

**Материалы по курсу ХОБП**  
**для студентов химического факультета МГУ**

**Авторы:**  
**ХПС – Свитанько Андрей**  
**Энзимология – Швыдкий Никита**

**Главный редактор:**  
**Свитанько Андрей**

**2011 г.**

# І Часть

## ХПС

### Лекция 1. Что такое жизнь с точки зрения химика.

#### 1. Многообразие и систематика – бла бла бла...

#### 2. Строение клеток – Основные характеристики клетки:

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

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

#### 3. Биологические полимеры - три основных типа –

а) Белки - высокомолекулярные соединения, построенные из полипептидных цепей (мономером которых являются  $\alpha$ - $\beta$ -аминокислоты).

##### Функции белков:

- 1) Транспортная (например, перенос вещества через биологические мембраны);
- 2) Каталитическая (связана со специальными биологическими катализаторами – ферментами, ускоряющими либо замедляющими биохимические реакции в клетках);
- 3) Защитная (как механическая защита биологических мембран, так и защита иммунная (в ответ на внедрение в организм чужеродных белков (антигенов) вырабатываются антитела, обеспечивающие иммунологическую защиту));
- 4) Структурная (образование биологических мембран, соединительной ткани).
- 5) Двигательная (специальные сократительные белки участвуют во всех видах движения клеток и организма).
- б) Сигнальная (многие белки являются рецепторами, воспринимающими импульсы, приходящие от других клеток).
- 7) Энергетическая – при расщеплении 1 г белка выделяется 17.6 кДж.
- 8) Гормональная или рецепторная – белки входят в состав многих гормонов, принимают участие в регуляции жизненных процессов.

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

##### Функции нуклеиновых кислот:

- 1) Химическая основа хромосомного генетического материала (гена).
- 2) Активное хранение генетической информации (ДНК).
- 3) Организация передачи генетической информации (ДНК и РНК).
- 4) Синтез полипептидных цепей белка (РНК).
- 5) Катализ (рибозимы).

в) Полисахариды - общее название класса сложных высокомолекулярных углеводов, молекулы которых состоят из десятков, сотен или тысяч мономеров — моносахаридов.

##### Функции полисахаридов:

Полисахариды необходимы для жизнедеятельности животных и растительных организмов. Они являются одним из основных источников энергии, образующейся в результате обмена веществ организма. Они принимают участие в иммунных процессах, обеспечивают сцепление клеток в тканях, являются основной массой органического вещества в биосфере.

**4. Определение живого. Основные свойства живого** - Живые организмы отличаются от неживой природы присущими им свойствами. К характерным свойствам живых организмов относятся: единство химического состава, обмен веществ и энергии, сходство уровней организации. Для живых организмов характерны также размножение, наследственность, изменчивость, рост и развитие, раздражимость, дискретность, саморегуляция, ритмичность и др.

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

#### **6. Типы химической связи –**

Ковалентная химическая связь образуется электронами общими для двух атомов.

Ионные связи образуются в тех случаях, когда один атом отдаёт один или более электронов другому.

Водородные связи возникают в результате дипольных взаимодействий. Чаще всего они имеют место в тех молекулах, где атомы Н связаны с О, N или галогенами, особенно F.

Гидрофобные взаимодействия (гидрофобность или лиофобность) связывают неполярные (гидрофобные) части одной или разных молекул в водных растворах, характеризуя способность вещества взаимодействовать с жидкой средой.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия складываются из сил отталкивания атомов, обусловленных перекрыванием их электронных плотностей и дисперсионного взаимного притяжения.

Макроэргические связи - это ковалентные связи которые гидролизуются с выделением значительного количества энергии 30 кДж/моль и более (свободная энергия гидролиза).

Ориентационные силы действуют между полярными молекулами.

Индукционные силы действуют между полярной и неполярной молекулами, а также между полярными молекулами.

Дисперсионное межмолекулярное взаимодействие действует между неполярными молекулами.

Силы отталкивания действуют между молекулами на очень малых расстояниях, когда приходят в соприкосновение заполненные электронные плотности атомов, входящих в состав молекул.

**7. Свойства воды как растворителя для биологических макромолекул** - вода — растворитель. Полярные молекулы воды растворяют полярные молекулы других веществ. Вещества, растворимые в воде, называют гидрофильными. Вещества, не растворимые в воде, — гидрофобными; Вода - прежде всего растворитель, в среде которого протекают все элементарные акты жизнедеятельности. К тому же вода - продукт и субстрат энергетического метаболизма в живой клетке. Образно говоря, вода - это арена, на которой разыгрывается действие жизни и участник основных биохимических превращений.

## **Лекция 2. Структура и функция белка.**

### **1. Уровни организации структуры белка**

Первичная – линейная, в виде полипептидной цепочки, последовательность аминокислотных остатков, соединённых пептидными связями. В природных белках встречаются только L-аминокислоты.

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

2 типа вторичных структур:

$\alpha$ -спираль (полипептидная цепь сворачивается в спираль за счёт водородных связей между аминогруппой и карбонильной группой, находящейся в 4 от этой аминогруппы пептидном фрагменте).

$\beta$ -складка (две полипептидные цепи связываются друг с другом. Возможны параллельная или антипараллельная ориентации. В обоих случаях гидрофобные радикалы направлены наружу, «защищая» от воды водородные связи)

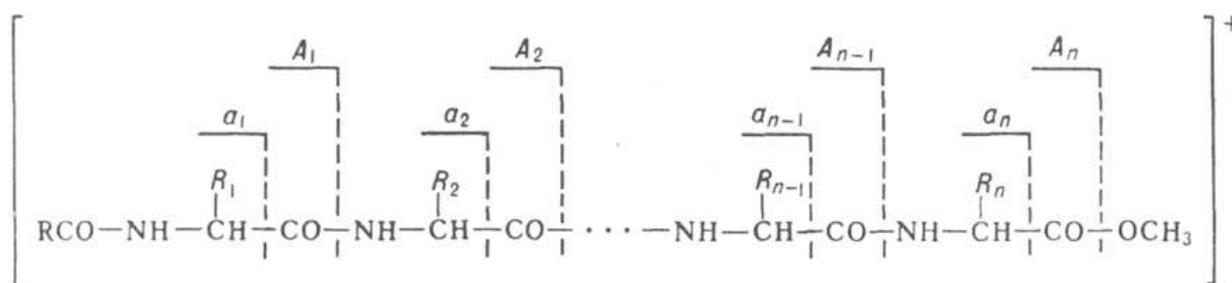
Третичная – глобулярная, за счет гидрофобных взаимодействий. Стабилизация вторичной структуры за счёт образования контактов между отдельными её частям; образуется молекула белка, внутри которой обычно находится изолированное от воды «гидрофобное ядро».

Четвертичная – объединение нескольких молекул с третичной структурой. Образование ассоциатов молекул, строение которых уникально и определяется первично структурой белка.

**2. Белок - линейный информационный полимер, обладающий полярностью...** Между соединившимися аминокислотами возникает пептидная связь, на основе которой образуется соединение – полипептид. *Ну что тут ещё сказать...*

### 3. Метод определения первичной структуры белка - масс-спектрометрия

При определении аминокислотной последовательности пептидов находит применение также масс-спектрометрия. В этом случае используется способность ионизированных молекул пептидов распадаться по так называемому аминокислотному типу фрагментации, заключающемуся в разрыве CO—NH или C $\alpha$ —CO связей:



**4. Типы вторичной структуры белка, водородная связь в полипептидной цепи – см. 1 билет этой лекции.**

**5. Третичная структура белка, конформация – см. 1 билет этой лекции + Денатурация**

Белковая молекула имеет нативную (функциональную) конформацию благодаря наличию большого числа слабых связей и быстро денатурирует при изменении условий среды, от которых эти силы зависят.

Изменение температуры, ионной силы, pH, а также обработка органическими или некоторыми дестабилизирующими агентами может привести к нарушению нативной конформации, что и называется денатурацией.

Денатурирующие вещества образуют связи с аминогруппами или карбонильными группами пептидного остова или некоторыми боковыми остатками аминокислот, подменяя собственные внутримолекулярные связи в белке, вследствие чего вторичная и третичная структуры изменяются. Эти изменения не затрагивают первичную структуру, при этом биологическая активность белка утрачивается.

### Ренативация

При определенных условиях денатурированный белок может быть ренативирован. Это происходит при удалении денатурирующего или дестабилизирующего фактора.

**6. Моделирование структуры аналогов, компьютерная симуляция – Что это? О\_о**

**7. Сложная поверхность белка, специфичность взаимодействия с другими молекулами –**

Поверхность белка это Ван-дер-ваальсова поверхность (внешняя поверхность молекулы при условии, что составляющие ее атомы представлены твердыми сферами ван-дер-

ваальсова радиуса) и поверхность одновременно доступная для растворителя (воды) (SAS, solvent accessible surface). SAS - это - поверхность области допустимых положений центров молекул воды

#### Взаимодействие белков с лигандами

Основным свойством белка, обеспечивающим его функцию, является избирательное взаимодействие с определенным веществом - лигандом.

Лигандами могут быть вещества разной природы, как низкомолекулярные соединения, так и макромолекулы, в том числе и белки. На белковых молекулах есть участки, к которым присоединяется лиганд - центры связывания или активные центры. Центры связывания формируются из аминокислотных остатков, сближенных в результате формирования вторичной и третичной структуры.

Связи между белком и лигандом могут быть нековалентными и ковалентными. Высокая специфичность взаимодействия («узнавания») белка и лиганда обеспечивается комплементарностью структуры центра связывания пространственной структуре лиганда. Под комплементарностью понимают химическое и пространственное соответствие активного центра белка и лиганда. Взаимодействие между белком P и лигандом L описывается уравнением:

белок + лиганд ↔ белково-лигандный комплекс.

**8. Четвертичная структура белка** – Под четвертичной структурой подразумевают способ укладки в пространстве отдельных полипептидных цепей, обладающих одинаковой (или разной) первичной, вторичной или третичной структурой, и формирование единого в структурном и функциональном отношениях макромолекулярного образования. Четвертичная структура имеется, например, у гемоглобина. *Тут больше нечего сказать...*

**9. Супрамолекулярные комплексы** - Простейший пример супрамолекулярных структур – это комплексы типа «хозяин-гость». Хозяином (рецептором) обычно выступает большая органическая молекула с полостью в центре, а гостем – более простая молекула или ион. Для супрамолекулярных структур, характерны следующие свойства:

- 1) наличие не одного, а нескольких связывающих центров у хозяина.
- 2) *Комплементарность*: геометрические структуры и электронные свойства хозяина и гостя взаимно дополняют друг друга. Комплементарность позволяет хозяину осуществлять селективное связывание гостей строго определенной структуры. В супрамолекулярной химии это явление называют «*молекулярное распознавание*»
- 3) Комплексы с большим числом связей между комплементарными хозяином и гостем обладают высокой структурной организацией.

Ферменты – идеальные молекулы-хозяева. Активный центр каждого фермента устроен таким образом, что в него может попасть только то вещество (субстрат), которое соответствует ему по размерам и энергии; с другими субстратами фермент реагировать не будет. Другим примером супрамолекулярных биохимических структур служат молекулы ДНК, в которых две полинуклеотидные цепи комплементарно связаны друг с другом посредством множества водородных связей. Каждая цепь является одновременно и гостем, и хозяином для другой цепи.

Основные типы нековалентных взаимодействий, формирующих супрамолекулярные структуры: ионные, ион-дипольные, ван-дер-ваальсовы, гидрофобные взаимодействия и водородные связи.

**10. Функции белков** – это уже было...

- 1) Транспортная (например, перенос вещества через биологические мембраны);
- 2) Каталитическая (связана со специальными биологическими катализаторами – ферментами, ускоряющими либо замедляющими биохимические реакции в клетках);
- 3) Защитная (как механическая защита биологических мембран, так и защита иммунная (в ответ на внедрение в организм чужеродных белков (антигенов) вырабатываются антитела, обеспечивающие иммунологическую защиту)).

- 4) Структурная (образование биологических мембран, соединительной ткани).
- 5) Двигательная (специальные сократительные белки участвуют во всех видах движения клеток и организма).
- б) Сигнальная (многие белки являются рецепторами, воспринимающими импульсы, приходящие от других клеток).
- 7) Энергетическая – при расщеплении 1 г белка выделяется 17.6 кДж.
- 8) Гормональная или рецепторная – белки входят в состав многих гормонов, принимают участие в регуляции жизненных процессов.

**11. Мутации в молекуле белка** - Мутация — это случайное изменение какого-то гена, вызванное радиационным, химическим или иным повреждением. Поскольку каждый ген управляет образованием того или иного клеточного белка или его части (а уже через эти белки — признаками организма в целом), то мутация в гене чаще всего ведёт в конечном счёте к некоторому искажению его белка — в случае так называемой микромутации, как правило, к „точечному“ искажению, попросту говоря — к замене одной определённой аминокислоты на другую. Последствия такой замены могут быть как очень вредными или даже смертельными для организма, если они затрагивают очень важное звено, либо же безвредными — нейтральными, а изредка (по счастливой случайности) даже полезными для лучшей адаптации к среде.

#### **12. Протеом - белковый портрет клетки –**

Протеом - совокупность всех белков (протеинов) и их модификаций в клетке, ткани или организме. Любые молекулярно-биологические процессы, происходящие в живых организмах, отражаются в протеоме. Протеом организма — величина не постоянная, поскольку экспрессия генов может меняться под воздействием множества факторов внешней среды, а также изменений внутри организма, связанных, например, с возрастом, болезнью или другими причинами. Количество генов человека — около сорока тысяч; количество синтезируемых организмом человека белков — около полумиллиона. Многие из этих белков могут взаимодействовать друг с другом, а также влиять на синтез других белков. Изучение протеома организмов — задача чрезвычайно сложная, требующая кооперации усилий многих ученых и исследовательских центров.

Предполагается, что расшифровка протеома поможет найти многие новые молекулярные маркеры и причины патологий человека различной природы. В настоящее время уже составлены протеомы определенных биологических жидкостей человека и лабораторных животных. Например, американские ученые составили белковую карту (протеом) человеческой слюны, идентифицировав более тысячи белков, содержащихся в секрете больших слюнных желез представителей разных этнических групп, различного пола и возраста. Полученные результаты сравнивались с данными о белках, присутствующих в крови и слезной жидкости. В человеческой слюне были обнаружены белки, являющиеся маркерами болезней Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона; рака толстой кишки, поджелудочной железы и молочной железы; а также диабета. Как полагают исследователи, результаты их работы позволят существенно расширить список заболеваний, диагностируемых по белковому составу слюны.

### **Лекция 3. Биологические мембраны, обмен веществом.**

#### **1. Биологические мембраны. Определение, строение и свойства –**

Биологические мембраны - сложные высокоорганизованные надмолекулярные структуры, ограничивающие клетки (клеточные, или плазматические, мембраны) и внутриклеточные органоиды-митохондрии, хлоропласты, лизосомы и др.

Строение: Представляют собой пленки толщиной 5-10 нм, состоящие гл. обр. из белков и липидов. Отношение липиды: белки (по массе) колеблется от 4:1 (мембрана миелина) до 1:3 (внутр. мембрана митохондрий). Мембраны биологические содержат также углеводы (до 10% от сухого в-ва по массе), к-рые, как правило, входят в состав гликопротеинов и

гликолипидов. В нек-рых специали-зир. мембранах биологических в заметных кол-вах могут присутствовать также хиноны (напр., убихиноны), каротиноиды, ретиноиды (ретинол, ретиналь и др.), токоферолы, долихолы (содержат 16-20 пренильных остатков, из которых концевой, несущий группу ОН, полностью насыщен) и порфирины. Около 20% всей массы мембраны составляет прочно связанная вода. С мембранами связываются также катионы, преимущественно  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , входящие в хелатные комплексы.

Свойства: Все клеточные мембраны представляют собой подвижные текучие структуры, поскольку молекулы липидов и белков не связаны между собой ковалентными связями и способны достаточно быстро перемещаться в плоскости мембраны. Благодаря этому мембраны могут изменять свою конфигурацию, т. е. обладают текучестью.

Мембраны — структуры очень динамичные. Они быстро восстанавливаются после повреждения, а также растягиваются и сжимаются при клеточных движениях.

Мембраны разных типов клеток существенно различаются как по химическому составу, так и по относительному содержанию в них белков, гликопротеинов, липидов, а следовательно, и по характеру имеющихся в них рецепторов. Каждый тип клеток поэтому характеризуется индивидуальностью, которая определяется в основном *гликопротеинами*. Разветвленные цепи гликопротеинов, выступающие из клеточной мембраны, участвуют в *распознавании факторов* внешней среды, а также во взаимном узнавании родственных клеток. Например, яйцеклетка и сперматозоид узнают друг друга по гликопротеинам клеточной поверхности, которые подходят друг к другу как отдельные элементы цельной структуры. Такое взаимное узнавание — необходимый этап, предшествующий оплодотворению.

Подобное явление наблюдается в процессе дифференцировки тканей. В этом случае сходные по строению клетки с помощью распознающих участков плазмалеммы правильно ориентируются относительно друг друга, обеспечивая тем самым их сцепление и образование тканей. С распознаванием связана и *регуляция транспорта* молекул и ионов через мембрану, а также иммунологический ответ, в котором гликопротеины играют роль антигенов. Сахара, таким образом, могут функционировать как информационные молекулы (подобно белкам и нуклеиновым кислотам). В мембранах содержатся также специфические рецепторы, переносчики электронов, преобразователи энергии, ферментные белки. Белки участвуют в обеспечении транспорта определенных молекул внутрь клетки или из нее, осуществляют структурную связь цитоскелета с клеточными мембранами или же служат в качестве рецепторов для получения и преобразования химических сигналов из окружающей среды.

Важнейшим свойством мембраны является также *избирательная проницаемость*. Это значит, что молекулы и ионы проходят через нее с различной скоростью, и чем больше размер молекул, тем меньше скорость прохождения их через мембрану. Это свойство определяет плазматическую мембрану как *осмотический барьер*. Максимальной проникающей способностью обладает вода и растворенные в ней газы; значительно медленнее проходят сквозь мембрану ионы. Диффузия воды через мембрану называется *осмосом*.

Функции биологических мембран следующие:

1. Отграничивают содержимое клетки от внешней среды и содержимое органелл от цитоплазмы.
2. Обеспечивают транспорт веществ в клетку и из нее, из цитоплазмы в органеллы и наоборот.
3. Выполняют роль рецепторов (получение и преобразование сигналов из окружающей среды, узнавание веществ клеток и т. д.).
4. Являются катализаторами (обеспечение примембранных химических процессов).
5. Участвуют в преобразовании энергии.

## **2. Липиды. Классификация, химическая структура. —**

Липиды — жирные кислоты, а также их производные, как по радикалу, так и по карбоксильной группе.

Липиды — это жироподобные органические соединения, нерастворимые в воде, но хорошо растворимые в неполярных растворителях (эфире, бензине, бензоле, хлороформе и др.). Липиды принадлежат к простейшим биологическим молекулам.

В химическом отношении большинство липидов представляет собой сложные эфиры высших карбоновых кислот и ряда спиртов. Наиболее известны среди них *жиры*. Каждая молекула жира образована молекулой трехатомного спирта глицерола и присоединенными к ней эфирными связями трех молекул высших карбоновых кислот. Согласно принятой номенклатуре, жиры называют *триацилглицеролами*.

Классификация:

Простые липиды

Примеры жирных кислот: миристиновая (насыщенная жирная кислота) и миристолеиновая (мононенасыщенная кислота) имеют 14 атомов углерода.

- Жирные кислоты
- Жирные альдегиды
- Жирные спирты
- Предельные углеводороды с длинной алифатической цепочкой
- Сфингозиновые основания

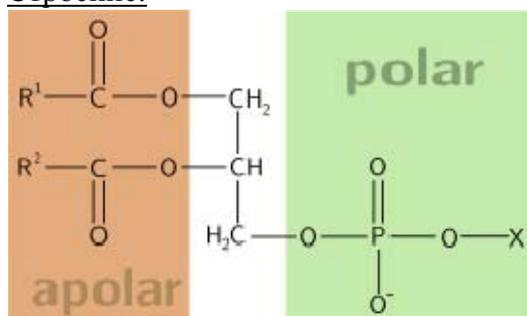
Сложные липиды

- Полярные
  - Фосфолипиды
  - Гликолипиды
  - Фосфогликолипиды
  - Сфинголипиды
  - Мышьяколипиды
- Нейтральные
  - Ацилглицериды
    - Триглицериды (Жиры)
    - Диглицериды
    - Моноглицериды
  - Воски
  - Церамиды
  - Эфиры стеринов
  - N-ацетилэтаноламиды

Оксилипиды

- Оксилипиды липоксигеназного пути
- Оксилипиды циклооксигеназного пути

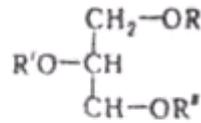
Строение:



Общее строение фосфолипидов  
Заместители  $R^1$  и  $R^2$  — остатки жирных кислот, X зависит от типа фосфолипида.

## Нейтральные липиды

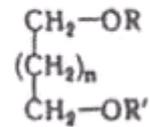
Воски  
(R, R' - алкил, алкенил)



Глицериды  
(R, R', R'' - ацил или H)

Плазмалогены  
(R-1- алкенил, R', R'' - ацилы)  
Алкилдиацилглицериды  
(R - алкил; R', R'' - ацилы)

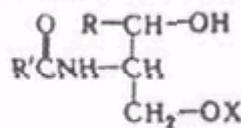
Диольные липиды  
(R, R' - ацил, алкил или алкенил,  
n = 0 - 4)



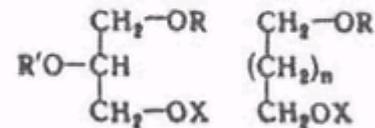
### г л и к о л и п и д ы

Г л и к о л и п и д ы  
(R, R' - ацил, алкил или алкенил)

Гликофинголипиды



Гликозилдиглицериды  
и диольные гликолипиды



Цереброзиды X - остаток нейтрального моно- или олигосахарда

Ганглиозиды X - олигосахаридная цепь, содержащая остатки сигнальных N-1

X - остаток моно- или олигосахарда,  
n = 0 - 2

**Функции липидов** следующие:

- Структурная.** Фосфолипиды вместе с белками образуют биологические мембраны. В состав мембран входят также стеролы.
- Энергетическая.** При окислении жиров высвобождается большое количество энергии, которая идет на образование АТФ. В форме липидов хранится значительная часть энергетических запасов организма, которые расходуются при недостатке питательных веществ. Животные, впадающие в спячку, и растения накапливают жиры и масла и расходуют их на поддержание процессов жизнедеятельности. Высокое содержание липидов в семенах растений обеспечивает развитие зародыша и проростка до их перехода к самостоятельному питанию. Семена многих растений (кокосовой пальмы, клещевины, подсолнечника, сои, рапса и др.) служат сырьем для получения растительного масла промышленным способом.
- Защитная и теплоизоляционная.** Накапливаясь в подкожной клетчатке и вокруг некоторых органов (почек, кишечника), жировой слой защищает организм животных и его отдельные органы от механических повреждений. Кроме того, благодаря низкой теплопроводности слой подкожного жира помогает сохранить тепло, что позволяет, например, многим животным обитать в условиях холодного климата. У китов, кроме того, он играет еще и другую роль — способствует плавучести.
- Смазывающая и водоотталкивающая.** Воск покрывает кожу, шерсть, перья, делает их более эластичными и предохраняет от влаги. Восковой налет имеют листья и плоды многих растений.
- Регуляторная.** Многие гормоны являются производными хо-лестерола, например половые (тестостерон у мужчин и прогестерон у женщин) и кортикостероиды (альдостерон). Производные хо-лестерола, витамин D играют ключевую роль в обмене кальция и фосфора. Желчные кислоты участвуют в процессах пищеварения (эмульгирование жиров) и всасывания высших карбоновых кислот.

**3. Гидрофобные взаимодействия** - сильное притяжение в воде между неполярными частицами (молекулами, остатками сложных молекул, частицами дисперсной фазы и т. п.). Причина гидрофобного взаимодействия - большая энергия водородной связи между молекулами воды, превосходящая энергию их взаимодействия с неполярными частицами. Термодинамическая невыгодность контакта воды с неполярными веществами (рассматриваемая как гидрофобность) и предопределяет сильное притяжение их молекул друг к другу.

#### **4. Липидные мицеллы, бислои, липосомы –**

##### 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. 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 заряженную полярную головку и сравнительно небольшие углеводородные цепи. 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  $10^{-4}$  —  $10^{-3}$  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.

##### Бислои:

Липидный бислой — это структура, характерная для плазматических мембран всех живых клеток. Об этом свидетельствуют данные рентгеновской дифракции и электронной микроскопии. Толщина этого слоя составляет примерно 4—5 нм в зависимости от типов присутствующих в нем жирных кислот. Неполярные хвосты липидных молекул обращены друг к другу, а полярные головки остаются снаружи бислоя, образуя внутреннюю и наружную гидрофильные поверхности. Эта модель хорошо объясняет высокое трансмембранное электрическое сопротивление.

##### Липосомы:

Липосомы — самопроизвольно образующиеся в смесях фосфолипидов с водой замкнутые пузырьки. Их стенка состоит из одного или нескольких бислоев фосфолипидов (слоев толщиной в две молекулы), в которые могут быть встроены другие вещества (например, белки). Внутри липосом содержится вода или раствор. Диаметр липосом варьирует от 20 нм (моноламеллярные везикулы, стенка состоит из одного бислоя) до 10-50 мкм (мультиламеллярные везикулы, стенка состоит из десятков или сотен бислоев).

## 5. Мембранные белки. Особенности строения. –

К **мембранным белкам** относятся белки, которые встроены в клеточную мембрану или мембрану клеточной органеллы или ассоциированы с таковой. Около 25 % всех белков являются мембранными.

Мембранные белки могут быть классифицированы по топологическому или биохимическому принципу. Топологическая классификация основана на локализации белка по отношению к липидному бислою. Биохимическая классификация основана на прочности взаимодействия белка с мембраной.

### Топологическая классификация

По отношению к мембране мембранные белки делятся на поли- и монотопические.

- *Поли- и монотопические, или трансмембранные, белки* полностью пронизывают мембрану и, таким образом, взаимодействуют с обеими сторонами липидного бислоя. Как правило, трансмембранный фрагмент белка является альфа-спиралью, состоящей из гидрофобных аминокислот (возможно от 1 до 20 таких фрагментов). Только у бактерий, а также в митохондриях и хлоропластах трансмембранные фрагменты могут быть организованы как бета-складчатая структура (от 8 до 22 поворотов полипептидной цепи).
- *Интегральные монотопические белки* постоянно встроены в липидный бислой, но соединены с мембраной только на одной стороне, не проникая на противоположную сторону.

### Биохимическая классификация

По биохимической классификации мембранные белки делятся на *интегральные* и *периферические*.

- *Интегральные мембранные белки* прочно встроены в мембрану и могут быть извлечены из липидного окружения только с помощью детергентов или неполярных растворителей. По отношению к липидному бислою интегральные белки могут быть трансмембранными поли- или монотопическими.
- *Периферические мембранные белки* являются монотопическими белками. Они либо связаны слабыми связями с липидной мембраной, либо ассоциируют с интегральными белками за счёт гидрофобных, электростатических или других нековалентных сил. Таким образом, в отличие от интегральных белков они диссоциируют от мембраны при обработке соответствующим водным раствором (например, с низким или высоким рН, с высокой концентрацией соли или под действием хаотропного агента). Эта диссоциация не требует разрушения мембраны.

Мембранные белки могут быть встроены в мембрану за счёт жирнокислотных или пренильных остатков либо гликозилфосфатидинозитола, присоединённых к белку в процессе их посттрансляционной модификации.

## 6. Мембранный транспорт

Существует несколько механизмов транспорта веществ через мембрану.

*Диффузия* — проникновение веществ через мембрану по градиенту концентрации {из области, где их концентрация выше, в область, где их концентрация ниже). Диффузный транспорт веществ (воды, ионов) осуществляется при участии белков мембраны, в которых имеются молекулярные поры, либо при участии липидной фазы (для жирорастворимых веществ).

*При облегченной диффузии* специальные мембранные белки-переносчики избирательно связываются с тем или иным ионом или молекулой и переносят их через мембрану по градиенту концентрации.

*Активный транспорт* сопряжен с затратами энергии и служит для переноса веществ против их градиента концентрации. Он осуществляется специальными белками-переносчиками, образующими так называемые *ионные насосы*. Наиболее изученным является  $\text{Na}^+/\text{K}^-$ -насос в клетках животных, активно выкачивающих ионы  $\text{Na}^+$  наружу, поглощая при этом ионы  $\text{K}^-$ . Благодаря этому в клетке поддерживается большая концентрация  $\text{K}^-$  и меньшая  $\text{Na}^+$  по сравнению с окружающей средой. На этот процесс затрачивается энергия АТФ.

В результате активного транспорта с помощью мембранного насоса в клетке происходит также регуляция концентрации  $\text{Mg}^{2-}$  и  $\text{Ca}^{2+}$ .

В процессе активного транспорта ионов в клетку через цитоплазматическую мембрану проникают различные сахара, нуклеотиды, аминокислоты.

Макромолекулы белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липопротеидные комплексы и др. сквозь клеточные мембраны не проходят, в отличие от ионов и мономеров. Транспорт макромолекул, их комплексов и частиц внутрь клетки происходит совершенно иным путем — посредством эндоцитоза. При *эндоцитозе* (*эндо...* — внутрь) определенный участок плазмалеммы захватывает и как бы обволакивает внеклеточный материал, заключая его в мембранную вакуоль, возникшую вследствие впячивания мембраны. В дальнейшем такая вакуоль соединяется с лизосомой, ферменты которой расщепляют макромолекулы до мономеров.

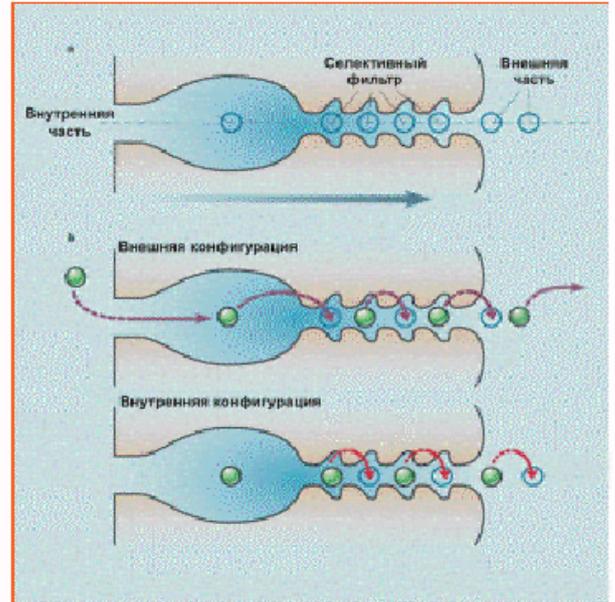
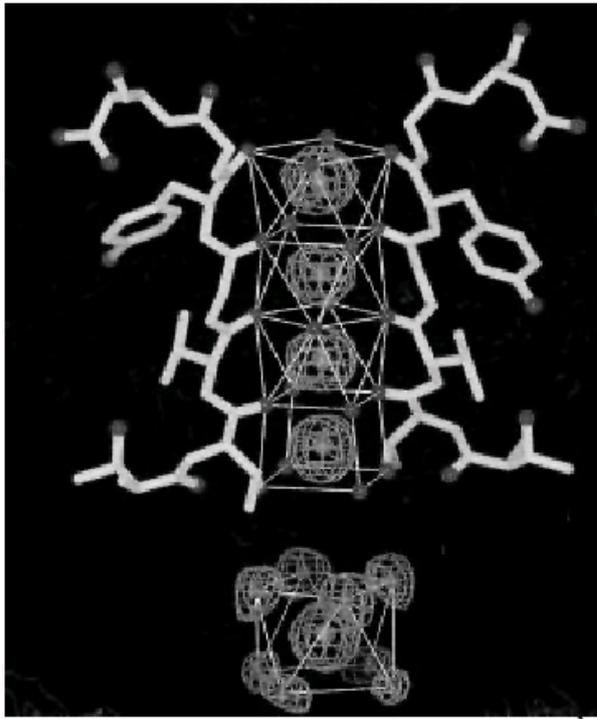
Процесс, обратный эндоцитозу, — *экзоцитоз* (*экзо...* — наружу). Благодаря ему клетка выводит внутриклеточные продукты или непереваренные остатки, заключенные в вакуоли или пузырьки. Пузырек подходит к цитоплазматической мембране, сливается с ней, а его содержимое выделяется в окружающую среду. Так выводятся пищеварительные ферменты, гормоны, гемицеллюлоза и др.

Таким образом, биологические мембраны как основные структурные элементы клетки служат не просто физическими границами, а представляют собой динамичные функциональные поверхности. На мембранах органелл осуществляются многочисленные биохимические процессы, такие как активное поглощение веществ, преобразование энергии, синтез АТФ и др.

### **7. Ионные каналы и насосы.**

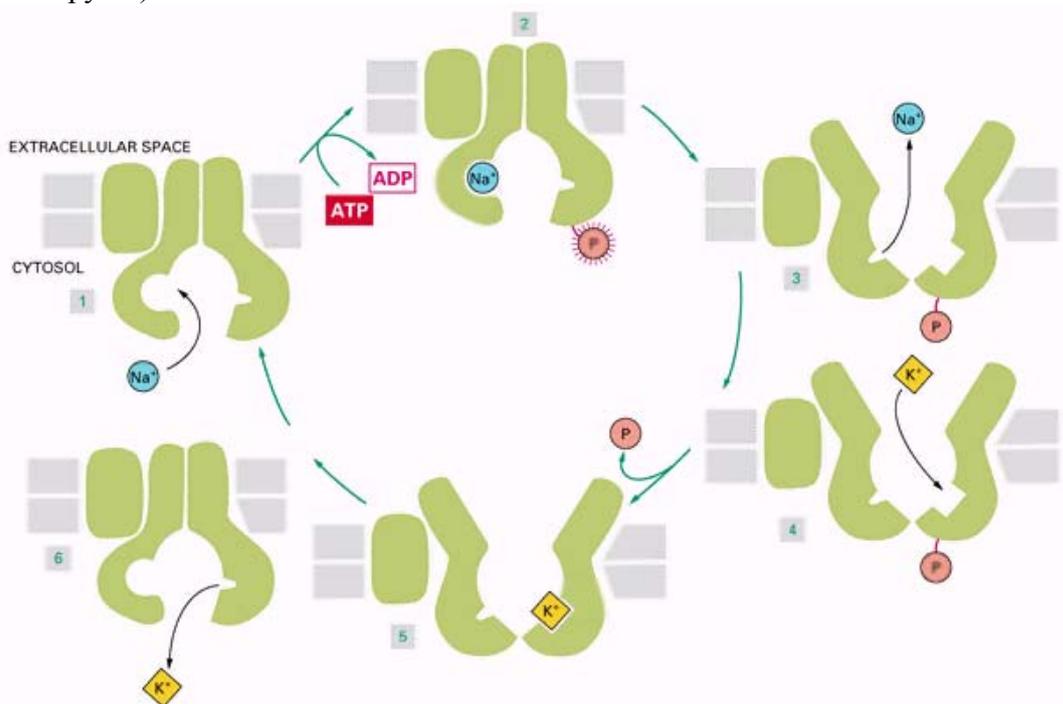
#### Калиевые каналы.

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



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

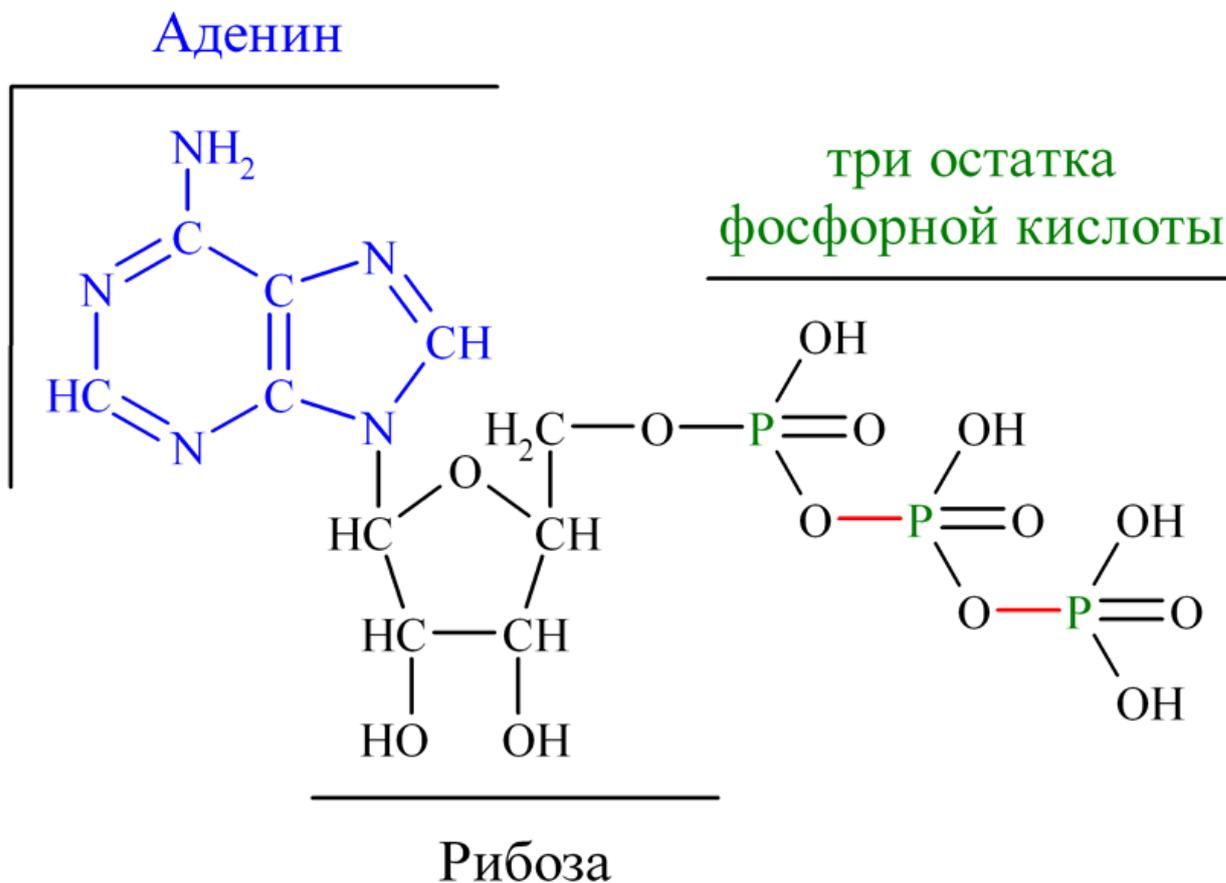
Активный транспорт ионов натрия и калия осуществляется специальным ферментом  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазой. Этот фермент состоит из двух субъединиц, каждая из которых встроена в клеточную мембрану. Между субъединицами находятся несколько полостей, положение которых зависит от конформации белка. На первом этапе работы насоса белок захватывает три иона  $\text{Na}^+$  и, за счёт энергии гидролиза АТФ, переносит полости на внешнюю сторону мембраны. Там ионы натрия освобождаются, а на их место попадают два иона  $\text{K}^+$ ; эти ионы перемещаются на внутреннюю сторону мембраны и выходят во внутреннюю среду клетки, после чего насос готов к новому циклу. Такой насос создаёт по разные стороны мембраны не только разность концентраций, но и разность зарядов, то есть электрический потенциал. Этот потенциал называется мембранным и может быть измерен, его величина составляет порядка (-50) мВ (разность между потенциалами внутри и снаружи).



## Лекция 4. Биоэнергетика.

**1. Определение биоэнергетики** - совокупность процессов преобразования энергии в биол. системах, а также раздел биологии, изучающий эти процессы. *(это хоть по нормальному звучит, остальные определения полная хрень).*

**2. АТФ, аденозинтрифосфат - универсальный реакционный модуль** - Аденозинтрифосфат (сокр. АТФ, англ. ATP) — нуклеотид, играет исключительно важную роль в обмене энергии и веществ в организмах; в первую очередь соединение известно как универсальный источник энергии для всех биохимических процессов, протекающих в живых системах. АТФ был открыт в 1929 году Карлом Ломанном, а в 1941 году Фриц Липман показал, что АТФ является основным переносчиком энергии в клетке.



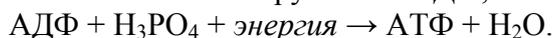
Главная роль АТФ в организме связана с обеспечением энергией многочисленных биохимических реакций. Являясь носителем двух высокоэнергетических связей, АТФ служит непосредственным источником энергии для множества энергозатратных биохимических и физиологических процессов. Все это реакции синтеза сложных веществ в организме: осуществление активного переноса молекул через биологические мембраны, в том числе и для создания трансмембранного электрического потенциала; осуществления мышечного сокращения.

Помимо энергетической, АТФ выполняет в организме ещё ряд других не менее важных функций:

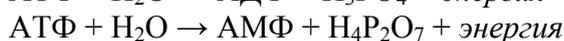
- Вместе с другими нуклеозидтрифосфатами АТФ является исходным продуктом при синтезе нуклеиновых кислот.
- Кроме того, АТФ отводится важное место в регуляции множества биохимических процессов. Являясь аллостерическим эффектором ряда ферментов, АТФ, присоединяясь к их регуляторным центрам, усиливает или подавляет их активность.

- АТФ является также непосредственным предшественником синтеза циклического аденозинмонофосфата — вторичного посредника передачи в клетку гормонального сигнала.
- Также известна роль АТФ в качестве медиатора в синапсах.

В организме АТФ синтезируется из АДФ, используя энергию окисляющихся веществ:



Гидролиз макроэргических связей молекулы АТФ, сопровождаемый отщеплением 1 или 2 остатков фосфорной кислоты, приводит к выделению, по различным данным, от 40 до 60 кДж/моль.



Высвобожденная энергия используется в разнообразных процессах, протекающих с затратой энергии.

### 3. Термодинамика биохимических реакций –

Рассчитать направление протекания реакций позволяют термодинамические уравнения. На уроках химии вы узнали, что многие самопроизвольно протекающие реакции экзотермичны, т. е. сопровождаются выделением теплоты. Практически все биохимические процессы протекают при постоянном давлении, равном атмосферному, и при постоянном объеме системы. Для проведения расчетов в таких условиях удобно воспользоваться специальной величиной – энтальпией. Изменение энтальпии в ходе реакции, обозначаемое  $\Delta H$ , равно теплоте, поглощенной системой (на самом деле,  $\Delta H = \Delta U + P \times \Delta V$ , где  $P$  – давление,  $V$  – объем,  $U$  – внутренняя энергия системы; но когда объем системы не меняется, наше утверждение справедливо). Для экзотермических процессов, в ходе которых выделяется тепло,  $\Delta H < 0$ , тогда как для эндотермических  $\Delta H > 0$ .

Возможность или невозможность самопроизвольного протекания реакции при постоянных температуре и давлении однозначно определяется изменением свободной энергии Гиббса:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

Здесь  $\Delta G$  – изменение свободной энергии Гиббса в ходе процесса,  $\Delta H$  – изменение энтальпии,  $T$  – абсолютная температура,  $\Delta S$  – изменение энтропии.

В энергообеспечении живых организмов важнейшую роль играет реакция гидролиза АТФ (подробнее о ней написано ниже):  $\text{АТФ}^{4-} + \text{H}_2\text{O} = \text{АДФ}^{2-} + \text{HPO}_4^{2-}$ .  $\Delta G$  этой реакции при 1 М концентрации всех ее участников ( $\Delta G^\circ$ ) и температуре 25 °С составляет (–34,5) кДж/моль. При этом изменение энтальпии в ходе реакции в этих условиях ( $\Delta H^\circ$ ) составит (–19,7) кДж/моль, а изменение энтропии ( $\Delta S^\circ$ ) равно 49,7 кДж/моль·град. Таким образом, в этой реакции и тепловой эффект, и увеличение беспорядка системы способствуют ее протеканию слева направо.

### 4. Фотосинтез, электрохимический потенциал и синтез АТФ –

Про синтез АТФ см. Выше.

Фотосинтез — процесс образования органических веществ из углекислого газа и воды на свету при участии фотосинтетических пигментов (хлорофилл у растений, бактериохлорофилл и бактериородопсин у бактерий).

С использованием изотопных меток показано, что источником  $\text{O}_2$  в фотосинтезе является только вода:



Фотосинтез пространственно и во времени разделяется на два сравнительно обособленных процесса: световую стадию окисления воды и темновую стадию восстановления  $\text{CO}_2$  (рис). Обе эти стадии осуществляются у высших растений и водорослей в специализир. органеллах клетки - хлоропластах. Исключение - синезеленые водоросли (цианобактерии), у к-рых нет аппарата фотосинтеза, обособленного от цитоплазматич. мембран.

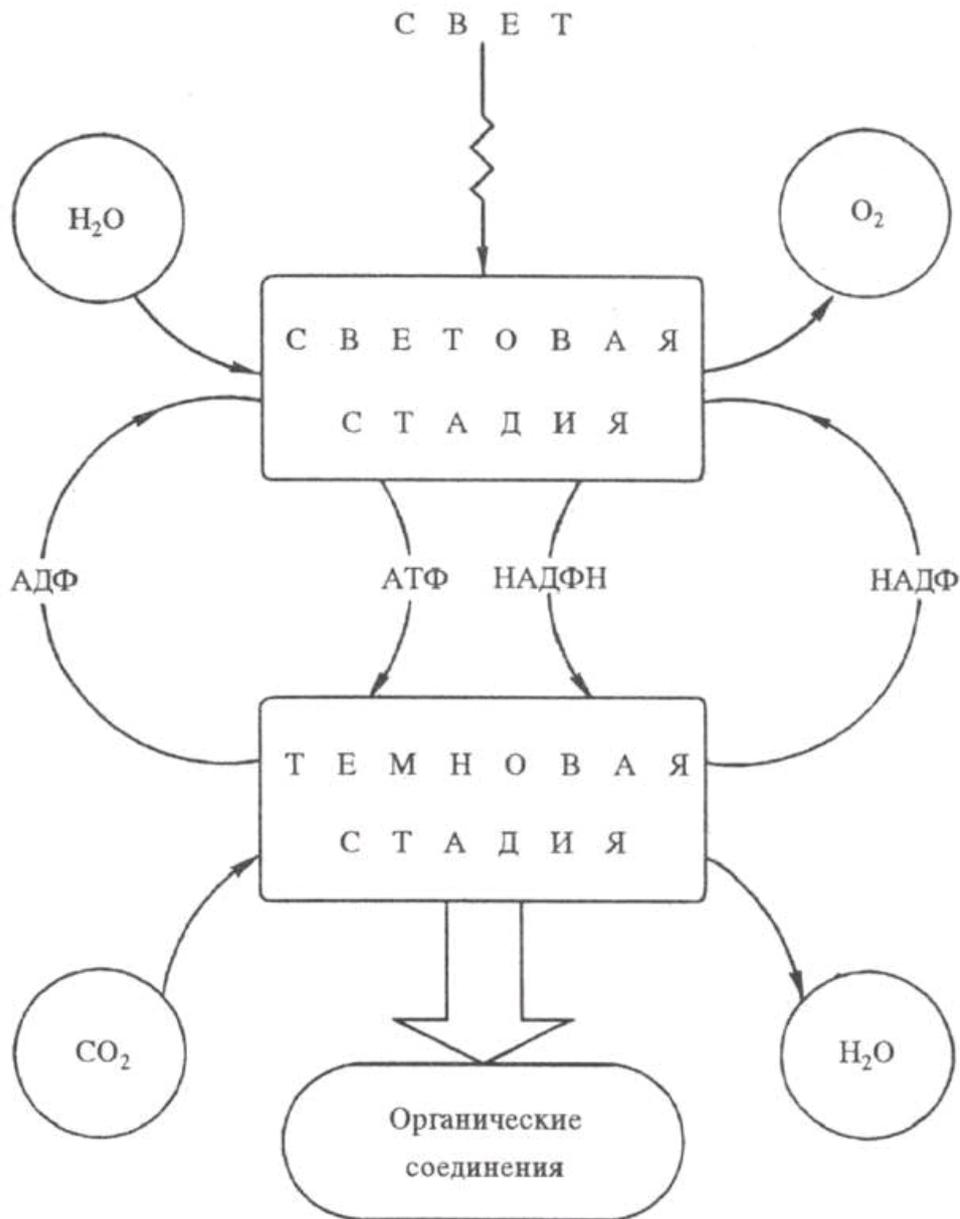


Рис. 1. Схема световой и темновой стадий фотосинтеза; АТФ и АДФ – соотв. аденозинтри- и аденозиндифосфат; НАДФ и НАДФН – соотв. окисленная и восстановленная формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

#### трансмембранный электрохимический потенциал

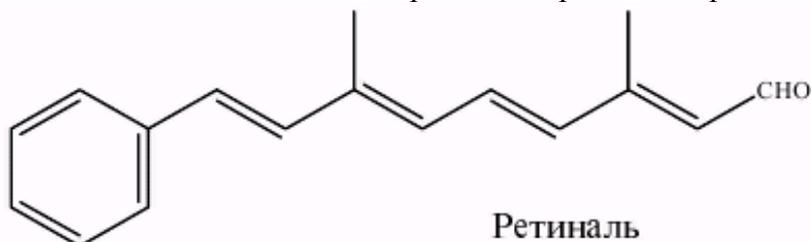
( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) – величина, определяющая разность концентрации протонов на внешней и внутренней стороне биол. мембран (внутренние мембраны митохондрий, тилакоиды хлоропластов, внутрицитоплазматические мембраны бактерий). Возникает за счет энергии, выделяемой при функционировании окислительно–восстановительных реакций дыхательной цепи или за счет поглощенных квантов света (фотосинтетическая цепь транспорта электронов). Т. э. п. может служить источником энергии для синтеза АТФ, обеспечения транспорта веществ, др. энергозависимых процессов клетки.

#### **5. Транспорт протонов и синтез АТР: Бактериородопсин как протонный насос, АТФ-синтетаза как молекулярная машина –**

##### Бактериородопсин как протонная помпа

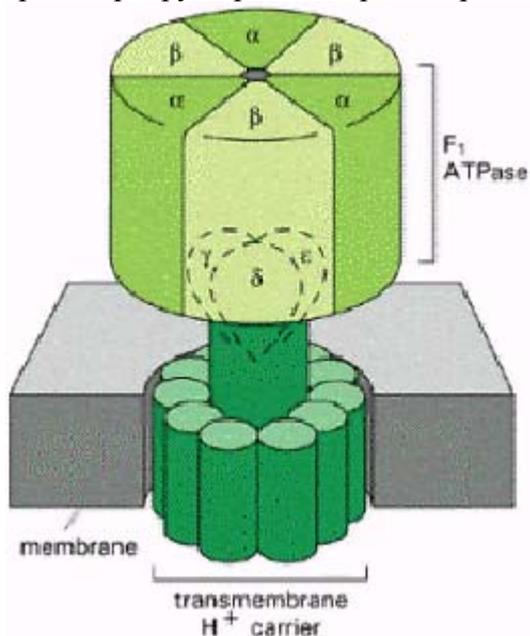
*Бактериородопсин* трансмембранный (то есть встроенный в клеточную мембрану) белок, состоящий из 7  $\alpha$ -спиралей. Обнаружен в бактериях солёных озёр. Для переноса протона необходим свет, поэтому в процессе переноса должен участвовать поглотитель света. Им является ретиналь, одна из двойных связей которого переходит в цис-конфигурацию;

ретиаль присоединяется к азоту Lys-216 с образованием енамина. Затем трёхкоординированный азот протонируется за счёт Asp-96 (находится на одной стороне мембраны) и депротонируется с переходом протона на Asp-85 (находится на другой стороне мембраны). В результате этого процесса протон переходит через мембрану в направлении градиента концентрации  $H^+$  - за счёт световой энергии создаётся разность химических потенциалов  $H^+$  по разные стороны мембраны.



#### Строение и механизм работы АТФ-синтетазы.

АТФ-синтетаза - фермент, обеспечивающий синтез АТФ из АДФ и фосфатного остатка. АТФ встроена в мембрану так называемой  $\gamma$ -субъединицей, на конце которой чередуясь располагаются 3  $\alpha$ - и 3  $\beta$ -субъединицы. Эта система имеет три активных центра, один из которых свободен, другой занимают АДФ и фосфатный остаток, третий - АТФ. Система постоянно вращается вокруг  $\gamma$ -субъединицы, в результате чего образуется АТФ. Энергия, необходимая для этого процесса, поставляется бактериородопсином, обеспечивающим ( $H^+$ ) по разные стороны мембраны. Фермент также может выступать в качестве АТФ-азы, транспортируя протоны против градиента концентрации за счёт энергии АТФ.

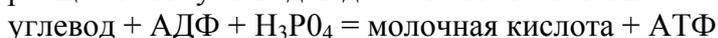


### **6. Законы биоэнергетики**

#### ПЕРВЫЙ ЗАКОН БИОЭНЕРГЕТИКИ

«Живая клетка избегает прямого использования энергии внешних ресурсов для совершения полезной работы. Она сначала превращает их в одну из трех конвертируемых форм энергии ("энергетических валют"), а именно: в АТФ,  $\Delta\mu_{H^+}$  или  $\Delta\mu_{Na^+}$ , которые затем расходуются для осуществления различных энергоёмких процессов.»

Иными словами, клетка предпочитает "денежное" обращение, а не бартер. Простейшим примером запасаения энергии в конвертируемой форме может быть гликолиз, или расщепление углеводов до молочной кислоты:



Если затем АТФ используется, например, для совершения механической работы (у животных для мышечного сокращения), то цепь событий завершается расщеплением АТФ до АДФ и  $H_3P_0_4$  сократительным белком — АТФазой (актомиозином):

$AT\Phi = AD\Phi + H_3PO_4 + \text{механическая работа}$

В целом же использование углеводов для энергообеспечения работы мышцы выразится уравнением:

углевод = молочная кислота + механическая работа.

#### ВТОРОЙ ЗАКОН БИОЭНЕРГЕТИКИ

«Любая живая клетка всегда располагает как минимум двумя "энергетическими валютами": водорастворимой (АТФ) и связанной с мембраной ( $\Delta\mu_{H^+}$  либо  $\Delta\mu_{Na^+}$ )»

У морских бактерий имеются по меньшей мере АТФ и  $\Delta\mu_{H^+}$ , но очень часто также и  $-\Delta\mu_{Na^+}$ . У пресноводных бактерий, "валютой" служат АТФ и  $\Delta\mu_{H^+}$ , что касается  $\Delta\mu_{Na^+}$ , то она, как правило, отсутствует из-за низкой концентрации  $Na^+$  в среде обитания.

#### ТРЕТИЙ ЗАКОН БИОЭНЕРГЕТИКИ

«Энергетические валюты "клетки могут превращаться одна в другую. Поэтому получения хотя бы одной из них за счет внешних ресурсов достаточно для поддержания жизнедеятельности».

Иначе говоря, не столь важно, в какой "валюте" поступит доход, если "валюта" эта конвертируемая. Взаимопревращение АТФ,  $\Delta\mu_{H^+}$  и  $\Delta\mu_{Na^+}$  осуществляется специальными ферментами. Взаимопереход  $AT\Phi \longleftrightarrow \Delta\mu_{H^+}$  катализируется  $H^+$  – АТФ-синтазой, превращение  $AT\Phi \longleftrightarrow \Delta\mu_{Na^+}$  обеспечивается  $Na^+$  – АТФ-синтазой, а равновесие  $\Delta\mu_{H^+} \longleftrightarrow \Delta\mu_{Na^+}$  осуществляется  $H^+/Na^+$  - антипортером.

### **Лекция 5. Структура нуклеиновых кислот.**

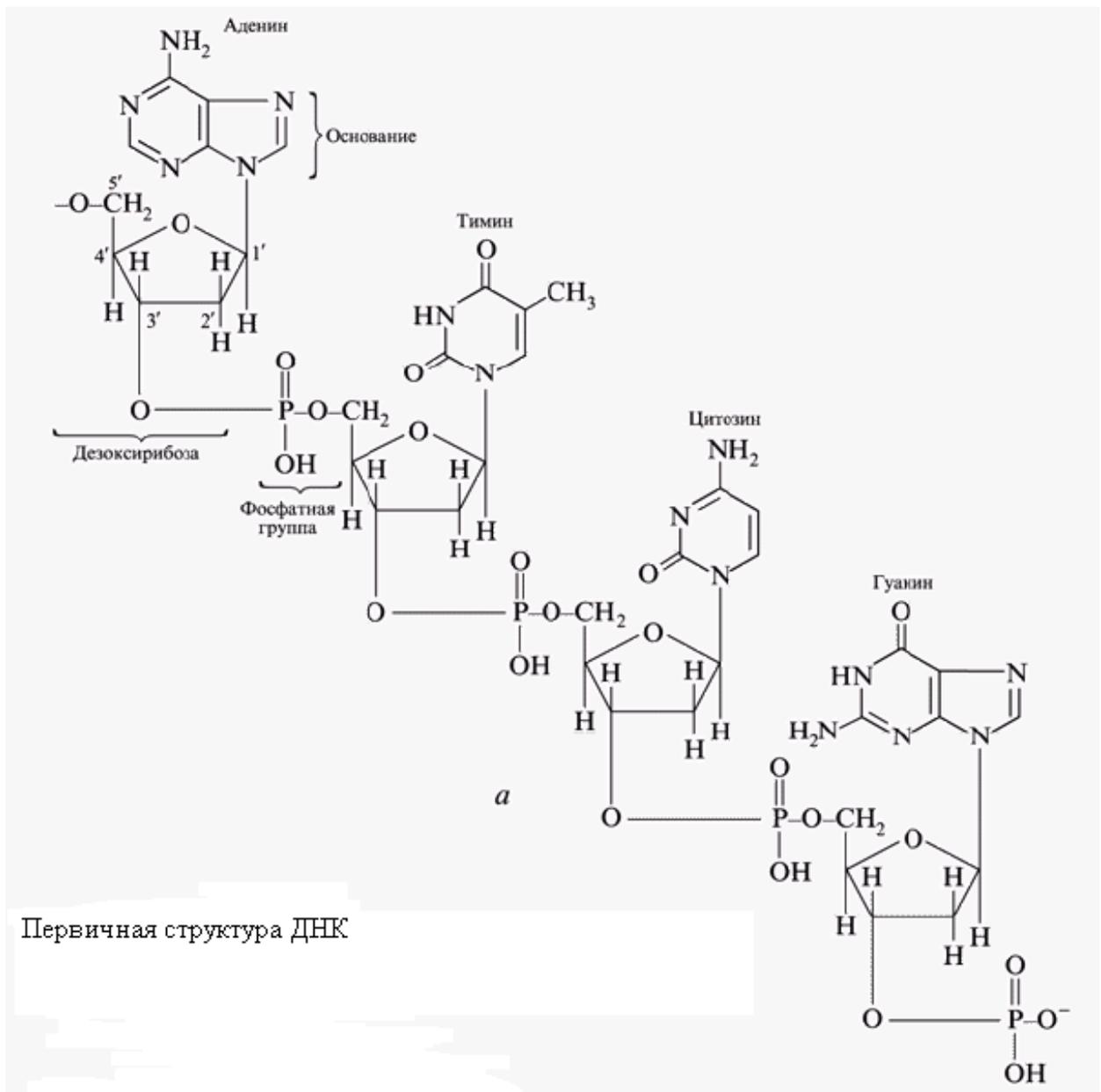
#### **1. Нуклеиновые кислоты - высокомолекулярные, линейные, полярные биополимеры**

Нуклеиновые кислоты (от лат. *nucleus* — ядро) — высокомолекулярные органические соединения, биополимеры (полинуклеотиды), образованные остатками нуклеотидов. Нуклеиновые кислоты ДНК и РНК присутствуют в клетках всех живых организмов и выполняют важнейшие функции по хранению, передаче и реализации наследственной информации. Нуклеиновые кислоты хорошо растворимы в воде, практически не растворимы в органических растворителях. Очень чувствительны к действию температуры и критических значений уровня pH. Молекулы ДНК с высокой молекулярной массой, выделенные из природных источников, способны фрагментироваться под действием механических сил, например при перемешивании раствора. Нуклеиновые кислоты фрагментируются ферментами — нуклеазами.

#### **2. Первичная структура полимерной цепи ДНК**

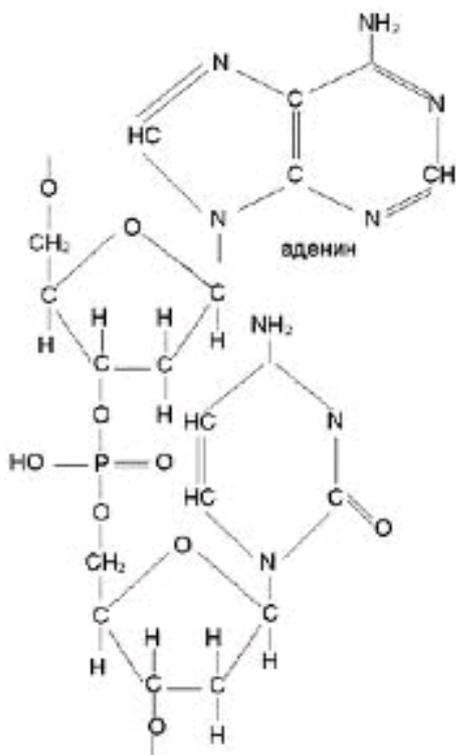
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — один из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. Основная роль ДНК в клетках — долговременное хранение информации о структуре РНК и белков.

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



### 3. Вторичная структура двуцепочечной ДНК. Изогеометричность комплементарных пар, стеклинг

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



В ДНК параллельный стэкинг имеет место между соседними парами нуклеотидов и повышает стабильность молекулярной структуры. Азотистые основания нуклеотидов имеют пуриновые или пиримидиновые группы в своем составе, состоящие, в свою очередь, из ароматических колец. В молекуле ДНК ароматические кольца расположены примерно перпендикулярно оси спирали, поэтому их поверхности расположены параллельно, что способствует перекрыванию р-орбиталей этих оснований.

Похожий эффект, именуемый T-стэкинг, часто наблюдается в белках, когда атомы водорода с частичным положительным зарядом одной ароматической системы направлены к центру другой ароматической системы перпендикулярно плоскости последней.

#### 4. Топология ДНК - суперспирализация.

Кольцевую ДНК, совершенно лишенную суперспиральных витков, называют *релаксированной*. Для того чтобы превратить релаксированную ДНК в суперспирализованную, необходимо затратить определенную энергию. Например, энергия, затрачиваемая на образование 15 суперспиральных витков в одной молекуле ДНК вируса SV-40 (ее контурная длина 1,7 мкм), составляет около 100 ккал/моль. Энергия напряжения суперспирализованной ДНК (энергия суперспирализации) примерно пропорциональна квадрату числа суперспиральных витков.

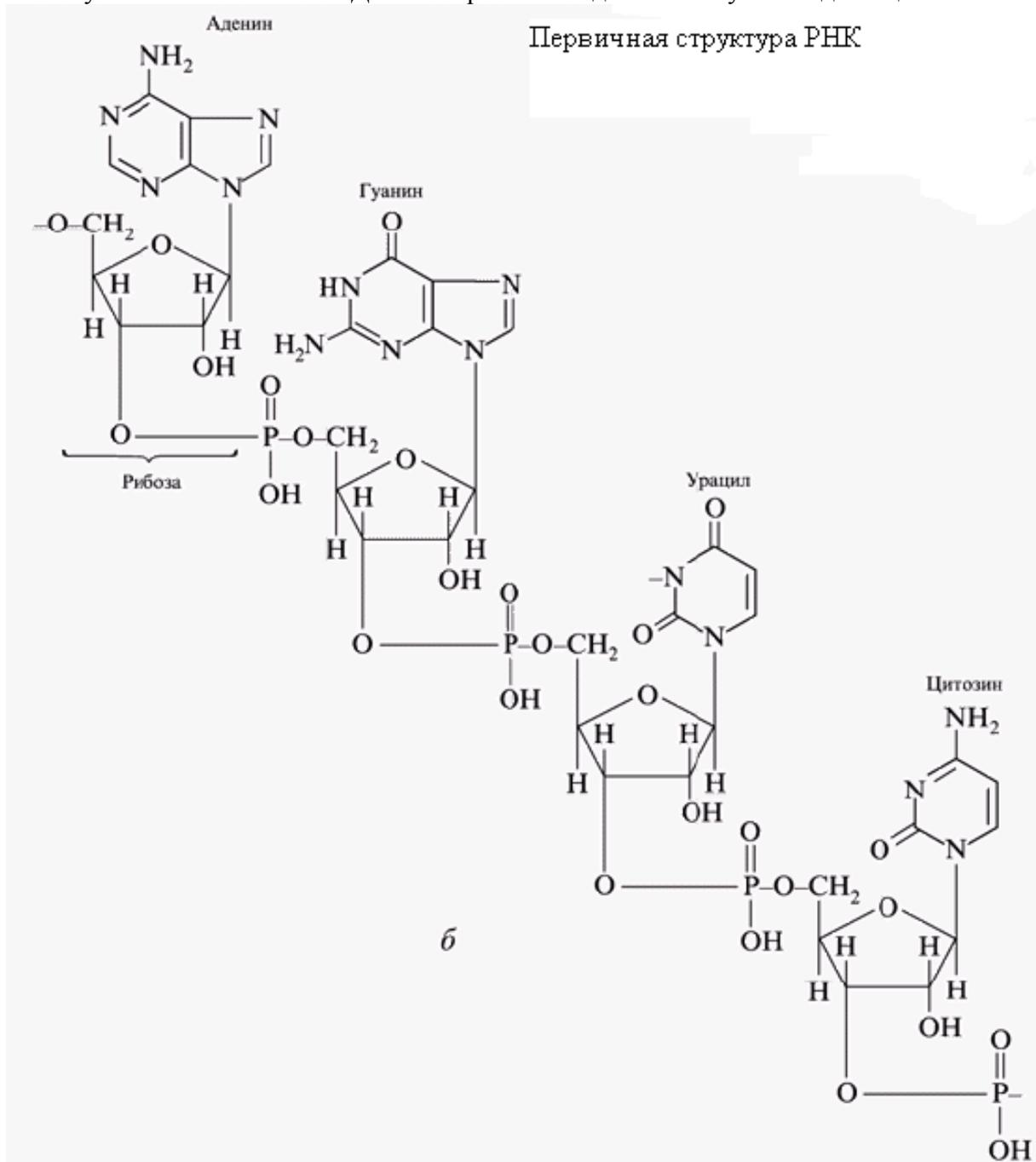
Суперспирализация, по-видимому, выполняет две биологические функции. Во-первых, *суперспирализованная ДНК имеет более компактную форму, чем релаксированная ДНК такой же длины*. Суперспирализация может играть определенную роль в упаковке ДНК. Во-вторых, Суперспирализация может влиять на степень расплетания двойной спирали и, следовательно, на ее взаимодействия с другими молекулами. Точнее, *отрицательная суперспирализация может приводить к раскручиванию двойной спирали*. Интересно отметить, что почти все кольцевые молекулы ДНК, встречающиеся в природе, отрицательно суперспирализованы. Важная характеристика замкнутой кольцевой ДНК - ее порядок зацепления  $L$  (от англ. linking). Число  $L$  указывает, сколько раз одна цепь пересекает другую цепь, если их спроецировать на плоскость. Число  $L$  должно быть целым. Кручение  $T$  (от англ. twisting) и величина суперспирализации  $W$  (от англ. writhing) связаны между собой уравнением

$$L = W + T$$

т.е. находятся в обратной зависимости. Порядок зацепления - топологическая характеристика; она может изменяться, лишь когда в одну или в обе цепи кольцевой ДНК вносятся разрывы. Действительно, были выделены ферменты, которые каталитически изменяют величину  $L$ . Каталитическую активность таких *топоизомераз* легко выявить с помощью гель-электрофореза, так как суперспирализованная ДНК более компактна и поэтому имеет большую подвижность, чем релаксированная ДНК.

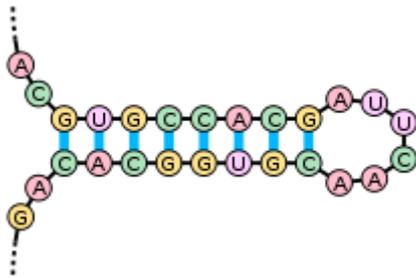
### 5. Первичная структура односторонней РНК. Отличия от ДНК

Молекулы РНК в отличие от ДНК построены из одной полинуклеотидной цепи.



### 6. Вторичная структура односторонней РНК

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



### 7. Третичная структура РНК.

Третичная структура РНК образование сверхспиралей м-РНК и т-РНК; механизм образования таких сверхспиралей схож с механизмом образования сверхспиралей ДНК

Функции РНК (на всякий случай):

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

### 8. Мимикрия пространственной структуры РНК и белка.

Судя по всему подразумевается сравнение пространственных структур РНК и белка, с последующим выявлением сходств... Можно посмотреть в 6 пункт этой главы и увидеть ответ)) У них у обоих существуют  $\alpha$ -спирали. Собственно – это всё, что я нашел в них схожего...

### 9. РНК-ферменты – рибозимы

Рибозим (сокращение от «рибонуклеиновая кислота» и «энзим»), также называемая ферментативной РНК или каталитической РНК — это молекула РНК, обладающая каталитическим действием. Многие рибозимы естественного происхождения катализируют расщепление самих себя или других молекул РНК, кроме того образование пептидной связи в белках происходит при помощи рРНК рибосомы.

Несмотря на то, что большинство рибозимов достаточно редко встречаются в клетках, иногда они очень важны для их существования. Например, активная часть рибосомы — молекулярной машины, осуществляющей трансляция(биология)трансляцию белков из РНК — является рибозимом.

В качестве кофакторов некоторые рибозимы часто содержат двухвалентные ионы металлов, например,  $Mg^{2+}$

*Ничего путного я больше тут не нашел...*

### 10. Функции нуклеиновых кислот

Ну, в начале я уже описал функции, но теперь это стоит сделать более подробно...

Функции: химическая основа хромосомного генетического материала (гена). Наименьшей единицей носителя генетической информации после нуклеотида являются три рядом расположенных нуклеотида – триплет. В ДНК закодирована информация о структуре белков. ДНК является матрицей для создания молекул РНК, она формируется на основе одной из цепей ДНК по принципу комплементарности. Цепи ДНК антипараллельны. Цепи закручиваются друг вокруг друга, а также вокруг общей оси и образуют двойную спираль. Такая структура поддерживается в основном водородными связями: двумя между Т и А, тремя между Г и Ц.

+ синтез полипептидных цепей белка (РНК).

+ Катализ (рибозимы).

## Лекция 6. Биосинтез нуклеиновых кислот.

### 1. Понятие о репликации

Репликация ДНК — это процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, который происходит в процессе деления клетки на матрице родительской молекулы ДНК. При этом генетический материал, зашифрованный в ДНК, удваивается и делится между дочерними клетками. Репликацию ДНК осуществляет фермент ДНК-полимераза.

Хеликаза, топоизомераза и ДНК-связывающие белки расплетают ДНК, удерживают матрицу в разведённом состоянии и вращают молекулу ДНК. Правильность репликации обеспечивается точным соответствием комплементарных пар оснований и активностью ДНК-полимеразы, способной распознать и исправить ошибку. Репликация у эукариот осуществляется несколькими разными ДНК-полимеразами. Далее происходит закручивание синтезированных молекул по принципу суперспирализации и дальнейшей компактизации ДНК. Синтез энергозатратный.

Цепи молекулы ДНК расходятся, образуют репликационную вилку, и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная цепь. В результате образуются две новые двуспиральные молекулы ДНК, идентичные родительской молекуле.

Процесс редупликации: раскручивание спирали молекулы - отделение одной цепи от другой на части молекулы ДНК - воздействие фермента ДНК-полимеразы на молекулу - присоединение к каждой цепи ДНК комплементарных нуклеотидов - образование двух молекул ДНК из одной.

## **2. Полуконсервативный механизм**

Каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм репликации называется полуконсервативным. В настоящее время этот механизм считается доказанным благодаря опытам Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя (1958 г.). Ранее существовали и две другие модели: «консервативная» — в результате репликации одна молекула ДНК состоит только из родительских цепей, а другая — только из дочерних цепей; «дисперсионная» — все получившиеся в результате репликации молекулы ДНК состоят из цепей, одни участки которых вновь синтезированы, а другие взяты из родительской молекулы ДНК).

## **3. Механизм полимеризации. Три этапа - инициация, элонгация и терминация.**

Полимеризация (греч. *polymeres* - состоящий из многих частей) — процесс образования высокомолекулярного вещества (полимера) путём многократного присоединения молекул низкомолекулярного вещества (мономера, олигомера) к активным центрам в растущей молекуле полимера. Молекула мономера, входящая в состав полимера, образует т.наз. мономерное звено. Элементный состав (молекулярные формулы) мономера и полимера приблизительно одинаков.

Обычно мономерами являются соединения, содержащие кратные связи, которые способны, раскрываясь, образовывать новые связи с другими молекулами, обеспечивая рост цепей.

Механизм полимеризации обычно включает в себя ряд связанных стадий:

- инициирование - зарождение активных центров полимеризации;
- рост (продолжение) цепи - процесс последовательного присоединения молекул мономеров к центрам;
- передача цепи - переход активного центра на другую молекулу;
- разветвление цепи - образование нескольких активных центров из одного;
- обрыв цепи - гибель активных центров.

## **4. ДНК - полимеразы. Точность репликации.**

ДНК-полимераза — фермент, участвующий в репликации ДНК. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию дезоксирибонуклеотидов вдоль цепочки нуклеотидов ДНК, которую фермент «читает» и использует в качестве шаблона. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с шаблоном, с которого ведётся

считывание. Собираемая молекула комплементарна шаблонной моноспиральной и идентична второму компоненту двойной спирали.

Как известно, две цепи молекулы ДНК антипараллельны. Разные концы одной цепи называются 3'-конец и 5'-конец. Репликация происходит путем непрерывного роста нуклеотида за нуклеотидом обеих новых цепей одновременно. Матрица считывается ДНК-полимеразой только в направлении 3'-5', добавляя свободные нуклеотиды к 3'-концу собираемой цепочки. Поэтому синтез ДНК происходит непрерывно только на одной из матричных цепей, называемой «лидирующей». Во второй цепи («отстающей») синтез происходит короткими фрагментами.

Ни одна из известных ДНК-полимераз не может создать цепочку «с нуля»: они в состоянии лишь добавлять нуклеотиды к уже существующей 3'-гидроксильной группе. По этой причине ДНК-полимераза нуждается в праймере, к которому она могла бы добавить первый нуклеотид. Праймеры состоят из оснований РНК и ДНК, при этом первые два основания всегда РНК-основания. Праймеры синтезируются другим ферментом — праймазой. Еще один фермент — геликаза — необходим для раскручивания двойной спирали ДНК с формированием одноцепочечной структуры, которая обеспечивает репликацию обеих цепочек в соответствии с полуконсервативной моделью репликации ДНК.

Некоторые ДНК-полимеразы обладают также способностью исправлять ошибки во вновь собираемой цепочке ДНК. Если происходит обнаружение неправильной пары нуклеотидов, ДНК-полимераза откатывается на один шаг назад. Благодаря своему экзонуклеазному действию ДНК-полимераза может исключить неправильный нуклеотид из цепочки и затем вставить на его место правильный, после чего репликация продолжается в нормальном режиме.

Точность копирования ДНК чрезвычайно высока. Ошибочное включение основания происходит с частотой  $10^{-8}$ — $10^{-10}$ . Однако известно, что физико-химические свойства оснований при образовании водородных связей должны давать более высокую частоту ошибок - до  $10^{-2}$ . Высокая точность копирования достигается благодаря контрольным и корректорским функциям ДНК-полимераз, участвующих в репликативном синтезе ДНК.

### **5. Проблема полярности. Фрагменты Оказаки**

Фрагменты Оказаки - это относительно короткие фрагменты ДНК (с РНК-праймером на 5' конце), которые образуются на отстающей цепи в течение репликации ДНК. Длина фрагментов Оказаки у *E. coli* составляет около 1000—2000 нуклеотидов, и обычно 100—200 нуклеотидов у эукариот.

Каждый фрагмент Оказаки образуется рядом с репликационной вилкой после РНК-праймера, образуемого праймазой, и далее продолжается ДНК-полимеразой III в случае прокариот. У эукариот отстающая цепь синтезируется ДНК-полимеразой  $\delta$ . Праймер позднее удаляется ферментом с эндонуклеазной активностью подобной РНКазе H, flap-эндонуклеазами и геликазой/нуклеазой Dna2.

*Что за проблема полярности, я так и не понял...*

### **6. Топологическая проблема репликации.**

До сих пор никак не учитывался тот факт, что комплементарные цепи ДНК закручены друг вокруг друга в спираль. Между тем это существенно. Большинство молекул ДНК бактерий и некоторые ДНК эукариот являются кольцевыми. Из-за спиральной закрученности цепи этих молекул оказываются зацепленными — их невозможно разделить, не порвав хотя бы одну из них. Даже если бы цепи не были зацепленными (т. е. ДНК не была бы кольцевой), при скорости движения репликативной вилки 1000 н. п. в секунду вся непрореплицированная часть ДНК должна вращаться со скоростью 6000 оборотов в минуту!

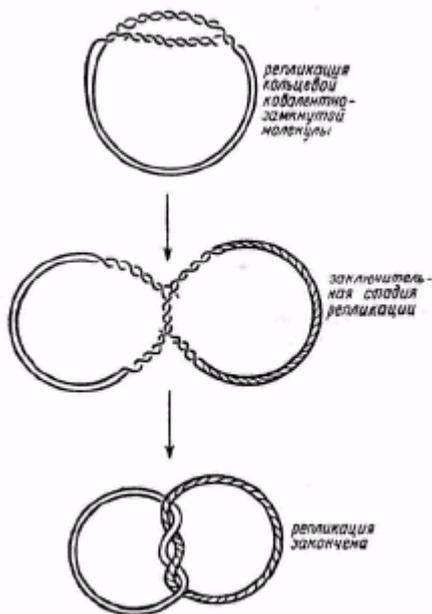


Рис. 35. Образование катенов при репликации кольцевых ДНК

Все эти проблемы разрешаются присутствием в клетке *топоизомераз*. Топоизомеразы на время вносят в зацепленные друг за друга цепи кольцевых молекул разрывы, которые необходимы для их разделения, т. е. выступают в роли «шарниров», позволяющих цепям ДНК раскрутиться. Способность бактериальной топоизомеразы II — ДНК-гиразы — отрицательно сверхспирализовать ДНК в АТР-зависимой реакции не только снимает вопрос о вращении всей непрореплицировавшейся части ДНК, но и облегчает действие хеликаз, поскольку отрицательная сверхспирализация, которую гириза создает перед вилкой, способствует расплетанию ДНК.

На заключительной стадии репликации кольцевых молекул часто остается одно или несколько зацеплений цепей исходной молекулы друг за друга. Это приводит к тому, что двуцепочечные кольца

дочерних молекул также оказываются зацепленными, образуют *катенан*. ДНК-гираза может расцепить зацепленные кольца, используя свою способность вносить временный двуцепочечный разрыв. Топоизомеразы необходимы для завершения репликации не только кольцевых молекул, но и очень длинных линейных эукариотических хромосом: две очень длинные дочерние молекулы не могут разойтись достаточно быстро, поскольку после репликации оказываются запутанными.

### 7. Антибиотики - ингибиторы топоизомеразы

Антибиот́ики (от др.-греч. ἀντί — anti — против, βίος — bios — жизнь) — вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших.

Некоторые антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение бактерий и при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма, и поэтому применяются в качестве лекарственных средств;

Некоторые антибиотики используются в качестве цитостатических (противоопухолевых) препаратов при лечении онкологических заболеваний.

Антибиотики не воздействуют на вирусы, и поэтому бесполезны при лечении заболеваний, вызываемых вирусами (например, грипп, гепатиты А, В, С, ветряная оспа, герпес, краснуха, корь).

Ингибиторы топоизомеразы I — противоопухолевые препараты, блокирующие репликацию ДНК и нарушающие ее репарацию в результате стабилизации комплекса ДНК с топоизомеразой I. Основные препараты: Иринотекан (Кампто), Топотекан (Хикамπτин).

### 8. Понятие о транскрипции.

Транскри́пция — процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.

Транскрипция катализируется ферментом ДНК-зависимой РНК-полимеразой. Процесс синтеза РНК протекает в направлении от 5'- к 3'- концу, то есть по матричной цепи ДНК РНК-полимераза движется в направлении 3'->5'

### 9. Три этапа транскрипции.

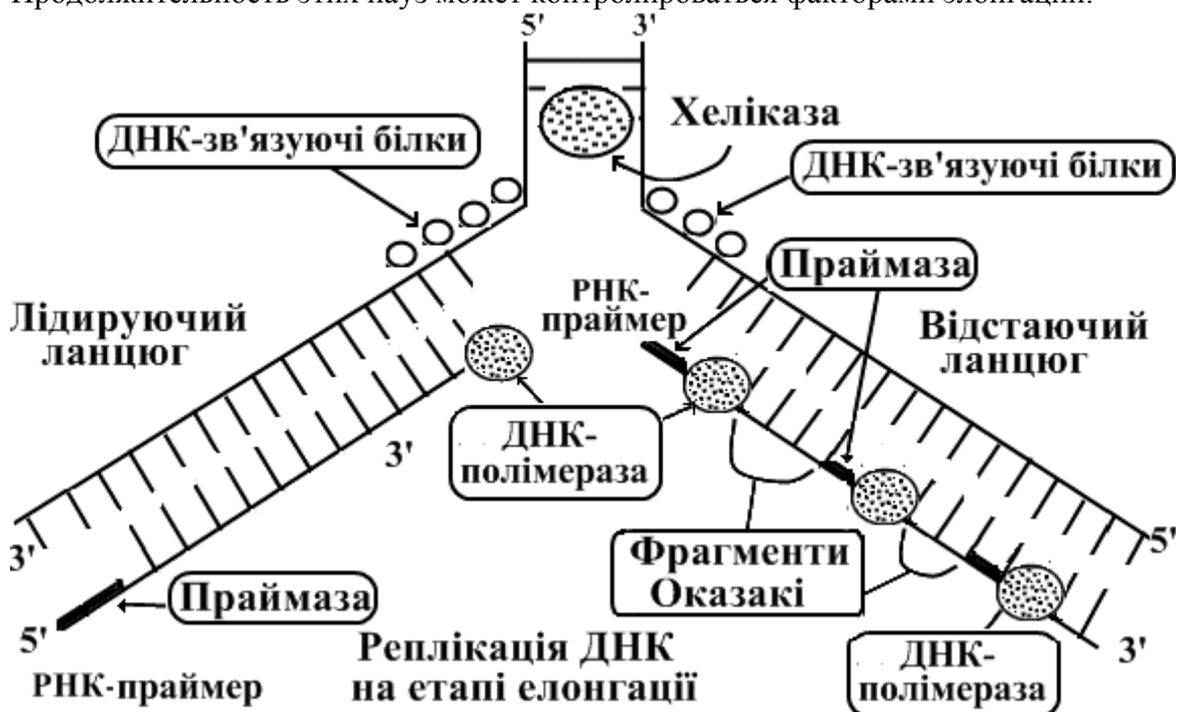
Инициация транскрипции — сложный процесс, зависящий от последовательности ДНК вблизи транскрибируемой последовательности (а у эукариот также и от более далеких

участков генома — энхансеров и сайленсеров) и от наличия или отсутствия различных белковых факторов.

Момент перехода РНК-полимеразы от инициации транскрипции к элонгации точно не определен. Три основных биохимических события характеризуют этот переход в случае РНК-полимеразы кишечной палочки: отделение сигма-фактора, первая транслокация молекулы фермента вдоль матрицы и сильная стабилизация транскрипционного комплекса, который кроме РНК-полимеразы включает растущую цепь РНК и транскрибируемую ДНК. Эти же явления характерны и для РНК-полимераз эукариот. Переход от инициации к элонгации сопровождается разрывом связей между ферментом, промотором, факторами инициации транскрипции, а в ряде случаев — переходом РНК-полимеразы в состояние компетентности в отношении элонгации (например, фосфорилирование СТД-домена у РНК-полимеразы II). Фаза элонгации заканчивается после освобождения растущего транскрипта и диссоциации фермента от матрицы (терминация).

На стадии элонгации в ДНК расплетено примерно 18 пар нуклеотидов. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущим концом цепи РНК. По мере движения РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетание, а позади — восстановление двойной спирали ДНК. Одновременно освобождается очередное звено растущей цепи РНК из комплекса с матрицей и РНК-полимеразой. Эти перемещения должны сопровождаться относительным вращением РНК-полимеразы и ДНК. Трудно себе представить, как это может происходить в клетке, особенно при транскрипции хроматина. Поэтому не исключено, что для предотвращения такого вращения двигающуюся по ДНК РНК-полимеразу сопровождают топоизомеразы. Элонгация осуществляется с помощью основных элонгирующих факторов, необходимых, чтобы процесс не останавливался преждевременно.

В последнее время появились данные, показывающие, что регуляторные факторы также могут регулировать элонгацию. РНК-полимераза в процессе элонгации делает паузы на определенных участках гена. Особенно четко это видно при низких концентрациях субстратов. В некоторых участках матрицы длительные задержки в продвижении РНК-полимеразы, т.н. паузы, наблюдаются даже при оптимальных концентрациях субстратов. Продолжительность этих пауз может контролироваться факторами элонгации.



У бактерій є два механізми термінації транскрипції:

- рo-зависимый механизм, при котором белок Rho (ρ) дестабилизирует водородные связи между матрицей ДНК и мРНК, высвобождая молекулу РНК.
- рo-независимый, при котором транскрипция останавливается, когда только что синтезированная молекула РНК формирует стебель-петлю, за которой расположено несколько урацилов (...УУУУ), что приводит к отсоединению молекулы РНК от матрицы ДНК.

Терминация транскрипции у эукариот менее изучена. Она завершается разрезанием РНК, после чего к её 3' концу фермент добавляет несколько аденинов (...АААА), от числа которых зависит стабильность данного транскрипта

*Сори, что на украинском картинка... Что нашел, то нашел)) Думаю I на II все заменить смогут)*

### **10. Сигналы транскрипции, промотор.**

Промотор — последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической, или осмысленной, транскрипции. У прокариот промотор включает ряд мотивов, важных для узнавания его РНК-полимеразой, в частности так называемые последовательности -10 и -35. Промотор асимметричен, что позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию в правильном направлении и указывает то, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК.

Промоторный участок в пределах оперона может частично перекрываться или вовсе не перекрываться с операторным участком цистрона (гена).

То, под каким промотором находится кодирующий РНК участок ДНК, играет решающее значение в интенсивности экспрессии этого гена в каждом конкретном типе клеток. Активация промотора определяется присутствием в каждом типе клеток своего набора транскрипционных факторов.

Синтез молекулы РНК, катализируемый РНК-полимеразой. Фермент начинает синтез у специального старт-сигнала в ДНК, называемого промотором, и заканчивает его у стоп-сигнала (сигнал терминации транскрипции), после чего полимераза и синтезированная готовая цепь РНК отделяются друг от друга. Скорость полимеризации при 37°C составляет примерно 30 нуклеотидов в 1 с, поэтому синтез цепи РНК длиной 5000 нуклеотидов длится около 3 мин.

### **11. Ингибиторы.**

ИНГИБИТОРЫ (от лат *inhibeo* - останавливаю, сдерживаю), в-ва, тормозящие хим. р-ции. Ингибирование характерно для каталитич и цепных р-ций, к-рые протекают с участием активных центров или активных частиц. Тормозящее действие обусловлено тем, что ингибитор блокирует активные центры катализатора или реагирует с активными частицами с образованием малоактивных радикалов, не способных продолжать цепь. Ингибитор вводится в систему в концентрации много меньшей, чем концентрации реагирующих в-в ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$  моль%). Кинетика р-ций с участием ингибиторов принципиально различна для каталитических и цепных р-ций. В каталитич. р-ции число активных центров фиксировано и ингибитор, блокируя часть из них, не расходуется в ходе процесса. Поэтому при введении ингибитора скорость р-ции снижается, а затем процесс протекает длит. время с постоянной скоростью. В нек-рых случаях эта скорость может медленно возрастать из-за расходования ингибитора по к.-л. побочной р-ции. В цепной р-ции активные частицы непрерывно генерируются, что приводит к расходованию ингибитора и постепенному самоускорению р-ции (в случае цепной неразветвленной р-ции обычно восстанавливается исходная скорость).

### **12. Обратная транскриптаза.**

Обратная транскриптаза (также известная как ревертаза или РНК-зависимая ДНК-полимераза) — фермент, катализирующий синтез ДНК на матрице РНК в процессе, называемом обратной транскрипцией.

Называется так потому, что большинство процессов транскрипции в живых организмах происходит в другом направлении, а именно, с молекулы ДНК синтезируется РНК-транскрипт.

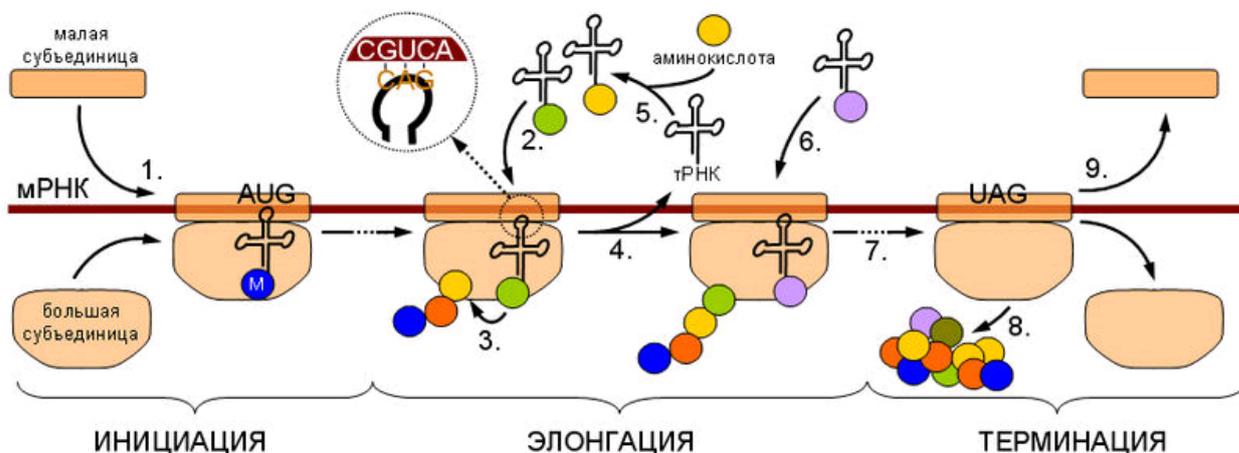
## Лекция 7. Биосинтез белка.

### 1. Понятие о трансляции. Основная "догма" молекулярной биологии.

Трансляцией называют осуществляемый рибосомой синтез белка из аминокислот на матрице информационной (или матричной) РНК (иРНК или мРНК).

Процесс трансляции разделяют на

- инициацию — узнавание рибосомой стартового кодона и начало синтеза.
- элонгацию — собственно синтез белка.
- терминацию — узнавание терминирующего кодона (стоп-кодона) и отделение продукта.



Центральная догма молекулярной биологии — обобщающее наблюдаемое в природе правило реализации генетической информации: информация передаётся от нуклеиновых кислот к белку, но не в обратном направлении. Правило было сформулировано Френсисом Криком в 1958 году и приведено в соответствие с накопившимися к тому времени данными в 1970 году. Переход генетической информации от ДНК к РНК и от РНК к белку является универсальным для всех без исключения клеточных организмов, лежит в основе биосинтеза макромолекул. Репликации генома соответствует информационный переход ДНК → ДНК. В природе встречаются также переходы РНК → РНК и РНК → ДНК (например у некоторых вирусов), а также изменение конформации белков, передаваемое от молекулы к молекуле.

### 2. Генетический код, его свойства.

Генетический код — свойственный всем живым организмам способ кодирования аминокислотной последовательности белков при помощи последовательности нуклеотидов.

В ДНК используется четыре нуклеотида — аденин (А), гуанин (G), цитозин (С), тимин (Т), которые в русскоязычной литературе обозначаются буквами А, Г, Ц и Т. Эти буквы составляют алфавит генетического кода. В РНК используются те же нуклеотиды, за исключением тимина, который заменён похожим нуклеотидом — урацилом, который обозначается буквой U (У в русскоязычной литературе). В молекулах ДНК и РНК нуклеотиды выстраиваются в цепочки и, таким образом, получают последовательности генетических букв.

#### Свойства генетического кода

1. Триплетность — значащей единицей кода является сочетание трёх нуклеотидов (триплет, или кодон).
2. Непрерывность — между триплетами нет знаков препинания, то есть информация считывается непрерывно.

3. Неперекрываемость — один и тот же нуклеотид не может входить одновременно в состав двух или более триплетов (не соблюдается для некоторых перекрывающихся генов вирусов, митохондрий и бактерий, которые кодируют несколько белков, считывающихся со сдвигом рамки).
4. Однозначность (специфичность) — определённый кодон соответствует только одной аминокислоте (однако, кодон UGA у *Euplotes crassus* кодирует две аминокислоты — цистеин и селеноцистеин)
5. Вырожденность (избыточность) — одной и той же аминокислоте может соответствовать несколько кодонов.
6. Универсальность — генетический код работает одинаково в организмах разного уровня сложности — от вирусов до человека (на этом основаны методы генной инженерии; есть ряд исключений, показанный в таблице раздела «Вариации стандартного генетического кода» ниже).
7. Помехоустойчивость — мутации замен нуклеотидов не приводящие к смене класса кодируемой аминокислоты, называют консервативными; мутации замен нуклеотидов, приводящие к смене класса кодируемой аминокислоты, называют радикальными.

### 3. Декодирование. Активация аминокислот. Аминоациладенилат.

Декодирование — это перевод символов отправителя в мысли получателя. Если символы, выбранные отправителем, имеют точно такое же значение для получателя, последний будет знать, что именно имел в виду отправитель, когда формулировалась его идея. Если реакции на идею не требуется, процесс обмена информации на этом должен завершиться. *Чушь? Вроде да, а может нет? Ну короче тут смысл в том, что аминокислоты закодированы буквами типа А, Т, G и т.д. Их можно декодировать, т.е. определить, что это за аминокислоты... Вроде так.*

#### Активация аминокислот

Для каждой из 20 аминокислот имеется соответствующая аминоацил-тРНК-лигаза, которая в цитоплазме соединяет аминокислоту с тРНК(tRNA) (см. с. 88). Этот процесс активации аминокислот осуществляется в две стадии. Сначала аминокислота связывается с ферментом и реагирует с АТФ (АТР), образуя макроэргический смешанный ангидрид — аминоациладенилат. Затем аминоацильный остаток переносится на концевую 3'-ОН-группу концевого остатка рибозы тРНК (другой группой лигаз аминоацил переносится на 2'-ОН-группу). В аминоацил-тРНК карбоксильная группа аминокислотного остатка этерифицируется остатком рибозы 3'-концевого остатка аденозина, входящего в последовательность ...ССА-3'.

Точность трансляции зависит, прежде всего, от субстратной специфичности аминоацил-тРНК-лигаз. Корректирующий механизм активного центра лигазы обеспечивает немедленное удаление ошибочно присоединенных аминокислотных остатков. В среднем встречается только одна ошибка на 1300 аминокислотных остатков — поразительно высокая точность «работы», если представить, насколько близки структуры некоторых аминокислот.

Аминоациладенилат — промежуточный продукт реакции активации аминокислот, представляет собой соединение, в котором карбоксил аминокислоты присоединён к остатку АМФ высокоэнергетической связью.

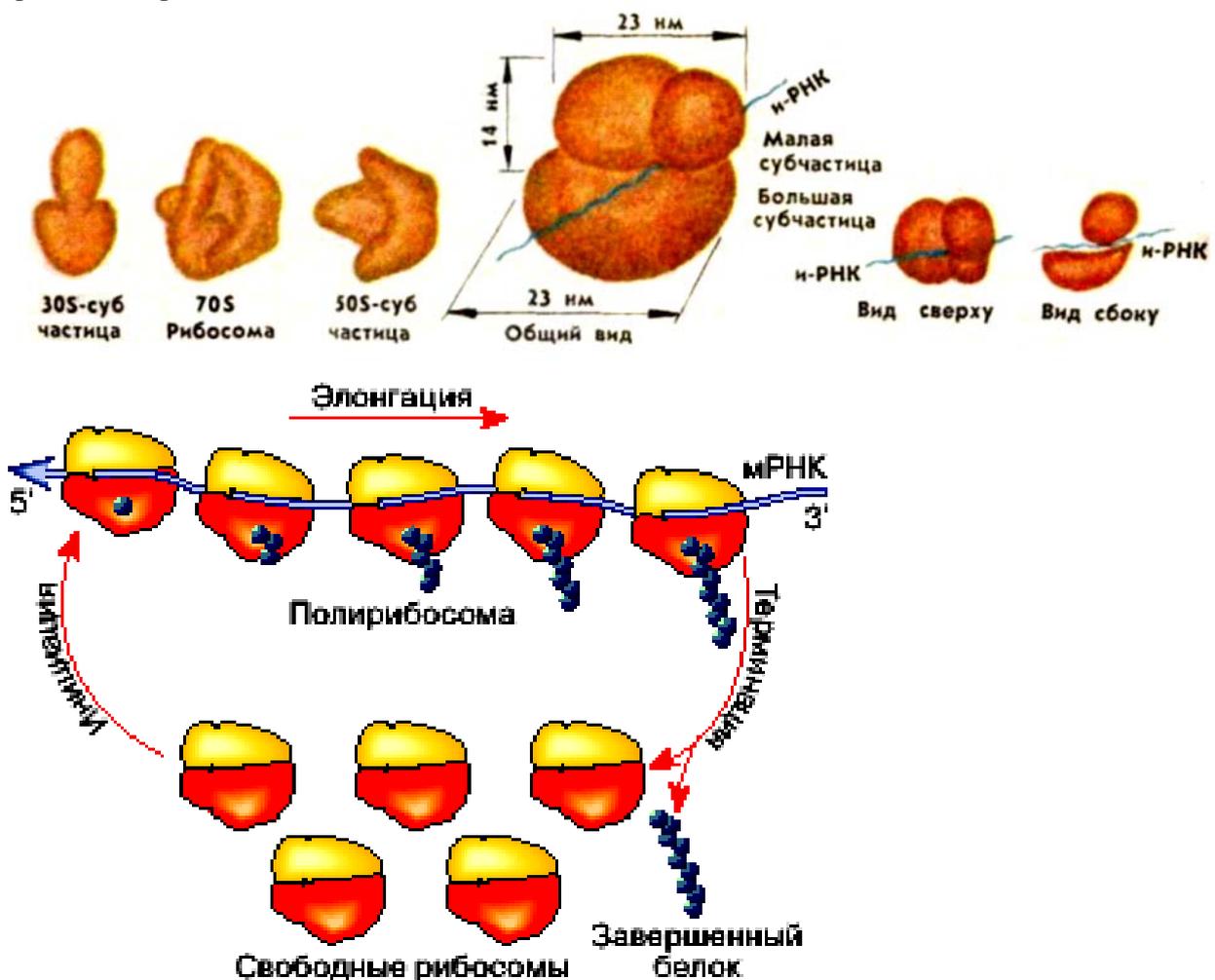
### 4. Рибосома - наноробот для биосинтеза белка. Структура рибосомы.

Рибосома — важнейший немембранный органоид живой клетки сферической или слегка эллипсоидной формы, диаметром 100—200 ангстрем, состоящий из большой и малой субъединиц. Рибосомы служат для биосинтеза белка из аминокислот по заданной матрице на основе генетической информации, предоставляемой матричной РНК, или мРНК. Этот процесс называется трансляцией.

Каждая рибосома состоит из большой. и малой субчастиц .Они названы соответственно 50S- и 30S-субчастицами. S - коэффициент седиментации (лат. sedimentum - осадок), он

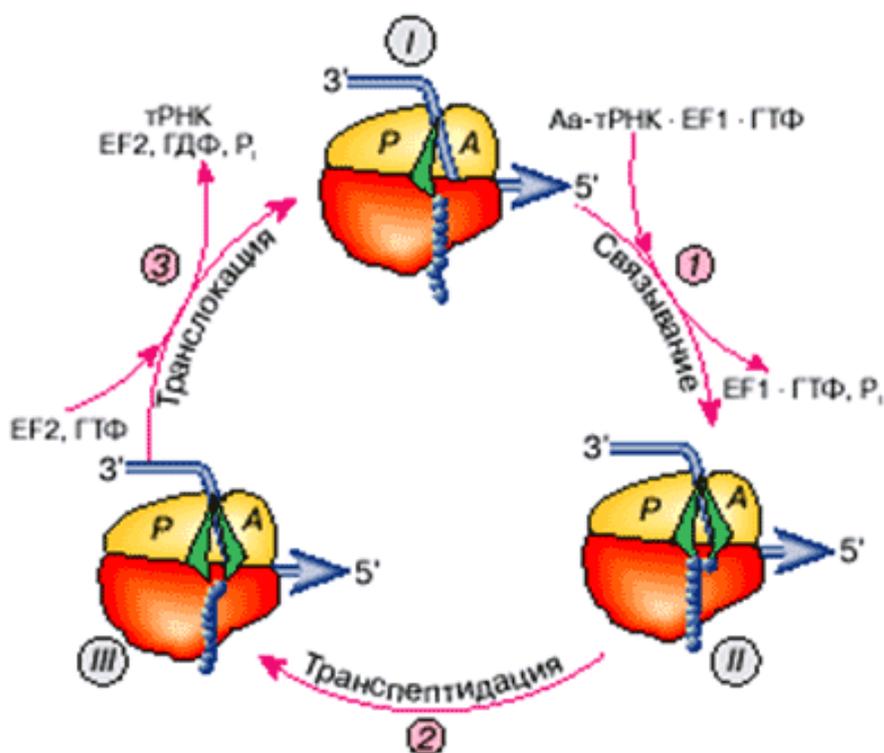
зависит от молекулярной массы и пространственной конформации частицы, осаждаемой при центрифугировании. Коэффициент седиментации бактериальной рибосомы равен 70S (нельзя механически складывать 30S и 50S, так как конформация ассоциированной рибосомы отличается от конформации каждой субчастицы). 30S-субчастица содержит 21 белок и одну молекулу 16S рибосомной РНК. В состав 50S-субчастицы входят 34 молекулы белка и две молекулы рибосомных РНК (23S и 5S). В цитоплазме эукариотических клеток находятся рибосомы с коэффициентом седиментации 80S; Они состоят из двух субчастиц - большой 60S и малой 40S, каждая из которых содержит большее количество разных белков, чем соответствующие субчастицы бактериальных рибосом. В митохондриях и хлоропластах тоже содержатся рибосомы. Они больше похожи на 70S бактериальные рибосомы, чем на 80S цитоплазматические рибосомы эукариот. Между синтезом белка в бактериях, митохондриях и хлоропластах имеется много общего.

Генетическая информация, находящаяся в клетке в виде ДНК и воспроизводимая в клеточных поколениях путем репликации ДНК, реализуется через биосинтез белка. Для этого отдельные участки ДНК - гены - сначала транскрибируются (переписываются) в виде многочисленных копий РНК (информационной РНК, или мРНК), а затем эти копии транслируются (прочитываются) белоксинтезирующими частицами клетки - рибосомами, результатом чего является продукция белков, определяющих всю совокупность свойств и признаков организма.



## 5. Цикл работы рибосомы. Схема образования пептидной связи.

Идеальная картинка))



Элементарный элонгационный цикл рибосомы, в результате которого прочитывается один триплет (кодон) мРНК и образуется одна пептидная связь (добавляется одна аминокислота к растущему полипептиду).

## 6. Антибиотики.

Антибиот́ики (от др.-греч. ἀντί — anti — против, βίος — bios — жизнь) — вещества природного или полусинтетического происхождения, подавляющие рост живых клеток, чаще всего прокариотических или простейших.

Некоторые антибиотики оказывают сильное подавляющее действие на рост и размножение бактерий и при этом относительно мало повреждают или вовсе не повреждают клетки макроорганизма, и поэтому применяются в качестве лекарственных средств;

Некоторые антибиотики используются в качестве цитостатических (противоопухолевых) препаратов при лечении онкологических заболеваний.

Антибиотики не воздействуют на вирусы, и поэтому бесполезны при лечении заболеваний, вызываемых вирусами (например, грипп, гепатиты А, В, С, ветряная оспа, герпес, краснуха, корь).

## 7. Полисомы.

Полисома, или полирибосома (англ. *Polysome, Polyribosome*) — несколько рибосом, одновременно транслирующих одну молекулу иРНК. Поскольку длина средней молекулы мРНК значительно превышает количество нуклеотидов, занимаемых на РНК рибосомой, одну молекулу РНК, в зависимости от скорости инициации одновременно транслируют несколько рибосом. Образование и количество рибосом в полисоме зависит от скорости инициации, элонгации и терминации на данной конкретной РНК. В настоящее время принята модель, в которой у эукариот начало мРНК (5' нетранслируемый участок) и её конец (3' нетранслируемый участок) расположены близко друг другу за счёт взаимодействия одного из факторов инициации трансляции IF4G/F с белком, ассоциированным с 3' нетранслируемым участком (ПАБ).

## 8. Пост-трансляционное формирование структуры белка.

Белок способен к спонтанной самоорганизации и ренатурации, только если он не подвергся сильной пост-трансляционной модификации — т.е. если его химическая структура не была сильно нарушена после биосинтеза. Например, инсулин (где половина цепи вырезается уже после того, как он свернулся) не способен к ренатурации.

Пост-трансляционные модификации бывают самые разные. Как правило, химические модификации контролируются специальными ферментами, а не "самоорганизуются" в самом белке. Кроме расщепления белковой цепи (протеолиза: он часто способствует превращению зимогена в активный фермент), наблюдается модификация концов цепи, ацетилирование, гликозилирование, пришивание липидов в определенные точки цепи, фосфорилирование определенных боковых групп, и т.д., и т.п. Недавно был обнаружен даже "сплайсинг" белковых цепей (спонтанное вырезание куска цепи и склейка образовавшихся при этом концов). Изредка наблюдается и спонтанная циклизация кусочков белковой цепи.

## Лекция 8. Регуляция экспрессии генов.

### 1. Прокариоты: Операторно - промоторный участок ДНК, регуляторный белок, оперон.

Прокариоты (лат. *Procaryota*, от греч. про «перед» и *κάρυον* «ядро»), или доядерные — одноклеточные живые организмы, не обладающие (в отличие от эукариот) оформленным клеточным ядром.

Прокариоты разделяют на два таксона в ранге домена (надцарства): Бактерии (*Bacteria*) и Археи (*Archaea*).

Для клеток прокариот характерно отсутствие ядерной оболочки, ДНК упакована без участия гистонов. Тип питания осмотрофный.

Генетический материал прокариот представлен одной молекулой ДНК, замкнутой в кольцо, имеется только один репликон. В клетках отсутствуют органоиды, имеющие мембранное строение.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ (от лат. *regulo*-привожу в порядок, налаживаю), группа белков, участвующих в регуляции разл. биохим. процессов. Важная группа регуляторных белков, к-рым посвящена эта статья, - белки, взаимодействующие с ДНК и управляющие экспрессией генов (выражение гена в признаках и св-вах организма). Подавляющее большинство таких регуляторных белков функционирует на уровне транскрипции (синтез матричных РНК, или мРНК, на ДНК-матрице) и отвечает за активацию или репрессию (подавление) синтеза мРНК (соотв. белки-активаторы и белки-репрессоры).

Известно ок. 10 репрессоров. Наиб. изучены среди них репрессоры прокариот (бактерии, синезеленые водоросли), регулирующие синтез ферментов, участвующих в метаболизме лактозы (lac-репрессор) в *Escherichia coli* (*E.coli*), и репрессор бактериофага  $\lambda$ . Их действие реализуется путем связывания со специфич. участками ДНК (операторами) соответствующих генов и блокирования инициации транскрипции кодируемых этими генами мРНК.

Репрессор представляет собой обычно димер из двух идентичных полипептидных цепей, ориентированных во взаимно противоположных направлениях. Репрессоры физически препятствуют РНК-полимеразе присоединиться к ДНК в промоторном участке (место связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы-фермента, катализирующего синтез мРНК на ДНК-матрице) и начать синтез мРНК. Предполагают, что репрессор препятствует только инициации транскрипции и не оказывает влияния на элонгацию мРНК.

Репрессор может контролировать синтез к.-л. одного белка или целого ряда белков, экспрессия к-рых носит координированный характер. Как правило, это ферменты, обслуживающие один метаболич. путь; их гены входят в состав одного оперона

(совокупность связанных между собой генов и прилегающих к ним регуляторных участков).

Мн. репрессоры могут существовать как в активной, так и в неактивной форме в зависимости от того, связаны они или нет с индукторами или корепрессорами (соотв. субстраты, в присут. к-рых специфически повышается или понижается скорость синтеза определенного фермента; см. Регуляторы ферментов); эти взаимод. имеют нековалентную природу.

Оперон — функциональная единица генома у прокариот, в состав которой входят цистроны (гены, единицы транскрипции), кодирующие совместно или последовательно работающие белки и объединенные под одним (или несколькими) промоторами. Такая функциональная организация позволяет эффективнее регулировать экспрессию (транскрипцию) этих генов.

Промотор — последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала специфической, или осмысленной, транскрипции. У прокариот промотор включает ряд мотивов, важных для узнавания его РНК-полимеразой, в частности так называемые последовательности -10 и -35. Промотор асимметричен, что позволяет РНК-полимеразе начать транскрипцию в правильном направлении и указывает то, какая из двух цепей ДНК будет служить матрицей для синтеза РНК.

Промоторный участок в пределах оперона может частично перекрываться или вовсе не перекрываться с операторным участком цистрона (гена).

То, под каким промотором находится кодирующий РНК участок ДНК, играет решающее значение в интенсивности экспрессии этого гена в каждом конкретном типе клеток. Активация промотора определяется присутствием в каждом типе клеток своего набора транскрипционных факторов

## **2. 2 типа контроля у прокариот: негативный и позитивный**

В зависимости от характера взаимодействия оператора и регуляторного белка у прокариот различают два типа регуляции активности генов в опероне: негативную и позитивную. При негативной, или отрицательной, регуляции связывание регуляторного белка с оператором репрессирует работу оперона, а при позитивной -наоборот, активирует его. В свою очередь негативной и позитивной могут быть как индукция, так и репрессия. В случае негативной индукции индуктор делает регуляторный белок неспособным связываться с оператором, и при этом структурные гены транскрибируются как, например, в лактозном опероне. При негативной же репрессии регуляторный белок приобретает свойства репрессора после взаимодействия с корепрессором. Таким корепрессором в триптофановом опероне служит накопленный в клетке триптофан, взаимодействие его с регуляторный белком приводит к подавлению транскрипции. При позитивной, или положительной, индукции под влиянием индуктора регуляторный белок (апоиндуктор) связывается с оператором и помогает РНК-полимеразе начать транскрипцию. В случае же позитивной репрессии корепрессор инактивирует апоиндуктор и тем самым способствует прекращению транскрипции.

## **3. 4 варианта регуляции экспрессии генов прокариот при участии лиганда.**

Прокариоты — доядерные организмы, не имеющие типичного ядра, заключенного в ядерную мембрану. Генетический материал представлен единственной нитью ДНК, образующей кольцо,— генофором. Деление клетки только амитотическое. В клетке прокариотов отсутствуют митохондрии, центриоли, пластиды, развитая система мембран. Эукариоты — ядерные организмы, имеющие ядро, окруженное ядерной мембраной. Генетический материал сосредоточен преимущественно в хромосомах, имеющих сложное строение и состоящих из нитей ДНК и белковых молекул. Деление клеток митотическое. Имеются центриоли, митохондрии, пластиды. Среди эукариотов существуют как одноклеточные, так и многоклеточные организмы.

а) Регуляция экспрессии галактозного оперона

Три гена, кодирующие ферменты, ответственные за метаболизм галактозы у *E. coli*, организованы в оперон с промотором (P) и примыкающим к нему регуляторным сегментом-оператором (O) на 5'-конце транскрибируемой последовательности: galE-galT-galK. (прозрачка 4).

Гены, кодирующие регуляторные белки, которые связываются с операторными или активаторными последовательностями, могут находиться как вблизи контролируемых ими генов, так и далеко от них. Например, ген, кодирующий репрессор галактозного оперона (galR), не сцеплен с транскрипционной единицей, состоящей из генов galE, gal T и gal K (прозрачка 4).

#### б) Регуляция экспрессии арабинозного оперона

Синтез ферментов, необходимых для утилизации арабинозы, регулируется двумя сопряженными транскрипционными единицами (прозрачка 4а). Первая - это ara -оперон, состоящий из трех генов, ara B, ara A и ara D, и некоего 5'-контролирующего участка. Вторая представлена геном ara C, кодирующим регуляторный белок, необходимый для транскрипции ara -оперона.

Позитивная или негативная регуляция транскрипции арабинозного оперона зависит от того, образуется или нет комплекс между арабинозой и белком, кодируемым только сцепленным с опероном геном araC (прозрачка 4а) J

#### в) Регуляция экспрессии лактозного оперона

Рассмотрим позитивную и негативную регуляцию лактозного оперона

- Негативная регуляция лактозного оперона. Бактерии *E. coli* могут использовать в качестве единственного источника углерода и энергии лактозу, поскольку они способны образовывать в большом количестве  $\beta$ -галактозидазу- фермент, расщепляющий лактозу на глюкозу и галактозу. Однако при росте на других источниках углерода в клетках *E. coli* образуется очень мало  $\beta$ -галактозидазы. Ген, ответственный за синтез  $\beta$ -галактозидазы (lac Z), называется индуцибельным, поскольку кодируемый им фермент синтезируется только тогда, когда в клетке присутствуют сахара, имеющие  $\beta$ -галактозильные остатки. Помимо  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -галактозиды индуцируют образование еще двух белков: ( $\beta$ -галактозидпермеазы (кодируемой геном lacY), необходимой для проникновения  $\beta$ -галактозидов в клетку, и  $\beta$ -галактозидтрансацилазы (lac A), фермента с невыясненной пока функцией (прозрачка 5). В этих трех генах- lac Z, lacY и lac A- содержится вся информация о белках, кодируемых lac-опероном. Они транскрибируются в единую полицистронную РНК, при трансляции которой образуются почти одинаковые количества соответствующих белков. Поэтому можно сказать, что три гена lac-оперона экспрессируются согласованно.

#### г). Регуляция экспрессии триптофанового оперона

Триптофановый оперон состоит из оператора, и пяти структурных генов (A-E). Последний кодирует ферменты, участвующие в биосинтезе триптофана - одной из незаменимых ам.к. по мере увеличения концентрации триптофана наступает момент, когда его дальнейший синтез становится нежелательным и транскрипция прекращается.

Триптофан синтезируется в *E. coli* из ароматического предшественника - хоризмовой кислоты - в ходе пяти последовательных реакций, катализируемых ферментным комплексом из пяти белков (прозрачка 10, 2). Эти кодируемые trp-опероном белки образуются согласованно, примерно в равных количествах, при трансляции полицистронной мРНК длиной 7000 нуклеотидов, транскрибируемой с промотора. При наличии в среде достаточного для роста бактерий количества триптофана клетки *E. coli* образуют ферменты биосинтеза триптофана в очень малых количествах. Однако если клетки лишены экзогенного триптофана, то в них начинается довольно интенсивный синтез всех пяти ферментов. Содержание ферментов этой группы в клетках *E. coli* может различаться до 700 раз в зависимости от внутриклеточного уровня триптофана.

Подобный разброс в уровне экспрессии обусловлен наличием двух практически независимых механизмов регуляции, каждый из которых «подгоняет» уровень синтеза trp-мРНК к концентрации внутриклеточного триптофана.

Механизмы: их два. Эффекты этих двух регуляторных механизмов комплементарны, мультипликативны и позволяют увеличивать степень экспрессии оперона.

*Если честно, в этом вопросе я сам абсолютно ничего не понял... Наверное это то, что надо, но не факт. Другого не нашел.*

#### **4. Триптофановый оперон.**

Триптофановый оперон — классический пример оперона в бактериальных геномах, может быть использован как пример регуляции анаболизма у прокариотов, а также механизма аттенюации (затухания) ферментативного синтеза.

Состоит из 5 цистронов, кодирующих четыре фермента заключительного этапа образования триптофана. Вслед за промотором и оператором в оперонах этого типа находится так называемый лидерный отдел; именно он оканчивается аттенюатором.

В процессе транскрипции этого отдела образуется лидирующий участок мРНК. Последний тут же связывает рибосому и начинает трансляцию с образованием лидирующего пептида (ЛП). Ключевая особенность последнего — среди его 14 аминокислотных остатков содержатся два остатка триптофана, то есть той самой аминокислоты, синтез которой контролируется опероном.

Аналогично, в ЛП фенилаланинового оперона среди 15 остатков 7 остатков фенилаланина, а в ЛП гистидинового оперона — 7 подряд остатков гистидина. Так что механизм аттенюаторной регуляции во всех этих случаях одинаков.

Таким образом, когда в клетке достаточно триптофана, то синтез лидерного пептида идет без задержки: образующая его рибосома не отстает от РНК-полимеразы. В этих условиях при достижении РНК-полимеразой аттенюатора с высокой долей вероятности срабатывает сигнал об окончании транскрипции: РНК-полимераза диссоциирует от ДНК и гены не считываются.

Триптофан, быстро включаясь в лидерный пептид, блокирует через аттенюаторный механизм синтез ферментов, необходимых для его образования. Блокирование, однако, не является полным, поскольку сохраняется небольшая вероятность того, что РНК-полимераза все же преодолеет аттенюаторный участок.

#### **5. Для эукариот характерна избыточность и неоднозначность регуляции.**

Регуляция транскрипции генов у эукариот характеризуется рядом особенностей, связанных с необходимостью поддержания координированной экспрессии генов в сложноорганизованной генетической системе. В организме человека гистологически различают около 100 типов клеток, каждый с уникальным набором генов, начинающих функционировать во время дифференцировки клеток-предшественников. Процесс формирования органов и тканей сопровождается пролиферацией строго определенных групп клеток, и упорядоченным во времени и пространстве перемещением клеток.

Гены высших организмов подразделяют по функциональному признаку на две группы: " гены домашнего хозяйства" (housekeeping genes) и " гены роскоши" (luxury genes) . К первой группе относятся гены, функционирующие повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. Они обеспечивают процесс гликолиза, биосинтез аминокислот и нуклеотидов, катаболизм белков и т.п. Гены, относящиеся ко второй группе, экспрессируются лишь в специализированных клетках и являются маркерами дифференцированных состояний.

Сложность жизненного цикла многоклеточных организмов определяет особенности функционирования генов. Большое число генов и целые блоки генов функционируют на определенных стадиях эмбриогенеза. У человека к ним относятся, например, гены альфа-фетопротеина . Экспрессия этих генов в клетках взрослого организма свидетельствует о развитии патологического процесса, в частности, злокачественных новообразований в

печени. Примером такого рода является избирательная инактивация одной из X-хромосом у самок млекопитающих.

Тканеспецифический характер экспрессии генов роскоши обеспечивается различными механизмами взаимодействия белковых факторов транскрипции с регуляторными последовательностями нуклеиновых кислот. Транскрипцию генов высших организмов осуществляют три различные РНК-полимеразы. При этом для промоторов каждой из них характерны специфические регуляторные последовательности нуклеотидов, с которыми взаимодействуют свои факторы транскрипции, изменяющие уровень транскрипции соответствующих генов.

Эукариотические факторы транскрипции реализуют механизм регуляции экспрессии генов комбинаторного типа. Молекулы факторов транскрипции обладают консервативными доменами, которые дают им возможность осуществлять высокоспецифические белок-белковые и белково-нуклеиновые взаимодействия. In vivo происходит объединение факторов транскрипции и других регуляторных белков в большие регуляторные комплексы. Каждое новое сочетание факторов придает комплексу уникальные регуляторные свойства, обеспечивая изменение специфичности его взаимодействия с регуляторными последовательностями ДНК и регуляторными белками аппарата транскрипции.

Уникальна способность эукариот использовать для регуляции транскрипции генов изменения структуры хроматина. С помощью таких механизмов осуществляется репрессия и дерепрессия генов во время дифференцировки клеток, и поддерживается соответствующее функциональное состояние отдельных генов, их больших массивов и целых хромосом на протяжении всей жизни организма. Перестройки хроматина в окрестностях регуляторных участков генов происходят и в связи с более тонкой регуляцией их транскрипции.

В процессе синтеза и после его завершения первичный транскрипт подвергается посттранскрипционным модификациям и процессингу. Таким образом, генетической информации, заключенной в конкретном гене, недостаточно для полноценной экспрессии, и чтобы ген правильно функционировал, требуется координированная работа дополнительных генов, многие из которых активны не вблизи регулируемых генов, а в других тканях, удаленных от клеток-мишеней. Для осуществления такой передачи регуляторных сигналов на большие расстояния в организме присутствуют специальные системы, осуществляющие генерацию, перенос и специфическое распознавание сигналов клетками.

#### **6. Блоки, каскады, дифференцировка. Пример - эмбриогенез.**

*Ну скажите мне, что такое блоки и каскады??? Не понимаю...*

##### Эмбриогенез

Период эмбрионального развития многоклеточного животного начинается с дробления зиготы и завершается рождением новой особи. Процесс деления заключается в серии последовательных митотических делений зиготы. Образующиеся в р-те нового деления зиготы две клетки и все последующие поколения клеток на этом этапе носят название бластомеров. В ходе дробления одно деление следует за другим, и не происходит роста образующихся бластомеров, в следствии чего каждое новое поколение бластомеров представлено более мелкими клетками. Эта особенность клеточных делений при развитии оплодотворенной яйцеклетки и определило появление образного термина - дробление зиготы.

У разных видов животных яйцеклетки различаются по количеству и характеру распределения в цитоплазме запасных питательных в-в (желтка). Это в значительной степени определяет характер последующего дробления зиготы. При небольшом количестве и равномерном распределении желтка в цитоплазме происходит деление всей массы зиготы с образованием одинаковых бластомеров - полное равномерное дробление (например у млекопитающих). При скоплении желтка преимущественно у одного из

полюсов зиготы происходит неравномерное дробление - образуются бластомеры, различающиеся по размерам: более крупные макромеры и микромеры (например у амфибий). Если же яйцеклетка очень богата желтком, то дробится её часть, свободная от желтка. Так, у пресмыкающихся, птиц дроблению подвергается лишь дисковидный участок зиготы у одного из полюсов, где располагается ядро - неполное, дискоидальное дробление. Наконец, у насекомых в процессе дробления задействован лишь поверхностный слой цитоплазмы зиготы - неполное, поверхностное дробление (в центре дробящейся зиготы сохраняется массы желтка).

В результате дробления ( когда число делящихся бластомеров достигает значительного числа) образуется бластула. В типичном случае (например, у ланцетника) бластула представляет собой полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток (бластодерма). Полость бластулы - бластоцель, иначе называемой первичной полостью тела, заполнена жидкостью. У амфибий бластула имеет очень небольшую полость, а у некоторых животных (например, членистоногих) бластоцель может полностью отсутствовать.

На следующем этапе эбрионального периода происходит процесс формирования гастрюлы - гастрюляция. У многих животных образование гастрюлы происходит путем инвоганаии, т.е. выпячивания бластодермы на одном из полюсов бластулы (при интенсивном размножении клеток в этой зоне). В р-те образуется двухслойный чашеобразный зародыш. Наружный слой клеток - эктодерма, а внутренний - энтодерма. Внутренняя полость возникающая при выпячивании стенки бластулы, первичная кишка, сообщается со внешней средой отверстием - первичным ртом (бластопором). Существуют и другие типы гастрюляции. Например, у некоторых кишечнополостных энтодерма гастрюлы образуется путем иммиграции, т.е. "выселения" части клеток бластодермы в полость бластулы и последующего их размножения. Первичный рот образуется путем разрыва стенки гастрюлы.

#### **7. Сигналы для клетки. Ответы клетки.**

Жизнь клетки зависит от внешних регуляторных сигналов ( сигналы клеточные), которыми могут быть физические воздействия (температура, электромагнитное излучение) или химические соединения. Хорошо изученными веществами, которые организм использует для регуляции жизнедеятельности клеток, являются, например, стероидные гормоны , цитокины или факторы роста , которые, достигая клеток-мишеней, вызывают метаболические изменения, связанные с изменением экспрессии групп генов. Не менее сильный и специфический ответ вызывают физиологически активные вещества экзогенного происхождения, например, феромоны или токсины. Чтобы адекватно реагировать на сигналы из окружающей среды, в том числе от других клеток организма, клетка должна их воспринимать и менять свое поведение в соответствии с получаемыми через эти сигналы инструкциями.

В связи с получением сигнала клетка должна решить несколько задач:

Отличить сигнал от множества других

Доставить его по назначению

Адекватно отреагировать на получение сигнала

Выключить системы реагирования сразу, как только сигнал исчезает из окружающей клетку среды.

Задача доставки сигнала по назначению связана со сложностью. Поступающий сигнал слаб и клетка должна его усилить, чтобы он смог быть воспринят внутри клетки внутриклеточными приемниками. Эту проблему клетка решает тем, что использует так называемые каскадные механизмы усиления сигнала .

Сигналы, передающиеся через сигнальные молекулы, являются первичными по отношению к каскадам биохимических реакций, запускающимся в клетках в ответ на их воздействие. Передача сигнала это последовательность реакций, включающих взаимодействие внеклеточных лигандов (сигналы клеточные) с рецепторами на

поверхности клетки с последующей активацией рецептора, заключающейся в изменении состояния его внутриклеточного домена. Активация рецептора вызывает каскад событий в клетке, в результате которых клетка адекватно реагирует на внешний сигнал.

Первичные сигналы распознаются клетками благодаря наличию у них специальных молекул-рецепторов белковой природы, взаимодействующих с первичными сигнальными молекулами или с физическими факторами. Первичный сигнал, как правило, не действует прямо на те метаболические процессы в клетке, для регуляции которых он предназначен. Воспринимающий его рецептор инициирует образование в клетке промежуточных химических соединений, запускающих внутриклеточные процессы, воздействие на которые было целью первичного внеклеточного сигнала. Такие промежуточные соединения несут в себе информацию о первичном регуляторном сигнале и являются вторичными его переносчиками, поэтому они получили название вторичных мессенджеров. Ими могут быть различные ионы, циклические нуклеотиды, продукты деградации липидов и целый ряд других химических соединений биогенного происхождения.

Вторичные мессенджеры позволяют усиливать первичный регуляторный сигнал от внеклеточных регуляторных молекул. Группы клеток и тканей приобретают способность к однотипной и одновременной реакции на первичный регуляторный сигнал, например, на действие гормона эндокринной системы. Это обеспечивает возможность быстрой адаптации многоклеточного организма к изменяющимся условиям внутренней и окружающей среды.

Изучение механизмов передачи и усиления сигналов является одной из основных задач биологии клетки. Их знание необходимо для понимания механизмов формирования функционального ответа клеток в норме, его регуляции и коррекции при патологических состояниях. В настоящее время известно около 50 белков-лигандов и 14 семейств рецепторов.

Существует несколько более или менее стандартных способов передачи сигнала от клеточной поверхности внутрь клетки, хотя эта проблема еще далека от окончательного понимания и постоянно появляются новые варианты сигнализации. Например классический обобщенный путь передачи сигнала заключается в цепочке взаимодействий - сигнальная молекула - рецептор на поверхности клетки-внутриклеточный усилительный механизм -включение определенных специфических для данного сигнала генов. Рис 3 дает упрощенную схему двух возможных путей многостадийного процесса передачи сигнала, которая начинается со взаимодействия некоторого внешнего фактора с рецептором на поверхности клетки. Таким внешним фактором может быть какой либо гормон или какой-нибудь фактор роста, в частности, цитокин.

#### Виды сигналов:

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

#### Виды ответов:

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

## **8. Три типа систем передачи сигнала. 4 свойства системы передачи сигнала**

### Системы передачи сигнала:

- 1) Ионные каналы.
- 2) Прямой транспорт (диффузия через мембрану).
- 3) Киназы - трансмембранные белки, подвергающиеся изменениям внутри клетки при получении сигнала извне (обычно при присоединении гормона).

Механизм действия киназ связан со способностью к фосфорилированию аминокислотных остатков Ser/Thr или Tyr: при поступлении сигнала на внешние рецепторы киназы внутри клетки гидролизуются одна молекула АТФ, а отщепившийся фосфатный остаток фосфорилирует киназу. При этом изменяется конформация белка, и киназа становится ферментом *фосфокиназой (протеинфосфокиназой)*. По окончании действия сигнала фосфокиназа дефосфорилируется под действием фермента из класса фосфатаз, происходит снятие сигнала. В реальности в клеточную мембрану встроено множество киназ, образующих *каскад*; при поступлении на такой каскад сигнала происходит его многократное усиление (амплификация). Подобные каскады являются одной из основных частей нейронных систем. В принципе, в любой нейронной системе могут быть выделены *входной слой* (первичная обработка информации - выделение нужного сигнала рецепторами), *скрытый слой* (последующая обработка информации передача сигнала через мембрану при помощи киназ) и *выходной слой* (интеграция сигнала).

### Свойства системы передачи сигнала:

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

## **9. Усиление и объединение сигнала. Каскад фосфокиназ.**

### В предыдущем вопросе...

## **10. Модель нейронной сети. Нелинейность функции выхода, обучаемость, устойчивость.**

Нейронные сети – это одно из направлений исследований в области искусственного интеллекта, основанное на попытках воспроизвести нервную систему человека. А именно: способность нервной системы обучаться и исправлять ошибки, что должно позволить смоделировать, хотя и достаточно грубо, работу человеческого мозга.

Искусственные нейронные сети (ИНС) — математические модели, а также их программные или аппаратные реализации, построенные по принципу организации и функционирования биологических нейронных сетей — сетей нервных клеток живого организма. Это понятие возникло при изучении процессов, протекающих в мозге, и при попытке смоделировать эти процессы. Первой такой попыткой были нейронные сети Маккалока и Питтса. Впоследствии, после разработки алгоритмов обучения, получаемые модели стали использовать в практических целях: в задачах прогнозирования, для распознавания образов, в задачах управления и др.

ИНС представляют собой систему соединённых и взаимодействующих между собой простых процессоров (искусственных нейронов). Такие процессоры обычно довольно просты, особенно в сравнении с процессорами, используемыми в персональных компьютерах. Каждый процессор подобной сети имеет дело только с сигналами, которые он периодически получает, и сигналами, которые он периодически посылает другим процессорам. И тем не менее, будучи соединёнными в достаточно большую сеть с управляемым взаимодействием, такие локально простые процессоры вместе способны выполнять довольно сложные задачи.

Нейронные сети не программируются в привычном смысле этого слова, они обучаются. Возможность обучения — одно из главных преимуществ нейронных сетей перед традиционными алгоритмами. Технически обучение заключается в нахождении коэффициентов связей между нейронами. В процессе обучения нейронная сеть способна

выявлять сложные зависимости между входными данными и выходными, а также выполнять обобщение. Это значит, что в случае успешного обучения сеть сможет вернуть верный результат на основании данных, которые отсутствовали в обучающей выборке, а также неполных и/или «зашумленных», частично искаженных данных.

В процессе обучения сеть в определенном порядке просматривает обучающую выборку. Порядок просмотра может быть последовательным, случайным и т. д. Некоторые сети, обучающиеся без учителя, например, сети Хопфилда просматривают выборку только один раз. Другие, например, сети Кохонена, а также сети, обучающиеся с учителем, просматривают выборку множество раз, при этом один полный проход по выборке называется *эпохой обучения*. При обучении с учителем набор исходных данных делят на две части — собственно обучающую выборку и тестовые данные; принцип разделения может быть произвольным. Обучающие данные подаются сети для обучения, а проверочные используются для расчета ошибки сети (проверочные данные никогда для обучения сети не применяются). Таким образом, если на проверочных данных ошибка уменьшается, то сеть действительно выполняет обобщение. Если ошибка на обучающих данных продолжает уменьшаться, а ошибка на тестовых данных увеличивается, значит, сеть перестала выполнять обобщение и просто «запоминает» обучающие данные. Это явление называется переобучением сети или оверфиттингом. В таких случаях обучение обычно прекращают. В процессе обучения могут проявиться другие проблемы, такие как паралич или попадание сети в локальный минимум поверхности ошибок. Невозможно заранее предсказать проявление той или иной проблемы, равно как и дать однозначные рекомендации к их разрешению.

Классификация по характеру обучения:

- Обучение с учителем — выходное пространство решений нейронной сети известно;
- Обучение без учителя — нейронная сеть формирует выходное пространство решений только на основе входных воздействий. Такие сети называют самоорганизующимися;
- Обучение с подкреплением — система назначения штрафов и поощрений от среды.

#### **11. Рак как множественное нарушение системы передачи сигнала для деления клеток.**

Рак — вид злокачественной опухоли, развивающейся из клеток эпителиальной ткани различных органов (кожи, слизистых оболочек и многих внутренних органов).

На ранней стадии развития эмбриона клетки взаимозаменяемы и очень быстро делятся. Затем они начинают дифференцироваться, превращаясь в специфические клетки, например нейроны, клетки крови или мышц. Дифференцировавшись, они перестают делиться и обычно включаются в состав определенных тканей. В этом смысле некоторые опухолевые клетки похожи на стволовые: они также идентичны друг другу, быстро делятся и — в худшем случае — могут включаться в новые ткани, образуя метастазы.

Со временем или от полученных повреждений специализированные клетки погибают, поэтому организм создает запас стволовых клеток. Стволовые клетки обычно делятся на два типа. Первый — полностью идентичен родительской клетке и служит для восполнения их естественной убыли. Клетки второго типа — это дифференцированные клетки, превратившиеся в те или иные виды «обычных» клеток, чтобы заменить отработавший свое клеточный материал.

В целом воздействуя на клетку, канцерогены вызывают определённые нарушения её структуры и функции (в особенности ДНК), что называется инициацией. Повреждённая клетка таким образом приобретает выраженный потенциал к малигнизации. Повторное воздействие канцерогена (того же, что вызвал инициацию, или любого другого) приводит к необратимым нарушениям механизмов, контролирующим деление, рост и дифференцировку клеток, в результате которых клетка приобретает ряд способностей, не свойственных нормальным клеткам организма — промоция. В частности, опухолевые

клетки приобретают способность к бесконтрольному делению, теряют тканеспецифическую структуру и функциональную активность, изменяют свой антигенный состав и пр. Рост опухоли (опухолевая прогрессия) характеризуется постепенным снижением дифференцировки и увеличением способности к бесконтрольному делению, а также изменением взаимосвязи опухолевая клетка — организм, что приводит к образованию метастазов.

*Из ансеров:*

Рак - заболевание, вызываемое неконтролируемым делением клеток. Причиной рака является нарушение системы передачи сигнала из-за особого белка RAS. RAS является так называемым p-белком, то есть работает не с АТФ, а с GTP (гуанидилтрифосфорной кислотой). В обычном, неактивном состоянии RAS связан с GDP, однако под действием особого фактора обмена GEF (guanine nucleotide exchange factor) может происходить замена GDP на GTP, активирующая RAS. Процесс начинается с прихода сигнала EDF (фактора роста клеток) на рецепторы тирозинкиназы; она фосфорилируется и связывается с GEF, который, в свою очередь, связывается с RAS, закреплённым в неактивном состоянии на внутренней поверхности клеточной мембраны. В результате этого закреплённая на RAS GDP обменивается на GTP, которая фосфорилирует MAP-киназу -- киназу, отвечающую за передачу сигнала деления и роста. В результате каскад MAP-киназ многократно усиливает сигнал на рост; клетка начинает неконтролируемо делиться.

## **Лекция 9. Геном, плазмиды, вирусы.**

### **1. Геном. Определение. Размеры.**

Геном — совокупность всех генов организма; его полный хромосомный набор.

В нормальной ситуации в большинстве клеток человека должно присутствовать 46 хромосом: 44 из них не зависят от пола (аутосомные хромосомы), а две — X-хромосома и Y-хромосома — определяют пол (XY — у мужчин или XX — у женщин), эти 46 хромосом составляют один геном. Хромосомы в общей сложности содержат приблизительно 3 миллиарда пар оснований нуклеотидов ДНК, в которых по оценкам содержится 20000-25000 генов.

### **2. Ген. Определение. Структура.**

Ген — структурная и функциональная единица наследственности, контролирующая развитие определенного признака или свойства. Совокупность генов родители передают потомкам во время размножения.

В настоящее время, в молекулярной биологии установлено, что гены — это участки ДНК, несущие какую-либо целостную информацию — о строении одной молекулы белка или одной молекулы РНК. Эти и другие функциональные молекулы определяют развитие, рост и функционирование организма.

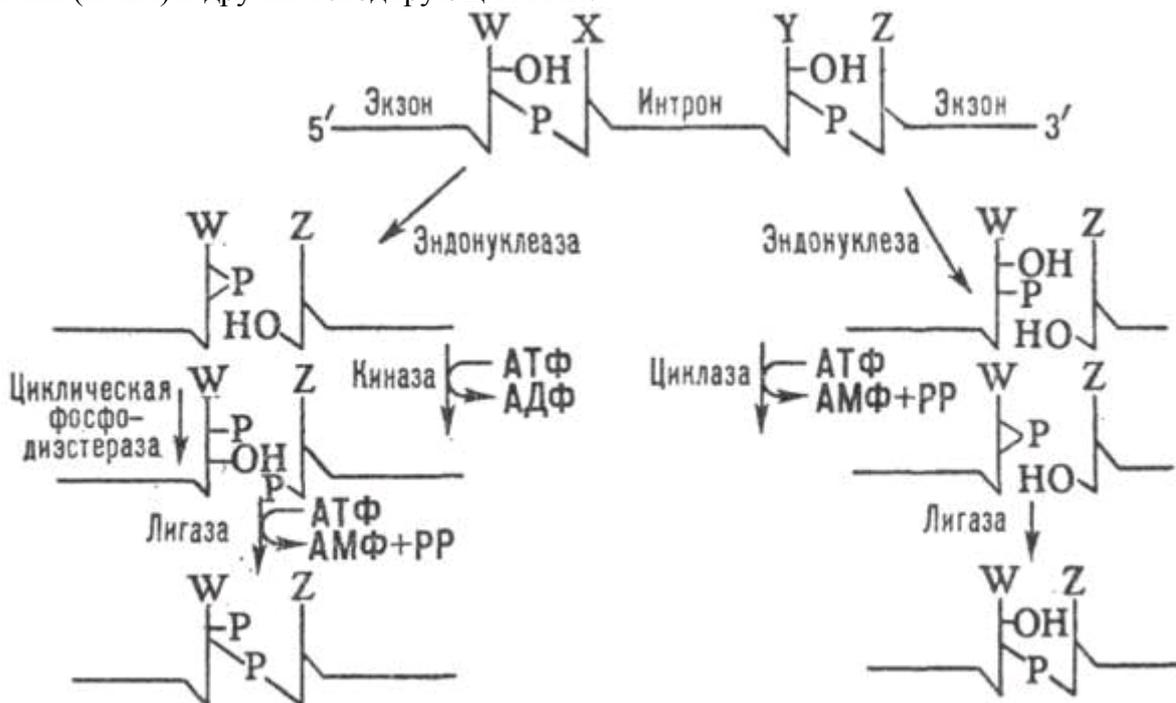
Ген представляет собой последовательность нуклеотидов ДНК размером от нескольких сотен до миллиона пар нуклеотидов, в которых закодирована генетическая информация о первичной структуре белка (число и последовательность аминокислот). Для регулярного правильного считывания информации в гене должны присутствовать: кодон инициации, множество смысловых кодонов и кодон терминации. Три подряд расположенных нуклеотида представляют собой кодон, который и определяет, какая аминокислота будет располагаться в данной позиции в белке. Например, в молекуле ДНК последовательность оснований ГАС является кодоном для аминокислоты метионина, а последовательность ТТТ кодирует фенилаланин. В молекуле иРНК вместо тимина (Т) присутствует основание урацил (У). Таблица генетического кода во всех руководствах представлена именно символами иРНК. Из 64 возможных кодонов смысловыми являются 61, а три триплета - УАА, УАГ, УГА - не кодируют аминокислоты и поэтому были названы бессмысленными, однако на самом деле они представляют собой знаки терминации трансляции.

### 3. Структура генов эукариот

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

### 4. Сплайсинг, химия сплайсинга, "конструктор РНК"

Сплайсинг (от англ. splice — сращивать или склеивать концы чего-либо) — процесс вырезания определенных нуклеотидных последовательностей из молекул РНК и соединения последовательностей, сохраняющихся в «зрелой» молекуле, в ходе процессинга РНК. Наиболее часто этот процесс встречается при созревании информационной РНК (мРНК) у эукариот, при этом путём биохимических реакций с участием РНК и белков из мРНК удаляются участки, не кодирующие белок (интроны) и соединяются друг с другом кодирующие аминокислотную последовательность участки — экзоны. Таким образом незрелая пре-мРНК превращается в зрелую мРНК, с которой считываются (транслируются) белки клетки. Большинство генов прокариот, кодирующих белки, не имеют интронов, поэтому у них сплайсинг пре-мРНК встречается редко. У представителей эукариот, бактерий и архей встречается также сплайсинг транспортных РНК (тРНК) и других некодирующих РНК.



Механизм сплайсинга пре-тРНК; W, X, Y, Z-пуриновые или пири-мидиновые основания; АДФ, АМФ, РР и Р-соотв. аденозиндифосфат, аде-нозинмонофосфат, пирозофосфорная к-та и остаток фосфорной к-ты.

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

### 5. Домены в структуре белка.

Домен белка — элемент третичной структуры белка, представляющий собой достаточно стабильную и независимую подструктуру белка, чей фолдинг проходит независимо от

остальных частей. В состав домена обычно входит несколько элементов вторичной структуры. Сходные по структуре домены встречаются не только в родственных белках (например, в гемоглобинах разных животных), но и в совершенно разных белках.

Достаточно часто доменам присваивают отдельные названия, так как их присутствие непосредственно влияет на выполняемые белком биологической функции — к примеру,  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий домен кальмодулина, гомеодомен, отвечающий за связывание с ДНК в различных факторах транскрипции и др. Так как домены достаточно «автономны» в формировании своей структуры и выполнении своей функции, с помощью генной инженерии можно «пришить» к одному из белков домен, принадлежащий другому (создав таким образом белок-химеру). Такая химера при удаче будет совмещать функции обоих белков.

### **6. Рекомбинация, "конструктор ДНК"**

Рекомбинация — процесс обмена генетическим материалом путем разрыва и соединения разных молекул. Рекомбинация происходит при репарации двунитевых разрывов в ДНК и для продолжения репликации в случае остановки репликационной вилки у эукариот, бактерий и архей. У вирусов возможна рекомбинация между молекулами РНК их геномов. Двойная спираль ДНК обычно не взаимодействует с другими сегментами ДНК, и в человеческих клетках разные хромосомы пространственно разделены в ядре. Это расстояние между разными хромосомами важно для способности ДНК действовать в качестве стабильного носителя информации. В процессе рекомбинации с помощью ферментов две спирали ДНК разрываются, обмениваются участками, после чего непрерывность спиралей восстанавливается, поэтому обмен участками негомологичных хромосом может привести к повреждению целостности генетического материала.

Рекомбинация позволяет хромосомам обмениваться генетической информацией, в результате этого образуются новые комбинации генов, что увеличивает эффективность естественного отбора и важно для быстрой эволюции новых белков. Генетическая рекомбинация также играет роль в репарации, особенно в ответе клетки на разрыв обеих цепей ДНК.

Самая распространённая форма кроссинговера — это гомологичная рекомбинация, когда принимающие участие в рекомбинации хромосомы имеют очень похожие последовательности. Иногда в качестве участков гомологии выступают транспозоны. Негомологичная рекомбинация может привести к повреждению клетки, поскольку в результате такой рекомбинации возникают транслокации. Реакция рекомбинации катализируется ферментами, которые называются рекомбиназы, например, Cre. На первом этапе реакции рекомбиназа делает разрыв в одной из цепей ДНК, позволяя этой цепи отделиться от комплементарной цепи и присоединиться к одной из цепей второй хроматиды. Второй разрыв в цепи второй хроматиды позволяет ей также отделиться и присоединиться к оставшейся без пары цепи из первой хроматиды, формируя структуру Холлидея. Структура Холлидея может передвигаться вдоль соединённой пары хромосом, меняя цепи местами. Реакция рекомбинации завершается, когда фермент разрезает соединение, а две цепи лигируются.

### **7. Иммунный ответ, иммуноглобулины**

Иммунный ответ — это сложная многокомпонентная, кооперативная реакция иммунной системы организма, индуцированная антигеном и направленная на его элиминацию. Явление иммунного ответа лежит в основе иммунитета. Иммунный ответ зависит от:

- антигена — свойства, состав, молекулярная масса, доза, кратность попадания, длительность контакта); — состояния организма (иммунологическая реактивность);
- условий внешней среды

Антитела (иммуноглобулины, ИГ, Ig) — это растворимые гликопротеины, присутствующие в сыворотке крови, тканевой жидкости или на клеточной мембране, которые распознают и связывают антигены. Иммуноглобулины синтезируются В-

лимфоцитами (плазматическими клетками) в ответ на чужеродные вещества определенной структуры — антигены. Антитела используются иммунной системой для идентификации и нейтрализации чужеродных объектов — например, бактерий и вирусов. Антитела выполняют две функции: антиген-связывающую функцию и эффекторную (например запуск классической схемы активации комплемента и связывание с клетками), являются важнейшим фактором специфического гуморального иммунитета, состоят из двух лёгких цепей и двух тяжелых цепей. У млекопитающих выделяют пять классов иммуноглобулинов — IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, различающиеся между собой по строению и аминокислотному составу тяжелых цепей.

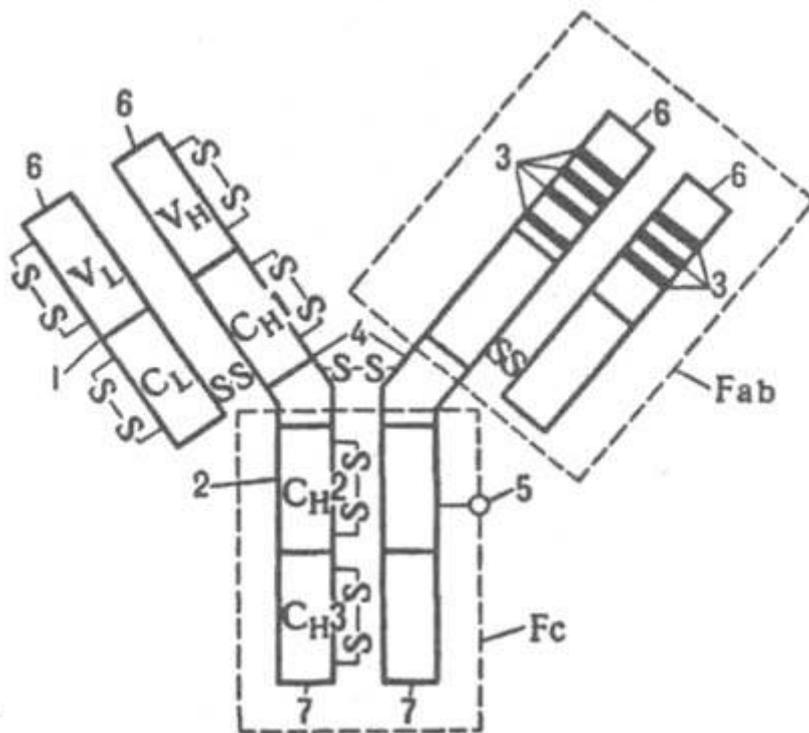


Рис. Схема строения иммуноглобулина G: 1 - легкая цепь; 2 - тяжелая цепь; 3 - гипервариабельные участки; 4 - шарнирная область; 5 - остаток олигосахарида; 6 - N-концы; 7 - C-концы;  $V_L$  и  $V_H$  - соотв. вариабельные домены легкой и тяжелой цепей;  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  и  $C_{H3}$  - постоянные домены тяжелой цепи; пунктиром обведены Fab- и Fc-фрагменты.

#### 8. "Конструктор ДНК и РНК", комбинаторика экзонов антител.

Экзон — это последовательность ДНК, которая представлена в зрелой РНК.

Зрелая РНК может образоваться в результате:

- удаления интронов из незрелой мРНК в процессе цис-сплайсинга
- или объединения и лигирования двух или более незрелых мРНК в процессе транс-сплайсинга.

Зрелая РНК может кодировать полипептид (мРНК) или выполнять некодирующие функции (входить в состав рибосомы, рРНК или участвовать в трансляции в случае тРНК). В зависимости от контекста, экзон может соответствовать и последовательности нуклеотидов ДНК и транскрипта РНК.

*Блин! Не знаю, ничего про комбинаторику!*

#### 9. Динамика генома, плазмиды - "генетические аксессуары". Особенности плазмид.

Плазмиды — дополнительные факторы наследственности, расположенные в клетках вне хромосом и представляющие собой кольцевые (замкнутые) или линейные молекулы ДНК. Плазмиды способны удваиваться (реплицироваться) автономно, но при этом они эксплуатируют репликационную систему клетки хозяина. Большинство плазмид кодирует специальные белки — инициаторы репликации. Эти белки начинают процесс репликации, который затем подхватывается и продолжается репликационной системой клетки.

Плазмиды широко используются в генной инженерии для переноса генетической информации и генетических манипуляций. Для этого создаются искусственные плазмиды — векторы, состоящие из частей, взятых из разных генетических источников, а также из искусственно созданных фрагментов ДНК.

Присутствие плазмид в клетках может быть объяснено преимуществами, которые дают плазмидные гены клетке-хозяину (возможность расти в присутствии антибиотика, использование более широкого круга субстратов, защита от бактериофагов, устранение конкурентов путем синтеза бактериоцинов) или же теорией эгоистичной ДНК, как в случае криптических плазмид (т. е. плазида поддерживается благодаря своей приспособленности к условиям внутри клетки).

#### **10. Вирусы - неживая материя. Примеры вирусов прокариот и эукариот. Ретровирусы.**

Вирус – супрамолекулярный химический комплекс, не являющийся живой субстанцией, но способный при попадании в клетку существенно влиять на её жизнедеятельность. Все вирусы несут определённый генетический материал, находящийся в виде одно- или двунитевых ДНК или РНК. Общей задачей всех вирусов является внедрение своего генетического материала в клетку, приводящее к синтезу специфических белков вируса. В дальнейшем эти белки способствуют образованию новых вирусных частиц, которые затем выходят из клетки, разрушая её мембрану. Специфические вирусы, атакующие бактерии, называют *бактериофагами*; они, как и плазмиды, нашли применение в генной инженерии. Механизм внедрения генетического материала вируса в геном клетки зависит от строения вируса. Если вирус содержит двунитевую ДНК, то, попадая в клетку, она участвует в процессе транскрипции точно также как ДНК клетки. В результате этого начинается синтез специфических белков вируса, которые зачастую могут выступать в роли праймеров, упрощая процесс транскрипции. Если вирус содержит однонитевую ДНК, то она, в первую очередь, участвует в процессе образования *репликативной формы ДНК* (дотраивания второй цепи); при этом исходная цепь называется *плюс-цепью*, а достроенная - *минус-цепью*. Затем на минус-цепи начинается выстраивание новых плюс-цепей, которые либо превращаются в новые репликативные формы ДНК, либо входят в состав новых вирусных частиц. РНК-содержащие вирусы могут иметь как плюс-, так и минус-цепи РНК. Отличие плюс-цепей состоит в том, что они могут выступать в качестве м-РНК для производства белков на рибосомах клетки. В обоих случаях новые цепи РНК выстраиваются на старых при помощи особого фермента *РНК-зависимой РНК-полимеразы (РНК-репликазы)*, которая либо синтезируется рибосомами на плюс-цепях, либо входит в состав вируса. Минус-цепи, выстраиваемые таким образом на плюс-цепях, участвуют в образовании новых плюс-цепей, при помощи которых синтезируются белки вируса или образуются новые вирусные частицы.

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

### **Лекция 10. Генетическая инженерия.**

#### **1. Анализ геномов.**

Анализ полного генома - Главной задачей, стоящей перед исследователями, и решению которой служит расшифровка всей последовательности ДНК, является выяснение всех аспектов жизнедеятельности того или иного организма, геном которого оказался полностью секвенированным. Решение этой задачи в полном объеме дело будущего, причем, наверное, отдаленного. Однако приближение к такому полному знанию лежит через постепенное выяснение основных принципов и особенностей функционирования

геномов. Необходимым этапом служит обнаружение *in silico* (т.е. на уровне ДНК) всех потенциальных белковых продуктов, составляющих протеом исследуемого организма. Далее необходимо каким-то образом определить функции этих еще гипотетических белков. Весьма заметную роль в таком познании выполняет сравнительный анализ этих белковых продуктов с уже известными.

## **2. Определение первичной структуры ДНК, автоматический синтез ДНК.**

Большие надежды в определении первичной структуры ДНК исследователи возлагают на физические, химические (синтез генов), генетические и другие методы, а также на методы выделения некоторых генов (или их фрагментов) из природных источников и синтеза генов на мРНК при участии фермента обратной транскриптазы. Для установления первичной структуры ДНК недавно предложен экспресс-метод, включающий применение двух ДНК-полимераз (из *E.coli* и из бактериофага Т4). Однако во всех этих случаях определяется структура небольшого участка ДНК, поэтому полная расшифровка первичной структуры ДНК генома человека ждет своего решения.

ДНК может быть выделена из любого биологического материала: из крови и других жидкостей организма, различных типов тканей и клеток, содержащих ядра. У человека ДНК чаще всего выделяют из лейкоцитов крови. Процесс выделения ДНК состоит из нескольких этапов: быстрый лизис клеток, удаление фрагментов клеточных органелл и мембран, ферментативное разрушение и экстрагирование белков, осаждение молекул ДНК в этаноле с последующим их растворением в буферном растворе. Оценку качества выделенной ДНК проводят на основании измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. В чистых образцах ДНК соотношение  $A(260)/A(280) > 1,8$ ; где  $A(260)$  и  $A(280)$  — оптическая плотность раствора при длине волны 260 и 280 нм, соответственно.

Для научных исследований ДНК не только выщеляют из биологического материала, но и получают синтетически при использовании ДНК-синтезаторов - приборов для автоматического синтеза ДНК. Принципиальное отличие процесса химического синтеза от биологического состоит в присоединении каждого нового нуклеотида к 5'-гидроксильному концу цепи, а не к 3'-концу.

## **3. Полимеразная цепная реакция.**

Полимеразная цепная реакция – способ воспроизведения генетического материала без участия векторов и клеток-хозяев. Для осуществления такой реакции необходимы два праймера и термостабильная ДНК-полимераза (выделяемая из термофильных микроорганизмов). Вначале исходную ДНК нагревают до 90<sup>1</sup> для разделения цепей, затем смесь охлаждают происходит присоединение праймеров, после чего на этих праймерах начинается синтез новых цепей. Многократное воспроизведение достигается повторением этой процедуры; каждый раз в промежутке между двумя праймерами образуется пара новых цепей, полностью идентичных исходным.

## **4. Рестриктазы. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.**

Рестриктазы – (ферменты, рестрикции), группа бактериальных нуклеаз, специфически расщепляющих ДНК. Предохраняют бактериальные клетки от чужеродных ДНК (напр., вирусных). Широко используются при определении первичной структуры ДНК, для картирования генов и в генетической инженерии для создания и клонирования гибридных молекул ДНК.

Рестриктазы подразделяют на 3 класса. К первому классу принадлежат ферменты (напр., EcoK из *Escherichia coli* K12), узнающие специфич. последовательность сайта, но разрывающие нить ДНК в произвольной точке (по-видимому, после образования комплекса с ДНК фермент неспецифически взаимодей. с удаленной областью ДНК или передвигается вдоль нити ДНК). Ко второму классу принадлежат ферменты (напр., EcoRI), расщепляющие ДНК в строго определенной точке по отношению к сайту узнавания. К третьему классу относят ферменты промежут. типа (напр., EcoPI), разрывающие нить ДНК в неск. точках на разном удалении от сайта узнавания.

Наиб. значение имеют рестриктазы второго класса, широко применяемые в генетической инженерии и при установлении структуры ДНК. Эти ферменты (мол. масса, рН оптим. каталитич. активности и рI значительно варьируют в зависимости от источника) расщепляют обе нити ДНК. При этом разрыв осуществляет иногда одна молекула рестриктазы в обеих нитях, иногда-две молекулы фермента (каждая атакует лишь одну нить, как, напр., EcoRI). В большинстве случаев 3', 5'-фосфодиэфирные связи в ДНК расщепляются с образованием 5'-фосфатов на месте разрыва молекулы (см. Нуклеиновые кислоты), лишь немногие рестриктазы (напр., NciI) образуют фрагменты с 3'-фосфатными группами. Все рестриктазы второго класса-Mg<sup>2+</sup>-зависимые ферменты. Для нек-рых рестриктаз (напр., EcoRI) установлена первичная структура.

Расщепление ДНК происходит обычно в пределах сайта узнавания, редко-на определенном расстоянии от него. При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами (см. рис.). Рестриктазы с одинаковыми сайтами узнавания наз. изошизомерами.

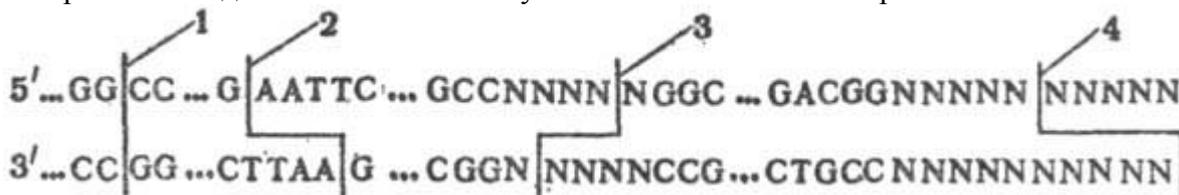


Схема расщепления ДНК разными рестриктазами: А, С, G и Т-соотв. дезок-сиаденозин, дезоксицитидин, дезоксигуанозин и дезокситимидин; N-любой дезоксинуклеозид, ферменты; 1-HaIII, 2-EcoI, 3-BglI, 4-HgaI.

Применение рестриктаз второго класса позволяет вырезать из ДНК определенные фрагменты, а также встраивать их в заданные места векторных молекул ДНК, т. е. направленно конструировать молекулы с новой генетич. информацией.

### 5. Дактилоскопия ДНК

ДНК-дактилоскопия или генетическая дактилоскопия представляет собой метод, используемый в судебно-медицинской экспертизе для идентификации лиц на основе уникальности последовательностей ДНК индивидуума. Метод был открыт в 1984 году британским генетиком Алемом Джеффрисом. Рассматривая рентгеновские снимки ДНК, он обнаружил, что ДНК разных людей имеют уникальные последовательности нуклеотидов. Последовательности ДНК конкретного человека составляют его ДНК-профиль или генетический паспорт, который можно использовать для идентификации личности. Составление ДНК-профиля человека (ДНК-профилирование) не следует путать с полной рашифровкой его генома.

Хотя 99,9% последовательностей ДНК человека совпадают по составу, тем не менее ДНК разных людей достаточно индивидуальны.<sup>[1]</sup> В ДНК-профилировании анализируется количество повторяющихся элементов в выбранном участке генома. Это количество называется тандемным повтором и является переменным. Чем больше участков генома (или локусов) анализируется при составлении ДНК-профиля, тем выше точность идентификации личности. В настоящее время число локусов для составления ДНК-профиля достигает 16 и более.

### 6. Клонирование. Примеры терапевтического клонирования.

Клонирование — метод получения нескольких генетически идентичных организмов путем бесполого (в том числе вегетативного) размножения.

Овца Дóлли — первое теплокровное животное, полученное из генетического кода другого взрослого существа путем клонирования.

Генетическая информация для процесса клонирования была взята из взрослых дифференцированных (соматических) клеток, а не из половых (гамет) или стволовых. Самого исходного животного (прототипа) на момент клонирования уже не существовало. А часть его клеток, необходимая для эксперимента, была своевременно заморожена и хранилась в жидком азоте чтобы сохранить и передать генетический материал. Сама

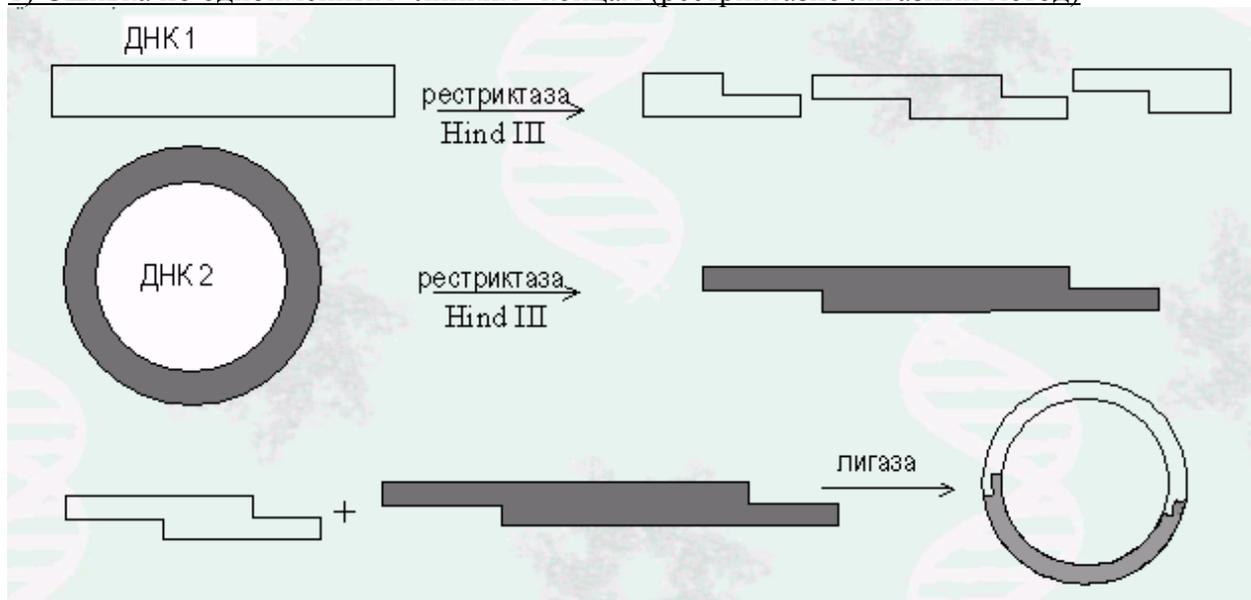
Долли стала самой известной овцой в истории науки. Она прожила 6,5 лет и оставила после себя 6 ягнят. Долли умерла в 2003-м году от эвтаназии.

### 7. Конструирование рекомбинантных ДНК.

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова "фрагмент ДНК" и "объединение *in vitro*", что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д.

Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

#### 1) Сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно лигазный метод)



#### 2) Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами



#### 3) Сшивка по "тупым" концам (коннекторный метод)

### 8. Генная инженерия - 4 основных этапа. Векторная ДНК, введение ДНК в клетку, клонирование, идентификация клонов.

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

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

нужный ген в чистом виде практически невозможно, поэтому в дальнейшие манипуляции вводится «грязный» образец.

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

Рассмотрим дальнейшие превращения на примере встраивания исследуемого гена в плазмиду pBR322, содержащую гены устойчивости к антибиотикам (ампициллину и тетрациклину). Под действием фермента, относящегося к группе *эндонуклеаз рестрикции* (ферменты, селективно расщепляющие нуклеотидную цепь в одном конкретном месте), такая плазида раскрывается на участке, ответственном за устойчивость к ампициллину. При этом образуется линейная молекула, имеющая так называемые *липкие концы* (однонитевые фрагменты d(pTrCpCpA)-OH), к которым легко может присоединиться нуклеотид, обладающий необходимым набором сопряжённых оснований. Если встраиваемый генетический набор получен химическим путём, то внедрение таких наборов на концах цепи не составляет труда; если же фрагмент был выделен из м-РНК (ДНК) клетки, то необходимые липкие концы образуются под действием фермента *дезоксинуклеотидил трансферазы*. После соединения липких концов, в результате действия ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы возникшие в ходе синтеза «дырки» зашиваются, образуется новая плазида, содержащая необходимый ген и называемая *рекомбинантной ДНК*. Полученные таким путём плазмиды внедряются в клетку-хозяина, где начинают реплицироваться.

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

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

## **9. Трансгенные организмы**

Трансгенный организм — живой организм, в геном которого искусственно введен ген другого организма.

Ген вводится в геном хозяина в форме так называемой «генетической конструкции» — последовательности ДНК, несущей участок, кодирующий белок, и регуляторные

элементы (промотор, энхансер и пр.), а также в некоторых случаях элементы, обеспечивающие специфическое встраивание в геном (например, т. н. «липкие концы»). Генетическая конструкция может нести несколько генов, часто она представляет собой бактериальную плазмиду или ее фрагмент.

Целью создания трансгенных организмов является получение организма с новыми свойствами. Клетки трансгенного организма производят белок, ген которого был внедрен в геном. Новый белок могут производить все клетки организма (неспецифическая экспрессия нового гена), либо определенные клеточные типы (специфическая экспрессия нового гена).

Создание трансгенных организмов используют:

- в научном эксперименте для развития технологии создания трансгенных организмов, для изучения роли определенных генов и белков, для изучения многих биологических процессов; огромное значение в научном эксперименте получили трансгенные организмы с маркерными генами (продукты этих генов с легкостью определяются приборами, например зелёный флуоресцентный белок, визуализируют с помощью микроскопа, так легко можно определить происхождение клеток, их судьбу в организме и т. д.);
- в сельском хозяйстве для получения новых сортов растений и пород животных;
- в биотехнологическом производстве плазмид и белков.

## 10. Генотерапия

Генотерапия — совокупность генноинженерных (биотехнологических) и медицинских методов, направленных на внесение изменений в генетический аппарат соматических клеток человека в целях лечения заболеваний. Это новая и бурно развивающаяся область, ориентированная на исправление дефектов, вызванных мутациями (изменениями) в структуре ДНК, или придания клеткам новых функций.

Новые подходы к генной терапии соматических клеток можно поделить на две большие категории: генная терапия *ex vivo* и *in vivo*. Разрабатываются специфические лекарственные препараты на основе нуклеиновых кислот: РНК-ферменты, модифицированные методами генной инженерии олигонуклеотиды, корректирующие генные мутации *in vivo* и т. д.

Существует несколько способов введения новой генетической информации в клетки млекопитающих. Это позволяет разрабатывать прямые методы лечения наследственных болезней — методы генотерапии.

Используют два основных подхода, различающиеся природой клеток-мишеней:

- фетальная генотерапия, при которой чужеродную ДНК вводят в зиготу или эмбрион на ранней стадии развития; при этом ожидается, что введенный материал попадет во все клетки реципиента (и даже в половые клетки, обеспечив тем самым передачу следующему поколению);
- соматическая генотерапия, при которой генетический материал вводят только в соматические клетки и он не передается половым клеткам.

## II часть Энзимология

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

Ферменты - высокоактивные белковые катализаторы.

Отличия ферментативного катализа:

- 1) Высокая активность (разница в скорости одной и той же реакции, катализируемой ферментом или небелковой частицей - например, протоном - может составлять 10-15 порядков).
- 2) Высокая селективность (ферменты обычно катализируют только один конкретный химический процесс).
- 3) Высокая эффективность (отсутствие побочных продуктов и дисбаланса «продукт-субстрат»).

Ферменты в химии:

- 1) Физическая химия исследует структуры белков и активных центров методами РСА, ЯМР, ЭПР, а также кинетику и механизмы действия ферментов.
- 2) Органическая химия - тонкий органический синтез, крупномасштабные синтетические процессы.
- 3) Аналитическая химия - иммуноферментный анализ, биолюминесцентный анализ, биосенсоры.
- 4) Неорганическая химия исследует поведение ионов металлов в активных центрах.
- 5) Химическая технология - производство лекарств, аминокислот и др. веществ.
- 6) Электрохимия - биоэлектрокатализ, то есть ферментативный катализ электродных процессов.
- 7) Коллоидная химия изучает белки как коллоидные частицы, а также поведение ферментов в обращённых мицеллах (мицеллярная энзимология).

### 2. Источники ферментов. Нахождение ферментов в природных объектах, локализация ферментов в клетке.

Микроорганизмы являются наиболее ценным источником ферментов в биохимии, поскольку

- 1) они имеют более высокие скорости роста;
- 2) их можно получить в больших количествах в ферментерах в контролируемых условиях, что экономически выгодно;
- 3) они осуществляют широкий спектр химических реакций;
- 4) их свойства можно легко улучшить с помощью методов генной инженерии

Некоторые ферменты выделяют из лекарственных растений (Дынное дерево— *Carica papaya* L., Канавалия— *Canavalia ensiformis* (L.) DC.)

Ферменты присутствуют во всех живых клетках и играют важнейшую роль во всех процессах жизнедеятельности.

В клетке фермент может находиться:

- 1) В свободном виде
- 2) Перисферический белок (фермент) – слабо присоединен к мембране
- 3) Интегральный – сильно взаимодействует с мембраной

Кроме того, некоторые ферменты имеют «якоря», позволяющие им находиться и в мембране и в цитоплазме.

### 3. Биосинтез ферментов. Посттрансляционная модификация. Сборка ферментов. Кофакторы и простетические группы.

Биосинтез белка — сложный многостадийный процесс синтеза полипептидной цепи из аминокислотных остатков, происходящий на рибосомах клеток живых организмов с участием молекул мРНК и тРНК. Биосинтез белка можно разделить на стадии транскрипции, процессинга и трансляции. Во время транскрипции происходит считывание генетической информации, зашифрованной в молекулах ДНК, и запись этой информации в молекулы иРНК. В ходе ряда последовательных стадий процессинга из иРНК удаляются некоторые фрагменты, ненужные в последующих стадиях, и происходит редактирование нуклеотидных последовательностей. После транспортировки кода из ядра к рибосомам происходит собственно синтез белковых молекул, путем присоединения отдельных аминокислотных остатков к растущей полипептидной цепи.

Сборка ферментов:

- 1) Сворачивание (при этом повышается стабильность)
- 2) Посттрансляционная модификация – это химическая модификация белка после его трансляции. После трансляции посттрансляционная модификация расширяет функциональный состав белка посредством дополнительного присоединения таких групп, как ацетатная (ацетилирование) или фосфатная (фосфорилирование) группы, а также липидов и сахаров (гликозилирование).
- 3) Встраивание кофакторов
- 4) Формирование активных центров.

Некоторые ферменты выполняют каталитическую функцию сами по себе, безо всяких дополнительных компонентов. Однако есть ферменты, которым для осуществления катализа необходимы компоненты небелковой природы. Кофакторы могут быть как неорганическими молекулами (ионы металлов, железо-серные кластеры и др.), так и органическими (например, флаavin или гем). Органические кофакторы, прочно связанные с ферментом, называют также простетическими группами. Кофакторы органической природы, способные отделяться от фермента, называют коферментами.

Фермент, который требует наличия кофактора для проявления каталитической активности, но не связан с ним, называется апо-фермент. Апо-фермент в комплексе с кофактором носит название холо-фермента. Большинство кофакторов связано с ферментом нековалентными, но довольно прочными взаимодействиями. Есть и такие простетические группы, которые связаны с ферментом ковалентно, например, тиаминпиродифосфат в пируватдегидрогеназе.

#### **4. Методы выделения биополимеров: особенности и трудности. Методы фракционирования белков. Хроматография, электрофорез и изоэлектрическая фокусировка. Критерии чистоты ферментных препаратов**

Основные трудности:

- 1) Большое разнообразие и незначительные различия в структуре
- 2) Низкое содержание фермента в исходном биоматериале
- 3) Высокая степень удерживания
- 4) Низкая стабильность
  - собственная
  - происходит отделение стабилизирующих факторов (мембраны)
  - повреждение молекулы (гидролиз цепи)
  - запуск действия активаторов (пероксиды)

##### **1) Методы фракционирования:**

1) Использование органических растворителей (ацетон, этанол) - понижение растворимости многих аминокислот и белков.

2) Использование минеральных солей - уменьшается электростатическое отталкивание одноимённо заряженных полиионов, что может приводить к осаждению некоторых компонентов.

- 3) Дробное осаждение.
- 4) Центрифугирование.
- 5) Гельфилтрация с использованием «молекулярных сит».
- 6) Диализ (отделение от низкомолекулярных компонентов при пропускании через полупроницаемые мембраны).
- 7) Ультрафилтрация.

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

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

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

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

На основании какого-то одного теста на гомогенность говорить о чистоте фермента можно лишь с какой-то долей вероятности. Эта вероятность увеличивается при использовании нескольких тестов и в этом случае фермент может быть признан чистым. Большинство тестов на гомогенность основаны на определении физических свойств белка. С помощью ультрацентрифугирования и гель-филтрации проводят дифференцировку по размеру молекул, а электрофорез и изоэлектрическое фокусирование позволяют дифференцировать белки по заряду. Если фермент имеется в большом количестве, его чистоту можно проверить по тесту растворимости. Существуют тесты, основанные на определенной каталитической активности фермента. На данный момент, можно получить фермент с более 99% чистотой.

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

Ковалентные связи - пептидная и дисульфидные мостики. Характерные значения энергий ковалентных связей (ΔG гидролиза): (-5) - (-30) кДж/моль.  $-CH_2-SH + HS-CH_2 \rightleftharpoons -CH_2-S-S-CH_2-$

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

Гидрофобные взаимодействия возникают за счёт перестройки системы водородных связей воды вблизи неполярной гидрофобной группы. Вода вытесняет гидрофобную молекулу или группу (А) в гидрофобную область белка.

Величина гидрофобного взаимодействия характеризуется величинами  $\Delta G = -RT \ln[A]_{\text{белок}}/[A]_{\text{вода}}$  или  $\pi = \lg([A]_{\text{белок}}/[A]_{\text{вода}})$  - константа гидрофобности Ганча. В пересчёте на одну  $\text{CH}_2$ -группу энергетический эффект гидрофобного взаимодействия составляет  $\Delta H = -0.57$  ккал/моль,  $T\Delta S = 0.34$  ккал/моль.

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

## **6. Уровни структурной организации белков: первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры, понятие о сверхвторичных структурах и доменах.**

Первичная структура белка - последовательность аминокислотных остатков, соединённых пептидными связями. В природных белках *Особенности пептидной связи* -  $\text{C-N}$  на 10% меньше, чем в других молекулах, вращение затруднено; преимущественно транс-<sup>R</sup> конфигурация. *Примеры аминокислот* (указан R): H (Gly - глицин),  $\text{CH}_3$  (Ala - аланин).

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

Известны два типа вторичных структур:  *$\alpha$ -спираль* (полипептидная цепь сворачивается в спираль за счёт водородных связей между аминогруппой и карбонильной группой, находящейся в четвёртом от этой аминогруппы пептидном фрагменте), *(P-складки)* (две полипептидные цепи связываются друг с другом; при этом возможны параллельная или антипараллельная).

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

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

Супервторичная структура – структура, полученная при взаимодействии  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\beta$ . Домен белка — элемент третичной структуры белка, представляющий собой достаточно стабильную и независимую подструктуру белка. Сворачивание домена в третичную структуру происходит независимо от других частей белка. Некоторые белки имеют 2 домена, причем активный центр находится на стыке этих доменов. Кол-во доменов можно определить с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии по количеству порогов.

## **7. Стабильность белков (ферментов). Денатурация и инактивация. Принципы стабилизации ферментов**

Ферменты стабильны при невысоких температурах (40-50 градусов) в диапазоне pH от 5 до 8. Денатурация белка – потеря белком (ферментом) специфических свойств вследствие нарушения пространственной структуры их молекул. Таким образом, скорость денатурации зависит от значения pH и температуры. Тепловая инактивация ферментов почти всегда является результатом денатурации белка. (наступает при  $T=70$ ) Процесс денатурации характеризуется высокой энергией активации.

Принципы стабилизации ферментов:

- 1) Иммобилизация
- 2) Химическая модификация
- 3) Стабилизация фермента кофакторами
- 4) Стабилизация солями
- 5) Стабилизация ферментов субстратом

## 8. Химическая модификация белков (ферментов). Виды ферментных препаратов.

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

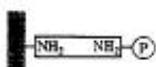
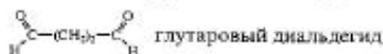
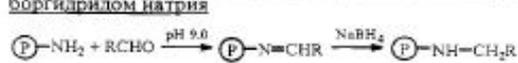
Химические модификации белков (используют для анализа или иммобилизации):

**N-концевая α-аминогруппа, ε-аминогруппа лизина**

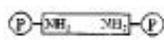
#### Имидозиферы



#### Альдегиды с последующим восстановлением боргидридом натрия

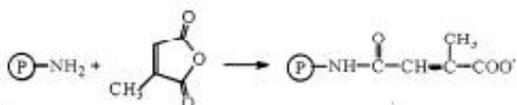


Иммобилизация на носителях, содержащих аминогруппу



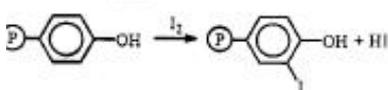
Получение конъюгатов белков

#### Ангидриды дикарбоновых кислот

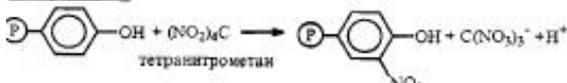


#### Тирозин

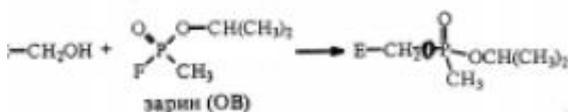
##### Иодирование



##### Нитрование



#### Ацетилхолинэстераза

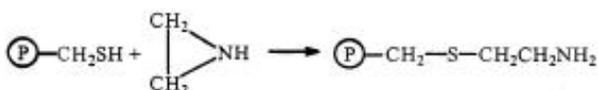


#### SH группа цистеина

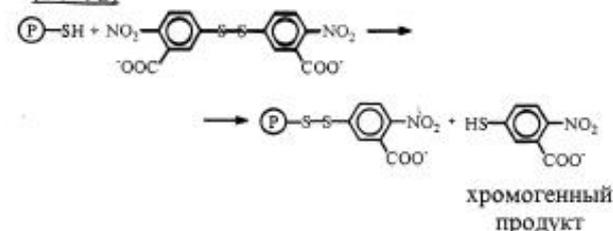
##### Бромуксусная кислота



##### Этиленимин

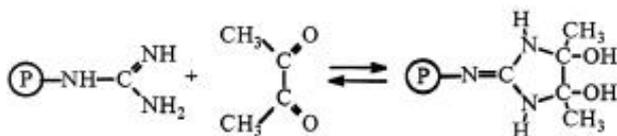


##### Реагент Элдмана - Дитиобиснитробензойная кислота (DNTB)



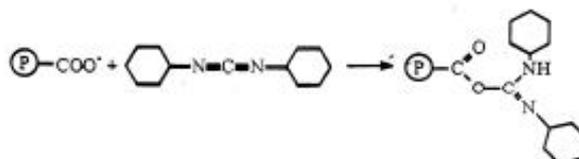
#### Гуанидиногруппа аргинина

##### Бутандион



#### Концевая карбоксильная группа, карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот

##### Дициклокарбодимид



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

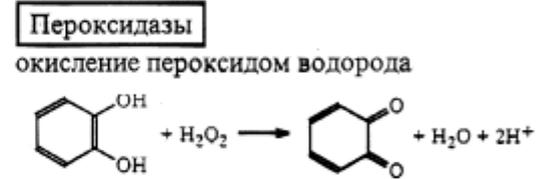
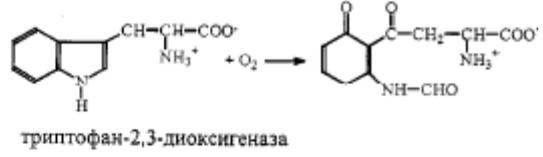
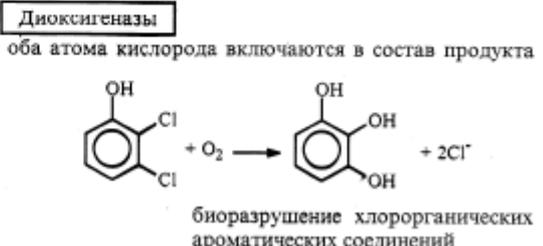
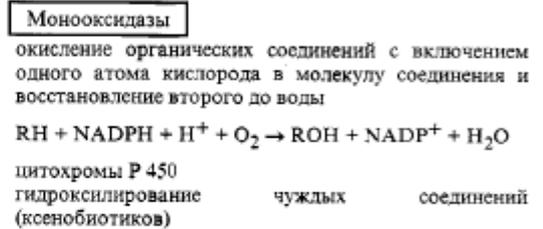
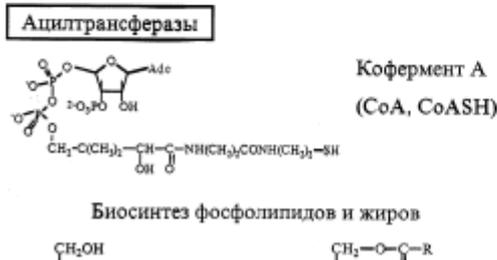
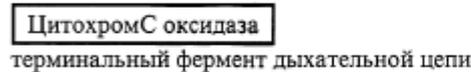
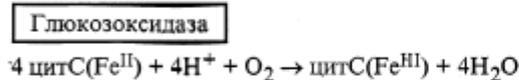
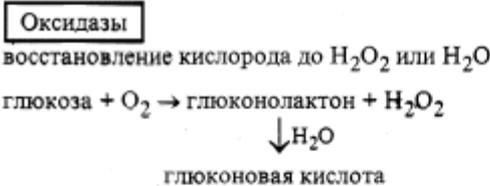
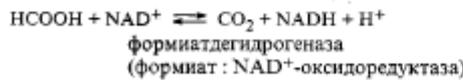
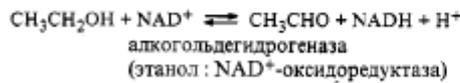
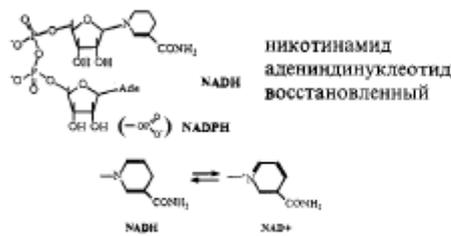
## 9. Классификация ферментов.

- КФ 1: Оксидоредуктазы, катализирующие окисление или восстановление. Пример: каталаза, алкогольдегидрогеназа
- КФ 2: Трансферазы, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяют киназы, переносящие фосфатную группу, как правило, с молекулы АТФ.
- КФ 3: Гидролазы, катализирующие гидролиз химических связей. Пример: эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза, липопротеинлипаза
- КФ 4: Лиазы, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов.
- КФ 5: Изомеразы, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата.

- КФ 6: Лигазы, катализирующие образование химических связей между субстратами за счет гидролиза АТФ. Пример: ДНК-полимераза

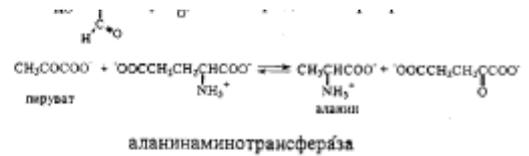
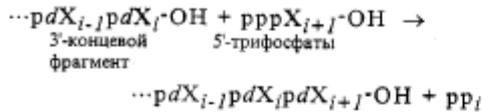
- 1) **Оксидоредуктазы** – катализируют окислительно-восстановительные реакции
- 2) **Трансферазы** – катализируют перенос радикала:  $XY + Z \rightarrow X + YZ$ ,  $Y = \text{Me, Ac, PO}_4$ .
- 3) **Гидролазы** – катализируют реакции гидролиза (активируют молекулы воды) эфиров карбоновых кислот, гликозидов,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

**NAD (NADP) зависимые дегидрогеназы**



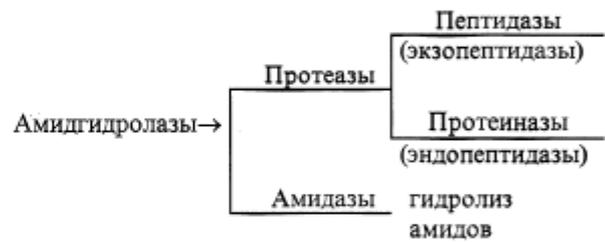
### ДНК-полимераза

Синтез цепи ДНК на матрице ДНК



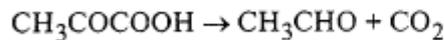
21

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



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

### Пируватдекарбоксилаза

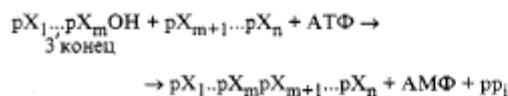


5) **Изомеразы** – катализируют реакции изомеризации.

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

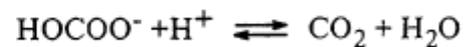
Реакции конденсации или присоединения, сопряжённые с гидролизом АТФ или ГТФ.

### РНК лигаза

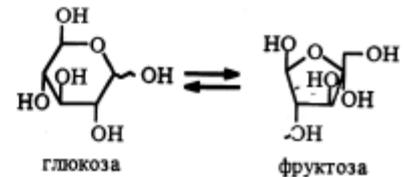
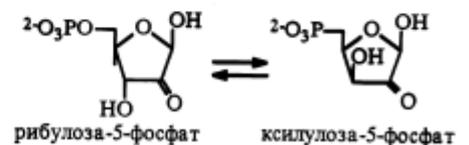


МЕХАНИЗМ

### Карбангидраза



- рацемазы
- эпимеразы



## 10. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Методы обработки экспериментальных данных.

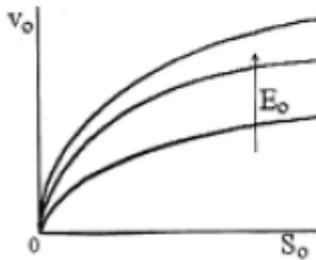
### 7. Стационарная кинетика ферментативных реакций. Методы обработки экспериментальных данных.

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

Схема Михаэлиса: предполагает, что реакция идёт по через обратимую стадию образования промежуточного продукта;  $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} X \xrightarrow{k_2} E + P$ . Система описывается уравнениями  $\frac{dX}{dt} = k_1 E S_0 - (k_{-1} + k_2) X$ ,  $v_0 = \frac{dP}{dt} = k_2 X$ ,  $E_0 = E + X$  – первые два уравнения являются обычными кинетическими уравнениями для реакций первого и второго порядков, а третье выражает условие материального баланса по ферменту. Записывая условие стационарности  $\frac{dX}{dt} = 0$ , находим  $k_1 E S_0 = (k_{-1} + k_2) X \Rightarrow E = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 S_0} X$ ,

22

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

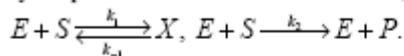


приходим к уравнению Михаэлиса-Ментен  $v_0 = \frac{k_2 E_0 S_0}{K_m + S_0}$ . При

$k_2 \ll k_{-1}$ ,  $K_m \approx \frac{k_{-1}}{k_1}$  – константа диссоциации промежуточного продукта (обычно фермент-субстратного комплекса). Для экспериментального определения параметров схемы Михаэлиса используют способ, представленный на рисунке;  $v_m = k_2 E_0$  – скорость реакции при  $S_0 \rightarrow \infty$ .

Схема Анри предполагает, что образование продукта

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



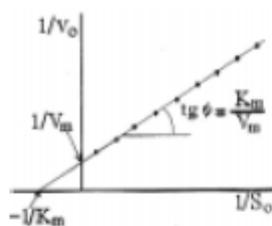
Система описывается уравнениями

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

$E_0 = E + X$ . Условие стационарности

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

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



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

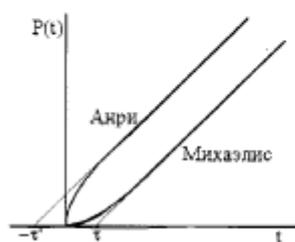
### 8. Дискриминация механизмов Михаэлиса и Анри.

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

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

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

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



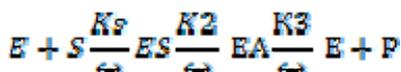
$$\tau = \frac{1}{k_1(S_0 + K_m)}$$

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

### 11. Кинетические схемы Михаэлиса и Анри, их дискриминация (см выше).

### 12. Трехстадийная схема ферментативного катализа. Константы скорости в элементарных стадиях ферментативного катализа. Лимитирующие стадии ферментативных реакций.

Трехстадийная схема ферментативного катализа описывается схемой:



$$V_0 = K_{kat} \cdot E_0 \cdot S_0 / (K_m + S_0)$$

$$K_{kat} = (K_2 \cdot K_3) / (K_2 + K_3)$$

$$K_m = (K_1 \cdot K_3) / (K_2 + K_3)$$

Кинетику процесса в стационарном режиме определяет самая медленная стадия (характеризуется наименьшей константой скорости). В этом случае

$$K_{kat} = K_{min} \text{ и } K_m = (K_1 \cdot K_{min}) / K_2$$

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

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

Лимитирующие стадии:

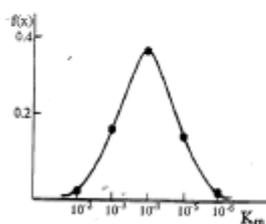
1) Диффузия (зависимость константы скорости от диффузии определяется уравнением

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

– коэффициент диффузии.

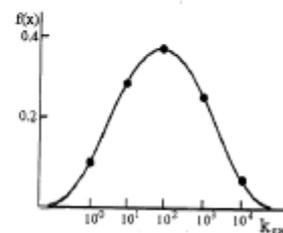
2) Изменение конформации.

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



Типичное значение

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



Типичное значение

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

13.

**Ингибирование ферментов. Обратимые и необратимые ингибиторы. Основы ингибиторного анализа.**

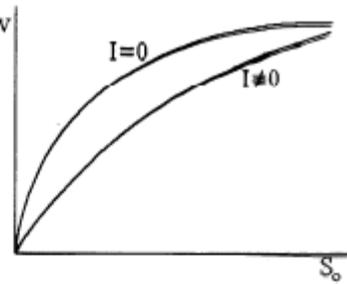
Необратимое ингибирование – образование прочной (не разрушаемой в условиях проведения катализа) химической связи ингибитора с функционально важными группами активного центра фермента. Необратимое ингибирование описывается схемой  $E + I \xrightarrow{k} EI$ . Считая  $I_0 \gg E_0$ , запишем кинетическое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

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

В процессе конкурентного ингибирования протекают реакции  $E + I \xrightleftharpoons{K_i} EI$ ,  $E + S \xrightleftharpoons{K_m} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$ ,  $E_0 \ll S_0$ ,  $E_0 \ll I_0$ . Величины  $EI$  и  $ES$  можно записать через константы равновесия соответствующих реакций  $EI = \frac{E \cdot I_0}{K_i}$ ,  $ES = \frac{E \cdot S_0}{K_m}$ ; тогда условие материального баланса по ферменту примет вид  $E_0 E + ES + EI = E \left( 1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} \right)$ . Скорость

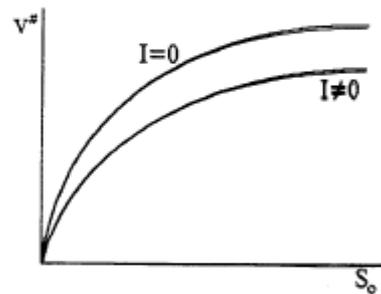
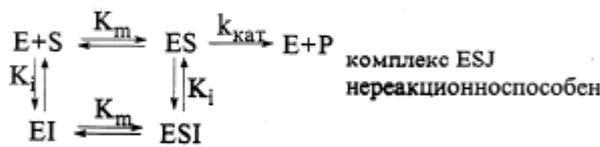
определяющей является стадия образования  $P$ , поэтому наблюдаемая скорость реакции определяется уравнением  $v$  первого порядка  $v_0 = \frac{dP}{dt} = k_{кат} ES = \frac{k_{кат} E \cdot S_0}{K_m} = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) S_0}$ .

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



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

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



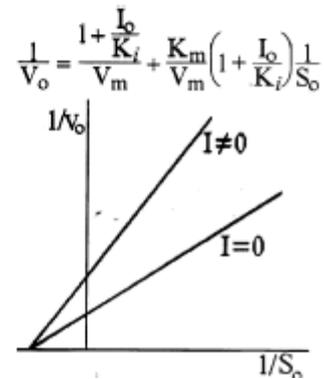
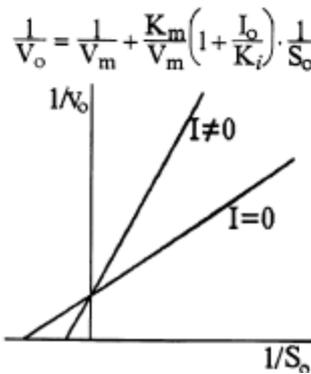
$$v_0 = \frac{k_{кат} S_0}{K_m} \frac{E_0}{1 + \frac{S_0}{K_m} + \frac{I_0}{K_i} + \frac{I_0 S_0}{K_m K_i}} = \frac{S_0 \frac{k_{кат} E_0}{1 + I_0/K_i}}{K_m + S_0}$$

Ингибитор влияет на скорость реакции, но не

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

Дискриминация

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



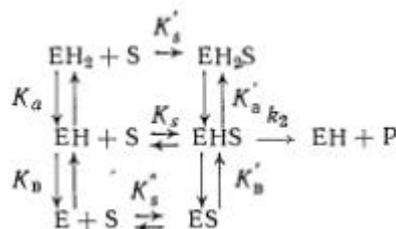
**14. Влияние pH на скорость ферментативной реакции, pH-зависимости кинетических параметров.**

В активных центрах фермента были обнаружены функциональные группы, способные присоединять или отщеплять ион водорода в области pH, оптимальной для проявления ферментативной активности. Возможность участия данной группы в процессе катализа существенно зависит от ее ионного состояния. Именно этим обуславливают наблюдаемую на опыте зависимость скорости ферментативной реакции от pH.

$$v = \frac{k_{кат} [E]_0 [S]_0}{K_{m(каж)} + [S]_0}$$

$$k_{кат} = \frac{k_2}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}}$$

$$K_{m(каж)} = K_s \frac{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}}{1 + \frac{[H^+]}{K'_a} + \frac{K'_b}{[H^+]}}$$



Анализ кинетической схемы ферментативной реакции типа формально сводится к подсчету концентрации активной формы  $f$  та исходя из выражений для констант диссоциации ионогенных его активного центра (или ионогенных групп фермента, контролирующих состояние активного центра). Для этой цели запишем, как с уравнение скорости:

$$v = k_2 [EHS],$$

уравнение материального баланса по ферменту (при  $[S]_0 \gg$

$$[E]_0 = [E] + [EH] + [EH_2] + [ES] + [EHS] + [EH_2S]$$

и выражения для констант равновесия:

$$\left. \begin{aligned} K_a &= \frac{[EH][H^+]}{[EH_2]}, & K'_a &= \frac{[EHS][H^+]}{[EH_2S]}; \\ K_b &= \frac{[E][H^+]}{[EH]}, & K'_b &= \frac{[ES][H^+]}{[EHS]}; \\ K_s &= \frac{[EH][S]}{[EHS]}. \end{aligned} \right\}$$

Анализ зависимости  $K_{кат}$  от pH позволяет найти значения констант диссоциации ионогенных групп фермент-субстратного комплекса ( $K^*_a$  и  $K^*_b$ ), в то время как анализ pH-зависимости эффективной константы скорости второго порядка  $K_{кат}/K_m$  приводит к константам диссоциации ионогенных групп свободного фермента ( $K_a$  и  $K_b$ ).

Если при связывании субстратом фермента константы диссоциации ионогенных групп не претерпевают изменений, следовательно, ионогенный процесс не оказывает влияние на сорбцию субстрата и константа Михаэлюса не зависит от pH. Тогда такой процесс аналогичен неконкурентному ингибированию и неконкурентной активацией. Если же активный центр фермента содержит группы, ионизация которых переводит фермент в неактивную форму, такой процесс будет аналогичен процессу конкурентного ингибирования.

## 12. Влияние pH на скорость ферментативных реакций.

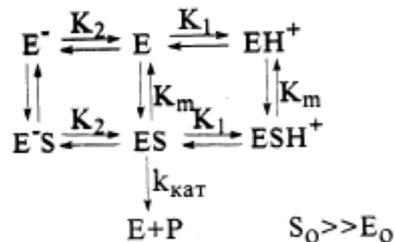
Ферментативные процессы, протекающие с участием протона, представлены на схеме.

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

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

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

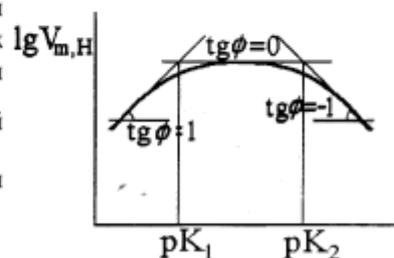
$$v_0 = \frac{dP}{dt} = k_{кат} ES = \frac{k_{кат} E \cdot S_0}{K_m} = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{(K_m + S_0) \left( 1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+} \right)}$$



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

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

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



## 15. Температурные зависимости скоростей ферментативных реакций. Термоинактивация ферментов.

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

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

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

Особенности ферментов, выделенных из термофильных организмов:

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

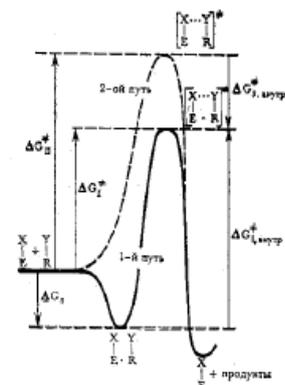
Одним из таких ферментов является гидрогеназа – белок, активирующий молекулу водорода. Он очень устойчив даже в кипящей воде и может быть использован в топливных элементах, системах биофотолиза воды, конверсии топлив, биокаталитического восстановления  $\text{CO}_2$ .

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

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

Выделяют 4 группы гидролаз:

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



4)

- 5) Высокая активность (разница в скорости одной и той же реакции, катализируемой ферментом или небелковой частицей - например, протоном - может составлять 10-15 порядков).
- 6) Высокая селективность (ферменты обычно катализируют только один конкретный химический процесс).
- 7) Высокая эффективность (отсутствие побочных продуктов и дисбаланса «продукт-субстрат»).

См. 17.

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

Предложено несколько объяснений высокой специфичности ферментов:

- 1) Концепция «ключ-замок» – характерное строение активного центра фермента, допускающее только соответствующий ему по строению субстрат.
- 2) Концепция «дыбы» – фермент активирует субстрат, растягивая и дестабилизируя связи.
- 3) Концепция индуцированного соответствия – только «отдельные» субстраты способны вызвать необходимые конформационные изменения в белке.

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

Цепи переноса заряда – к чему это??:

- 1) В свободном активном центре нуклеофил обладает низкой реакционной способностью, существенно ниже чем ОН<sup>-</sup> или алкоксильный ион.
- 2) В комплексе с высокоспецифичным субстратом фермента нуклеофил близок к

...алкоксильному иону

- 3) на стадии деацилирования в ацилферменте реакционная способность воды близка к реакционной способности гидроксид-иона

## **17 Физикохимические причины ускорения ферментативных реакций. Эффекты сближения и ориентации, усиление реакционной способности в ансамблях функциональных групп, эффекты среды. Теории ферментативного катализа.**

Ферментативный катализ обусловлен тремя основными причинами: во-первых, сорбция протекает так, чтоб облегчить последующую химическую реакцию, во-вторых, полифункциональным взаимодействием активного центра с субстратом, и, наконец, эффектами среды, характеристики которой (диэлектрическая проницаемость, полярность, вязкость) в пределах активного центра могут существенно отличаться от соответствующих показателей в водном растворе.

Среда активного центра обладает высокоразвитой микрогетерогенностью, где гидрофобные участки с исключительно низкой диэлектрической проницаемостью и полярностью чередуются с полярными участками с высоким электростатическим потенциалом. Эти эффекты способствуют многоцентровому взаимодействию фермента с молекулой субстрата.

Причины ускорения:

- 1) Сорбционные взаимодействия с белком боковых субстратных групп обеспечивают ускорение реакции на 7 порядков и более.
- 2) Полифункциональный катализ может привести к увеличению скорости на 3 порядка
- 3) Эффекты среды позволяют увеличить скорость на несколько десятичных порядков

Эффект сближения: в случае ферментного катализа сближение молекулы субстрата и каталитического центра достигается еще до начала стадии химического превращения, что понижает  $\delta G$  активации процесса. Движущей силой этого процесса является энергия сорбции субстрата.

Сорбция субстрата осуществляется функциональными группами белка, которые в дальнейшем не участвуют в химическом превращении. Кроме того, часто молекула субстрата атакуется одновременно несколькими каталитическими группами. Правильная ориентация достигается во многом благодаря геометрии и строению активного центра (расположен в складках цепи, гидрофобные карманы). К эффектам среды относятся пониженное значение диэл. Проницаемости и полярности (по сравнению с водой) и повышенное значение микровязкости.

## 18. Общий кислотно-основной катализ в механизме действия ферментов. Промежуточные соединения в ферментативном катализе.

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

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

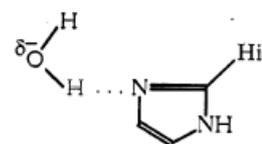
Примеры приведены на рисунках.

Применение:

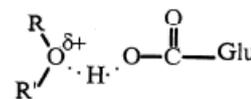
- 1) Увеличение реакционной способности атакующего центра.
- 2) Увеличение реакционной способности атакующих групп (цепи переноса заряда) – см. 13.
- 3) Использование быстрых реакций для оптимизации структуры переходного состояния.

17. Активные центры ферментов и механизмы катализируемых реакций. 4 группы гидролаз. Молекулярные механизмы действия  $\alpha$ -

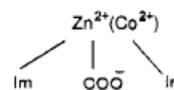
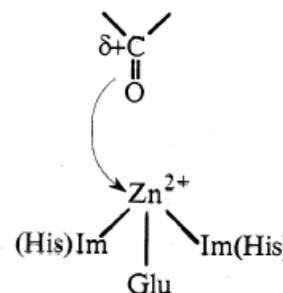
### Общий основной катализ



### Общий кислотный катализ

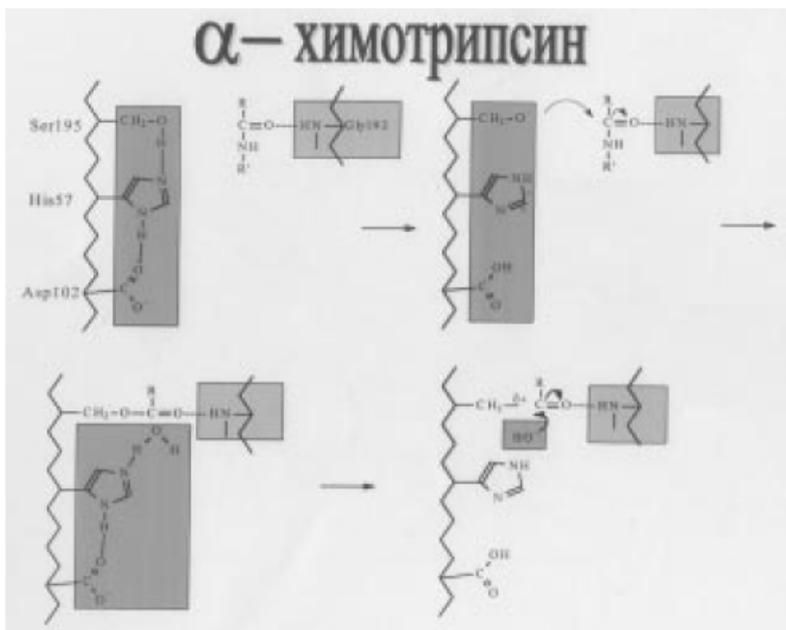


### Электрофильный катализ



электрофил

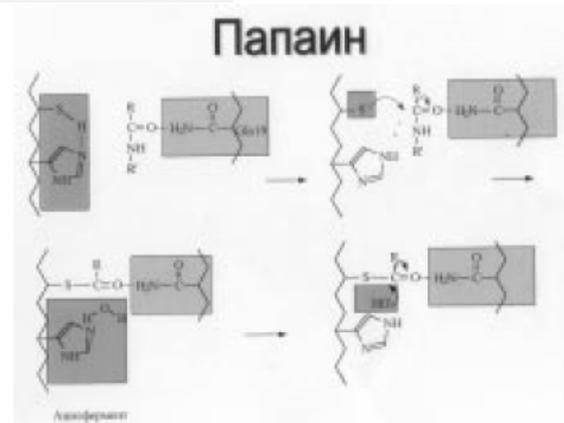
19. Активные центры ферментов и механизмы катализируемых реакций. Понятия о химических механизмах действия  $\alpha$ -химотрипсина, трипсина, эластазы, папаина, пепсина, лизоцима, карбоксипептидазы, рибонуклеазы, карбоангидразы.



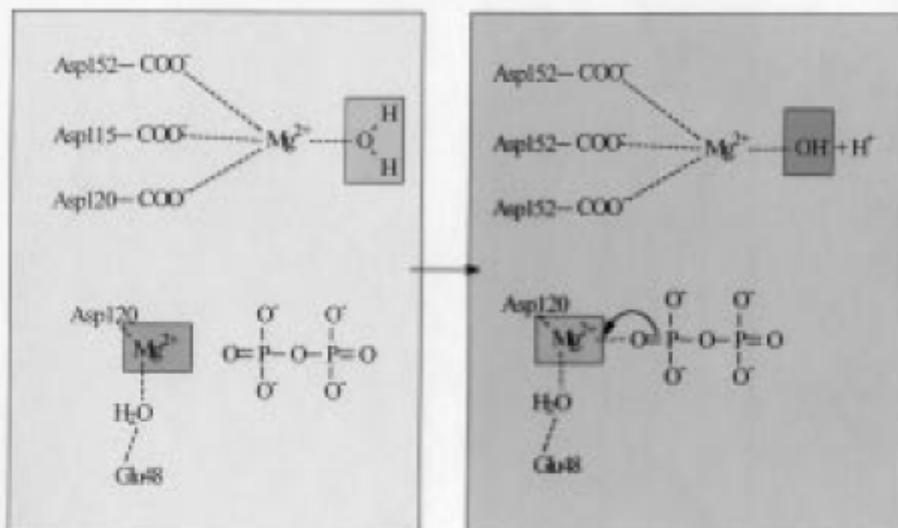
↑ + продукты

Диаграмма изменений стандартной свободной энергии по координате реакции:

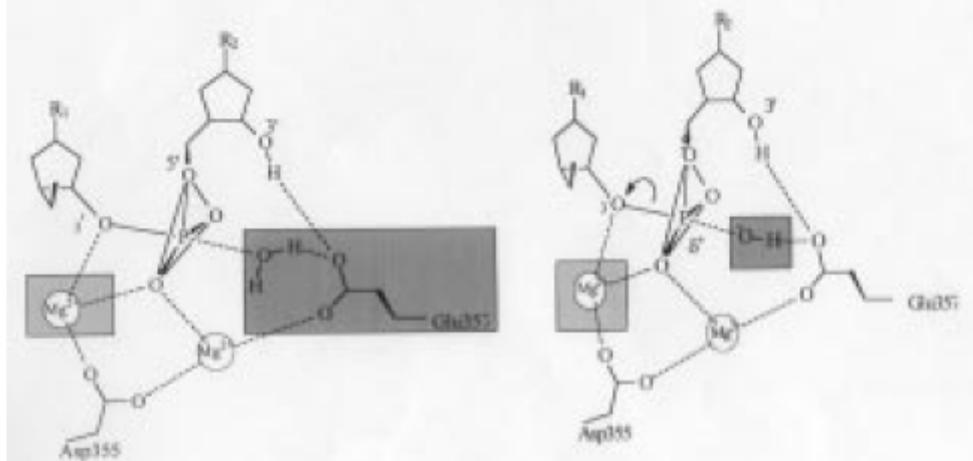
1-й путь — для процесса (2.1); 2-й путь — для (2.2); направление стрелок определяет знак величины свободной энергии (вверх — положительный, вниз — отрицательный)

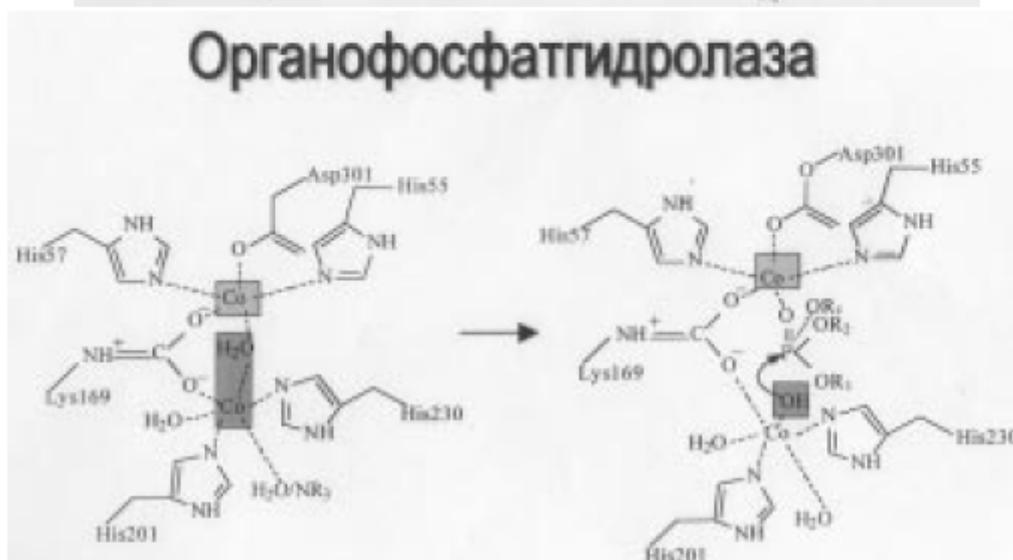
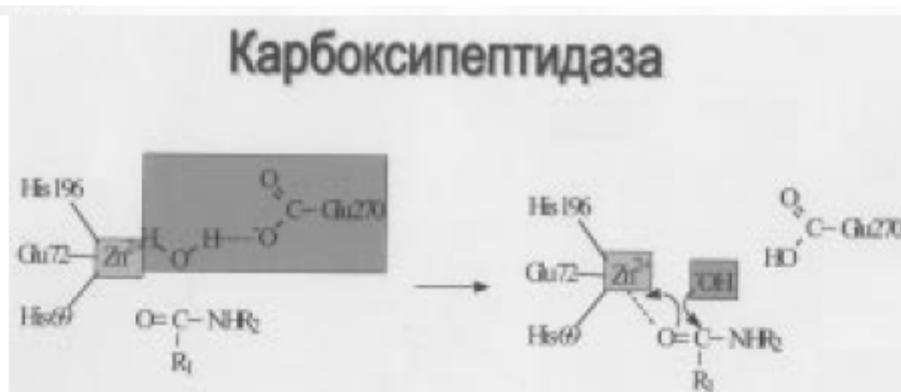


# Пирофосфатаза



# Эксонуклеаза





## 20. Прикладная энзимология, основные направления развития и области практического использования ферментов. Биоконверсия вещества и энергии.

### Основные направления инженерной энзимологии:

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

Биоконверсия состоит в получении из биомассы жидкого (этанол и др.) и газообразного (биогаз, водород) топлива, а также тепловой энергии, получаемой при биоокислении. Биоконверсия возобновляемого растительного сырья в топливо, кормовые и пищевые продукты, полупродукты для химической и микробиологической промышленности рассматривается в настоящее время как одна из ключевых отраслей биотехнологии. Для активации биоконверсии были использованы соли аскорбиновой кислоты и культуры кормовых дрожжей.

## 21. Имобилизованные биокатализаторы. Носители и методы иммобилизации. Основные характеристики иммобилизованных ферментов.

Иммобилизация - процесс создания гетерогенных катализаторов путем связывания ферментов с носителями различной химической природы. Таким образом, фермент из гомогенного катализатора превращается в гетерогенный.

Свойства:

- 1) Фермент можно легко отделить от продукта
- 2) Реакцию можно проводить в специальных технологических устройствах – химических реакторах
- 3) Имобилизация позволяет многократное использование фермента
- 4) Рост устойчивости фермента к тепловой денатурации
- 5) Носитель позволяет направленно менять окружение фермента и в известных пределах менять кинетические характеристики реакции (регулировать концентрацию ионов водорода в активном центре).

Носители делятся на 2 класса: природные и синтетические. К природным относят Полисахариды, производные целлюлозы, декстрана и агарозы. Гидроксильные группы полисахаридов подвергают химической модификации, вводя различные функциональные группы, обеспечивающие связь с ферментом (хемосорбция).

Синтетические носители: ионообменные смолы (Dowex, Amberlit), сополимеры стирола с дивинилбензолом, кварц, стекло, каолин, силикагели и т.д.

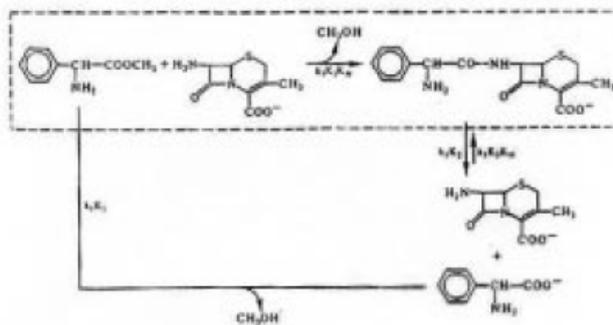
Ферменты иммобилизируют за счет сорбции с образованием ионных, водородных и гидрофобных связей, образования ковалентных связей фермент-носитель, включения в водонепроницаемые гели (с помощью акриламида) или микрокапсулы.

## 22. Использование ферментов в химическом синтезе. Принципы конструирования реакционных систем.

### 28. Ферменты в тонком органическом синтезе.

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

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



Для исследования кинетики ферментативных реакций обычно используют следующие идеальные модели реакторов, в которых не учитывается тепловыделение, градиенты концентраций на поверхности катализатора и др. эффекты:

- 1) Проточный безградиентный реактор (реактор идеального перемешивания) – замкнутый объем с ферментом, куда подается раствор субстрата и откуда отводятся продукты и непрореагировавшие вещества.
- 2) Проточный реактор идеального вытеснения – объем, равномерно заполненный ферментом, в который с постоянной скоростью подается раствор субстрата. При этом устанавливается постоянный градиент концентрации, который определяется скоростью подачи субстрата.
- 3) Мембранный реактор – массоперенос субстрата осуществляется через полупроницаемую мембрану постоянной толщины.

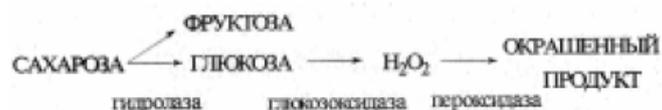
### 23. Использование ферментов в химическом анализе и медицинской диагностике. Иммуноферментный анализ. Биоломинесцентный анализ. Биосенсоры.

Основные направления:

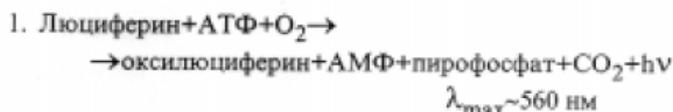
- 1) Ферменты как аналитические реагенты.
- 2) Иммуноферментный анализ.
- 3) Биоломинесцентный анализ.
- 4) Биосенсоры.

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

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



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



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

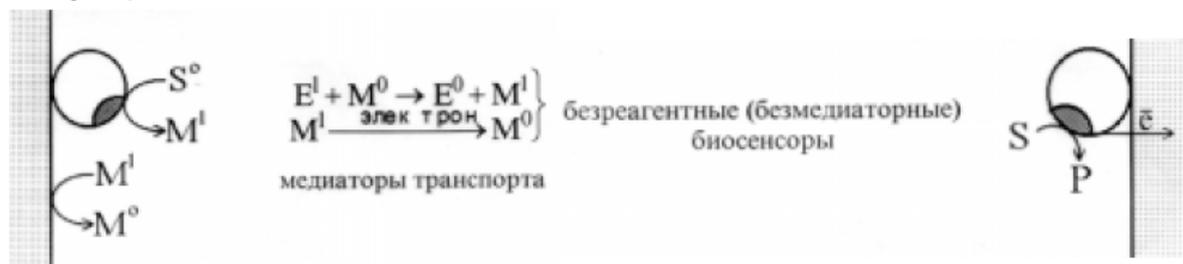


24.

получают продукт и по нему определяют количество фермента.

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

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



### 27. Промышленное получение и использование ферментов.

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

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

25.

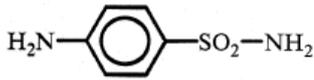
### 26. Ферменты в медицине. Лекарственные препараты на основе ферментов и их регуляторов.

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

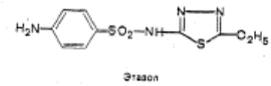
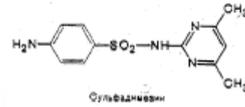
Причины заболеваний: нарушение синтеза клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, циклосерин); нарушение проницаемости цитоплазматической мембраны (полимиксины), нарушение синтеза РНК (рифампицин), нарушение синтеза белка на уровне рибосом (тетрациклины, левомицетин, макролиды, аминогликозиды).

Лекарственные препараты на основе ферментов:

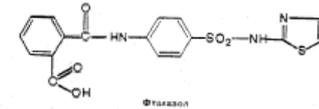
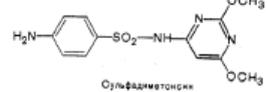
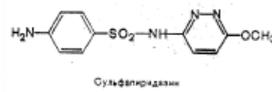
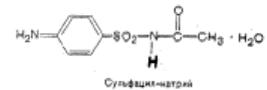
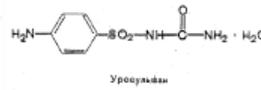
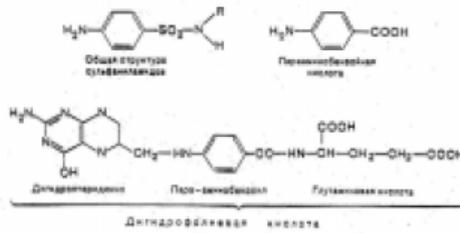
1) Сульфамидные препараты



производные сульфаниловой кислоты

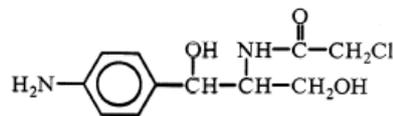


Нарушают синтез дигидрофолиевой кислоты

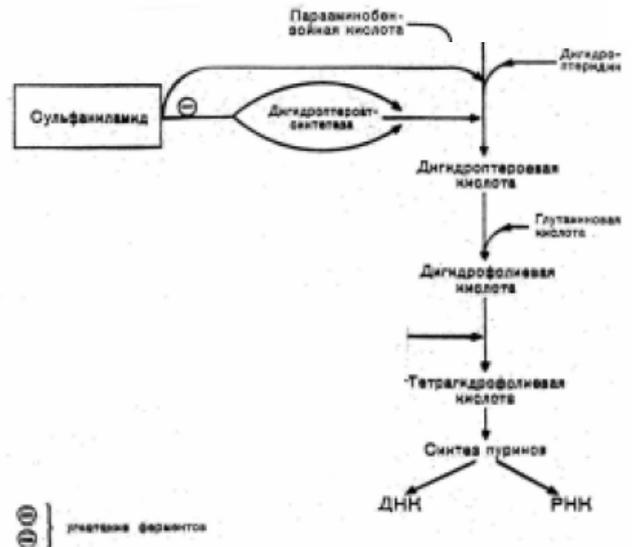


2) Левомицетин

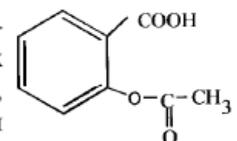
**Левомицетин**  
 (хлорамфеникол, хлороцид, хлоронитрин)



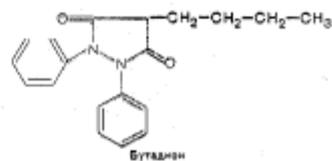
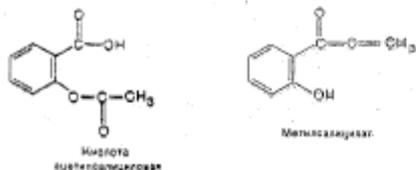
Блокирует рибосомальный синтез белка,  
 ингибирует фермент пептидилтрансферазу



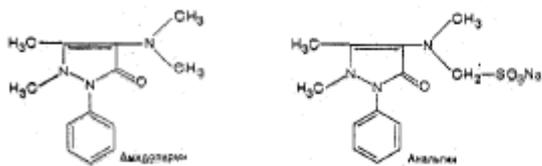
3) Ингибиторы простагландин-Н-синтетазы (простагландин-Н-синтетаза – РGH – катализирует синтез эйкозаноидов, стимулирующих сокращение гладкомышечной ткани, биосинтез стероидных гормонов, секрецию желудочного сока, агрегацию тромбоцитов, болевые реакции и воспалительные процессы)



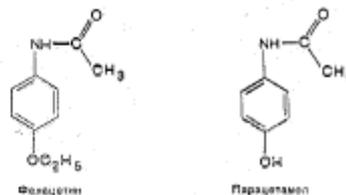
Производные салициловой кислоты



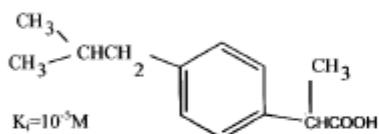
Производные имидазола



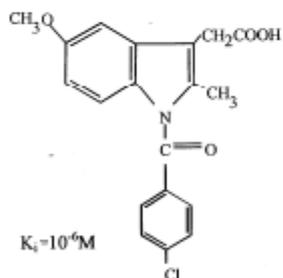
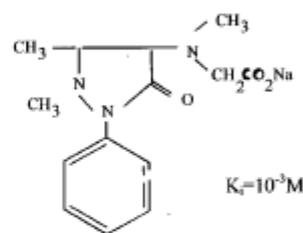
Производные анлина



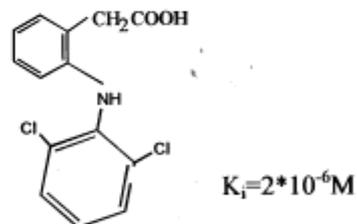
Аспирин – медленный необратимый ингибитор



Бруфен и анальгин – быстрые обратимые ингибиторы

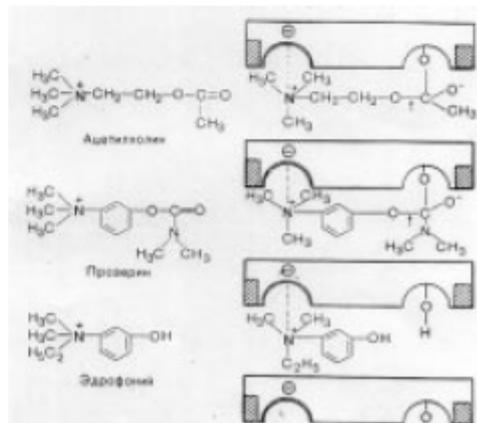


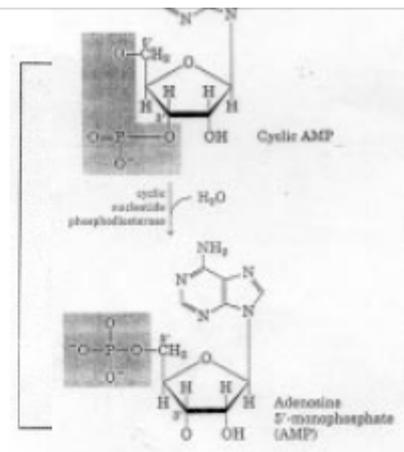
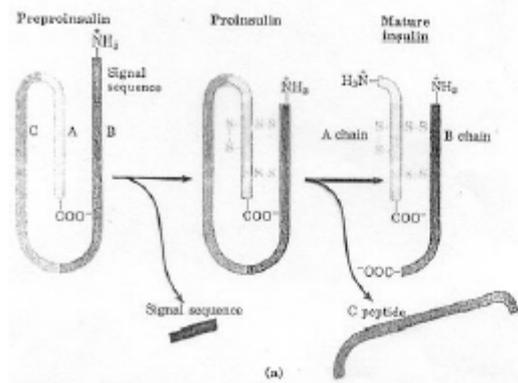
Индометацин и вольтарен – медленные обратимые ингибиторы



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

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

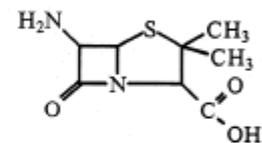




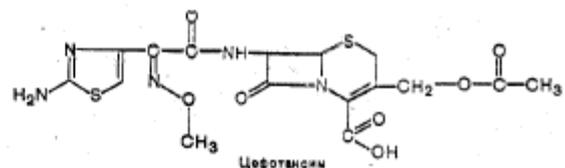
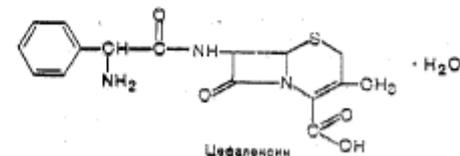
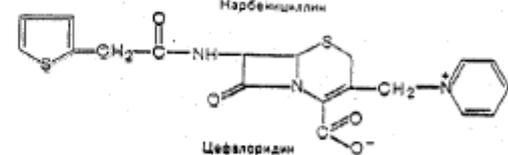
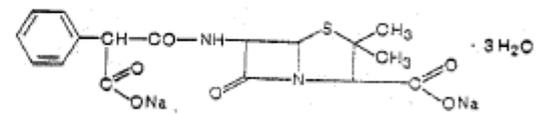
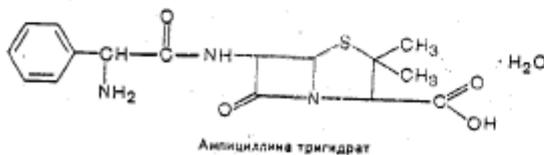
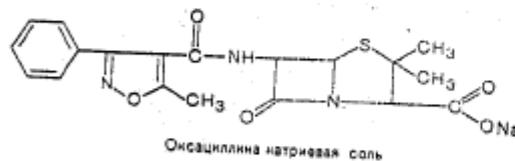
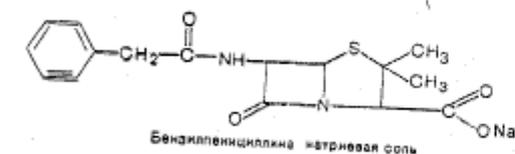
## 20. Нестероидные противовоспалительные препараты.

Антибиотики:

1) Пенициллины



6-аминопенициллановая кислота



2) Левометицин – см. 19.

## 27. Основные мишени действия лекарственных препаратов.

Основные мишени:

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

## 28. Ферменты антибактериального действия. Особенности строения клеточной стенки бактерий.

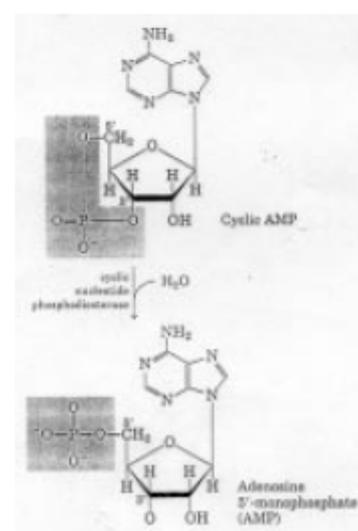
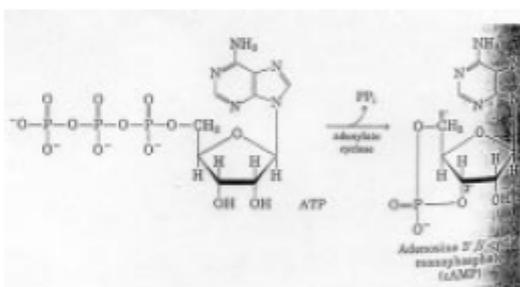
## 29. Транспорт в живых системах. Рецепторы и системы передачи сигнала. Понятие о гормональной регуляции.

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

33

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

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

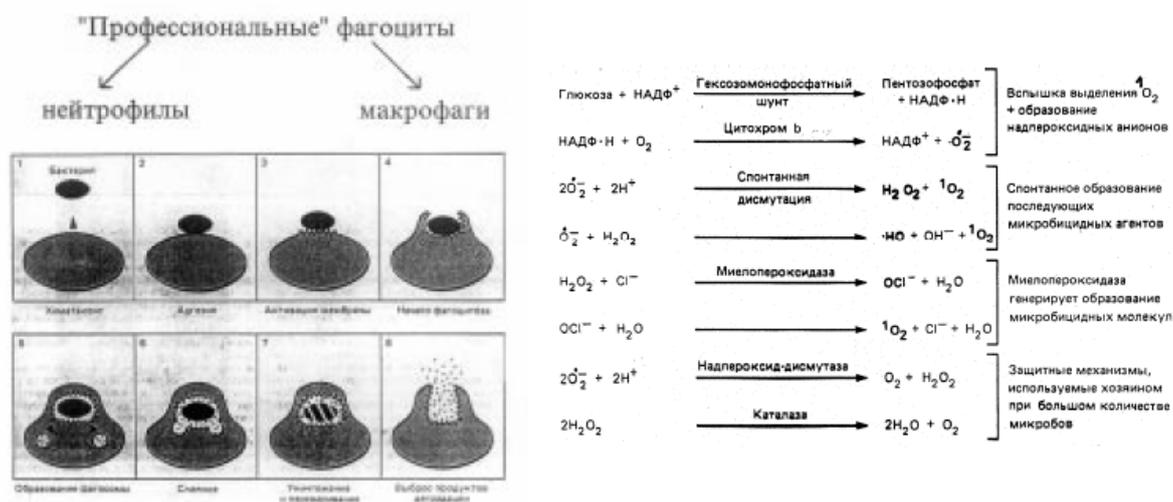


## 28. Механизмы обеспечения целостности организма и иммунитет.

### 22. Специфический и неспецифический иммунитет. Антитела.

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

Неспецифический иммунитет обеспечивается самими фагоцитами – макрофагами



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

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

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

### 29. Инженерия биокатализаторов и биокаталитических систем.

Биокатализаторы используют наравне с другими химическими катализаторами, только их действие, в отличие от классического химического катализа, основано на активности ферментов.

Биокаталитические системы привлекают внимание химиков благодаря их уникальным свойствам: в отличие от химических катализаторов, они действуют в мягких условиях и имеют исключительно высокую избирательность действия. Кроме того,

биокаталитические системы получают из возобновляемого сырья и представляют собой легко биodeградируемые в окружающей среде природные соединения. Благодаря таким особенностям, промышленная биотехнология рассматривается как экологически безопасная альтернатива традиционным химическим процессам, как элемент «зеленой химии» — новой стратегии развития химической индустрии.

Синтез мономеров с использованием биокаталитических систем микроорганизмов — одно из перспективных направлений развития промышленной биотехнологии. Получение мономера акриламида с помощью бактерий, обладающих нитрилгидратазной активностью, было первым успешным примером использования биокатализа для получения продуктов крупнотоннажной химии. Из всего многообразия мономеров, используемых сегодня в полимерной химии, два типа — акриловые мономеры (непредельные соединения) и молочная кислота (оксикислота) — наиболее привлекательны как объекты для биотехнологов. Именно применение биокаталитических систем для получения акриловых мономеров и молочной кислоты могло бы повысить качество получаемой продукции, а также обеспечить разработку экономически эффективных и конкурентоспособных технологий.

### **30. Современное состояние и тенденции развития химической энзимологии**

Химическая энзимология — это междисциплинарная область знаний, в рамках которой изучаются каталитические процессы, осуществляемые биологическими объектами — ферментами. Ферментативный катализ или биокатализ — ускорение химических реакций под действием ферментов. В основе функционирования различных живых объектов лежат многочисленные химические реакции расщепления питательных веществ, синтеза необходимых организмам химических соединений и трансформации их энергии в энергию разнообразных биохимических процессов (см. Рис. 1). Все эти реакции не могли бы происходить с необходимой для живых организмов скоростью, если бы в ходе эволюции не возникли механизмы их ускорения с помощью ферментативного катализа.

Химическая энзимология активно использует методы и подходы самых разных наук: химии, биологии и физики. Одновременно с этим химическая энзимология в свою очередь значительно обогащает новыми знаниями эти науки. Так, физическая химия и химическая кинетика являются основой изучения механизмов ферментативных реакций. Белок как макромолекула — предмет исследования полимерной химии и, в то же время, биохимии. Молекулярное моделирование предоставляет мощный, развитой аппарат для получения структур и изучения особенностей строения ферментов, а химическая энзимология в свою очередь даёт большую массу всевозможных объектов для исследований и дальнейшего развития этого аппарата. Использование ферментов для тонкого органического и энантиоселективного синтеза — вклад химической энзимологии в органическую химию.

На основе ферментов созданы широко применяемые в настоящее время аналитические методы, такие как иммуноферментный анализ и различные методы, использующие биосенсоры в качестве чувствительных элементов. Очевидно, что мицеллярная энзимология представляет интерес, как для коллоидной химии, так и для ферментативного катализа. Явление биоэлектрокатализа объединяет энзимологию и электрохимию. Во многих областях современной науки и практики ферменты находят место либо как объект исследования, либо как инструмент для осуществления тех или иных процессов.

Сегодня химическая энзимология является в высокой степени зрелой областью науки. Развитие знаний в этой области позволило расширить фундаментальное понимание не только химических, но и биологических процессов в живой природе. Области современного использования ферментов достаточно разнообразны: химический синтез сложных органических молекул, химический анализ, электрокатализ, фармацевтическая индустрия, пищевая промышленность, бытовая химия, сельское хозяйство, защита окружающей среды. Можно ожидать, что роль химической и инженерной энзимологии в будущем будет только возрастать.