328
 Серечные гликозиды 496, 702, 710—712
 Серин 29, 32, 34, 38—40, 61, 83, 84, 171, 181, 197
 Серотонин 242, 648, 649, 665
 Серратамолд 156
 Сесквитерпены 694, 697, 698, 778—781
 Сефадексы 54, 503
 Сиаловые кислоты 229, 463, 473, 493, 494, 532—534, 588
 Сигуатоксин 772
 Синактен 265
 Синалар 708
 Синтезаторы 127, 146, 147, 366
 Синтомицин 737
 BNPS-Скатол 50, 64, 76, 167
 Сквален 700
 Скипидар 693, 696, 697
 Скополамин 645, 646
 Скофофин 269
Смита расщепление углеводов 465, 468
 Совкаин 644
 Соласодин 706, 708, 713
 Солюбилизация 557, 558, 560, 561, 584, 585
 Соматические мутации 208
 Соматомедины 251
 Соматостатин 249, 251, 266—269, 437
 Соматотропины 238, 249—251, 266, 267
 Сорбит 453, 494
 D-Сорбоза 448
 Спектиномицин 735
 Спектрин 20, 22
 Спектры
 комбинационного рассеяния 111—113
 кругового дихроизма 111
 COSY и NOESY 113, 114
 спин-спиновые взаимодействия 111—117
 Спирамицины 739, 740
 Сплайсинг 416, 417
 Статины 266—269
 Стахиоза 497
 Стеариновая кислота 519, 520
 Стерины 700, 702
 Стероидные алкалоиды 706, 708, 713
 — гормоны 265, 702—709, 714
 — — механизм действия 714
 Стигмастерин 704
 Стимуляторы роста и развития растений 715, 720, 721
 Стиптитовая кислота 667
 Стрептокиназа 231, 237
 Стрептолидин 742
 Стрептомицеты 440
 Стрептомицин 496, 690, 723, 734
 Стрептонигрин 747
 Стрептотрицин 496, 723
 Стрептоцид белый и красный 679
 Стрихинин 641, 657, 658, 760, 761, 763
 Строн 785
 Строфантин 711, 712
 Стюарт-фактор 231—233, 237
 «Стэкинг»-взаимодействия 335, 346, 398
 Субстрат (ы)
 гидролитических ферментов, оптимум pH 185
 конформации 188
 концентрация 178—180, 182, 183
 лизоцима 189—191
 РНКазы 186, 187
 стерическое соответствие с ферментами 177, 188
 химотрипсина 198
 Субстратоподобные агенты 160
 Субтилизин 47, 194
 Субтилин 154
 Субъединичный состав
 антигенов гистосовместимости 218
 аспаратаминоминотрансферазы 202
 белков 33, 103, 117, 118, 123, 237, 240, 614—636
 гемоглобина 206, 207
 гликопротеиновых гормонов 252
 компонента 222, 224
 натриевого канала 632
 репрессоров 399
 рибосом 402—404
 РНК-полимераз 413
 трансдукция 614—615
 транспортных АТФаз 620—628
 холинорецептора 629—631
 цитохром-с-оксидазы 617
 Сузукациллины 602
 Сульпростон 757
 Сульфазезин 728
 Сульфогликолипиды 606
 Сульфитолиз 164
 Сульфохиновозилдиацилглицерин 532
 Супербатрахотоксин 762
 Суперспирализация 96—98, 341, 342, 410
 Т-Супрессоры 210, 211, 220
 Сустак 659
 Сфинганин 518
 Сфингозины 517, 518, 523, 531, 534, 540
 Сфинголипиды 515, 518, 531, 533, 534, 538, 539, 541, 545, 546
 Сфингомиелин 515, 531, 545, 587
 Сцилларен А 711, 712
 Табекс 650
 D-Тагатоza 448
 Тайпоксин 761
 D-Талоза 447
 Тарихатоксин 764
 Тауматины 293, 294
 Тафцин 110, 291, 292
 Тебаин 639, 641
 Тейхоевые кислоты 494, 510—512
 Теобромин 658, 659
 Теория
 адапторная биосинтеза белков 419, 420
 «биологических насосов» 598
 «динамического фармакофора» 263
 иммунитета 209
 «качания» 420
 кинетики действия ферментов 179
Митчелла 619
 пептидная 26
 пиридоксалевого катализа 202—205
 протеина 24, 25
 селекции клонов 209, 211
 «скользящих нитей» 253
 тетрауклеотидная 296
 Теофилин 658, 659
 Терминаторы 412, 413
 Терминация
 биосинтеза белков 410—413, 419, 426
 репликации 410, 411
 транскрипции 412, 413
 трансляции 419
 Термолизин 46, 47, 76
 Терпены 694—702, 720, 721
 Терпин 696
 α-Терпинен 663, 696
 Террамицин 731, 732
 Тестостероны 252, 705, 706, 714
 1,2,3,4-Тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозид 483
 2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-α-D-глюкопиранозилбромид 481, 483
 2,3,4,6-Тетра-О-ацетил-β-D-глюкопиранозилхлорид 481
 Тетрагидроканнабинолы 648, 649
 5,6,7,8-Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК) 678
 (9Z)-Тетрадеценаль 775
 (9Z)-Тетрадецилацетат 775
 Тетратерпены 694, 701
 Тетрациклины 431, 434, 663, 723, 731—733
 Тетраэтоксипропан 162
 Тетродотоксин 632, 764
 Тетрозы 446, 448
 D-Тетрулоза 448
 Техника рекомбинантных ДНК, см. Генная инженерия
 Тиамин, см. Витамин В₁
 Тиаминмонофосфат 672
 Тиамфеникол 738
 Тиенамицин 728
 Тилозин 739
 Тимидин 299, 325, 328, 360, 386, 387
 Тимидинкиназа (ТК) 211, 440
 Тимин 296, 298, 299, 384
 Тимозин 292
 Тиогактаозидацилтрансфераза 414, 415
 Тиодепсипептиды 154
 Тиоктовая кислота (липоевая), см. Витамин N
 Тиолиз 129, 130, 137, 164
 4-Тиоуриндин 303
 Тиоциметин 738
 Тирам 793
 Тиреолиберин (ТРГ) 242, 266, 267
 Тиреотропин 267
 Тирозин 30—32, 38, 50, 52, 135, 166, 167, 197, 293, 490, 501, 684, 718
 Тиролиберин 252
 Тиротропин (ТСГ) 238, 242, 252, 266, 267
 Тироцидины 287
 Тиурам-дисульфиды 782
 Тканевый (ε) активатор плазминогена 231, 237
 — гормоны 271—273
 — фактор 231, 233, 237
 — ферменты 267
 Токотриенолы 686
 α-Токоферол, см. Витамин E
 Токсины, см. также Яды
 алкалоиды 760, 761, 766, 769
 амфибий 712, 761—763

- Токсины, см. также Яды
 белки 210, 229, 275—284, 760, 761, 766
 блокирующие передачу нервного импульса
 95, 116, 117, 159, 279—284, 629, 632,
 764, 772
 ботулинический 760, 761, 766
 водорослей и морских беспозвоночных 22,
 275, 284, 632, 699, 771—773
 высших растений 766—768
 гликопротеины 761, 766
 грибов 110, 276—278, 769, 770
 дифтерийный 761
 змей 280—282, 314
 пептиды 275—284, 770
 рыб 763, 764
 членистоногих 22, 110, 278, 280, 282, 283,
 632, 765, 766
- Томатин 496
- Топоизомеразы 341
- Топохимическая модификация (трансфор-
 мация) белков и пептидов 111, 160,
 173—175
- Транзиции 385
- Транквилизаторы 648
- Трансамидаза (трансглутаминаза) 236, 237
- Трансаминирование 202—205
- Трансдукция 725
- Транскортин 714
- Транскриптазы обратные 297, 309, 328, 351
- Транскрипция 173, 297, 351—353, 400, 401,
 406, 411—419, 655, 661, 714, 743, 795
- Трансляция 226, 258, 343, 350, 351, 372,
 406, 415, 419, 420, 422—426, 714
- Транспорт веществ и ионов через мембраны
 активный 618—628
 ионные насосы 598, 606, 617, 622
 ионофоры 590—598
 каналы, модели 603, 604
 — на основе антибиотиков 598—604
 — натриевые 22, 632—634
- Трансфекция 433, 434
- Трансферазы 177, 172, 177, 202—205, 211,
 351, 352, 484, 415, 425, 471
- Трансферрин 471
- Трансформация
 клеток 433, 434
 топохимическая белков и пептидов 111,
 160, 173—175
- Трансфосфатидилирование 544
- D-Треоза 447, 476, 477
- Треонин 29, 32, 34, 38—40, 58, 61, 84, 277
- Третичная структура
 белков 32, 98—117, 168
 нуклеиновых кислот 344, 345
- Тридаименол 794
- Триаконтанол 720, 721
- Триамцинолон 708
- Триацилглицерин 516, 553, 558
- 1 α ,24,25-Тригидроксихолекальциферол 685,
 686
- Тримекаин 644
- Триметоприм 655, 656
- Тримидал 793, 794
- Триозофосфативомераза 99, 101
- Триозы 446, 447
- Трипсин 33, 34, 41—47, 76—78, 151, 152,
 177, 185, 197, 272
- Трипсиноген 41
- Триплатин 277
- Триплатинин 277
- Триптофан 28, 30, 32, 34, 49, 50, 52, 64, 76,
 77, 84, 167, 168, 197, 293, 668, 676, 717
- Тритерпены 694, 700
- Трифлуралин 787
- Трифурин 794, 795
- Трифосфаденозин 674
- Трихлорметафос-3 790
- Трихлортриазин 491
- Трихомицин 748
- Трихотечены 769
- Трихотоксины 602
- Тромбин 22, 231
- Тромбосаны 687, 752—758
- Тромбопластин 231, 232, 237
- Тромбоцитактивирующий фактор 525
- Тропан 644
- Тропин 645
- Тропоколлаген 257, 258
- Трополон 667
- Тропомоизин 255—257
- Тропонин 255—257
- Тростниковый сахар 492
- Тубокурарин, α -Тубокураринхлорид 651,
 652, 760, 761
- Туникамицин 507
- Тургорин 721
- β -Туяплицин 667
- Уабайн 711, 712
- Убихиноны 673, 692
- Углевод-белковые биополимеры 508—512
- Углеводы 444
 алкилирование 458
 ацетаты 483, 486
 ацетоллиз 468, 469
 биосинтез 445
 в полипептидных цепях 508—512
 гидролиз 468, 469, 475
 — ферментативный 465, 466, 468, 475
 гликозидные связи 460—476, 480—491,
 505, 506
 имидаты 486, 487
 как компоненты липидов 532—535
 конформации 331, 332, 476—480
 метанолиз 463, 464, 468, 469, 475
 метилирование 458
 окисление 306, 454—456, 465, 468, 469
 ортоэфир 483, 484, 489
 простые эфиры 489
 расщепление по Смитсу 465, 466
 структурный анализ 450, 461, 465—470,
 475, 476, 479
 химический синтез 480—491
- Уотсона — Крика модель 296, 297, 335—341
- Урацил 298, 299, 303, 384, 385
- Уреаза 177, 185
- Уретановые группы 129—131
- Уридин 299, 300
- Уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин
 (UDP — NAG) 728—730
- Уридиндифосфат глюкоза 445
- Уридиндифосфомуравовая кислота (UDP—
 NAM) 728, 730
- Урокиназа 231, 237
- Уроновые кислоты 463, 468, 494, 495
- Уротропин 737
- Фактор (ы)**
 актиноцитов 690
 антигеморрагический 688, 689
 антигемофильный 231, 232, 237
 антидерматитный 674
 антипеллагрический 675
 антистерильный 686
 белковые 226, 413, 414, 419, 422—426
 желтый молока 672—674
- комплемента 220—224
 кровотожения 679
 лакриматорный 751
 лимфоцитактивирующий 229
 липотропный 683
 некроза опухолей (TNF) 210, 229, 230
 противоязвенный 692
 роста 228, 670, 671, 677—679, 687, 718
 рилизинг- 266—269
 свертывания крови 230—238
 термолabileный 176
 тимические 292
 тканевый 231, 233, 237
 тромбоцитактивирующий 525
 узнавания 221
 R 725
- Фаллоидин 276—278
- Фанхион 664
- Фарнезилпирофосфат 693, 697
- Фарнезол 697, 698
- Фенадон 642
- Фенамин 653
- Фенаримол 793, 794
- Фенацетин 643
- Фенвалерат 778, 792
- Фенерган 648
- Фенилаланин 28, 30, 83, 84, 107, 197
- Фенилаланинол 602
- α -Фенил- β -гидроксипропионовая кислота
 (троповая) 645
- Фенилтиогидантоины (ФТГ) 57—62
- Фенобарбитал 647, 648
- Феноксиметилпенициллин 724, 725
- Феноксиуксусная кислота 724
- Фентанил 642
- Ферментативная кинетика 178—185
- Ферментативные реакции, см. также Фер-
 менты
 гидролиз, см. Ферментативный гидролиз
 кинетика 178—185
 протеолиз 45—48
 свертывания крови 231—234
 синтез нуклеиновых кислот 348—353
 — пенициллинов 724, 725
 — пептидный 128, 149—152
 — фосфолипидов 524, 527
 — фрагментов ДНК и РНК 370—372
 субстраты 179, 181
 трансаминирование 202—205
 фосфорилирование 370, 371, 693
 энергия активации 187, 188
- Ферментативный гидролиз, см. также Про-
 теолиз, Ферменты в синтезе белков и пеп-
 тидов 150
 ДНК и РНК 307—316, 318
 концевых аминокислотных остатков 67—
 70
 полипептидных цепей 41—48, 76
 рацематов аминокислот 85
 углеводов 465, 466, 475
 фосфолипидов 756
- Фермент (ы) 20, 177, см. также по названиям
 активаторы 184, 185
 активность 176, 177, 593
 — влияние pH и температуры 185
 — единицы 181
 — центры 160, 170—172, 181—188, 190,
 195, 197—199, 201, 203, 204, 214—218,
 229
 аллостерические 184, 185
 влияние на действие гормонов 239—245
 гликогенолиза 239, 240
 гликопротеины 471
 денатурация 185
 для определения структуры

- белков и пептидов 41—48, 67—70
 — сахаров 465, 466, 475
 для разделения рацематов аминокислот 85
 для синтеза
 — нуклеиновых кислот 348—353, 367, 368
 — пептидов 128, 149—152
 изоизомеры 310
 иммобилизованные 160
 инактивация 181, 730
 ингибиторы, см. Ингибиторы ферментов
 индукция 714
 каталитические группы 187, 188
 кинетика 177—187
 классификация 177, 178
 конформации 177, 188
 концентрация и скорость реакций 178, 179
 кооперативные эффекты 184, 185
 кофакторы, см. Коферменты
 механизм действия 188—207
 множественные формы 178
 пиридоксальные 202—205
 протеолитические 45—48
 расщепляющие ДНК 297, 309—312
 — ДНК и РНК 314—316
 — РНК 312—314
 регуляторные 184, 185
 репликации 407—411
 рестрикции 297, 308—310
 свертывания крови 231—238
 стереоспецифичность 177
 суперспирализации ДНК 341
 термофильных бактерий 185
 тканевые 267
 токсины 314
 транскрипции 297, 351
 транспортные 103, 613, 618—628
 флавиновые 671—674
 Феромоны 638, 697, 773—778
 Ферроцитохром 616
 Фетуин 471
 Фибрин 231, 234—236
 Фибриноген 231, 234, 235, 237
 Фибринолиз 231, 236, 237
 Фибринолизин 237
 Фибринопептиды 235
 Фибробласты 229
 Фиброин шелка 92, 93, 97
 Фибронектин 236, 237
 Физостигмин 660, 661
 Филиппин III 750
 Фитоалексины 697, 721
 Фитогормоны 715—721
 Фитол 698
 Фитонциды 750, 751
 Фитостерины 702
 Фитоэджизоны 721
 Фитоэджистероиды 709
 Фишера
 проекционные формулы 83, 446, 447, 449
 синтез гликозидов 480
 — глицилглицина 124
 — хлорангидридов 125, 126, 139, 154, 155
 Флавинадениндинуклеотид (FAD) 673
 Флавиномононуклеотид (FMN) 672, 673
 Флавины 672—674
 Флаван желтых цветов 691
 Флавоноиды 643
 Флексибилит 699
 Флемицины 746, 747
 Флуазифопбутил 784
 Флуометурон 788
 Флуорескамин 36, 54, 146
 Флуостигмин 660
 Флуклоридон 787, 788
 Фокса модель 603
 Фолатредуктаза 678
 Фолиевая кислота 677—679
 Фолиновая кислота 678
 Фолитропин (ФСГ) 242, 252, 266
 Формикинуренин 163
 Формилметионилпептидилпурамицин 737
 Фосфакол 660
 Фосфамид 790
 Фосфатазы 178, 185, 314
 Фосфатидилглицерин 529, 537, 544
 Фосфатидилглицероламинилглицерин 533
 Фосфатидилинозит 528, 529, 537, 554, 577, 587
 Фосфатидилинозит-4,5-дифосфат (PIP₂) 243, 244, 528, 529, 683
 Фосфатидилинозитфосфат 528, 529
 3-*sn*-Фосфатидил-*sn*-1'-миоинозиты, см. Фосфатидилинозит
 Фосфатидилсерин 527, 537, 544, 545, 554, 577, 587, 611
 Фосфатидилхоллин 524—526, 531, 536, 537, 543—545, 554—559, 566, 576, 587, 611
 Фосфатидилэтаноламин 288, 526, 527, 537, 538, 544, 545, 554, 567, 576, 587, 611
 Фосфатидовая кислота 516, 524, 528, 529, 538, 544, 545, 554, 587
 Фосфоэстеразы (ФДЭ) 242—245, 314, 317—318, 614, 615
 Фосфоинозитиды, см. Фосфатидилинозит, его фосфат и дифосфат
 Фосфолипазы 524, 543, 544, 557
 Фосфолипиды 514, 515, 523—531
 бислои на их основе 562—569
 внутриклеточный транспорт 587—589
 гидролиз 756
 конформации 536—538
 липосомы на их основе 575—580
 монослои на их основе 550—554
 мицеллообразование 554—561, 583
 упаковка в биомембранах 554, 563
 фазовые переходы 565—568
 фоторецепторной мембраны 611
 химический синтез 540—546
 Фосфомоноэстеразы 314
 Фосфопрогены 27
 Фосфорибозилпирофосфат-аминотрансфераза 172
 Фосфорилазы 78, 253
 Фосфорилирование
 в синтезе липидов 540, 541, 543—545
 ДНК и РНК 353
 как биоспецифическая модификация белков 160
 нуклеозидов 354—366
 ферментативное олигонуклеотидов 370, 371, 693
 фосфатидилинозита 528, 529
 Фотоаффинная модификация белков 172, 173
 Фотоокисление 164, 166
 Фотосинтез «бесхлорофильный» 606
 Фруктаны 501
 Фруктоза 444, 445, 448, 449, 452, 453, 467, 492, 496, 498, 501
 Фторотан 646, 647
 Фузидиевая кислота 740, 741
 Фузикоцин 720, 721
 Фукоза (G-дезоксигалактоза) 449, 473, 475, 487, 494, 505, 533
 α-Фукозидаза 466
 Фунгициды 782, 793—795
 Фурагин 664
 Фуразолидон 664
 Фуранозы 306, 449, 450, 459
 Фурациллин 664
 6-(2-фурфурилметиламино)-пурин 718
 Фюзилад 784
 Хагемана фактор 231, 232, 234, 237
 Хаотропные вещества 585
 Хелатирующие агенты 104, 105
 Хеликазы 408, 409
 Т-Хелперы 210, 220, 229
 Хельфериха метод 483
 Хеурса формулы 449, 476
 Химиотерапия 656
 Химическая модификация
 антибиотиков 725
 белков и пептидов 43, 44, 111, 151, 159—175, 187
 биоспецифическая 160, 169—173, 187
 бифункциональными реагентами 160, 168, 169
 введением меток 37, 40, 117, 160
 ДНК 322, 323, 325, 326
 каталитических групп в ферментах 187
 ковалентным присоединением белков к полимерам 160
 направленным мутагенезом 160
 нуклеиновых кислот 384—397
 посттрансляционная 32
 селективная 43, 44, 160—168, 170, 171
 топомимическая 111, 160, 173—175
 фотоаффинная 172, 173
 химические метки 40, 117, 160, 316, 317, 466
 Химотрипсин 42, 43, 45—47, 149, 150, 169—171, 177, 181, 187, 197—200
 Химотрипсиноген 197
 Хингамин 655, 656
 Хинидин 654, 655
 Хинин 294, 654—656
 Хиниофон 664
 Хиновоза 494
 Хинокитол 667
 Хиноформ 664
 Хиноид 655, 656
 Хитин 478, 479, 493, 501, 502
 Хитобиоза 475
 Хлорамфеникол 723, 737, 738
 Хлордиазепоксид 648
 Хлоридин 655, 656
 Хлорин 683
 4-Хлор-3-индолилуксусная кислота 716, 717
 Хлорекват 718
 Хлоромидетин 663
 Хлорофиллы 681, 698, 787, 788
 Хлорофос 790
 Хлорохин 655, 656
 N-(2-Хлорпиридил-4)-N-фенилмочевина 787
 Хлортетрацилин 731—733
 Хлорхалинхлорид (хлорекват) 718
 3-[(3-Холамидопропил)диметиламмоний]-пропансульфонат (ЧАПС) 104, 561
 Холат натрия 561
 Холевая кислота 710
 Холекальциферол 685
 Холестерин 514, 549, 558, 559, 702—704
 Холецистокинин-панкреозимин (ХЦК-ПЗ) 274, 275
 Холин 523, 524, 692
 Холинорецепторы 81, 103, 281, 628—631, 645, 650, 651, 770
 Холинхлорид (ССС) 683
 Холинэстераза 645, 660
 Хондритинсульфаты 493, 494, 502, 510, 511

- Хонцля — Рудингера модификация 139
 Хризантемовая кислота 791, 792
 Хроматин 400, 401, 411, 416, 417
 Хроматография 36
 аффинная 56, 58, 160, 471, 472
 биоспецифическая 160
 высокоэффективная жидкостная обра-
 щенная 38, 39, 41, 54—56, 463
 газожидкостная 59, 463, 464
 двумерная 318—322
 ионообменная 53, 54, 463, 467
 ковалентная 55
 на бумаге 53, 58, 463
 распределительная 463
 тонкослойная 37, 38, 58, 61, 463
 хемоспецифическая 55
 эксклюзионная 54, 466, 467, 501
 Хромато-масс-спектрометрия 464, 717
 Хромодиопсины 269
 Хромомицины 745, 746
 Хромопротеины (хромопротеиды) 27
 Хромосомы 400, 401, 408—411
- Ц**
 Цвиттергенты 104
 Цвиттер-ионы 32, 71, 104, 525, 531
 Целлюлоза 479
 Целлюлоза 54, 478, 479, 499
 Церамиды 517, 518, 531, 533, 534, 538, 545,
 546
 Цереброзиды 496, 515, 533, 538
 Цереброновая кислота 522
 Церулоплазмин 471
 Цефазолин 727, 728
 Цефаклор 727, 728
 Цефакситин 727, 728
 Цефалоспорины 724, 727, 728
 Цефамицины 727, 728
 Цефацетрил 727, 728
 Цианиды 52, 164, 451, 483, 541
 Цианкобаламин, см. Витамин В₁₂
 Цигалотрин 792
 Цикламет натрия 292, 293
 Цикло-аденозин-3',5'-монофосфат 240—242
 Циклобрадикинины 273
 Циклодекадепептиды 591
 Циклооксигеназа 759, 760
 Циклоолигомеризация 108
 Циклопентанопергидрофенатрен 704
 Циклопептиды 106, 107, 109, 128, 139, 148,
 153, 174, 175, 276—278
 Циклополиэферы 597
 Циклосерин 730
 Циклоспорин А 291
 Циксотоксин 768
 Цимоксанил 795
 Циниб 793
 Цинерубин 744
 Циннамицин 154
 Цинхонидин 654, 655
- Цинхонин 654, 655
 Циперметрин 791, 792
 Цистеин 30, 31, 34, 39, 44, 52, 53, 55, 65,
 133, 135, 153, 154, 163, 164, 181
 8α-(S-L-Цистеинил)-FAD 673
 Цистеиновая кислота 76, 163
 Цистин 31, 34, 39, 164
 Цитидины 299, 300, 304, 334, 355, 389
 СТР-Цитидинтрифосфат 184, 185
 Цитидиловая кислота 301
 Цитизин 650
 Цитогемин 681
 Цитокинины 715, 718
 Цитозин 296, 298, 299, 303, 325, 326, 384,
 385, 387, 389, 390
 Цитохром(ы) класса *a*, гемы 681
 — *c* 63, 99, 100, 557, 636
 Цитохром-*c*-оксидаза (цитохромоксидаза)
 616—618
 Цитохром-*c*-редуктаза 103, 104
 Цитраль 695
 Цитреовиридин 770
 (S)-Цитронеллол 695
- Ч**
 Четвертичная структура белков 33, 117—
 123, 168
- Ш**
Шайна — Дальгарно гипотеза 423, 424
Шимониши метод 73
 Шиффовы основания 161, 204, 493
 «В-Шпилька» 93, 109, 436
- Э**
Эдмана метод 38, 57—67, 73, 74, 76
 Эггонин 643
 Эдизоны 709, 778, 779
 Эдизотропин 778, 779
 Эдистероиды 709
 Эдистерон 709, 779
 Экзогликозидазы 465, 466
 3'(5')-Экзодезоксирибонуклеазы 309
 Экзонуклеазы 311, 312, 350, 351, 417
 Экзоны 418
 Экспрессия генов и клонов 377, 382, 436—
 439
 Эластаза 47
 Эластин 260, 261
 Электронная микроскопия, анализ
 АТФаз 623
 бактериородопсина 606, 607
 белков 103, 120, 121, 123
 биологических мембран 582, 583
 рибосом 402—404
 холинорецептора 630, 631
 цитохромоксидазы 617, 618
 Электрофорез, анализ
 белков 53, 55, 76, 584
 нуклеиновых кислот 318—322
 олигосахаридов 463
 Эледоизин 151
 Электрокортин 707
 Элениум 648
Эллмана реактив 75, 163
 Элонгация 409, 411, 412, 419, 420
- Эмеримицины 602
 Эметин 663, 664
 Энантотоксин 768
 Эндо-β-N-ацетилглюкозаминидазы 475
 Эндогликозидазы 475
 Эндодезоксирибонуклеазы 309
 Эндонуклеазы 297, 308—310, 315, 316, 372—
 375, 417, 428—432, 436
 Эндорфины 261—263, 271, 406, 641
 Энапрост 754, 755, 757, 760
 Энзимология 176, 177, 207
 Энкефалины 110, 261, 263, 270, 271, 372, 641
 Энниатины 593, 594
 Энтеросептол 664
 Энхансеры 417
 Эпитопы 210, 211
 Эпопростенол 753, 754, 756, 757, 760
 Эптам 785, 786
 Эрабутоксин *b* 282
 Эргоалкалоиды 649, 760, 769
 Эргокальциферол 685
 Эргометрин 769
 Эргостерин 601, 602, 685, 704, 793
 Эрготамины 653, 769
 Эриодиктин 691
 D-Эритроза 447, 476, 477
 Эритроксилин 643
 Эритромицины 738—740
 Эритролула 448
Эрлиха реакция 32
 Эстрадиол 704, 714
 Эстран 702
 Эстриол 704
 Эстрогены 704, 705
 Эстрон 252, 704, 705
 Эструмат 757
 Этаконазол 794
 Этафос 790
 5-Этилбутанолид 776
 Этилен 646, 719, 721, 786
 Этистерон 706
 Этрел 646, 719, 721, 786
 Эфедрин 652, 653
 Эффект(ы)
 аномерный 477, 478
 гипотензивный 273
 гипохромный 335
 кооперативные 184, 185
 Δ²-Эффект 478
 Эхиномицин 290
- Ю**
 Ювабион 697, 779
 Ювенильные гормоны (ЮГ) 697, 721, 778—
 780
 Ювооцимен II 780
 Юглон 732
Юнга модель 603, 604
- Я**
 Яды 272, 314, 316—318, 629, 699, 760—764,
 см. также Токсины
 ЯМР-спектроскопия 113—117, 461, 469,
 470, 536, 537, 539
 Ятрен 664

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	4	Химический синтез и химическая модификация белков и пептидов	124
Введение	8	Химический синтез пептидов и белков	—
Предмет биоорганической химии	11	<i>Исторический очерк</i>	—
		Защитные группы, используемые в пептидном синтезе	128
		NH ₂ -Защитные группировки	—
		COOH-Защитные группировки	131
		Защитные группировки для функциональных групп боковых цепей аминокислот	133
		Методы создания пептидной связи	138
		Хлорангидридный метод	139
		Азидный метод	—
		Метод ангидридов	140
		Метод активированных эфиров	141
		Карбодиимидный метод	142
		Карбоксиангидридный метод	143
		Синтез на полимерном носителе	145
		Синтез полиаминокислот	148
		Ферментативный синтез пептидов и белков	149
		Полусинтез пептидов и белков	151
		Синтез циклопептидов	153
		Синтез гетеродетных пептидов	—
		(S—S)-Пептиды	—
		S-Пептиды	154
		Депсипептиды	—
		Примеры синтеза пептидов и белков	156
		Химическая модификация белков и пептидов	159
		Селективная модификация аминокислотных остатков	160
		Бифункциональные реагенты	168
		Биоспецифическая модификация белков	169
		Топохимические трансформации пептидных систем	173
		Биологическая роль белков	176
		Ферменты	—
		<i>Исторический очерк</i>	—
		Общая характеристика ферментов	177
		Классификация ферментов	—
		Принципы ферментативной кинетики	178
		Единицы активности ферментов	181
		Ингибиторы ферментов	—
		Активаторы ферментов	184
		Кооперативные эффекты и регуляторные ферменты	—
		Влияние pH на активность ферментов	185
БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ			
Биологические функции белково-пептидных веществ	20		
<i>Исторический очерк</i>	24		
Строение белков и пептидов	27		
Аминокислоты	—		
Первичная структура белков и пептидов	33		
Определение аминокислотного состава	34		
Анализ N- и C-аминокислотных остатков	37		
Фрагментация полипептидной цепи	41		
Ферментативные методы гидролиза	—		
Химические методы расщепления	48		
Выбор рациональной схемы разделения пептидов	53		
Определение аминокислотной последовательности	57		
Метод Эдмана	—		
Автоматическое определение аминокислотной последовательности	62		
Ферментативные методы	67		
Масс-спектрометрический метод	70		
Анализ расположения сульфгидрильных групп и дисульфидных связей	74		
Стратегия и тактика исследования первичной структуры белков	76		
Пространственное строение белков и пептидов	82		
Стереохимия аминокислот	—		
Пептидная связь	85		
Невалентные взаимодействия в пептидной цепи	88		
Вторичная структура белков	91		
Сверхвторичная структура	96		
Третичная структура белков	98		
Денатурация и ренатурация белков	103		
Пространственная структура пептидов	106		
Методы исследования пространственного строения белков и пептидов в растворе	111		
Четвертичная структура белков	117		

Влияние температуры на активность ферментов	185
Активный центр	186
Причины высокой каталитической активности ферментов	187
Механизм действия ферментов	188
Лизоцим	—
Рибонуклеаза	191
Химотрипсин	197
Карбоксипептидаза А	199
Аспаратаминотрансфераза	202
Миоглобин и гемоглобин	205
Защитные белки	208
Белки иммунной системы	—
<i>Исторический очерк</i>	—
Клетки иммунной системы	209
Структура и функция антител	211
Антигены тканевой совместимости	218
Система комплемента	220
Медиаторы иммунного ответа	224
Интерфероны	—
Лимфокины и монокины	226
Фактор некроза опухолей (TNF)	229
Белки систем свертывания крови и фибринолиза	230
Белки — гормоны	238
<i>Исторический очерк</i>	—
Механизм действия пептидно-белковых гормонов	239
Взаимодействие гормонов с рецепторами	—
Структура и свойства аденилатциклазной системы	—
Биосинтез гормонов	245
Отдельные представители белковых гормонов	247
Инсулин	—
Соматотропин	249
Пролактин	251
Гликопротеиновые гормоны аденогипофиза	252
Паратгормон	—
Белки мышц и соединительных тканей	253
Структура мышц	—
<i>Исторический очерк</i>	—
Коллаген	257
Биологическая роль пептидов	261
Нейропептиды и пептидные гормоны	—
Нейропептиды	—
Энкефалины и эндорфины	—
Окситоцин и вазопрессин	263
Адренокортикотропный гормон	265
Меланоцитстимулирующие гормоны	—
Либерины и статины	266
Вещество Р	269

Пептиды-коннекторы	269
Пептиды, действующие на сон	—
Липотропины	271
Пептидные гормоны	—
Тканевые гормоны	—
Кальцитонин	273
Глюкагон	274
Гормоны желудочно-кишечного тракта	—
Пептидные токсины	275
Пептиды из бледной поганки	276
Пептидные токсины из яда пчел	278
Нейротоксины из яда змей и скорпионов	280
Пептидные токсины морских беспозвоночных	284
Пептидные антибиотики	285
Грамицидин S	—
Бацитрацины	287
Полимиксины	288
Актиномицины	289
Эхиномицин	290
Пептиды — регуляторы иммунитета	291
Пептиды с вкусовыми качествами	292

НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ 295

Исторический очерк 296

Строение нуклеиновых кислот 298

Первичная структура нуклеиновых кислот —

Нуклеозиды 299

Нуклеотиды 301

Редкие (минорные) компоненты нуклеиновых кислот 302

Олиго- и полинуклеотиды 304

Определение первичной структуры 307

Ферменты, расщепляющие ДНК 309

Ферменты, расщепляющие РНК 312

Ферменты, расщепляющие ДНК и РНК 314

Определение строения олигонуклеотидов 316

Современные методы определения последовательности фрагментов нуклеиновых кислот 319

Пространственная структура нуклеиновых кислот 330

Конформации компонентов нуклеиновых кислот 331

Углеводные компоненты —

Нуклеозиды и нуклеотиды 332

Взаимное расположение углеводных остатков и гетероциклических оснований 333

Конформации нуклеиновых кислот 335

Двуспиральные полинуклеотиды —

Циклические ДНК и суперспирализация 341

Разрушение и восстановление двуспиральных структур. Денатурация, ренатурация и гибридизация	342	Реакции с карбонильными соединениями	394
Конформации одноцепочечных нуклеиновых кислот	343	Окисление	—
Конформация тРНК	—	Расщепление N-гликозидных связей	395
Синтез нуклеиновых кислот	348	Расщепление фосфоэфирных связей	—
Ферменты биосинтеза нуклеиновых кислот	—	Нуклеопротеиды	397
ДНК-полимеразы	—	Структура нуклеопротеидных комплексов	398
ДНК-полимераза бактериофага Т4	351	Комплексы репрессоров с операторами	399
РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза)	—	Хроматин. Нуклеосомы	400
ДНК-зависимые РНК-полимеразы	—	Рибосомы	401
Концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (терминальная трансфераза)	—	Вирусы и другие нуклеопротеиды	404
ДНК- и РНК-лигазы	352	Проблемы нуклеиново-белкового узнавания	405
Химический синтез олигонуклеотидов	354	Процессы с участием нуклеиновых кислот: репликация, транскрипция и трансляция	406
N-, O-Защитные группы	—	Репликация	—
Фосфорилирование нуклеозидов	355	Репликация хромосомы <i>E. coli</i>	408
Фосфодиэфирный метод синтеза олигонуклеотидов	359	Репликация ДНК бактериофагов и плазмид	410
Фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов	361	Репликация в эукариотических клетках	—
Фосфитный метод	363	Транскрипция	411
Синтез на полимерных носителях	365	Транскрипция в бактериальных клетках	413
Синтез полирибонуклеотидов	367	Транскрипция в клетках эукариот	416
Ферментативный синтез олигорибонуклеотидов	—	Процессинг РНК	417
Химический синтез олигорибонуклеотидов	368	Трансляция	419
Химико-ферментативный синтез фрагментов ДНК	370	Активация аминокислот: тРНК и аминоацил-тРНК-синтетазы	421
Клонирование синтетических полидезоксирибонуклеотидов	372	Белковые факторы, участвующие в трансляции	422
Использование синтетических олиго- и полинуклеотидов в биоорганической химии и биотехнологии	377	Инициация трансляции	423
Химическая модификация нуклеиновых кислот	384	Стадия элонгации	425
Модификация гетероциклических оснований	—	Терминация	426
Реакции пиримидиновых оснований с бисульфитом натрия	—	Генная инженерия	—
Реакции с гидразином и гидроксиламином	385	Способы соединения фрагментов ДНК, используемые в генной инженерии	428
Окисление	386	Векторы, используемые в <i>E. coli</i> ,— плазмиды и бактериофаги	430
Галогенирование	387	Трансформация, трансфекция, клонирование и селекция	433
Меркурирование	—	Получение ДНК для клонирования	435
Алкилирование	388	Идентификация клонов	436
Реакции с карбодимидом	389	Проблемы экспрессии чужеродных генов	—
Ацилирование	—	Идентификация экспрессирующих рекомбинантных клонов	439
Реакции с альдегидами	—	Клонирование в различных организмах	—
Взаимодействие с азотистой кислотой	390	Клонирование в грамположительных бактериях	440
Модификация углеводных остатков	391	Клонирование в дрожжах	440
Ацилирование	—	Клонирование в клетках животных	—
Алкилирование	393	Генная инженерия растений	441

УГЛЕВОДЫ	443	Отдельные классы липидов	519
<i>Исторический очерк</i>	444	Жирные кислоты	—
Строение углеводов и углеводовсодержащих биополимеров	446	Фосфолипиды	523
Первичная структура и химические свойства углеводов и углеводовсодержащих биополимеров	—	Гликолипиды	532
Моносахариды	—	Пространственная структура липидов	536
Циклические формы и таутомерия моносахаридов	449	Химический синтез липидов	540
Реакции карбонильной группы	450	БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ	547
Окисление углеводов	454	<i>Исторический очерк</i>	548
Реакции гидроксильных групп	456	Основные принципы построения мембранных липидных структур	549
Гликозиды	460	Монослой	550
Олигосахариды	462	Мицеллы	554
Полисахариды	467	Бислой	562
Гликопротеины	470	Модельные мембраны	570
Пространственное строение углеводов	476	Бимолекулярные липидные мембраны (БЛМ)	—
Конформации моносахаридов и их производных	—	Липосомы	575
Пространственная структура олиго- и полисахаридов	478	Молекулярная организация биологических мембран	580
Синтез углеводов и углеводовсодержащих биополимеров	480	Биогенез мембран	586
Синтез гликозидов	—	Транспорт через мембраны	590
Синтез олигосахаридов	481	Ионофоры	—
Синтез полисахаридов	488	Антибиотики-каналобразователи	598
Синтез неогликопротеинов	490	Характеристика отдельных биологических мембранных систем	604
Отдельные представители углеводов и углеводовсодержащих биополимеров	492	Пурпурная мембрана и бактериородопсин	605
Моносахариды	—	Зрительный родопсин	611
Гликозиды	496	Цитохром-с-оксидаза	616
Олигосахариды	—	Транспортные аденозинтрифосфатазы (АТФазы)	618
Полисахариды	498	H^+ -АТФаза	619
Гликопротеины	503	Na^+ , K^+ -Активируемая аденозинтрифосфатаза	621
Иммуноглобулины	—	Ацетилхолиновый рецептор	628
Групповые вещества крови	—	Натриевый канал	632
Муцины	504	Белки фотосинтетических реакционных центров	634
Углеводсодержащие смешанные биополимеры	508	НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ	637
ЛИПИДЫ	513	Алкалоиды	638
<i>Исторический очерк</i>	514	Группа морфина	639
Общие принципы построения липидных молекул	515	Синтетические анальгетики	642
Липиды, построенные на основе глицерина	516	Группа кокаина	643
Липиды, построенные на основе сфингозина	517	Группа атропина	644
		Группа никотина	650

Группа тубокурарина	651		
Группа эфедрина	652		
Группа хинина	654		
Группа стрихнина	657		
Группа кофеина	658		
Группа физостигмина	660		
Группа пельтьерина	662		
Группа резерпина	665		
Группа колхицина	666		
Витамины	668		
<i>Исторический очерк</i>	668		
Витамин А	669		
Витамины В	671		
Витамин С	684		
Витамины D	—		
Витамины Е	686		
Витамин F	687		
Витамин Н (биотин, биос II)	—		
Витамины К	688		
Витамин N	690		
Витамин Р	691		
Витамины Q	692		
Витамин U	—		
Терпены	693		
<i>Исторический очерк</i>	694		
Монотерпены	—		
Сесквитерпены	697		
Дитерпены	698		
Тритерпены	700		
Тетратерпены	701		
Политерпены	—		
Стероиды	702		
Половые гормоны	704		
Гормоны коры надпочечников	707		
Экдизон и гормоны насекомых	709		
Желчные кислоты	710		
Сердечные гликозиды	—		
Стероидные сапонины	712		
Стероидные алкалоиды	713		
Механизм действия стероидных гормонов	714		
Регуляторы роста и развития растений	715		
Антибиотики	722		
<i>Исторический очерк</i>	—		
Пенициллины, цефалоспорины и родственные анти- биотики	724		
		Циклосерин	730
		Тетрациклины	731
		Стрептомицин и другие аминогликозидные анти- биотики	734
		Пуромицин	736
		Хлорамфеникол	737
		Эритромицин и другие макролиды	738
		Ансамacroлиды	741
		Актиномицин D	742
		Антрациклины	744
		Оливомицины, хромомицины и aureоловая кислота	745
		Блеомицины	746
		Стрептонигрин	747
		Митомицины	748
		Полиеновые макролидные антибиотики	—
		Гризеофульвин	750
		Фитонциды	—
		Простагландины и тромбосаны. Лейко- триены	752
		Простагландины и тромбосаны	—
		<i>Исторический очерк</i>	753
		Лейкотриены	758
		Яды и токсины	760
		Яды амфибий и рыб	761
		Токсины членистоногих	765
		Токсины высших растений	766
		Микотоксины	769
		Токсины водорослей и морских беспозвоночных	771
		Феромоны и ювенильные гормоны насеко- мых	773
		Феромоны насекомых	—
		Ювенильные гормоны насекомых	778
		Пестициды	781
		<i>Исторический очерк</i>	—
		Гербициды	783
		Инсектициды	788
		Фунгициды	793
		Именной указатель	796
		Предметный указатель	797

ОВЧИННИКОВ
Юрий Анатольевич

БИООРГАНИЧЕСКАЯ
ХИМИЯ

Зав. редакцией *Т. П. Крюкова*
Редактор *Н. В. Королева*
Оформление художника *В. А. Крючкова*
Художники *С. Ф. Лухин, С. Г. Бессонов, В. Я. Сиднин,*
А. Е. Тачков, Т. Я. Демина, Н. Н. Буркова, Э. М. Фрам,
Ю. В. Мазуров, А. М. Прокофьев, О. М. Шмелев, Б. А. Гомон
Е. Е. Барк, И. А. Филиппова, П. А. Жиличкин, Е. А. Виноградова
Г. Н. Сумарокова, Т. В. Корабельникова, О. П. Коновалова,
Г. В. Либерова, В. П. Лухина, Т. Н. Дмитриева
Фотограф *Р. З. Мухаметжанов*
Художественный редактор *В. М. Прокофьев*
Составители указателей *М. Н. Ратманский, Н. Д. Ефремова*
Технические редакторы *Е. Н. Зелянина, Н. Т. Щербак*
Корректоры *М. М. Крючкова, Т. С. Крылова, Г. М. Махова*
Ответственная за выпуск *Е. Л. Борисенко*

Сдано в набор 07.01.87. Подписано к печати 29.10.87. А 07432. Формат 84×108^{1/16}
Бум. офсетная для высокохудожественной печати. Гарнит. «Таймс». Печать офсет-
ная. Усл. печ. л. 85,68+0,42 форз. Усл. кр.-отт. 508,2. Уч.-изд. л. 71,48+0,61 форз
Тираж 10 500 экз. Заказ 5094. Цена 9 р. 10 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Просвещение» Государственного
комитета РСФСР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли. 129846,
Москва, 3-й проезд Марьиной рощи, 41.

Ордена Трудового Красного Знамени ПО «Детская книга» Росглавполиграфпрома
Государственного комитета РСФСР по делам издательства, полиграфии и книжной
торговли. 127018, Москва, Сушевский вал, 49.