



ХИМИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

# ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

КОПЫЛОВ АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ  
ЛЕВАШОВ АНДРЕЙ ВАДИМОВИЧ

ХИМФАК МГУ

—  
КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН  
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ  
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ  
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.  
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ  
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://VK.COM/TEACHINMSU).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ  
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,  
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,  
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ  
[VK.COM/TEACHINMSU](https://VK.COM/TEACHINMSU).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА  
СТУДЕНТКУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ  
**ЕРШОВУ МАРИЮ АЛЕКСЕЕВНУ**

---

## Оглавление

Лекция 1. Введение в химические основы биологических процессов.....	4
Лекция 2. Энергетические единицы живого.....	7
Лекция 3. Белки .....	14
Лекция 4. Биологические мембранны .....	21
Лекция 5. Информационные молекулы.....	27
Лекция 6. Биосинтез .....	32
Лекция 7. Действия с ДНК .....	38
Лекция 8. Структура ДНК .....	42
Лекция 9. Ген .....	47
Лекция 10. Биоинженерия .....	52
Лекция 12. Биохимические процессы с белками и ферментами .....	64
Лекция 13. Белки и ферменты .....	68
Лекция 14. Кинетика ферментативных реакций (часть 1) .....	75
Лекция 15. Кинетика ферментативных реакций (часть 2) .....	80
Лекция 16. Катализ и его виды .....	86
Лекция 17. Ферменты в биотехнологии .....	90
Лекция 18. Использование ферментов и каталитических процессов в биотехнологии.....	97
Лекция 19. Ферменты в медицине .....	101
Лекция 20. Сфера применения ферментов и их разнообразие .....	106
Лекция 21. Ферменты и их свойства в не водной среде .....	109

## Лекция 1. Введение в химические основы биологических процессов.

Внутренняя жизнь клетки – высокоупорядоченная сложная динамическая система, основанная на целесообразности поведения молекул.

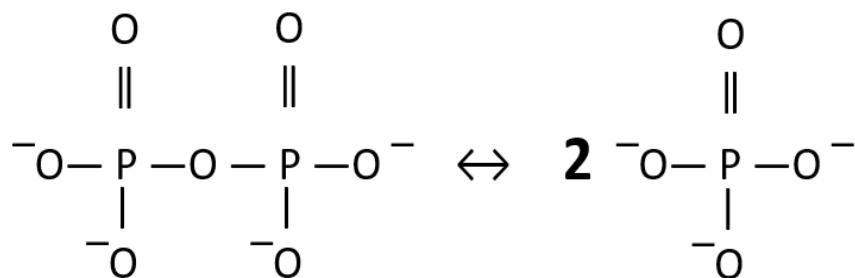
Системный подход (или сложно-системное мышление) – основан на том, что жизнь или живую клетку необходимо рассматривать не как некую сумму химических реакций, а как систему макромолекул.

В 2010 году Джон Крейг Вентер и его коллеги создали «синтетическую жизнь». Они взяли маленькую бактерию и убрали из неё ДНК. Далее учёные синтезировали свою новую ДНК длиной в полмиллиона нуклеотидов и индуцировали её обратно в бактерию. В результате они создали клетку с полностью новым синтетическим генетическим материалом. Таким образом, человечество впервые получило возможность менять свою биологическую сущность.

Прикладное значение химической биологии связано с развитием высоких технологий (hi-tech). Так, например, с помощью хай-тека можно бороться с отравлением угарным газом. Угарный газ попадает в эритроциты крови и связывается с гемоглобином. Гемоглобин содержит железо, которое имеет большее сродство с угарным газом (CO), чем с атмосферным кислородом ( $O_2$ ). В результате человек испытывает недостаток кислорода. Кислородные подушки в таком случае не помогают. Бороться с отравлением можно с помощью инъекции в кровь эритропоэтина, который участвует в дифференциации эритроцитов из стволовых клеток. В результате в крови организма образуются дополнительные эритроциты, которые связываются с кислородом. Основная задача биологической химии - выяснение химических принципов (ключевых) функционирования биологических систем

### Парадигма живого: порядок из хаоса за счёт энергии

Неравновесное стабильное состояние клетки происходит за счёт энергии химической связи:



#### *Пирофосфат*

#### *Фосфат*

Жизнедеятельность организма основана на том, что живое тело представляет собой химический реактор, который синтезирует и расщепляет фосфорную кислоту. За целый день клетки живого тела производят столько же пирофосфата и расщепляют его, сколько весит наше тело. Таким образом, главное отличие живого от неживого, в том, что живое создаёт динамическое равновесие в неравновесной системе (**гомеостаз**).

И так, основная функция **живого**:

**Гомеостаз** – способность **открытой системы** сохранять постоянство своего внутреннего состояния посредством скоординированных реакций, направленных на поддержание динамического устойчивого неравновесия.

Основные функции **жизни**:

**Размножение.** В результате деления клеток происходит их удвоение. Образуется популяция – совокупность особей/клеток одного вида, способная длительно существовать во времени и пространстве.

**Система** это -

- 1) Множество взаимосвязанных объектов и ресурсов, организованных в единое целое и противопоставляемое среде.
- 2) Совокупность сущностей (объектов) и связей между ними, выделенных из среды на определённое время с определённой целью. То есть система способна перегруппировываться: для одной цели она использует одни элементы, для другой цели – другие элементы системы.

Основные свойства **живого** определяются тем, что это система:

- 1) сложная (совокупность разных по строению и функции молекул),
- 2) открытая (обмен веществами, трансформация энергии),
- 3) динамическая (изменчивость),
- 4) адаптивная,
- 5) эволюционная.

### Сложная система

В системе существует **иерархия**: любой неэлементарный объект можно рассмотреть, как подсистему целого (к которому рассматриваемый объект относится), выделив в нём отдельные части и определив взаимодействия этих частей, служащих какой-либо функции. Так, например, для молекул элемент системы – это молекула, а надэлемент – комплекс молекул (Рис. 1). Свойства в системе неравноценны сумме свойств элементов.

Возникающие свойства: появляются как ответная реакция на внешние воздействия и на происходящие изменения в самой системе.

Сложные системы нелинейны (вероятностны) и редко развиваются по единственному и предсказуемому пути.

**Связи элементов:**  
**Материальные** (взаимодействуют друг с другом)  
**Информационные**

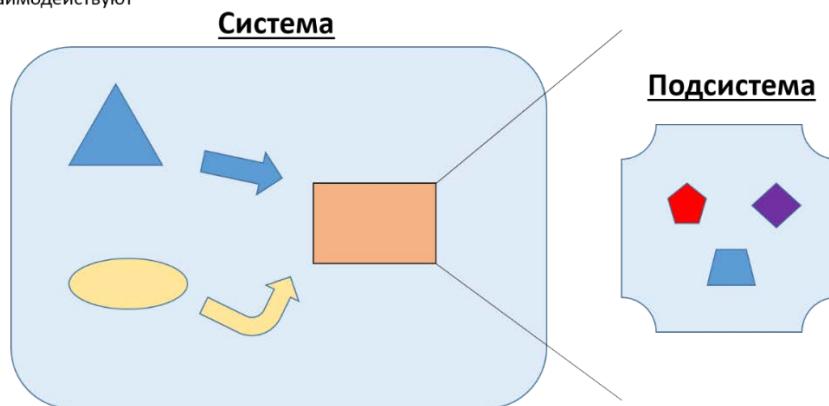


Рис. 1. Иерархия молекул в клетке

Закон необходимости разнообразия (**закон Эшби**): при создании проблеморазрешающей системы необходимо, чтобы система имела большее разнообразие, чем разнообразие решаемой проблемы, или была способна создать такое разнообразие.

Система должна обладать возможностью изменять своё состояние в ответ на возмущение; разнообразие возмущений требует соответствующего ему разнообразия возможных состояний.

### Открытая система

По термодинамической классификации выделяют *закрытые* и *открытые* системы.

*Закрытые системы* – изолированные системы, у которых отсутствует какой-либо обмен энергией, веществом и информацией с окружающей средой.

Среди закрытых систем выделяют *замкнутые* и *незамкнутые* системы. *Замкнутые* системы – обмениваются только энергией, но не обмениваются веществом, а в *изолированных* любой обмен исключён.

*Открытые системы* – системы, которые обмениваются энергией, веществом и информацией с окружающей средой. В открытых системах могут происходить явления самоорганизации, усложнения или спонтанного возникновения порядка.

## Лекция 2. Энергетические единицы живого.

Минимальная единица биологии – клетка, минимальная единица химии – атом, молекула

### Вводная часть по биологии

Живые организмы:

- 1) Многоклеточные
- 2) Одноклеточные



*Биомасса бактерий ~ Биомасса эукариотов*

*Биомасса растений >> Биомасса Животных*

Таблица 1. Разнообразие продолжительности существования различных живых существ

Растения	$4-5 \times 10^3$ лет
Рыбы/черепахи	$2 \times 10^2$ лет
Насекомые	$3 \times 10^{-3}$ лет (1 день)
Бактерии	$2 \times 10^{-6}$ (10 минут)

### Размер клетки

Большинство клеток имеет размер от нескольких десятых мкм до нескольких мкм. Малые размеры живых клеток определяются тем, что каждая клетка выполняет определённую химическую роль и происходит передача сигнала. У жирафа, у которого один нейрон имеет размер 4-5 м, передача импульса происходит медленно, так как малым молекулам для передачи сигнала необходимо преодолеть расстояние в 4-5 м. Таким образом, ограничение клетки в размерах обусловлено оптимальным осуществлением обмена веществ с помощью макромолекул и передачи сигнала.

Клеточная мембрана отделяет клетку от окружающей среды. Внутриклеточные мембранные делят клетку на **компартменты**, выполняющие специфические биологические функции. Клетка бактерии имеет только 1 компартмент. У клеток животных и растений – несколько компартментов: ядро, митохондрии, хлоропласты (у растений).

## История развития клеток

3,5 млрд лет назад – появилась первая живая клетка (**прогенота**), 2,4 млрд лет назад - клетки, способные к фотосинтезу (продукция глюкозы за счёт энергии фотонов света)

1,6 млрд лет назад - эукариотические клетки

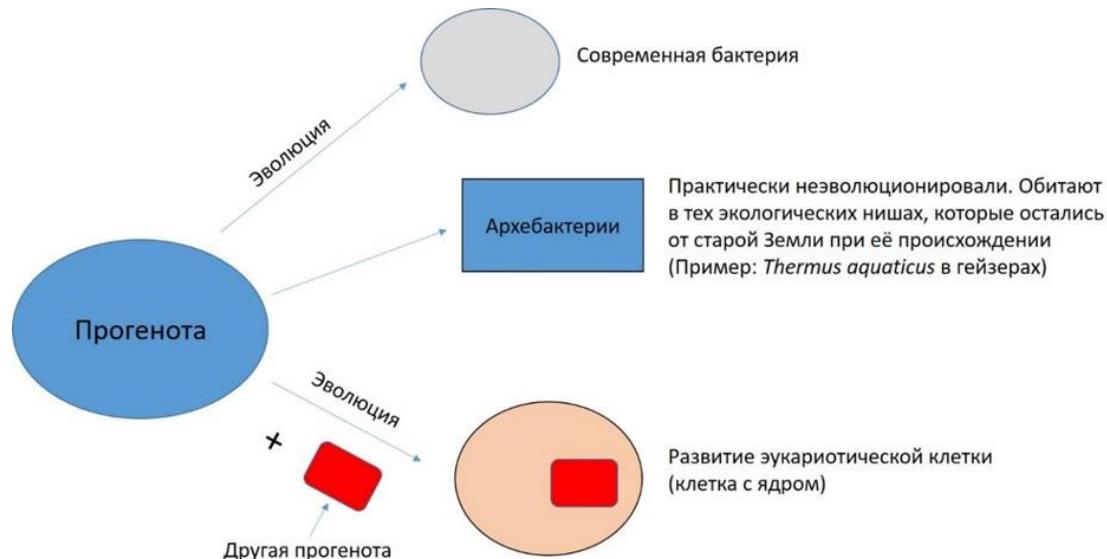


Рис. 2. Развитие прогеноты

Эндосимбиотическая гипотеза эволюции трёх доменов объясняет появление в клетках митохондрий и хлоропластов, которые имеют собственный генетический материал, путём съедения клеткой-предшественником бактерий, способных к синтезу пирофосфата/фотосинтезу (Рис. 3)

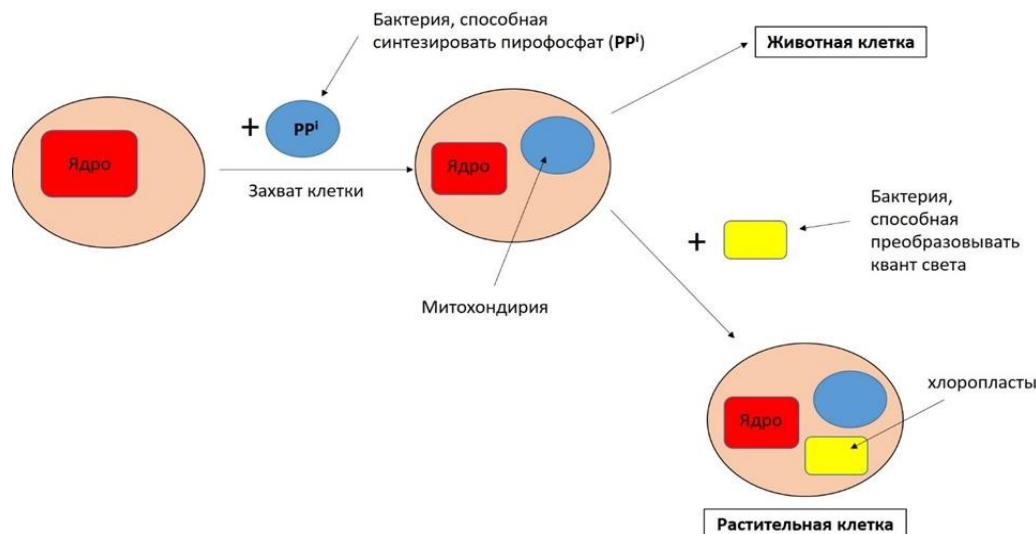


Рис. 3. Эндосимбиотическая теория

Подводя итог, дадим общее определение живому:

Живое – это сложная система, которая открыта (т.е. обменивается с окружающей средой веществом и преобразует энергию), саморегулируется и самовоспроизводится; для её функционирования критичны молекулы воды, липидов, белков и нуклеиновых кислот.

Единица живого – это **клетка**

**Клетка** – ограниченная активной мембраной, упорядоченная, структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и др.) и их молекулярных комплексов, участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

### Химическая биология

Единообразие структурной и функциональной химии живого: «Что справедливо для слона – справедливо и для бактерии» (Жак Люсьен Моно). Другими словами, некоторые молекулы, ферменты у различных организмов имеют одинаковую структуру и одинаковый механизм действия.

### Типы и энергия химических связей

В живой клетке нековалентных связей значительно больше чем ковалентных. Это связано с динамичностью живой системы, перегруппировкой молекул.

**Ковалентная связь** - химическая связь, образованная перекрытием пары валентных (находящихся на внешней оболочке атома) электронных облаков. Ковалентная связь прочная и требует большого количества энергии для разрыва связи.

**Нековалентная связь:** намного слабее ковалентной связи.

#### 1) Ван дер Ваальсовы взаимодействия

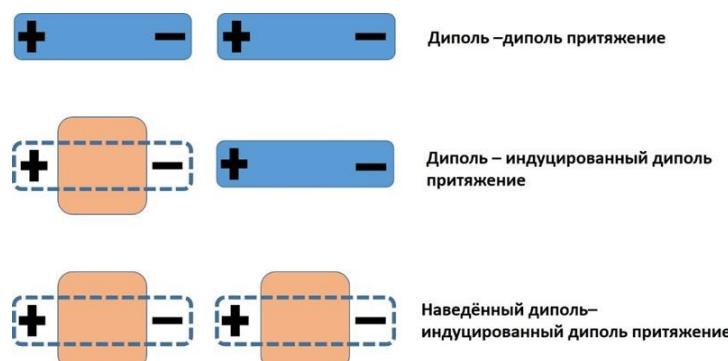
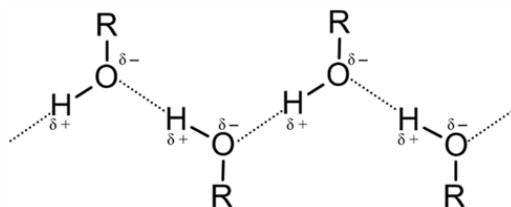


Рис. 4. Разные виды Ван дер Ваальсовых сил

2) **Водородная связь** - связь, образованная между электроотрицательным атомом и атомом водорода H, связанным ковалентно с другим электроотрицательным атомом (Рис. 5). В качестве электроотрицательных атомов могут выступать N, O или F.



*Рис. 5. Схема водородной связи*

**Кулоновские взаимодействия** - взаимодействие двух зарядов.  $F = \frac{k * q_1 * q_2}{r^2}$ ;  $k = \frac{1}{4\pi\xi}$ .

Взаимодействие сильно зависит от среды. Так, сила взаимодействия будет сильно различаться в полярной среде (воде) и гидрофобной среде (белок).

### Почему именно реакция пирофосфатной связи используется клеткой для получения и затраты энергии?

Амиды и пептиды, эфиры – стабильные соединения. Уксусный ангидрид, наоборот, высокореактивен. Пирофосфат является промежуточным по значению энергии реакции гидролиза. Так, пирофосфат не требует большого количества для синтеза, однако может и вступать в обменные реакции. Таким образом, пирофосфатная связь – компромисс между высокой реактивной способностью и относительной стабильностью.

### Необычные свойства водных растворов

1) Необычные свойства воды – определены **присутствием водородной связи**. Жидкая вода представляет собой идеальную трёхмерную структуру, образованную за счёт водородных связей. При кристаллизации воды (образования льда) рушится идеальная трёхмерная структура воды, упаковка становится менее плотной, чем у жидкой воды. Поэтому лёд в воде всплывает на поверхность, хотя кристаллы других веществ преимущественно тяжелее жидкости и наоборот оседают на дно. Температура кипения жидкой воды высокая так же за счёт водородной связи, которая требует дополнительную энергию для разрыва.

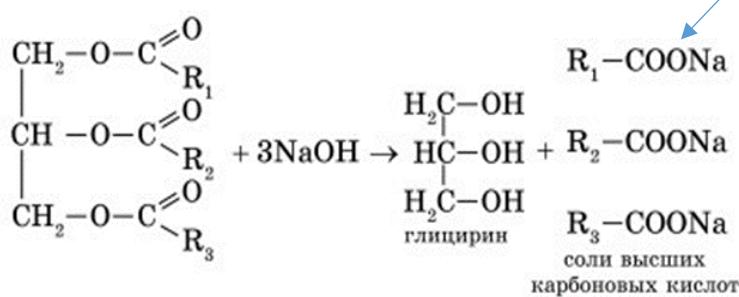
2) **Гидрофильные взаимодействия** – водородные связи воды с растворённым веществом. Например, гидроксил (-OH) короткого спирта заменяет гидроксил в воде и вклинивается в матрицу воды, оставшийся углеродный радикал расталкивает молекулы воды в матрице, что нарушает энтропию в воде. Встраивание всё же происходит, за счёт того, что энтропийный эффект теплового взаимодействия гидроксильной группы спирта компенсирует нарушение энтропии в матрице воды.

3) **Электростатические взаимодействия с заряженным веществом**. Например, NaCl растворяется в воде вследствие того, что энергия гидратации ионов натрия и хлора выше

энергии их взаимодействия в кристалле. Вокруг ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  образуются гидратные оболочки разной структуры, так как с катионом реагирует кислород в молекуле воды, а с анионом водороды в молекуле воды.

#### 4) «Гидрофобные эффекты» для неполярных веществ.

В случае, если энтропийный эффект теплового взаимодействия групп, встраивающейся в матрицу воды, не компенсирует нарушение энтропии в матрице воды, появляются гидрофобные эффекты. Так, например, короткий спирт растворяется в воде, а спирт с длинной углеродной цепочкой уже не растворяется. Гидрофобный эффект возникает, когда несколько молекул выталкиваются водой. Молекулы слипаются друг с другом, так как площадь слипнувшихся молекул меньше суммы площадей каждой молекулы по отдельности.



**МЫЛО** - амфи菲尔ное соединение. Есть гидрофобный углеродный участок и гидрофильный участок  $\text{COO}^-$ . Имеет конусовидную форму, в воде собираются в цилиндры за счёт гидрофобного эффекта

**Как происходит стирка:** к одежде с жировым пятном добавляют мыло ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ).

Гидрофобные участки молекул мыла ориентируются к жировому пятну (гидрофобный эффект), а карбокислотные группы ориентируются наружу – образуется мицелла. Далее одежду отбивают, трут на тёрке механически удаляя мицеллы с жиром.

### Макромолекулы

**Макромолекула** – химическое соединение, молекулы которого состоят из большого числа повторяющихся звеньев (структурных звеньев).

**Мономер** – низкомолекулярное вещество, из которого полимеризацией (или поликонденсацией) получается макромолекула.

**Поликонденсация** – полимеризация, при которой, кроме макромолекулы, образуются низкомолекулярные вещества.

Если в полимеризации (поликонденсации) участвуют разные молекулы, то получается **сополимер**, структурное звено которого состоит из остатков каждой молекулы, участвующей в реакции (Например, ДНК).

### Природные макромолекулы (белки и нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК))

- получаются поликонденсацией

- линейны, неразветвлённые
- асимметричные («направленные»)
- информационные (т. е. с помощью 20 аминокислот можно записать текст)
- самоорганизующиеся в пространстве (строгая структура в пространстве)

### Границы системы живого (клетки)

1. Биологические мембранны
2. Липиды
3. Липосомы

Если в воду капнуть амфи菲尔ное соединение – образуется спонтанный липидный бислой.

**Биологическая мембрана** = липидный бислой + белки

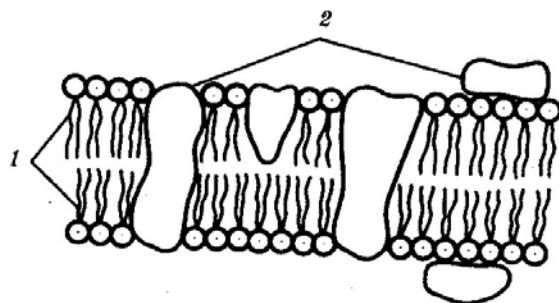


Рис. 6. Биологическая мембрана. 1 – липидный бислой, 2 – белки

**Функции биологической мембран:**

- образование динамичных границ раздела
- селективный транспорт
- сенсорные функции

**Свойства биологической мембраны:**

- двумерная
- гибкая (движение)
- способна к самоорганизации (деление и слияние клеток)
- встроенные белки определяют некоторые свойства мембраны
- селективно проницаема (мембранная биоэнергетика)

**Липиды** – растворимые в жирах и жирорастворителях (и нерастворимые в воде) низкомолекулярные органические соединения, в том числе жиры, стеролы и изопреноиды.

**Жирные кислоты:**

-предельные,

-непредельные (Есть изгиб в углеродной цепи за счёт присутствия в цепи двойной связи. Присутствие непредельных жирных кислот придаёт мембране гибкость) Основной липид мембранны – фосфатидилхолин.

$C_{15}H_{31}COOH$  – пальмитиновая  
 $C_{17}H_{35}COOH$  – стеариновая  
 $C_{17}H_{35}COOH$  – олеиновая  
(непредельная)

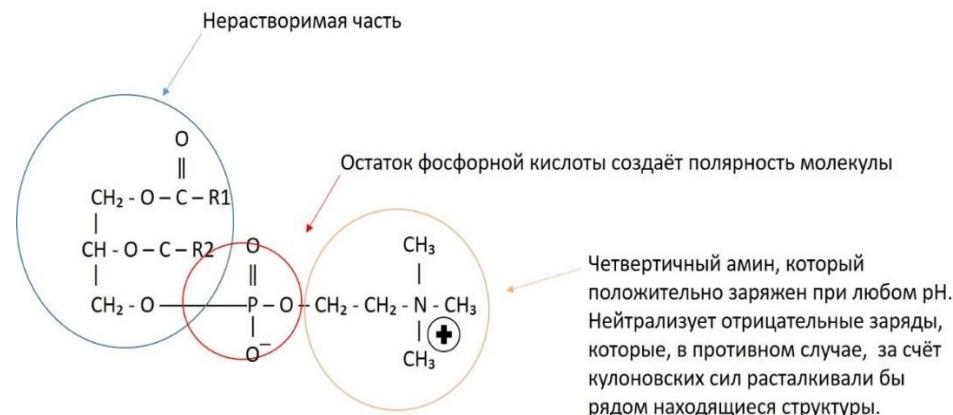


Рис. 7. Структура фосфатидилхолина

Метод молекулярной динамики – формирование липидного бислоя на суперкомпьютере

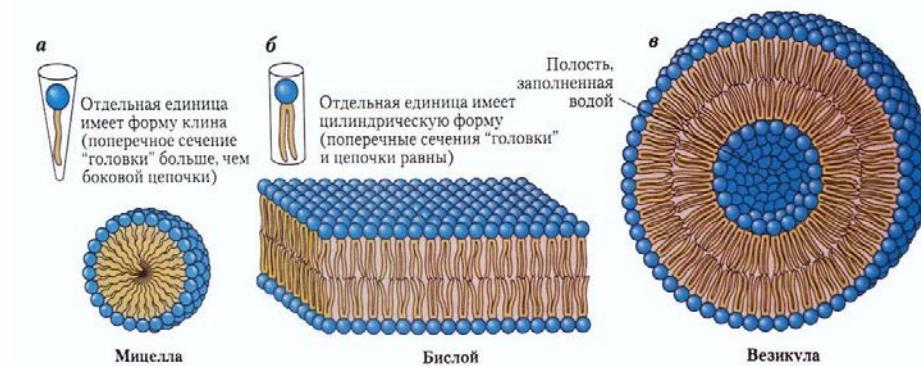


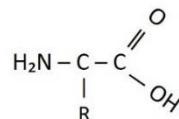
Рис. 8. Структура мицеллы, бислоя, везикулы

## Лекция 3. Белки

Белки составляют 15 % от макромолекул в клетке.

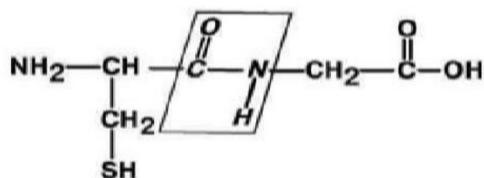
Протеом – белковый портрет клетки.

Белок – нелинейная информационная макромолекула, повторяющееся звено – аминокислотный остаток



*Рис. 9. Формула аминокислоты*

Синтез белков осуществляется за счёт образования между аминокислотами пептидной связи:

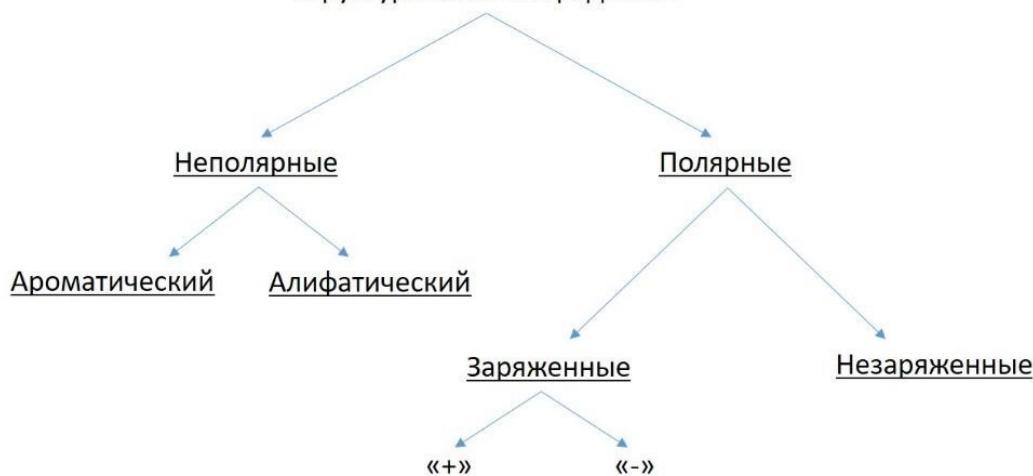


Атомы пептидной группы  
находятся в одной плоскости

Так как амиды аминокислот незаряжены, следовательно, пептидная связь также не протонируется

В состав белков входит 20 различных аминокислот, которые различаются по структуре бокового радикала. В зависимости от строения своего бокового радикала аминокислоты выполняют различные функции в белке и определяют свойства белка.

### Структура бокового радикала



<b>Неполярные</b>		<b>Полярные</b>	
<b>Алифатические</b>		<b>Незаряженные</b>	<b>Отрицательно заряженные</b>
Аланин Ала, А	<chem>CC(N)C(=O)C</chem>	Глицин Гли, Г	Глутаминовая кислота Глу, Е
Валин Ван, В	<chem>CCC(C)N(C)C(=O)C</chem>	Серин Сер, С	Аспарагиновая кислота Асп, Д
Лейцин Лей, Л	<chem>CCCC(C)N(C)C(=O)C</chem>	Тreonин Тре, Т	
Изолейцин Иле, І	<chem>CCC(C)CCN(C)C(=O)C</chem>	Цистеин Цис, С	Лизин Лиз, К
Метионин Мет, М	<chem>CCCS(=O)(=O)CCN(C)C</chem>	Глутамин Глн, Q	Аргинин Арг, Р
Пропролин Про, П	<chem>C1CCCC1C(=O)N</chem>	Аспарагин Асн, Н	Гистидин Гис, Н

<b>Ароматические</b>			
Фенилаланин Фен, F	<chem>CC1=CC=C1N(C)C(=O)C</chem>	Тирозин Тир, Y	<chem>CC1=CC(O)=CC=C1N(C)C(=O)C</chem>

Рис. 10. Классификация аминокислот по боковому радикалу

Средняя длина белка – 300 аминокислот ( $L=300$  Ак), то есть по идее разнообразие белков –  $20^{300}$ . Однако это не так. Существуют ограничения на структуру белка.

### Уровни организации структуры белка

- Первичная структура
- Вторичная структура
- Третичная
- Четвертичная



Рис. 11. Уровни организации структуры белка

**Первичная структура белка ( $\Gamma^0$ ):**

— это не химическая структура, а информация (!)

Химическая структура макромолекул белка – связывание аминокислот пептидной связью.

Первичную структуру определяют с помощью **методом перекрывающихся последовательностей**. Случайным образом белок режут на короткие куски. Короткие пептиды читают и получают базу данных коротких пептидов. Далее тот же белок режут другим образом (тоже случайным) и получают другие короткие пептиды. После этого ищут перекрывающиеся последовательности. По этим перекрываниям составляют структуру белка.

**Масс-спектрометрия** – метод исследования вещества, основанный на определении отношения массы к заряду ионов, образующихся при ионизации.

Каждый пептид имеет некоторый заряд (сумму зарядов радикалов аминокислот, входящих в состав белка). Пептиды ионизируют и помещают в электромагнитное поле. В зависимости от своей массы и заряда пептиды имеют различную траекторию в электромагнитном поле. Таким образом, можно различить и отделить различные пептиды друг от друга.

**Вторичная структура белка ( $\Pi^0$ ):**

- образуется основной полипептидной цепью без участия радикалов -  $\alpha$  – спираль;  $\beta$  – структура

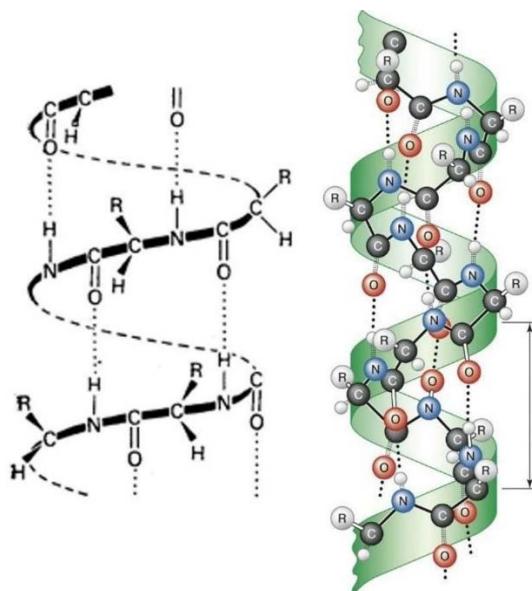
 **$\alpha$  – спираль**

Рис. 13.  $\alpha$  - структура белка

Водородные связи располагаются на периферии, правая (!) спираль

### $\beta$ – структура

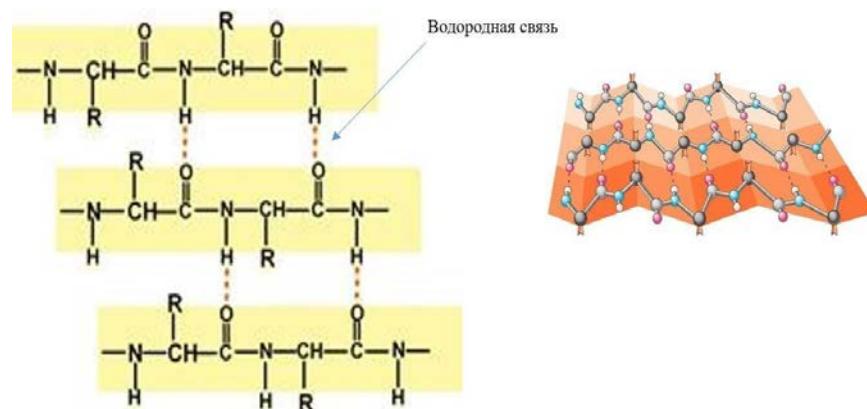


Рис. 12. Вторичная структура белка

### Третичная структура белка, конформация ( $\text{III}^0$ ):

- расположение (координаты) всех атомов белка в пространстве. Конформация (в отличие от конфигурации) может изменяться без разрыва связи.

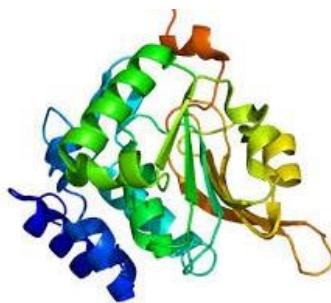


Рис. 14. Третичная структура белка

Укладка полипептидной цепи в трёхмерную структуру определяется структурой бокового радикала, т. е. первичной структурой белка. Конформация – результат большого числа слабых взаимодействий.

Общий принцип формирования структуры белковой глобулы: гидрофобные боковые радикалы благодаря гидрофобному эффекту формируют ядро белка, поверхность которого формируется гидрофильными боковыми радикалами, которые контактируют с водой.

Существуют третичные структуры только из  $\alpha$ -спиралей или  $\beta$ -структур, а также из сочетания  $\alpha$  и  $\beta$  – структур.

Домен третичной структуры – структурно/функционально автономный элемент третичной структуры белка.

Природа в эволюции создаёт новые белки комбинированием готовых доменов путём комбинирования их генов. Существуют консервативные белки, которые практически не изменяют свою структуру на протяжении нескольких млн лет. К таким белкам относятся, например, гистоны, участвующие в упаковке ДНК.

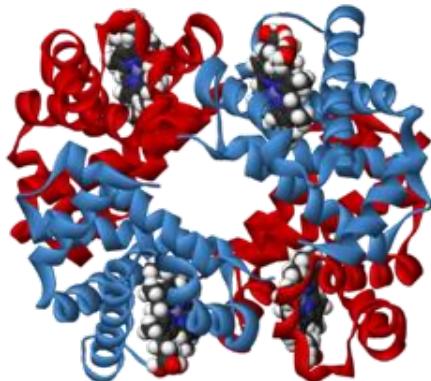
Поверхность третичной структуры имеет сложный рельеф, неравномерное распределение заряда и функциональных групп. На поверхности белка располагаются полярные аминокислоты (преимущественно, заряженные). При нейтрализации/ изменении заряда на каком-то участке белка произойдёт конформационный переход. Поверхность белка – сумма массы нековалентных взаимодействий единиц белка между собой и с растворителем. Любое изменение среды (скорее всего) приведёт к изменению конформации белка. Для осуществления сильного изменения конформации белка используется реакция гидроксильной группы белка с пирофосфатной связью.

### **Катализ:**

Сложная поверхность белка обеспечивает специфичность его взаимодействия с другими молекулами. Углеродная поверхность – хороший катализатор, так как она сорбирует молекулы, изменяя их энергию и осуществляет реакцию между молекулами при их сближении. Идеальный катализатор – сорбирует на свою поверхность только те молекулы, которые должны реагировать, а также сближает их и стабилизирует переходное состояние химической реакции (гипотеза «ключ-замок»).

### **Четвертичная структура белка (IV):**

- надмолекулярные комплексы белков (взаимодействия с другими белками)



*Рис. 15. Четвертичная структура белка*

Интерактом – полный набор взаимодействий между молекулами в отдельной клетке.

Динамический интерактом белков на примере белка EGFR (белок на поверхности клетки). При взаимодействии EGFR с другими белками, клетка начинает делиться. Если белок EGFR мутантный, клетка делится бесконтрольно – развивается опухоль. Из-за нелинейности

процессов в клетке и большого количества взаимодействий разных молекул между собой, очень сложно найти именно тот этап активирования мутированного EGFR, на который надо воздействовать, чтобы предотвратить развитие рака.

### Субмолекулярный комплекс «антитело-антиген»:



*Рис. 16. Структура антигена*

### Тест на беременность:

В период беременности в крови и в моче женщины присутствует гормон ХГЧ (хорионный гонадотропин человека). У не беременной женщины его нет. К ХГЧ нашли специфичное антитело. Результат взаимодействия антитела с ХГЧ отображается в виде индикаторной полоски, появляющегося значка или других заметных маркеров.

Вирус – супрамакромолекулярный химический комплекс (четвертичная структура белка)

Вирус НЕ ЖИВОЙ!

Белок – динамическая структура. Если белок кинуть в раствор, то белок начнёт сам сворачиваться. Белок способен к самоорганизации (переход денатурированной формы в нативную). Возникают элементы доменов ( $\alpha$  и  $\beta$  – структуры), домены складываются и образуется третичная структура. Если белок нагреть – наоборот произойдёт денатурация (разворачивание белка).

Количество денатурированных состояний значительно больше, чем нативных состояний (Рис. 17)

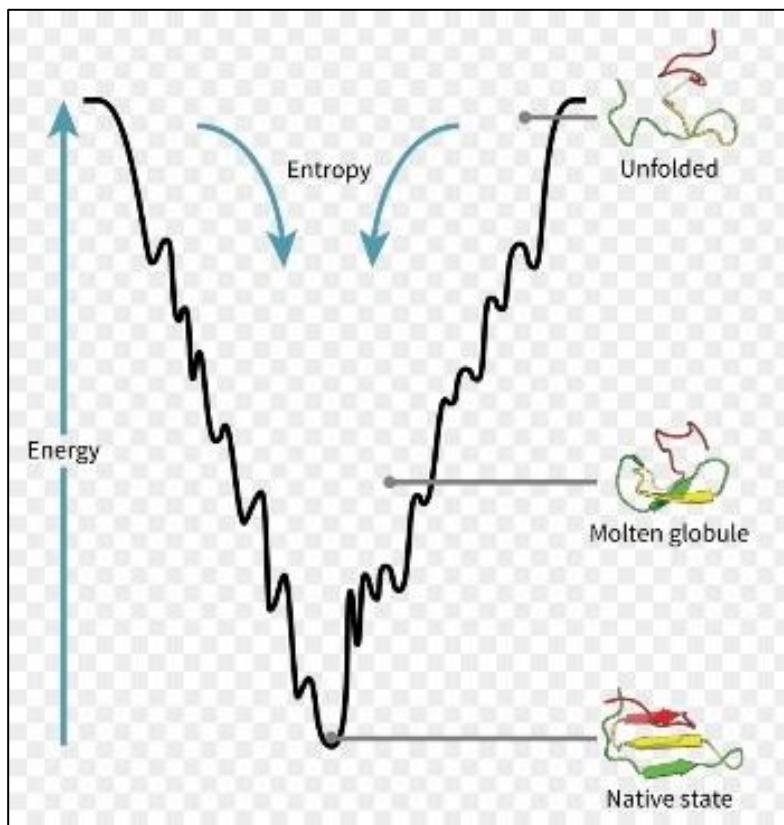
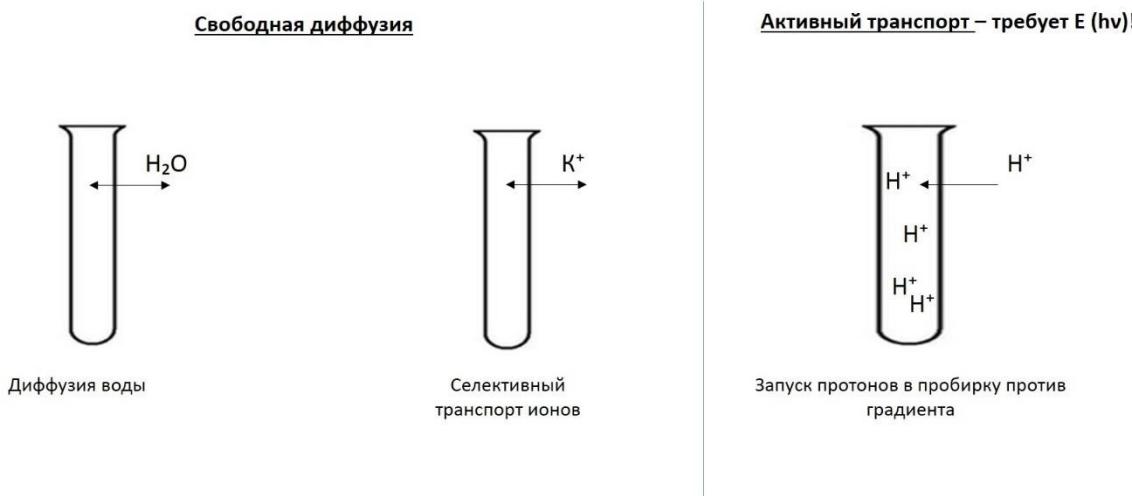


Рис. 17. Энергетика самоорганизации третичной структуры белка.

## Лекция 4. Биологические мембранны

Пробирка (в химии) = компартмент (в химической биологии) = клетка (в биологии)  
Рассмотрим 3 пробирки:



Белки обеспечивают транспорт веществ через мембрану. Выделяют 2 типа транспорта – пассивный и активный.

**Пассивный транспорт** - движение по градиенту концентрации (диффузия)

**Активный транспорт** – движение против градиента концентрации

Белки мембранны могут пронизывать бислой (трансмембранные белки), а также располагающиеся на поверхности мембранны снаружи или внутри клетки.

Толщина мембранны – около 5 нм.

Таблица 2. Соотношение белков и липидов в мембране зависит от природы клетки

	Липиды в мембране (%)	Белки в мембране (%)
Человек	30	30
Кукуруза	26	47
Дрожжи	7	52
Бактерии (E. coli)	25	75

Почему такие разные соотношения белков и липидов у человека и микроорганизмов?

Это связано с тем, что у бактерий белки являются «лицом» клетки, они выполняют работу – транспорт воды, ионов, трансформация энергии происходит на мембране. Одноклеточным организмам необходимо отвечать на все сигналы из внешней среды (изменение температуры, солёности и тд). К дифференцированным клеткам органов человека поступает значительно меньше сигналов, поэтому они могут себе позволить иметь меньшее количество белков.

Мембранные липиды и белки могут передвигаться по мембране – **латеральная диффузия**. 2 клетки можно слить друг с другом при высокой подвижности мембран клеток. Если маркировать мембранные белки другими окрашенными белками и лазером выжечь часть окрашенных белков, то через какое-то время область мембраны с выжженными белками исчезнет за счёт латеральной диффузии мембранных белков.

Белок существует воде. Внутри мембраны гидрофобная область.



Рис. 18. Структура мембранного белка

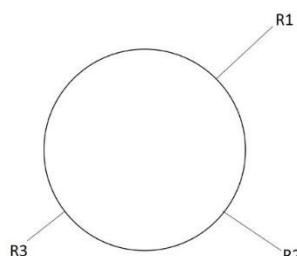


Рис. 19. Вид  $\alpha$ -спирали сверху. R1,2,3 – боковые радикалы аминокислот

Гидрофобная часть трансмембранного белка представляет собой  $\alpha$ -спираль (Рис. 19).

Для того чтобы  $\alpha$ -спираль могла встроиться в гидрофобную часть мембраны, боковые радикалы аминокислот, входящих в трансмембранный домен, должны быть гидрофобными (например, триптофан, фенилаланин и тд.).

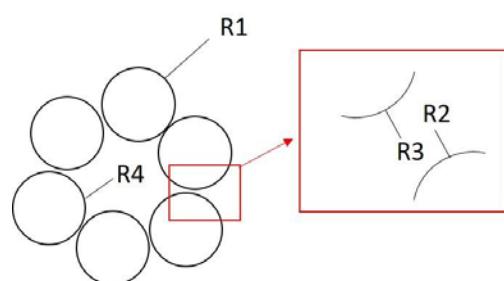


Рис. 20. Альфа пучок (вид сверху)

Рассмотрим рисунок 20. Для осуществления транспорта веществ из клетки и внутрь, в мембране есть пучок  $\alpha$ - спиралей. В такой структуре различные боковые радикалы аминокислот выполняют различные функции. Боковые радикалы R1 создают гидрофобную область вокруг пучка, чтобы пучок мог встроиться в мембрану. R2 и R3 – обеспечивают белок-белковые взаимодействия, которые поддерживают структуру белка. Связывание боковых радикалов двух соседних  $\alpha$ -спиралей осуществляется за счёт образования водородных связей между R2 и R3 (например, лизин, серин, аргинин и тд). R4 (комплексоны) – боковые радикалы, направленные внутрь «колодца», образованного пучком.

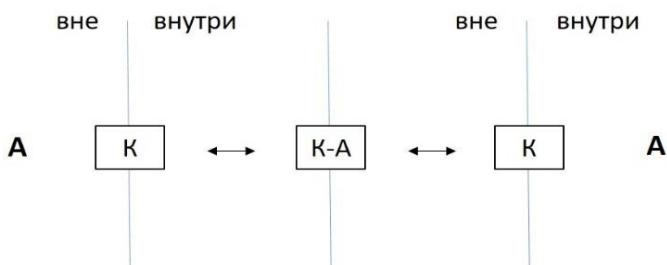


Рис. 21. Пассивный транспорт вещества A. К-колодец.

При пассивном транспорте, транспортируемая молекула образует комплекс с «колодцем» пучка. Далее комплекс диссоциирует и за счёт повышенной концентрации с одной из сторон мембранны, транспортируемая молекула переносится в область пониженной концентрации (Рис. 21)

Для транспортирования молекулы во внутрь мембраны необходимо затратить энергию для её дегидратации. Ион в мембране не растворяется, следовательно, энергия также будет высока. Энергия комплексообразования в пучке  $\alpha$ -спиралей понижает траты энергии для переноса веществ через мембрану.

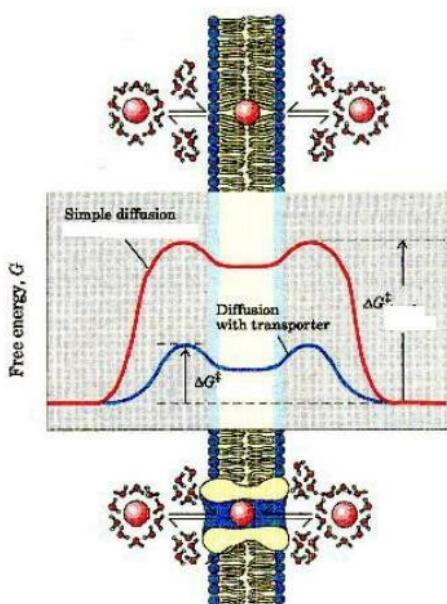


Рис. 22. Энергетика трансмембранных переноса

**Аквопорины** – обеспечивают селективный транспорт воды через мембрану ( $10^9$  молекул  $\text{H}_2\text{O}/\text{сек}$ ).

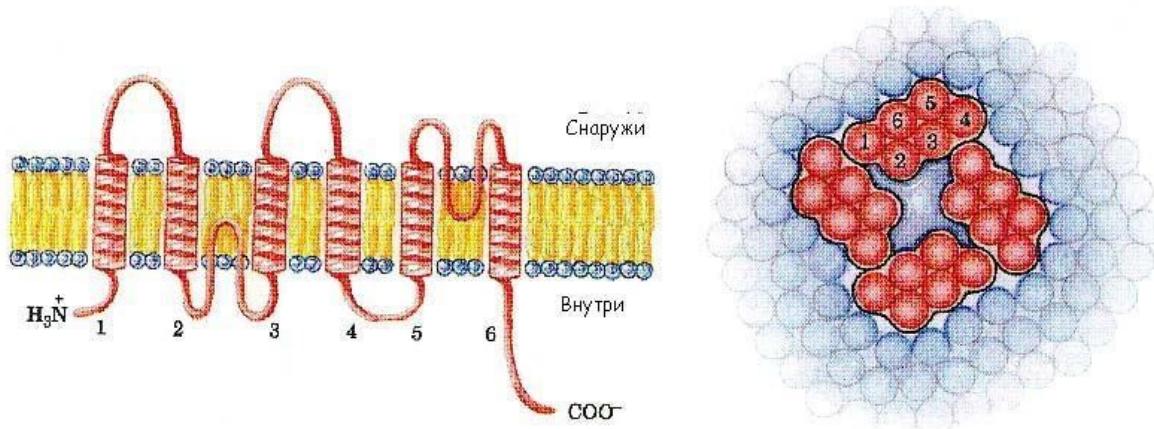


Рис. 23. Структура аквапорина

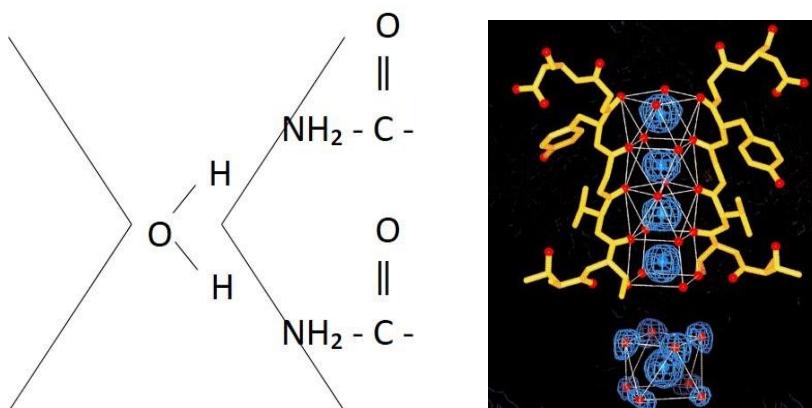


Рис. 24. Схема колодца аквапорина

Аквапорин представляет собой 4 комплекса из 6  $\alpha$ -спиралей, пронизывающих мембрану. Все трансмембранные колодцы имеют форму песочных часов. Молекула воды координируется с «колодцем» за счёт водородных связей, образующихся за счёт остатков аминокислот (Рис. 24). Такая форма предотвращает транспорт других молекул через аквапорины. Протоны не проникают в аквапорин за счёт низкой изоэлектрической проницаемости в колодце (2-5). Также на входе в колодец располагаются аргининовые спирали (положительно заряженные), которые непускают положительно заряженные частицы в колодец.

**K<sup>+</sup>-канал** пропускает в клетку ионы калия. Для транспорта K<sup>+</sup> используется калиевый хелатный комплекс, который обеспечивает комплексобразование (Рис. 25).

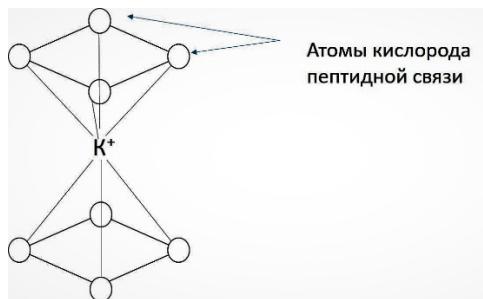


Рис. 25. Структура калиевого канала

Таким образом калиевый канал представляет собой пучок  $\alpha$ -спиралей с хелатным комплексом в колодце. Кислород для комплекса берётся из пептидных связей, который имеет чёткую ориентацию в белке. Ионы натрия и лития могут попадать в канал. Селективный транспорт обеспечивается за счёт константы диссоциации хелатного комплекса. При попадании лития в комплекс диссоциации не происходит.

**Антибиотики** – вещества, которые токсичны для микроорганизмов. Обычно являются продуктом метаболизма особых микроорганизмов или растений. Действие антибиотиков направлено на нарушение жизненно важных процессов у бактерий. Чтобы бактерия погибла, антибиотики образуют поры в клеточной стенке бактерий, через которые происходит

проникновение веществ (пассивный транспорт). Антибактериальные ионофоры – органические вещества, осуществляющие транспорт ионов через мембрану. Антибиотик *валиномицин* – пептидный ионофор, который связывает  $K^+$ , антибиотик *грамицидин* – пептидный ионофор для  $H^+$ ,  $M^+$ ,  $NH_4^+$ .

**Активный транспорт** – энергозависимый перенос против градиента концентрации. Энергия для транспорта берётся из кванта света. Энергия кванта света переходит в энергию разности потенциалов на мембране (мембрана заряжена «+» с одной стороны и «-» с другой за счёт разной концентрации протонов). Далее энергия преобразуется в энергию химической связи (пирофосфатной связи АТФ). Для цепляния и перебрасывания протонов через колодец транспортных белков необходим рычаг (*протонный насос*), который двигается (*цис-транс изомеризация ретиналя*) в зависимости от света.

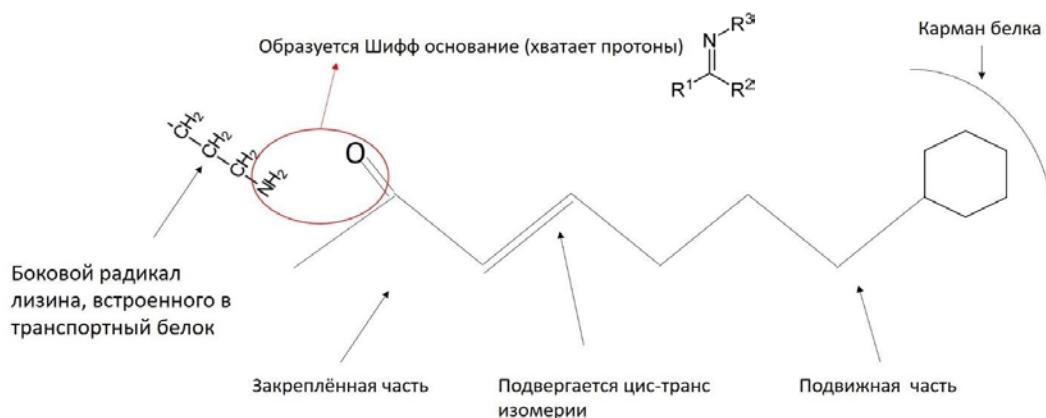


Рис. 26. Схема протонного насоса

Перекачивание протонов происходит следующим образом:

- 1) Протонирование. Снаружи карбоксильная группа захватывает  $H^+$
- 2) Переход  $H^+$  с карбоксильной группы на Schiff протонного насоса
- 3) Происходит цис-транс изомеризация
- 4)  $H^+$  передаётся на карбоксильную группу с внутренней стороны клетки

## Лекция 5. Информационные молекулы

Открытие ДНК привело к рождению молекулярной биологии.

А. Н. Белозерский – изучал нуклеотидный состав ДНК, Э. Чаргaff – сформулировал правило Чаргaffа: суммы пуринов и пиримидинов в составе ДНК всегда одинаковы.

Существуют комплементарные (за счёт водородной связи) пары: A-T, G-C.

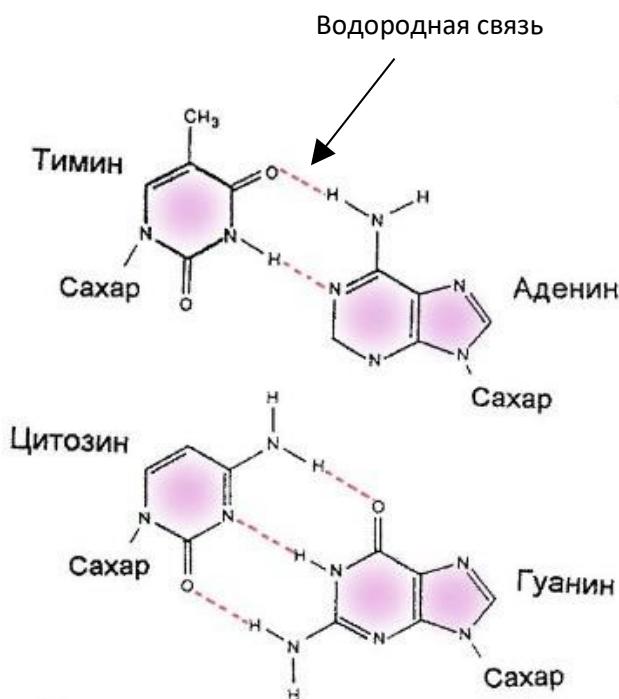


Рис. 27. Комплементарное азотистые основания

Комплементарные пары изогеометричны (то есть, если мысленно наложить одну пару на другую, то они полностью совпадут), благодаря чему образуется идеальная двойная спираль.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные, линейные, направленные биологические молекулы – полинуклеотиды.

Повторяющееся звено – нуклеотид, синтезируется из мономеров – нуклеозидтрифосфатов.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, РНК – рибонуклеиновая кислота

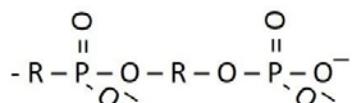
### Структура двутяжевой ДНК:

- Химическая структура макромолекулярной цепи ДНК; боковые радикалы – гетероциклические основания (T, C, A, G).
- Первичная структура ДНК – информация, записанная в чередовании 4 букв.
- Вторичная структура ДНК – изогеометрическая двойная спираль, которая обеспечивает точность матричного копирования.

Аббревиатура ДНК:

Н – нуклеин («ядро»), К – линейный сополимер ортофосфорной кислоты, Д – линейный сополимер ортофосфорной кислоты и двухатомного спирта – дезоксирибозы.

ДНК как химическое вещество была выделена Иоганном Фридрихом Мишером в 1869 году из лейкоцитов гноя. Тогда, в составе были выявлены азот (N) и фосфор (P).



Почему именно фосфорная кислота лежит в основе образования макромолекулы ДНК? – одноосновные кислоты не подходят, так как они не могут участвовать в образовании цепи. Серная кислота (двуосновная) также не походит, так как эфир серной кислоты нерастворим в воде. Кремниевая кислота (четырёхосновная) не подходит, так как константа диссоциации очень мала.

Почему дезоксирибоза?

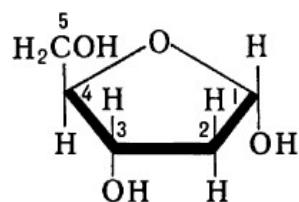


Рис. 28. Рибоза

Самый простой двухатомный спирт – этиленгликоль. Однако этиленгликоль не подходит для образования макромолекулы ДНК, так как эфир этиленгликоля и фосфорной кислоты является симметричным, и поэтому на его основе нельзя считать информацию (считать текст). Необходим направленный текст. В природе был отобран сахар 2'-дезоксирибоза, который является двухатомным спиртом.

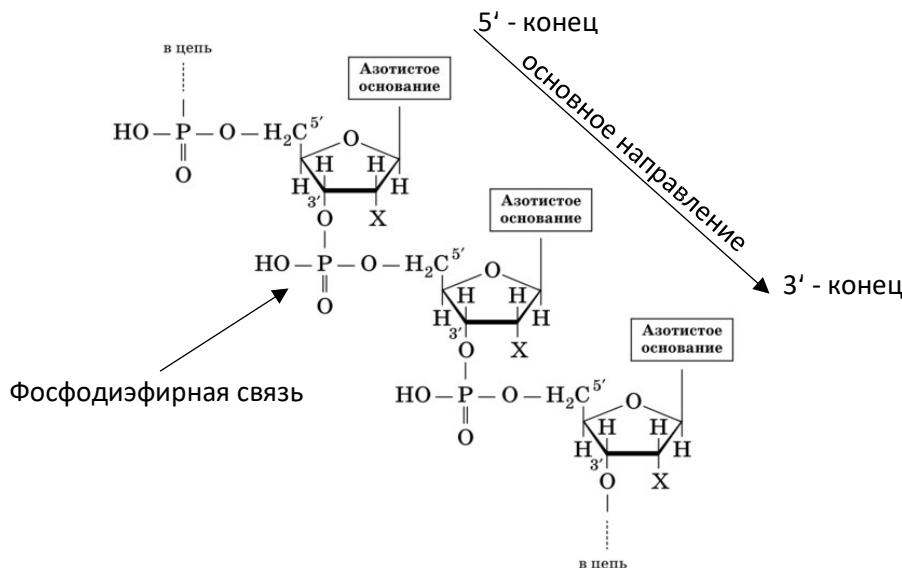


Рис.29. Полинуклеотидная цепь ДНК

**Структура гетероциклических оснований, входящих в состав ДНК (азотистые основания)**

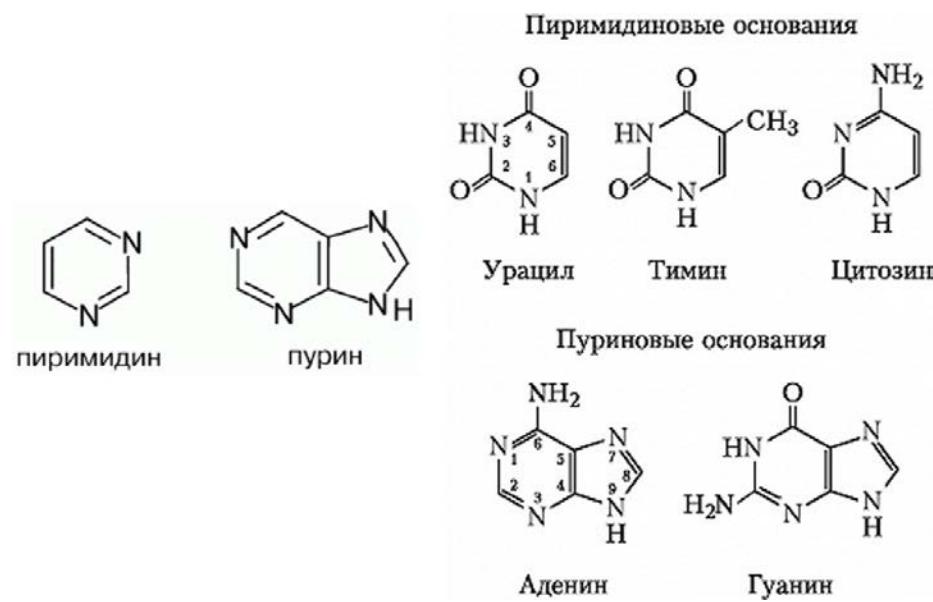


Рис. 30. Азотистые основания

Азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот, являются производными пиримидина и пурина.

Аденин – производная пурина, у которой есть аминогруппа. У гуанина вместо аминогруппы появляется гидроксильная группа, которая изомеризуется в кето-группу (кето-енольная таутомерия) и появляется другая аминогруппа.

Тимин – производная пиримидина – шестичленный цикл с двумя азотами и гидроксильной группой, который изомеризуется (кето-енольная таутомерия). Цитозин имеет в цикле три азота, кето-группу и аминогруппу. Урацил входит в состав РНК вместо тимина. Гетероциклы представляют собой **плоские соединения**.

Многие противораковые и противовирусные препараты направлены на то, чтобы не дать возможность образовать фосфодиэфирную связь. **Ацикловир** – соединение (часто используемое как противовирусный препарат), сходное по строению с нуклеотидом, однако имеющий вместо сахара эфир (Рис. 31). Такое соединение, выстраиваясь в цепочку ДНК, блокирует дальнейший синтез цепочки ДНК.

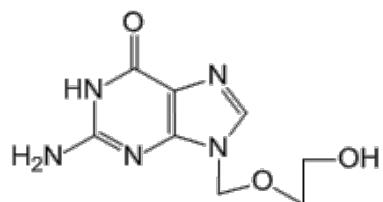


Рис.31. Структура ацикловира

### Вторичная структура ДНК – двойная спираль

1. Изогеометрические комплементарные пары-регулярность структуры двойной спирали (Рис. 32). Именно благодаря изогеометричности пар А-Т и Г-Ц образуется идеальная двойная спираль.

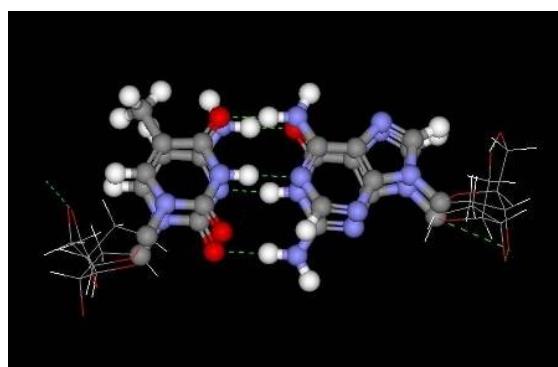


Рис. 32. Изогеометрические комплементарные пары

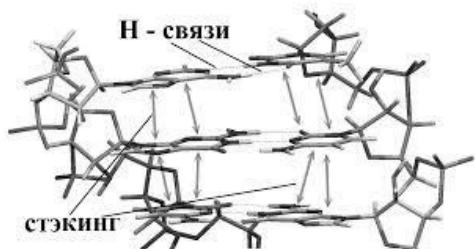


Рис. 33. Стекинг

2. **Стекинг** – взаимодействие ароматических молекул, при котором их расположение напоминает расположение монет в стопке и поддерживается ароматическими взаимодействиями ( $\pi$ - $\pi$  взаимодействия). То есть, гетероциклические основания относительно двойной спирали ДНК лежат друг на друге. Если сделать рентгенограмму двойной спирали ДНК сверху – получается крест (Рис. 34)

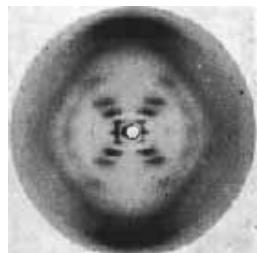


Рис. 34. Рентгенограмма ДНК

3. Анти-параллельность двух цепей

4. Денатурация – «расплетание» двойной связи, ренатурация – «образование» двойной связи

Гидрофильные взаимодействия сахара и фосфата располагаются с наружной стороны двойной спирали ДНК, а боковые гетероциклические радикалы (гидрофобные), повёрнуты внутрь (Рис. 35). На виток – 10 пар нуклеотидов (угол между парами нуклеотидов в одной цепи равен  $36^\circ$ , диаметр спирали –  $20 \text{ \AA}$ ).

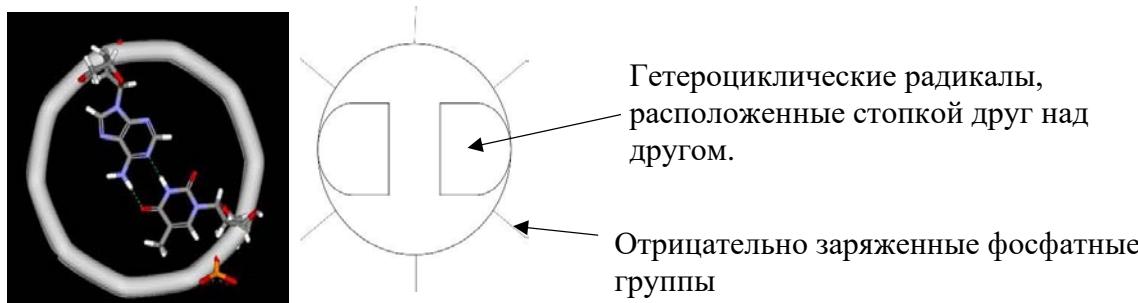


Рис.35. Структура ДНК (вид сверху)

## Лекция 6. Биосинтез

Природа «не любит» реакции прямого синтеза ( $A+B = A-B$ ), поскольку они энергетически затратны. Природа использует обменные реакции ( $A-X + B-Y = A-B + XY$ ), поскольку они не требуют существенных затрат энергии.

**Биосинтез нуклеиновых кислот (матричное копирование):**

- Репликация ДНК – удвоение ДНК (всей информации; Рис. 36). Полуконсервативный механизм (т. к. одна цепь родительская, а вторая синтезированная).

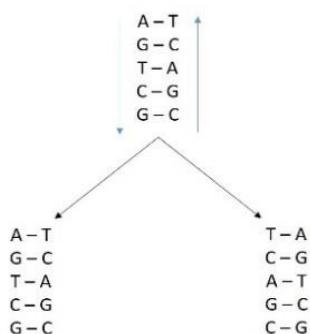


Рис. 36. Репликация

- Транскрипция РНК – списывание части информации (Рис. 37).

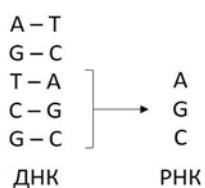


Рис. 37. Транскрипция

### Репликация

3 этапа биосинтеза:

- 1) Инициация – начало
- 2) Элонгация - продолжение
- 3) Терминация - конец

ДНК – полимераза (ДНК- зависимая ДНК-полимераза) - фермент, который полимеризует ДНК.

Для того, чтобы считать информацию с участка ДНК, этот участок надо расплести. Матричный катализ имеет преимущество по сравнению с неспецифическим катализом, так как задаёт последовательность реакций и сближает реагирующие молекулы (Рис. 38).

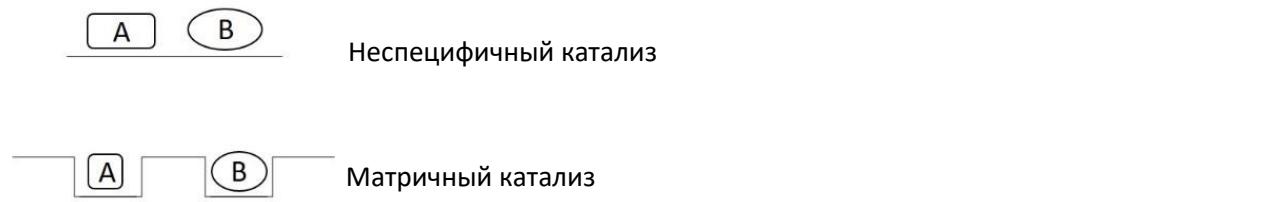


Рис. 38. Различные катализы

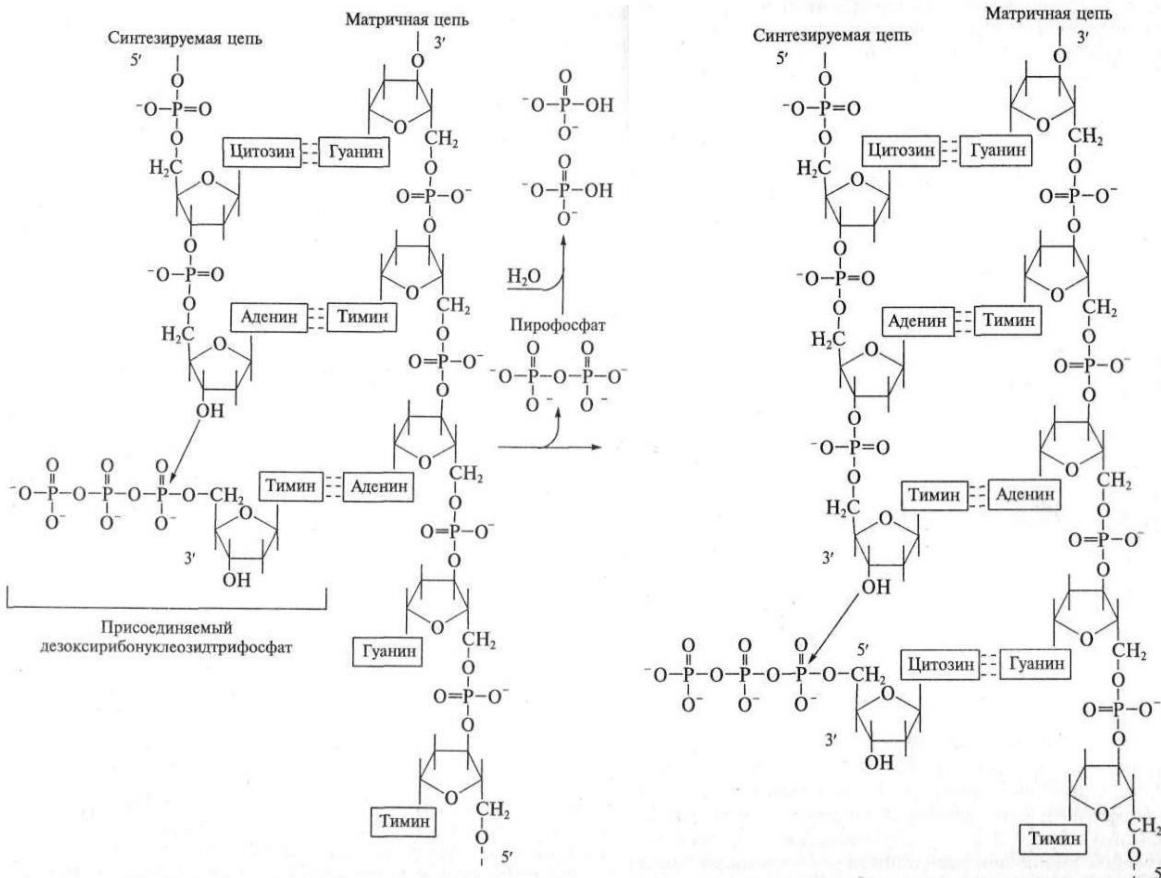


Рис.39. Образование дочерней цепи ДНК в процессе

В процессе репликации матричный катализ осуществляется за счёт родительской цепи ДНК (матричная). Дочерняя цепь растёт 3' – концом. Матричная ДНК ориентирует с помощью комплементарных взаимодействий азотистые основания нуклеозидтрифосфата и уже

встроенного в дочернюю цепь нуклеотида (или другого нуклеозидтрифосфата), за счёт чего между ними образуется фосфодиэфирная связь. Пара электронов гидроксильной группы нуклеозида атакуют фосфаты нуклеозидтрифосфата, которые имеют сильный δ+ (за счёт электроотрицательных кислородов вокруг). В результате происходит алкоголиз и образуется фосфодиэфирная связь (Рис. 39). Таким образом, присоединяя нуклеозидтрифосфаты, дочерняя цепь растёт.

### Превращение энергии и вещества:

Энергия излучения (фотон) → Электрическая энергия (конденсатор, трансмембранный потенциал) → Химическая энергия (химическая связь в трифосфате)

Синтез и превращение аденоцина – 5 – трифосфата (АТФ) /день = вес тела человека

Реакционноспособный АТФ легко вступает в реакции замещения. Происходит перераспределение связей. Таким образом, АТФ – универсальный реакционный модуль (то есть достаточно стабильная связь, чтобы существовать в воде, но и достаточно реакционноспособная, чтобы в воде проводить обменные реакции).

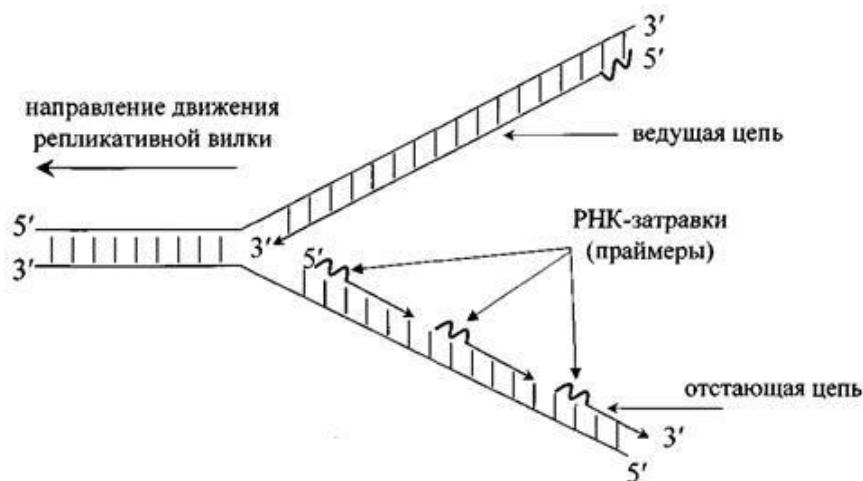


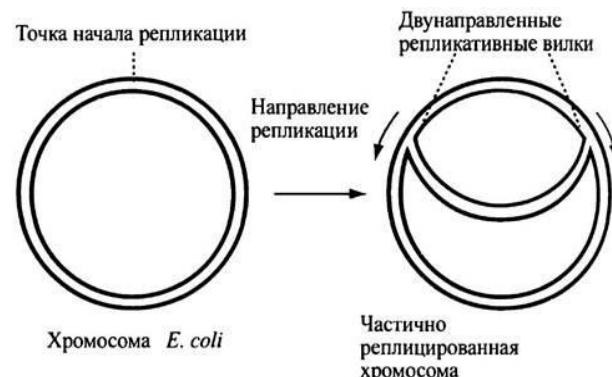
Рис.40. Репликативная вилка

**Реплисома** – белковый интерактом. Реплисома имеет форму руки или бублика, по размеру в точности соответствует диаметру спирали 20 Å. Если произойдёт неправильное спаривание нуклеотидов, то спираль станет либо толще, либо тоньше (геометрия изменится) и реплисома застрянет или начнёт вибрировать (репликация останавливается).

Репликативная вилка - структура, перемещающаяся вдоль родительской спирали ДНК и характеризующаяся местным расхождением двух её цепей, в пределах которой происходит активная репликация ДНК. Специальные белки расплетают ДНК на определённом участке. Реплисома идёт вдоль цепей, достраивая дочернюю цепь ДНК (по направлению 3'-конец) комплементарную родительской цепи 3' - 5'. Обратная дочерняя цепь 3' - 5' синтезируется из фрагментов Оказаки (короткие участки, образующиеся на обратной родительской цепи),

которые в дальнейшем за счёт фермента ДНК-лигазы сшиваются между собой, образуя цепь ДНК.

Этап инициации репликации на примере ДНК бактерий (кольцевая и замкнутая ДНК):



*Рис.41. Репликация кольцевой ДНК*

Существует участок ДНК (**ori**) с определённой первичной структурой, который узнаётся белками репликации («молекулярное» узнавание - образование высокоспецифического комплекса). То есть белок считывает последовательность этого участка и взаимодействует только с этим участком. ДНК накручивается на белок – образуется суперспираль (закрученная двойная спираль – третичная структура ДНК). При этом соседние участки ДНК расплываются. Репликация идёт в обе стороны (Рис. 41). У эукариотов многорепликонная система.

Этап терминации репликации: белки репликации натыкаются на стоп-последовательность, в результате репликационная вилка оказывается «заперта» и репликация прекращается.

Раскручивание ДНК при репликации вызывает суперспирализацию участков, расположенных рядом с репликационной вилкой. Для снятия возникающего напряжения и свободного продвижения вилки здесь работают специфические ферменты релаксации — **топоизомеразы**. Топоизомеразы способны осуществлять разрывы в цепях ДНК в целях релаксации ДНК и затем сшивать участки обратно. Ингибиторы топоизомеразы (хинолоны/фторхинолоны) используют в качестве антибиотика, так как в условиях отсутствия действия топоизомераз ДНК запутывается и теряет возможность реплицироваться (Рис. 42).

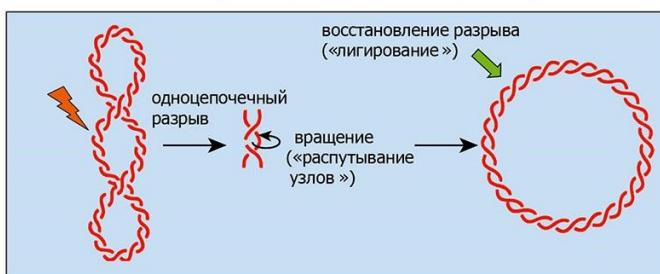
**Топоизомера I (Topoisomerase I, Topo I, Top I)****Ингибиторы топоизомеразы 1 (camptothecines – CPT)**

Рис. 42. Действие топоизомеразы и ингибитора топоизомеразы

**Транскрипция** – биосинтез РНК.

А. Н. Белозёрский и Э. Чаргафф открыли РНК, обратив внимание на то, что нуклеотидный состав ДНК отличается от состава РНК.

Три этапа: инициация, элонгация, терминация.

Считывается одна цепь, получается подкопия генов. Фермент транскрипции – РНКполимераза (ДНК зависимая РНК-полимераза). Промотор-область слева от начала гена, последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая РНК-полимеразой как стартовая площадка для начала транскрипции. На ДНК разных клеток существуют 2 промоторных участка, которые достаточно консервативны, однако в некоторой степени отличающиеся друг от друга.



Рис. 43. Схема участка ДНК с геном. +1 - начало считывания

РНК –полимераза садится на промотор, происходит плавление ДНК. Фермент считывает одну цепь ДНК.

У эукариотов в промоторной области работает большое количество белков, за счёт ошибки считывания одного белка компенсируется работой других белков. Отдельная ошибка не приведёт к потере функции в клетке и ген всё равно продолжит экспрессироваться.

Ингибиторы транскрипции:

1. Блок матрицы ДНК – интеркаляция в двойную спираль (антибиотики или яды связываются с ДНК и блокируют РНК-полимеразу)
2. Блок фермента РНК-полимеразы (например,  $\alpha$ -аматин из бледной поганки, который блокирует перемещение РНК-полимеразы по ДНК. Также ингибитором РНК-полимеразы является антибиотик рифампицин)
3. Блок реакции – модифицированный субстрат (например, изменённые сахара – ацикловир или кордицепин, у которого положение гидроксильных групп не позволяет образовать фосфодиэфирную связь)

## Лекция 7. Действия с ДНК

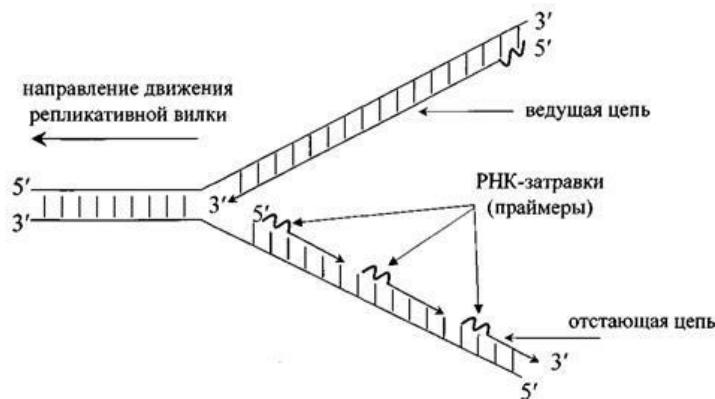


Рис. 44. Репликация ДНК

**Денатурация** ДНК – разрушение исходной (нативной) вторичной/третичной структуры;  
**ренатурация** ДНК – восстановление исходной (нативной) вторичной/третичной структуры

При нагревании двойной спирали ДНК структура начинает двигаться, в результате чего образуется хаотический клубок (2 отдельных тяжа ДНК).

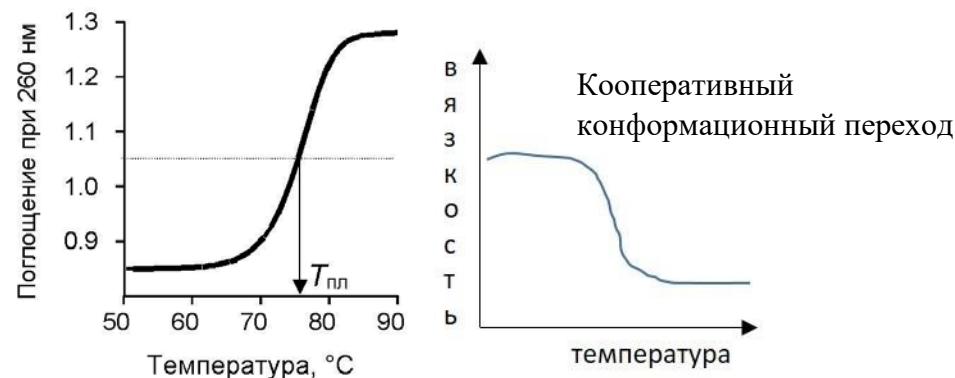


Рис. 45. Зависимость вязкости или относительного поглощения спирали ДНК от температуры

Различные участки ДНК плавятся при разной температуре. Участки с чередующимися А-Т парами более легкоплавки чем участки с Г-С парами.

**Что ещё вызывает денатурацию?**

Изменение **pH** является инициатором плавления ДНК. В щелочи азотистые основания депротонируются, что приводит к плавлению ДНК. **Мочевина** также инициирует плавление ДНК за счёт конкуренции мочевины за водородные связи с азотистыми основаниями. **Суперспиральность** стимулирует частичное раскручивание двойной спирали (денатурация).

При **ренатурации** могут происходить неправильные спаривания, что приводит к сдвигу. Чтобы при ренатурации образовалась изначальная двойная спираль в верной фазе необходимо уменьшать температуру медленно. Тогда повышается вероятность спаривания более длинных участков. Также необходимо на некоторое время остановить охлаждение ДНК на уровне температуры чуть выше температуры плавления ДНК. Это даёт возможность разрушаться образованным участкам и взаимодействовать с новыми.

Кинетика ренатурации зависит от сложности структуры ДНК (длины цепи и количества повторов; Рис. 46)

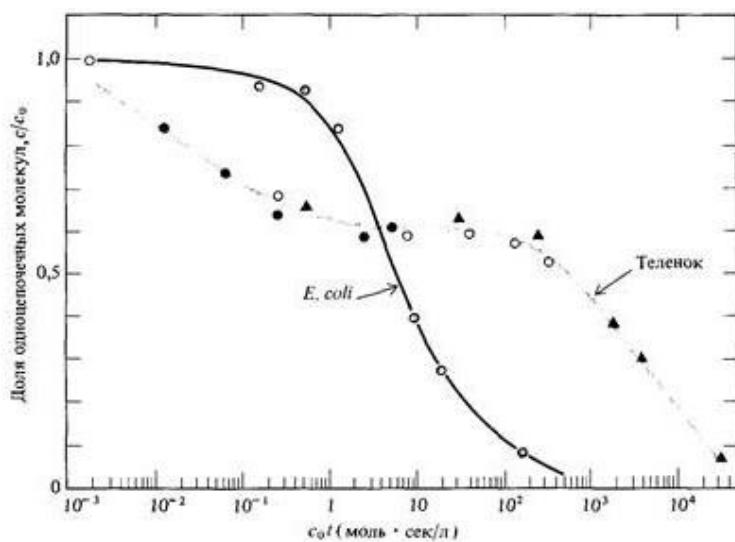


Рис.46.Кинетика ренатурации для разных видов

- Гибридизация зонда

- синтез олигонуклеотида (цепь из нескольких нуклеотидов) на некотором участке ДНК (полинуклеотида).

Температура плавления зонда будет ниже температуры плавления ДНК. Зонд можно пометить радиоактивной или флуоресцентной меткой.

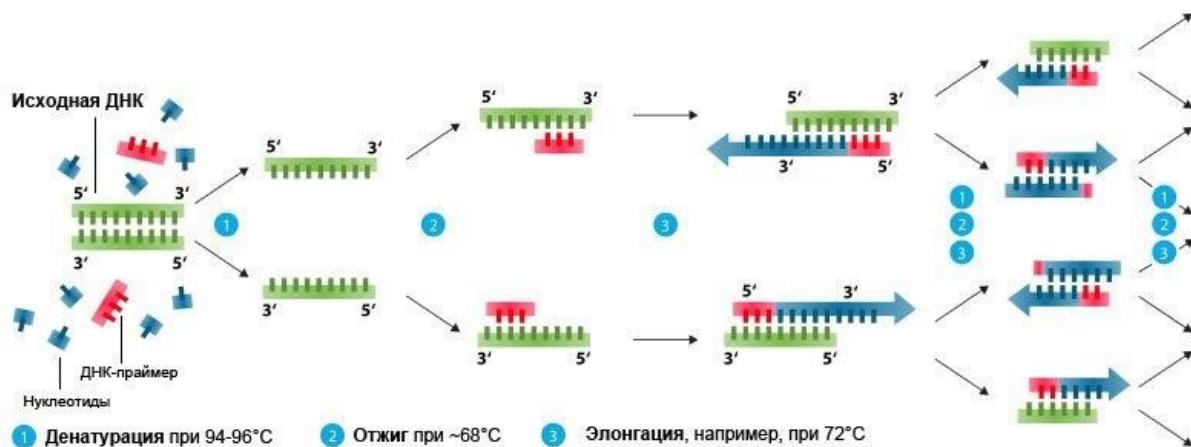
У нас есть пробирка с ДНК. Повышаем температуру, двойная спираль расплетается на 2 одиночные цепи. Добавляем в пробирку зонд с флуоресцентной меткой, который будет комплементарно взаимодействовать с заданной последовательностью.

Метод FISH - метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на хромосомах. флуоресцентная гибридизация помогает заметить нарушения или аномалии в хромосомах. Также можно определять положение инфекционных агентов.

Гибридизация на твёрдой фазе (ДНК – чип) - множество небольших одноцепочечных молекул — ДНК-зондов, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию.

- **ПЦР**

– многократное копирование фрагментов ДНК в лабораторных условиях. Берём образец с двутяжевой ДНК (ds).



*Рис. 47. Полимеразная цепная реакция*

Образец нагреваем ( $80\text{-}90^{\circ}\text{C}$ ) и получаем расплетённые тяжи ДНК (ss). Добавляем 2 зонда комплементарных заданным участкам ss ДНК. Образец охлаждаем ( $72^{\circ}\text{C}$ ). Далее добавляем dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфаты) и ДНК-полимеразу. Происходит синтез ДНК и получаем 2 двутяжевые ДНК (ds). Далее заново поднимаем температуру и снова повторяем все действия. В результате получается пробирка с высокой концентрацией определённых участков ДНК (Рис. 47).

Раньше в каждый цикл необходимо было добавлять ДНК-полимеразу заново, так как фермент не выдерживал высоких температур. Для решения данной проблемы Керри Маллис выделил ДНК-полимеразу из термофильных бактерий *Thermus aquaticus* (Taq). Таq – ДНК-полимераза работает при  $70^{\circ}\text{C}$ .

Системы детекции количества продукта ПЦР:

- 1) Неспецифические – интеркалирующие красители (встраиваются в двойную спираль ДНК)
- 2) Специфические
  - линейные разрушаемые пробы (зонд метят флуорофором и гасителем люминесценции и спаривают с серединой гена. Как только ДНК-полимераза начинает работать, она вызывает возгорание)
    - «молекулярные маячки»
    - примыкающие пробы

## Секвенирование

– определение первичной структуры ДНК

Классический метод – метод Сэнгера (читает более 1000 нуклеотидов)

Берём 4 пробирки с образцом ДНК. В 1 пробирку добавляем все 4 вида дезоксинуклеотидтрифосфата (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) и помеченный флуоресцентной меткой дидезоксинуклеотидтрифосфат (например, ddTTP) в очень малом количестве.

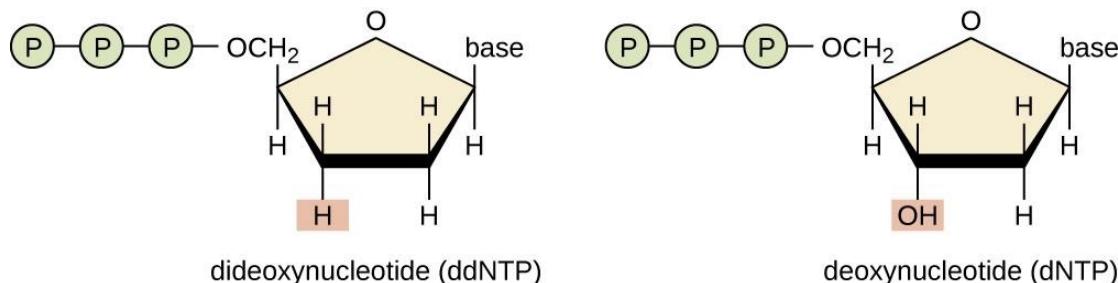


Рис. 48. Формула дезоксинуклеотидтрифосфата и дидезоксинуклеотидтрифосфата

Все dNTP вступают в реакцию синтеза новой цепи ДНК, однако за счёт ddTTP, который при встраивании блокирует дальнейший синтез ДНК, в пробирке будут получаться фрагменты ДНК разной длины, помеченные на конце флуоресцентной меткой (Рис. 49).

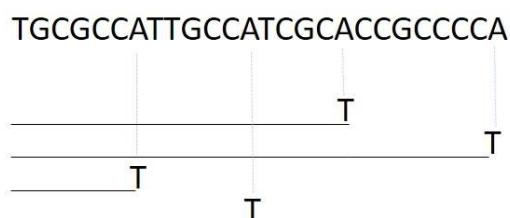


Рис.49. Фрагменты ДНК, полученные методом Сэнгера

Длина каждого фрагмента соответствует положению буквы (A, T, C или G). Таким образом, в каждую из 4 пробирок добавляем все 4 типа dNTP и один из типов ddNTP (ddATP/ ddCTP/ ddTTP/ ddGTP), а также ДНК-полимеразу. С помощью такого метода можно полностью прочитать первичную структуру ДНК. Для того, чтобы получить 1 пробирку с ДНК, а не в 4, нужно покрасить исходные олигонуклеотиды разными красками.

### **Секвенирование единичных молекул:**

Используют мембранные с белковыми нанопорами, через которые протягивается молекула ДНК. В нанопорах пропускают ток, при прохождении различных гетероциклов ДНК через пору измеряют сопротивление. Такой метод хорош высокой скоростью считывания, однако частота ошибок высока.

## Лекция 8. Структура ДНК

Существует определённая трёхмерная организация для определения катализа и последовательности. Реакция происходит при динамических конформационных изменениях, которые происходят синхронно.

**Транскрипция** - процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы

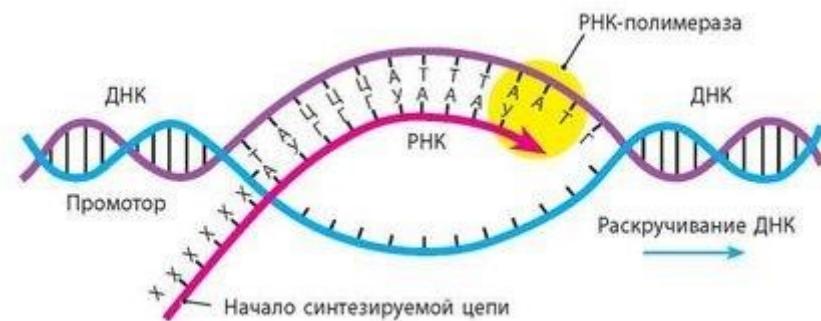
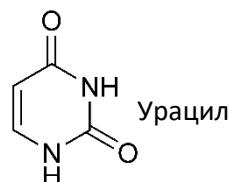


Рис. 50. Схема транскрипции

### Структура однотяжевой РНК

- Отличия химической структуры цепи РНК от цепи ДНК:
  - рибоза вместо дезоксирибозы
  - Урацил (У) вместо тимила (Т)



- Вторичная структура однотяжевой РНК – шпилька (Рис. 51). Комплементарные участки РНК спариваются, образовывая вторичную структуру (примерно 20 нуклеотидов на шпильку).

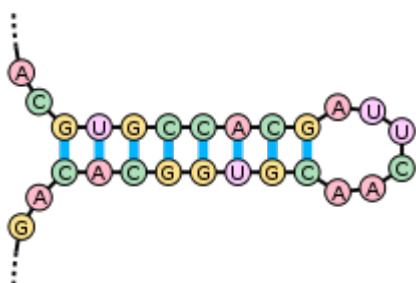


Рис. 51. Вторичная структура РНК



*Рис. 52. Третичная структура РНК*

В отличие от двойной спирали торцевые гетероциклические основания ориентированы к воде, что нестабильно. Для стабильности РНК может сворачиваться в третичную структуру, которая напоминает повёрнутую букву L (Рис. 52). В такой структуре все нуклеотиды спрятаны от воды, кроме двух участков: концов (3' и 5'-концы) и одной петли. РНК может складываться в уникальную третичную структуру, которая ничем не хуже третичной структуры белка, и может образовывать сложную поверхность. Сложную поверхность РНК, как и белок, может использовать для катализа. РНКовый фермент – рибозим. Скорость превращения рибозима – 100 молекул /год, это достаточно медленно по сравнению с белковыми ферментами. Это связано с меньшим разнообразием четырёх нуклеотидов по сравнению с 20 аминокислотами в белке.

Пребиотическая эволюция: первой молекулой, которая начала путь живого – РНК, которая способна копировать себя, размножаться и функционировать. Далее в ходе эволюции появились ДНК и белки. ДНК, как стабильная структура, служит для хранения информации, а нестабильная РНК работает.

#### Функции нуклеиновых кислот:

##### 1) ДНК

- а) Активное хранение генетической информации
- б) Передача генетической информации

##### 2) РНК

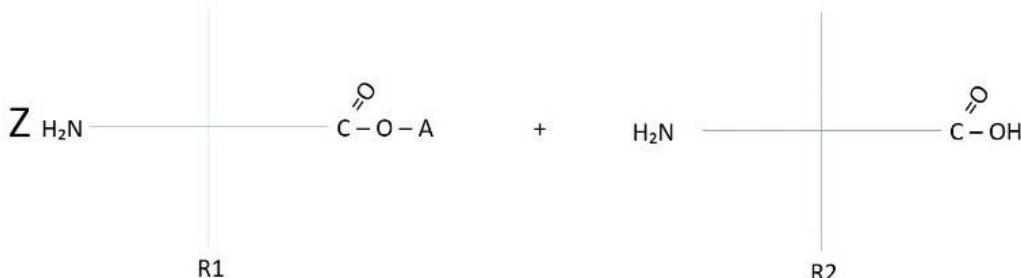
- а) Передача генетической информации –транскрипция
- б) Катализ -рибозимы
- в) Синтез полипептидных цепей белка – трансляция:

**мРНК** – матрица в синтезе белка (кодирует белок)

**тРНК** – активация и транспорт аминокислот

**рРНК** – организация вместе с белками структуры рибосом

Для синтеза направленной цепи белка необходимо блокировать фрагменты аминокислот, которые не должны вступать в реакцию. В случае трансляции блокировать будет формил. Активация синтеза происходит за счёт эфирной связи (Рис. 53).



*Рис. 53. Активация синтеза полипептидной цепи*

Твердофазный метод синтеза белка: первый мономер аминокислоту присоединяют к нерастворимому полимерному носителю (твердой фазе, например, полистирол), который помещают в колонку-реактор. Раствор, содержащий второй мономер и другие необходимые реагенты, пропускают через колонку. При этом образовавшийся продукт реакции также оказывается присоединенным к твердой фазе. Растущая полимерная цепь в процессе синтеза закреплена на твердой фазе, и все реакции с другими компонентами, находящимися в растворе, протекают на поверхности носителя.

- **Трансляция**

– перевод генетической информации с «языка» последовательности нуклеотидов (мРНК) на «язык» последовательности аминокислот (белок).

В трансляции участвуют:

- АРСаза (аминоацил-тРНК-синтетаза)
- тРНК (транспортная РНК)
- мРНК (матричная РНК)
- рибосома (в составе имеет пРНК (рибосомная РНК))

### М. Ниренберг – расшифровка генетического кода (1961г)

- Ниренберг создавал бесклеточную систему (пробирку со всеми содержимыми клетки не в денатурированном виде) для изучения вирусной РНК. Так он следил за синтезом белка с помощью мечения аминокислот. Однако Ниренберг вместо РНК добавил PolyU (полинуклеотид, состоящий только из уридинов). В результате выпал осадок

полифенилаланин. Таким образом, была разгадана первая буква генетического кода. То есть последовательность уридинов кодирует аминокислоту фенилаланин.

Один N (нуклеотид) – может закодировать 20 аминокислот

$N_1N_2$  - может закодировать 16 аминокислот ( $4^2$ )

$N_1N_2N_3$  (кодон) - может закодировать 64 аминокислот ( $4^3$ )

### Генетический код:

1. **Триплетный** (кодон; аминокислота задана тремя нуклеотидами)

Например, UUU – фенилаланин, GGU - глицин

2. **Неперекрывающийся**, без пропусков (нуклеотид в последовательности входит в состав только одного кодона)



3. **Вырожденный** (способность разных кодонов кодировать одну аминокислоту)

Например, фенилаланин кодируют UUU и UUC. Данное свойство демонстрирует устойчивость генетического кода, так как при мутации и замене последней U на C всё равно будет синтезироваться фенилаланин и работа не нарушается.

4. **Универсальный** (один кодон может кодировать только одну аминокислоту)

Кодон AUG - стартовый кодон – кодирует метионин; UAA, UAG, UGA – стоп-кодоны – не кодируют ни один белок. На стоп-кодонах останавливается синтез.

Рибосома – молекулярная машина для биосинтеза белка. Состоит из 2 субъединиц – большой и малой.

**тРНК** – молекула, которая одним участком (петля с антикодоном) взаимодействует с мРНК, другим участком активирует аминокислоту. Антикодон тРНК считывает кодон мРНК. В соответствии кодону ставится аминокислота, которая крепится к тРНК за счёт эфирной связи (Рис. 54). Любой белок начинается с формилметионина.

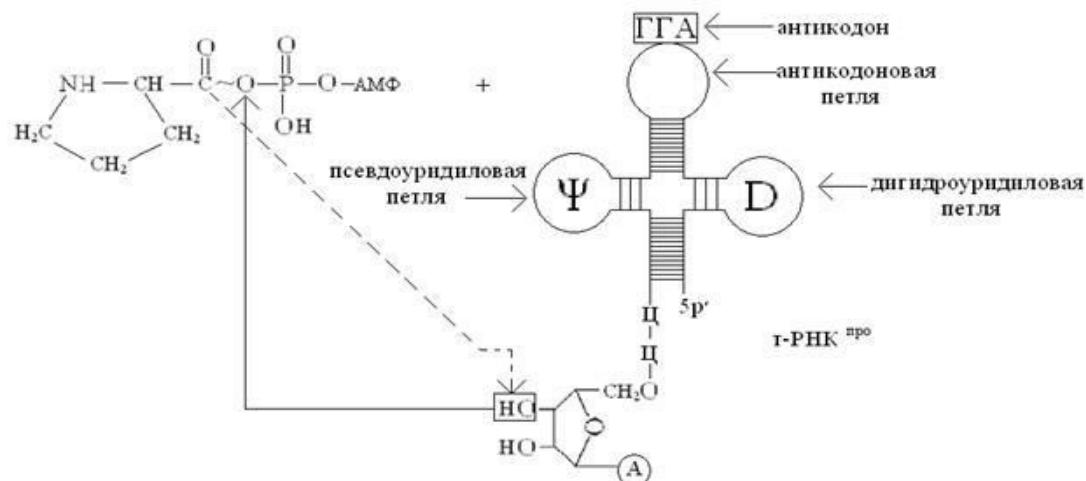


Рис.54. Схема связывания тРНК с матричной РНК и аминокислотой

## Лекция 9. Ген

### Всеобщая декларация о геноме человека и правах человека

А. Человеческое достоинство и геном человека

#### Статья 1

Геном человека подчёркивает фундаментальную общность всех членов человеческого рода, а также признание их внутреннего достоинства и разнообразия.

Геном – совокупность всей ДНК клетки

Также у митихондрий и хлоропластов есть свой набор генетической информации.

У прокариот – нуклеоид, кольцевая ДНК, все связи одинаковые, длина – несколько млн нуклеотидов. У эукариот – хромосомы (несколько десятков), длина – несколько млрд нуклеотидов. Митохондрии и хлоропласти – компартменты с автономной репликацией ДНК (независимо от хромосом). У них есть свой набор генетической информации (несколько копий).

Митохондрия: 2-50 копий ДНК/клетку. Длина – 20 тысяч пар нуклеотидов. У «хромосомы» митохондрий присутствуют только основные гены (*ori* (отвечающий за репликацию), гены рибосомной РНК, гены синтеза АТФ. Между митохондриями и ядром может происходить обмен генов.

У эукариот геном значительно длиннее, чем у прокариот и вирусов. Однако размеры одноклеточных эукариот (например, дрожжей) геном на порядок и больше короче, чем у многоклеточных растений и животных (Таблица 3). Это объясняется тем, что дрожжам необходимо быстро размножаться, поэтому им выгодно как можно больше укоротить свой геном, чтобы ускорить процесс репликации. У растений существуют множественные хромосомы, а, следовательно, размеры геномов значительно больше, чем у животных. Это связано с тем, что растения неподвижны. В отличие от животных, которые могут перебежать на другой ареал, обновляя свою ДНК, растения не двигаются.

Таблица 3. Размеры геномов

Растения	Животные	Дрожжи	Прокариоты	Митохондрии и хлоропласти	Вирусы	Плазмиды
$10^9$ - $10^{11}$	$10^8$ - $10^9$	$10^7$	$10^5$ - $10^6$	$10^4$ - $10^5$	$10^3$ - $10^4$	$10^3$ - $10^4$

На данный момент многие геномы полностью прочитаны. Например, среди вирусов первичная структура генома прочитана у гриппа, ВИЧ, гепатита и тд. У патогенных бактерий – чума, холера, туберкулэз, сифилис, язва. У животных – нематода, дрозофилы, мышь, человек. У растений – арабидопсис, рис, кукуруза.

### Ген как основная единица генетической информации

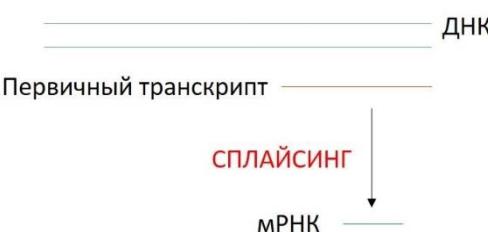
Ген – участок ДНК, содержащий информацию для образования функционального биологического продукта. Имеет структурную (копируется в РНК) и регуляторную части.

Средний ген – 1000 нуклеотидов

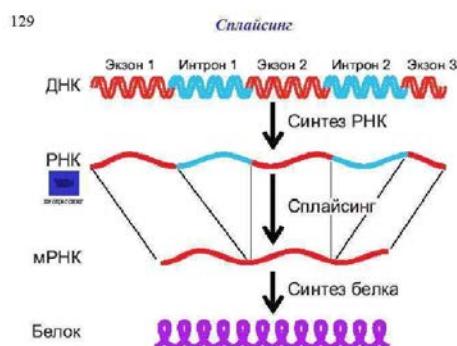
Прокариоты: 1000000 нуклеотидов, 1000 генов

Эукариоты: 1000000000 нуклеотидов,  $10^7$  –кодирующая ёмкость. Получается, что только 1-10 % ДНК кодирующая. Что тогда делают остальные 90% ДНК?

У эукариотов гены «в кусках», то есть имеют смысловые участки, которые прерваны несмысловыми. В процессе созревания матричной РНК первичный транскрипт (транскрибированный участок с ДНК) проходит процесс вырезания различных участков, соединения и тд. Этот процесс называется **сплайсингом**.



*Рис.55. Созревание мРНК*



*Рис.56. Сплайсинг*

**Сплайсинг** – удаление инtronов и лигирование экзонов (Рис. 56). Интроны – участки первичного транскрипта, которые при сплайсинге вырезаются, экзоны – участки, входящие в состав зрелой мРНК. На самом деле, экзоны вставлены в инtronную подложку. С точки

зрения эволюции это легко объясняется. Изначально ДНК была бессмысленна и синтезировалась случайным образом. Затем начали появляться короткие смысловые участки, которые кодировали домены белка. Далее эти участки эволюционировали в более сложные смысловые участки. То есть, эволюция не путём перебора, а путём комбинирования. За счёт комбинирования разных экзонов природа создаёт новые белки (комбинирование готовых доменов).

Сплайсинг – это **переэтерификация**. На первом этапе происходит гидролиз фосфодиэфирной связи на границе между экзоном и инtronом (гидролиз). Далее образованный гидроксил на сахаре атакует фосфор на соседнем экзоне (Рис. 57).

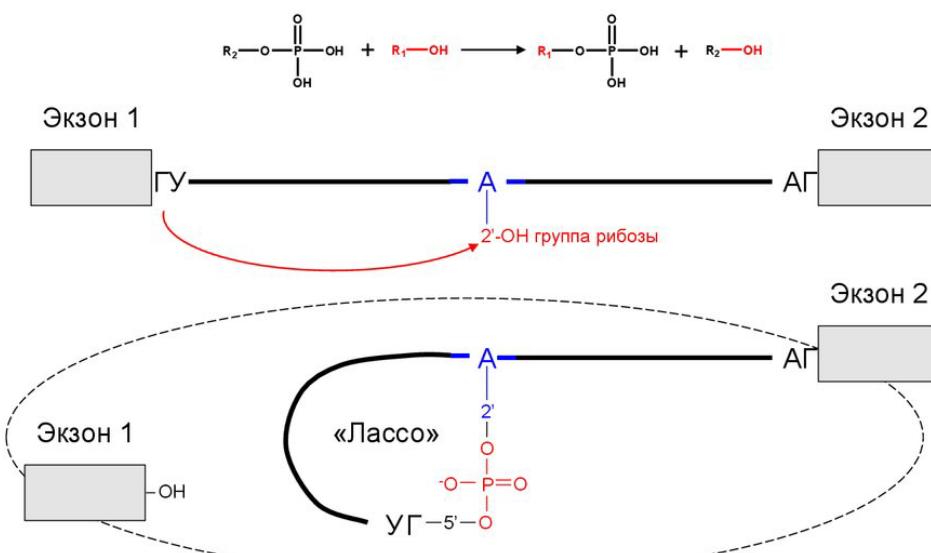


Рис.57. Реакция переэтерификации

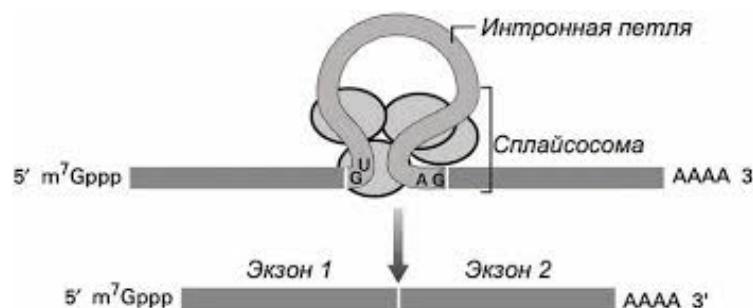


Рис.58. Положение сплайсосомы

Для процесса сплайсинга РНК необходимо образовать петлю, сблизить концы с помощью белков и осуществить там месте стыка химическую реакцию. Основание петли называется сплайсосомой, там происходит сплайсинг (Рис. 58). К сплайсосоме подходят специализированные белки.

## Антитела

В наших организмах огромное количество различных антител. При попадании инфекции в тело, при взаимодействии антигена с антигеном, клетка с данным антигеном начинает активно размножаться. В результате в теле накапливаются клетки, секретирующие антитела, а также клетки памяти.

Антитела состоят из доменов (100-200 аминокислот), имеющих структуру  $\beta$ -сэндвич (3  $\beta$ -структуры, наложенные на 4  $\beta$ -структуры). Огромное разнообразие антител обуславливается тем, что каждый домен иммуноглобулина кодируется не одним экзоном, а целой группой экзонов (Рис. 59).

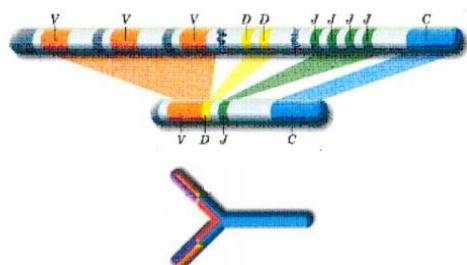


Рис.59. Кодирование иммуноглобулина

**Рекомбинация ДНК-** процесс обмена участками гомологичных хромосом (Рис. 60).  
**Интеграция ДНК** – процесс внедрения кольцевой ДНК в основную цепь ДНК.

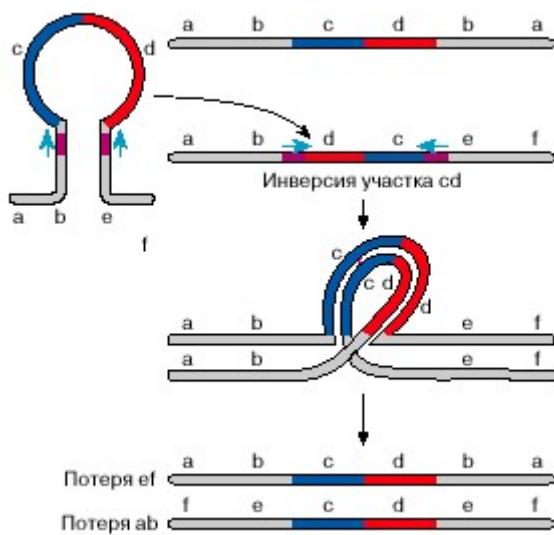
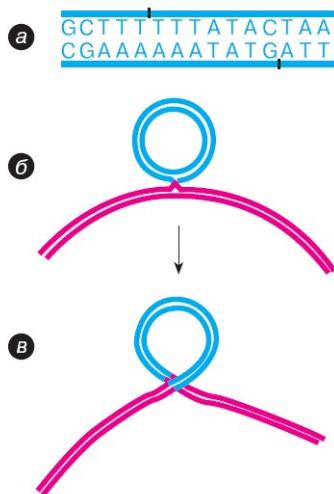


Рис.60. Рекомбинация

Разнообразие антител, помимо сплайсинга РНК, обусловлено так же и рекомбинацией ДНК. Таким образом, 1 ген = 1000000 вариантов антител.

*Рис.61. Интеграция*

**Экстрахромосомные элементы** – участок ДНК, которая может отщепляться от основной цепи ДНК. Среди экстрахромосом выделяют плазмиды (внутри клетки) и вирусы (вне клетки).

Основные свойства плазмид:

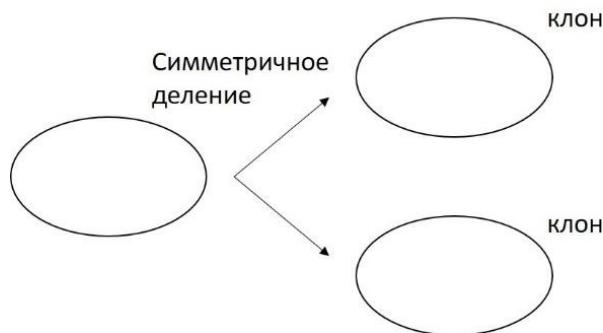
- 1) Автономная репликация (плазмиды имеют свой участок ori)
- 2) Трансформация (при поглощении плазмида клеткой, клетка обретает новые свойства)
- 3) Гены устойчивости к антибиотикам

Плазмида может одеваться в оболочку и выходить из клетки либо разрывая клетку (лизис), либо путём интеграции (встраивание в геном). Вирусы – «взбесившиеся гены», не являются живой субстанцией. Открытие вирусов произошло в 1892 году Дмитрием Ивановским. Он пропускал сок больных листьев табака через фильтр, который не пропускал через себя клетки. Однако жидкость после фильтрации продолжала заражать другие растения при контакте. Так был открыт вирус табачной мозаики. Relenza – препарат - ингибитор нейраминидазы (поверхностного фермента вируса гриппа). Нейраминидаза помогает вирусным частицам выйти из клетки.

## Лекция 10. Биоинженерия

Биоинженерия – это не просто очередной этап познания и переустройства мира, это революция: человек получил возможность менять свою биологическую сущность.

- **Клонирование**



*Рис.62. Клонирование*

– точное воспроизведение живого объекта в нескольких копиях (клоны). Клонировать можно только живые объекты (организмы, клетки). Клон – генетически идентичное потомство одной клетки/одного организма (Рис. 62). Все клоны несут идентичный набор генов. Генетики получают клоны размножением партеногенезом, т.е. бесполым путём, без предшествующего оплодотворения. Естественное клонирование человека – феномен однояйцевых близнецов.

**Клонирование ДНК** – это жаргон. Почему так называется? Если взять пробирку с двумя разными ДНК с разными генами, но одной длины, то мы не можем эти ДНК разделить. В таких случаях разбавленную смесь двух ДНК добавляют в пробирку с клетками. За счёт сильного разбавления смеси ДНК только одна ДНК проникает внутрь клетки. Так же остаётся много пустых клеток. Далее получают клоны из смеси клеток. Для этого пробирку с клетками вновь разбавляют (1 клетка/0,1 мл) и равномерно распределяют по поверхности желе в чашке Петри. Чашку ставят в термостат при 37°C. Через некоторое время на поверхности желе образуются скопления клеток, каждое из которых является скоплением клонов из одной клетки. То есть происходит «титрование» клеток из изначальной смеси.

Таким образом, что мы можем делать с генетическим текстом:

- 1) Читать – секвенировать (см. лекцию 7),
- 2) Писать – химический синтез, пцр
- 3) Узнавать – белки, нуклеиновые кислоты, молекулярные узнавающие элементы (МУхЭли)
- 4) Редактировать: разрезать (рестриктазы), шивать (лигазы), интеграция (вставлять), замещать (интеграция).

**Химический синтез ДНК:**

Для получения длинных последовательностей (гены) используют ПЦР (полимеразная цепная реакция), тогда как для получения коротких цепей используют прямой синтез.

**Прямой синтез олигонуклеотидов:**

Синтез олигонуклеотидов проводится путем пошагового присоединения мономеров в направлении от 3'- к 5'-концу. Всего для присоединения одного мономера требуется совокупность из четырех химических реакций, которые составляют цикл синтеза (Рис. 63):

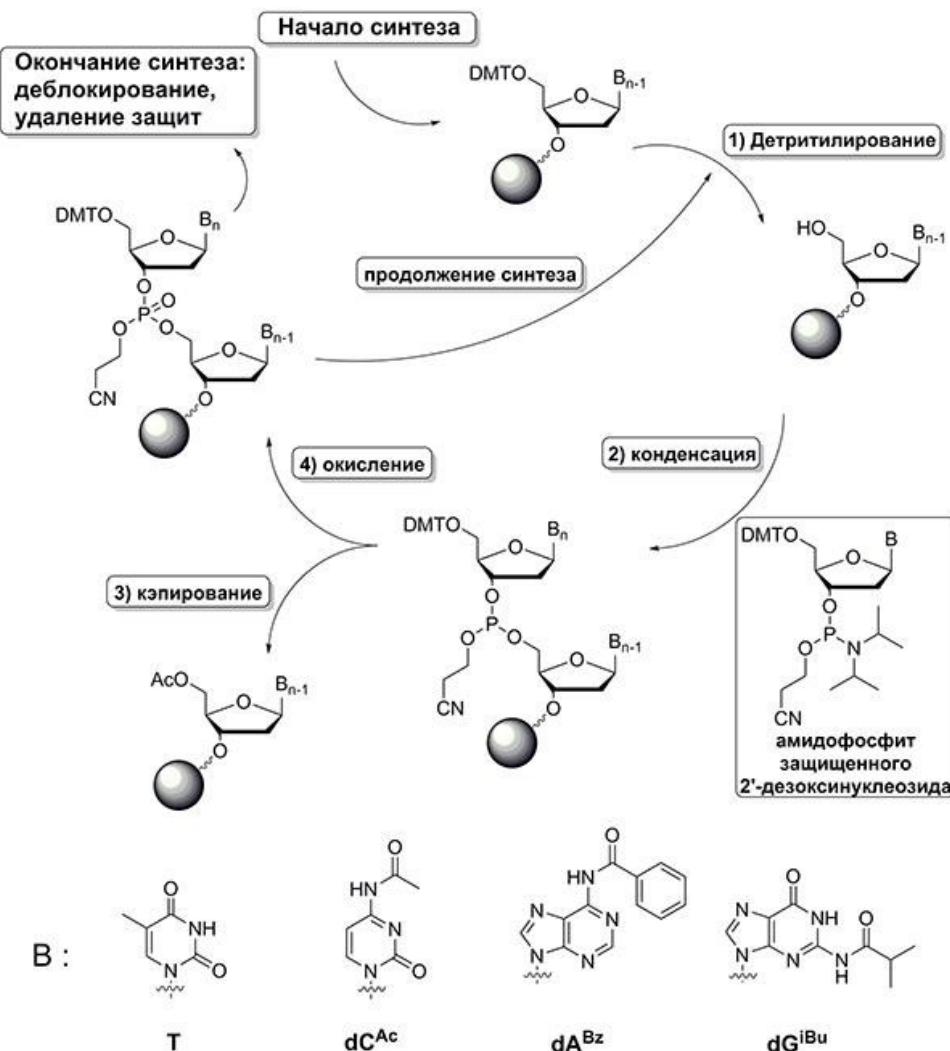


Рис.63. Синтез олигонуклеотидов

- 1) стадия удаления 5'-диметокситритильной защиты,
- 2) стадия конденсации (за счёт активированного трёхвалентного фосфора)

3) стадия кэпирования (блокирование не прореагировавших гидроксильных групп, чтобы предотвратить их участие в конденсации)

4) стадия окисления

### Разрезание генома:

Для разрезания используются ферменты нуклеазы. **Экзонуклеазы** отщепляют по одному нуклеотиду с конца цепи ДНК, **эндонуклеазы** – расщепляют фосфодиэфирную связь внутри цепи. Также существуют узнающие первичную структуру нуклеазы, которые расщепляют определённые последовательности – палиндромы (Рис. 64). Разрезание двойной цепи происходит ассиметрично, выступающие концы получили название «липкие концы», так как если потом заново смешать и охладить смесь, то комплементарные участки вновь взаимодействуют, но образуется не полная молекула, а молекула с разрывом (не будет двух фосфодиэфирных связей).

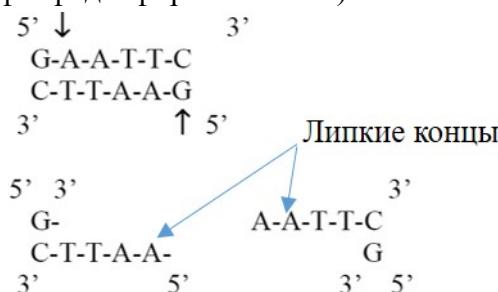


Рис.64. Разрезание полиндрома

Липкие концы способствуют объединению разных участков ДНК, которые при добавлении лигазы сшиваются и образуется целостная рекомбинантная цепь ДНК.

Мегарестриктазы – гибридные ферменты, состоящие из белка, узнающего соседние последовательности, и самой рестриктазы. Мегарестриктазы используются для более определённой работы с последовательностью.

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов подбирается рестриктаза, которая гидролизует у матери ДНК в 4-5 местах, а у отца в 2-3. Получаем разные фрагменты.

Далее всё перепечатывается на фильтр и обрабатывается раствором с зондом. В результате на фильтре выявляются фрагменты матери и отца, комплементарные зонду. Для определения отцовства надо определить какому человеку подходит длина фрагмента.

Генетическая дактилоскопия – ряд научных методов биологической идентификации на основе уникальности последовательности нуклеотидов ДНК. С помощью дактилоскопии ДНК можно идентифицировать личность и родство. Также с помощью этого метода определили инcest Египетских фараонов, происхождение Евы (по прослеживанию передачи митохондриальной ДНК, которая передаётся только от матери).

## Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ)

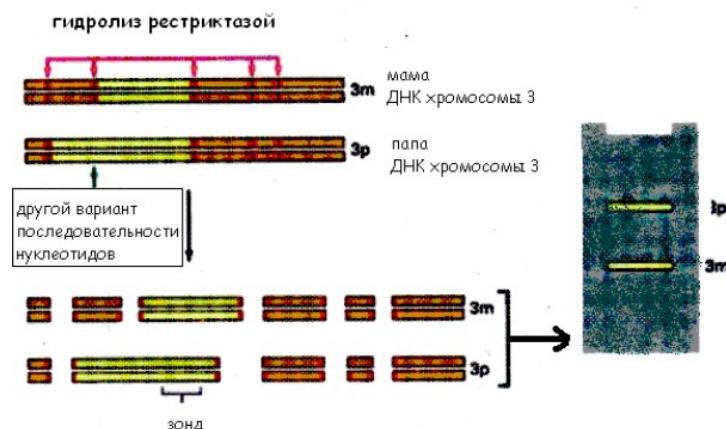


Рис.65. Механизм определения отцовства

### Генная инженерия – 5 основных этапов

#### In vitro (в пробирке)

##### 1) Получение ДНК

- преимущественно, с помощью ПЦР

##### 2) Выбор вектора - молекулы ДНК для клонирования (как правило, это плазмида (Рис. 66))

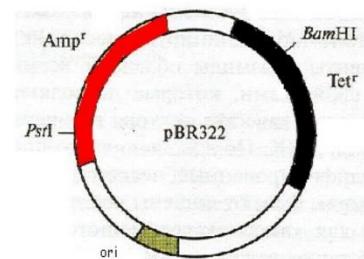


Рис.66. Плазмида

Векторные молекулы ДНК должны:

- бладать способностью автономно реплицироваться (то есть иметь участок ori)
- содержать один или несколько маркерных генов, благодаря экспрессии которых у клетки появляются новые признаки, позволяющие отличить трансформированные клетки от исходных (например, ген устойчивости к тетрациклину)

- содержать 1-2 участка для различных рестриктаз в разных районах (но не в ori)

### 3) Получение рекомбинантных ДНК

-с помощью рестриктаз, липких концов и лигаз

#### In vivo (в клетке)

### 4) Введение рекомбинантной ДНК в клетку (трансформация)

-микроинъекция, электропорация, эндоцитоз, биобаллистика

-слияние мембран: липосомы, рецепторный

-введение  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  связывается с фосфатом липидного слоя, в следствие чего в бислой образуются дырки)

### 5) Отбор целевых клеток (скрининг)

- При помощи зонда. Например, если в клетку интегрировать плазмиду с геном устойчивости к тетрациклину, то при обрабатывании общей смеси клеток тетрациклином будут выживать только те клетки, которые содержат плазмиду. То же самое можно провести с пенициллином. То есть, имея несколько фильтров и замачивая их разными антибиотиками, можно отбирать нужные клетки.

Память – возникновение устойчивой связи нейронов. Для изучения памяти используется оптогенетика. **Оптогенетика** — методика исследования работы нервных клеток, основанная на внедрении в их мембрану специальных каналов, реагирующих на возбуждение светом. Преимущество оптогенетических методов перед традиционными электрофизиологическими методами изучения нейронных сетей и воздействия на них состоит в возможности высокоселективной активации, либо подавления конкретных нейрональных связей. Эта селективность открывает новые возможности в терапии болезни Паркинсона, депрессии, тревожности и эпилепсии.

## Лекция 11. Биотехнология и ГМО

Наука → прикладная наука → инженерия → производство → потребление

Биотехнология - технология, основанная на живых организмах или их составляющих

Биотехнология в древности – пивоварение, хлебопечение, выделка кожи.

### Современная биотехнология:

Таблица 4. Рынок некоторых продуктов биотехнологии

Продукт	Объем производства, т	Объем мирового рынка	Рыночная цена, евро/кг
Пиво	155 000 000	450 млрд	2,50
Этанол	35 000 000	9 млрд	0,25
Тетрациклин	4500	900млн	20,00
Инсулин	8	1 млрд	125,00



Рис. 67. Различные виды биотехнологии

- **Трансгенные организмы (ГМО)**

Цель введения/делеции нового гена в клетку:

- Замена дефектного гена для восстановления функции
- Новый ген для изменения фенотипа (приобретения новых свойств)
- Новый ген для продукции новых веществ (клеточные фабрики, фабрики-организмы)

Нокаут гена – выключение или изменения гена, делая его неработоспособным, на уровне ДНК.

Нокдаун гена – выключение целого гена (выключение экспрессии на уровне мРНК). Если убрать блок, ген начинает вновь экспрессироваться.

**Промышленная биотехнология** – применение биотехнологии для производства, включая промышленную ферментацию. К промышленной биотехнологии, например, относится:

- использование клеток (бактерий, дрожжей, животных) или ферментов для производства химических веществ, пищи, кормов, бумаги, текстиля, биотоплива, детергентов
- разрушение токсичных/загрязняющих среду веществ

**Белая биотехнология** (см. Рис. 67) позволяет развиваться независимо от экономики, основанной на нефти и газе.

Биовыщелачивание - извлечение химических элементов (Cu, Au, Co, Ni) из многокомпонентных соединений посредством их растворения микроорганизмами (бактериями или грибами) в водной среде

Самый большой объем производства ферментов – липаза, изомераза, трансфераза (то, что добавляют в стиральные порошки)

### Сельское хозяйство:

Генетически модифицированные культуры – преимущественно растения - ДНК модифицированы методами генной инженерии, чтобы ввести новое свойство, которого нет в природном растении.

Пищевые культуры: придание устойчивости некоторым пестицидам, болезням, стрессовым условиям, устойчивости к химическим веществам, снижение порчи, улучшение пищевой ценности и тд. Пример: золотой рис (содержит различные аминокислоты, которых нет в обычном рисе).

Технические культуры: производство лекарств, биотоплива и др. полезных веществ; использование для биоремедиации (очистка вод, грунтов и атмосферы с использованием метаболического потенциала клеток или организмов).

В 2010 году 10% культивируемых земель в мире были заняты ГМ-культурой!!!

Легальность и регуляторные правила для ГМ – культур сильно отличаются в разных странах.

### Получение трансгенных растений:

- 1) Получение рекомбинантной ДНК и введение её в клетку (см. Лекция 10)
- 2) Меристемное клонирование

Пример, Бт-кукуруза – генномодифицированная культура кукурузы, в которую был вставлен ген, позаимствованный у бактерии *Bacillus thuringiensis* (Bt). Данный ген экспрессирует белок, который ядовит для гусениц *Ostrinia nubilalis*. Таким образом, была создана трансгенная кукуруза, ядовитая для основного вредителя.

### Получение трансгенных животных:

На примере мыши: самку мыши оплодотворяют и с помощью тонкой пипетки вносят в виде плазиды ген в ядро раннего эмбриона. Далее эмбрионы пересаживают в самку носителя и отбирают потомство с изменённым генотипом (Рис. 68)

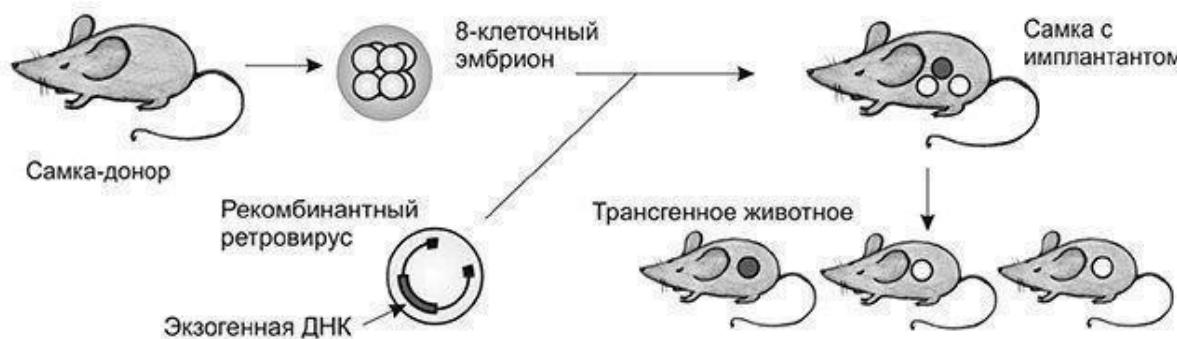


Рис. 68. Схема трансгеноза

Пример животного-фабрики: молоко ГМ-коровы для производства белков.

Также используется пересадка ядер и клонирование. Так, получили овечку Долли. Взяли клетку и удалили из неё ядро. Далее в клетку ввели модифицированное ядро и вырастили из неё овечку.

### Медицина:

Биотехнология обеспечивает производство лекарств:

- низкомолекулярных (например, антибиотиков),

-высокомолекулярных, например, полезных белков (Пример: получение инсулина человека в *E. coli*)

Использование моноклональных антител при диагностике некоторых заболеваний позволяет не только идентифицировать патологические отклонения, но и с помощью модифицированных производных тех же антител устранять это отклонение; такой подход получил название **терапии**.

Персонализированная медицина – индивидуальный подбор лекарств.

Возможности диагностики колоссально выросли. Проведение мониторинга по многим параметрам с помощью биосенсоров (с помощью считывания электрического сигнала) даёт возможность для развития и использования *непрерывной и дистанционной диагностики*.

Рекомбинантные белки, разрешённые для лечения человека: вакцины, моноклональные антитела, гормон роста, эритропоэтин, интерфероны, инсулин и тд.

Для экспрессии гена необходим промотор. Поэтому необходимо клонировать не только ген, но и промоторную зону.

### Селекция клонов по цвету колоний. Бело-голубая селекция с помощью гена LacZ

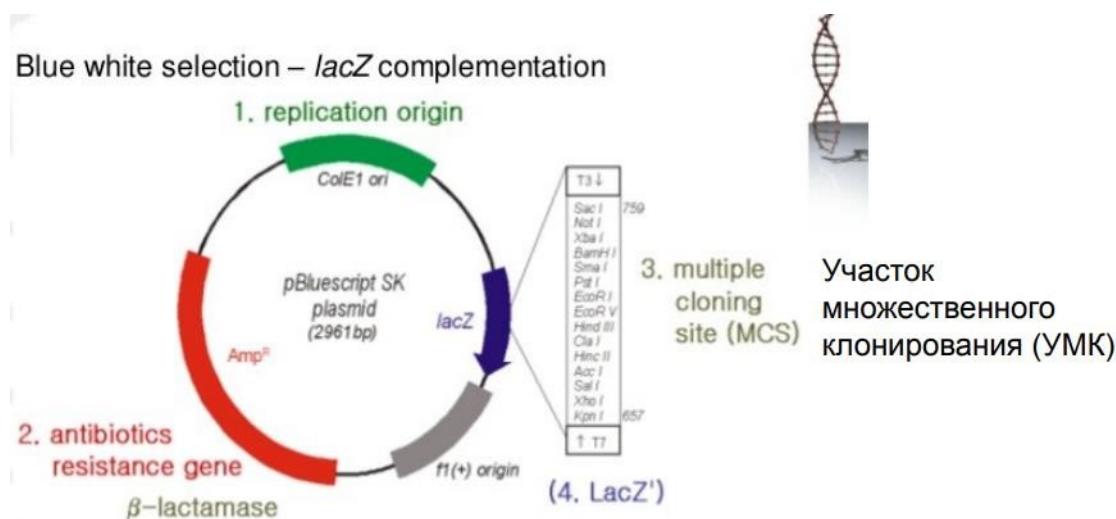


Рис.69. Используемая плазмида для селекции клонов по цвету колонии

Берут плазмиду с участком ori, антибиотик-устойчивым участком и геном LacZ (Рис. 69). При считывании гена LacZ образуется мРНК, которая транслирует белки, расщепляющие лактозу до галактозы и глюкозы. Если клонировать ДНК по УМК (участок множественного клонирования с набором участков для рестриктаз), то получается рекомбинантная ДНК с разорванным геном LacZ. При транскрипции мРНК будет иметь часть матрицы, которая не будет транслировать белки, расщепляющие лактозу. Таким образом, если взять пробирку с

клетками и ввести туда рекомбинантную ДНК, то у нас получатся 2 вида колоний клеток: голубые колонии (у которых ген LacZ не разорван и происходит расщепление лактозы) и белые колонии (с рекомбинантным вектором, расщепление лактозы не происходит).

**Иммуноскрининг клонов на экспрессию белков (Рис. 70):** трансгенные клетки высеваются на твёрдую питательную среду, которая обеспечивает рост только трансформированных клеток. Далее из каждой выросшей колонии берут клетки и переносят их на твёрдую подложку. Клетки подвергают лизису, белки фиксируют на фильтре. Далее на фильтр наносят антитела, которые могут связываться только с искомым белком. Остальные белки удаляются и на фильтр наносятся вторые антитела с субстратом, который окрашивается при гидролизе. Гидролиз может произойти только в присутствии вторых антител. Далее отбирают окрашенные колонии и культивируют их. Таким образом, выделяют чистые колонии с рекомбинантной ДНК, которая кодирует белок, гомологичный первым антителам.

**Моноклональные антитела** - антитела, вырабатываемые иммунными телами, принадлежащими к одному клеточному клону.

В организме есть множество клеток лимфоцитов с рецепторами. Тот рецептор, который взаимодействовал с чужеродным агентом, подаёт сигнал клетке размножаться. Часть размножившихся клеток превращаются в клетки памяти, другая часть продолжает продуцировать антитела, специфичные попавшему в организм антигену. При последующем попадании в тело такого же антигена, в организме уже накоплено огромное количество антител.

Раковые клетки миеломы активно делятся. Клетки селезёнки имеют иммунные свойства, однако плохо делятся. Для получения моноклональных антител, у мыши берут раковые клетки миеломы и сливают их с иммунными клетками мыши, получая гибриды. Такие клетки хорошо делятся и имеют антитела (Рис. 71)

### Мишени действия антибиотиков:

Хинолоны – на стадии репликации, рифампицин – на стадии транскрипции, рифампицин, стрептомицин, эритромицин, тетрациклин, хлорамфеникол – на стадии трансляции (действуют на рибосомы)

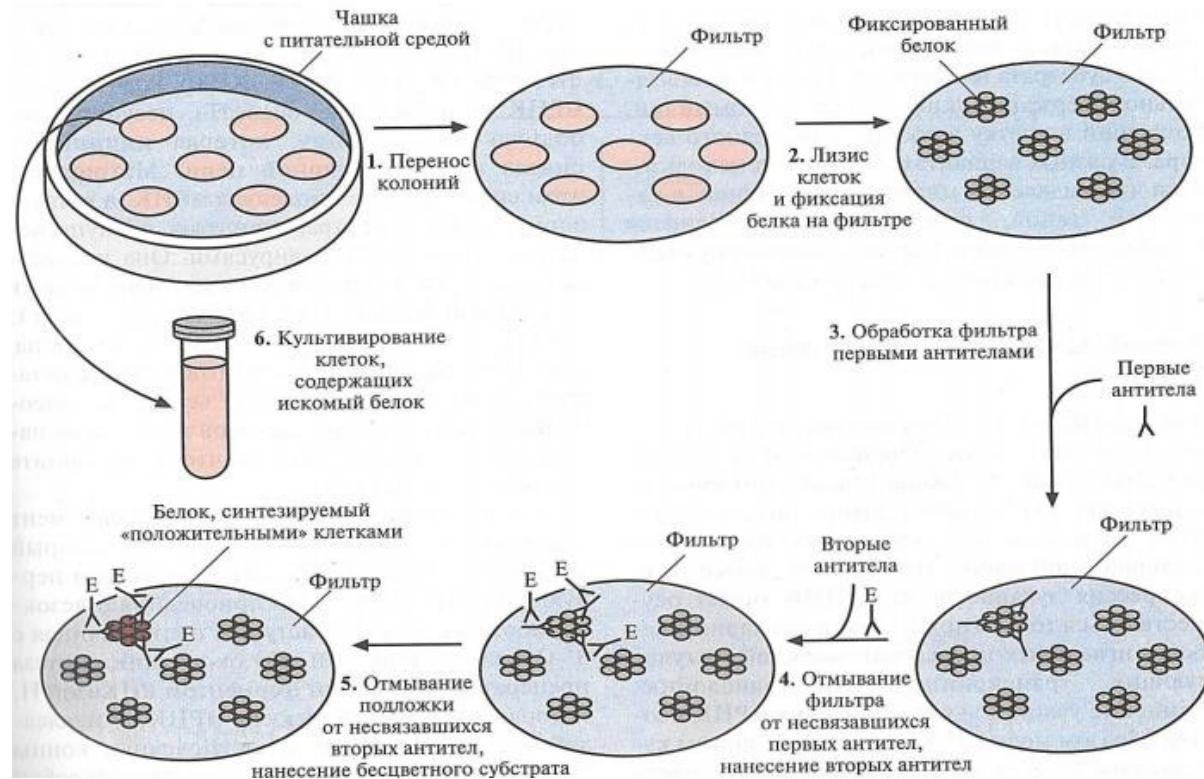


Рис. 70. Иммуноскрининг клонов на экспрессию

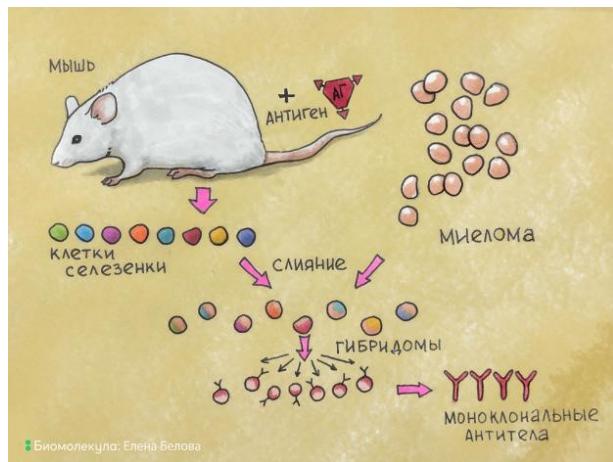


Рис. 71. Получение моноклональных антител

**Клеточная и тканевая инженерия; регенеративная медицина**

На данный момент возможно производить различные ткани:

*На основе стволовых клеток:* кровеносные сосуды, хрящи, сосуды печени, нервную ткань, скелетные мышцы, кожу, сердечные мышцы

*Без употребления стволовых клеток:* мочевой пузырь, хрящи уха, носа, суставов, слизистую оболочку полости рта, сердечный клапан, слюнные железы, трахею, мочеточник, ткань почки и кишечника

Известно, что жировые клетки дедифференцируют клетки мозга. Возможно, однажды, с помощью жировых клеток можно будет исправлять различные нарушения мозга.

Случай из жизни: для спасения своей дочери родители зачали второго ребёнка (мальчика). Учёные проверили оплодотворённые клетки на дефект гена. Матери вернули только здоровые клетки. В результате мальчик родился здоровый, его костный мозг пересадили больной сестре.

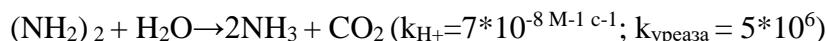
## Лекция 12. Биохимические процессы с белками и ферментами

На сегодняшний день установлены все вещества, которые присутствуют и образуются в живой материи, известны промежуточные стадии и составлены карты метаболизма

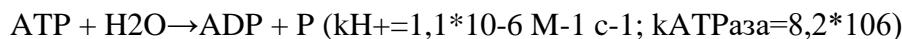
Основные биохимические процессы:

- гликолиз (и глюконеогенез),
- цикл Кребса (и цикл лимонной кислоты),
- пентозофосфатный цикл окисления углеводов,
- окисление и синтез жирных кислот,
- цикл мочевины.

Все биохимические процессы ферментативно катализируются. Особенность ферментативной реакции – многократное ускорение реакции. Рибозимы в несколько раз ускоряют. Ферменты – высокоактивные катализаторы. Ферментативная реакция – 1 секунда, обычная катализитическая реакция – 200000 лет. Так, например:



Различие между скоростями ферментативной реакции гидролиза мочевины и кислотного катализа гидролиза мочевины составляет  $10^{13}$  раз,



Различие в скоростях ферментативного гидролиза аденоциантифосфата и кислотного катализа гидролиза аденоциантифосфата –  $10^{12}$  раз.

Энзимология, как наука, была заложена в 19 веке. Химик Юстус Либих (1803-1873), в отличие от Луи Пастера, утверждал, что биохимический катализ свойственен не только живым организмам, то есть для протекания биохимического катализа необходима живая клетка. М. М. Манассеина показала, что бесклеточные экстракти дрожжей обладают сбраживающим эффектом, то есть бесклеточные экстракти сохраняют катализитические свойства. В. А. Анри в 1903 году защитил диссертацию на тему о регуляции ферментативной реакции. Однако основоположником кинетики ферментативных процессов считается Леонор Михаэлис – автор одной из первой работы по кинетике ферментативной реакции. В своей работе Михаэлис использовал параметр pH, введённый Сёренсеном, благодаря Сёренсену, который характеризует ферментативную реакцию (меру кислотности). Таким образом, формула, выведенная впервые Анри, имеет название **уравнение Михаэлиса-Ментен**.

Фермент – гликопротеид с ионами металлов и низкомолекулярными органическими компонентами (кофакторы, необходимые для построения активных центров). Базой всех ферментов является белок. Белок синтезируется на рибосомах, транспортируются ЭПР (эноплазматический ретикулум), где происходит созревание ферментов путём частичного

протеолиза. В аппарате Гольджи происходит гликозилирование. В зависимости от своей функции фермент может секретироваться, встраиваться в мембрану или расщепляться в лизосоме. В основном высокая метаболическая активность отмечается на мемbrane. Ферменты часто локализуются на мембране, могут находиться в разных в разных состояниях и работать как интегральные белки, так и как периферические.

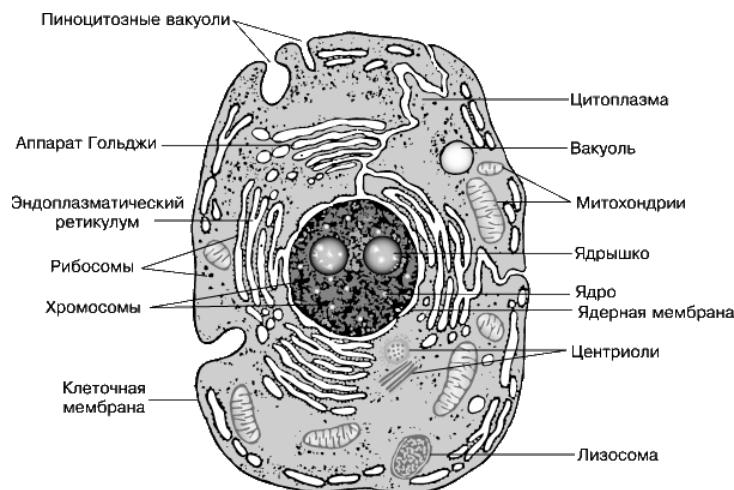


Рис. 72. Строение клетки

#### Характеристики белковой молекулы:

- 1) Молекулярный вес
  - 2) Изоэлектрическая точка (значение pH, при котором общий заряд молекулы равен 0)
  - 3) Первичная последовательность аминокислот
  - 4) Трёхмерная структура

## **Методы выделения и очистки белков (ферментов)**

### **Часто используемые виды биоматериала:**

- Культуральная жидкость (берутся секретируемые ферменты)
  - Клетки одноклеточных прокариот (например, *E. coli*)
  - Клетки одноклеточных эукариот (чаще всего дрожжи)
  - Плазма или сыворотка крови животных
  - Клетки крови животных (например, эритроциты или лейкоциты)
  - Различные ткани животных (печень, мышцы скелетные или сердца и тд)
  - Различные ткани растений

**Стадии выделения и очистки ферментов:**

- 1) **Гомогенизация** (разрушение клетки, тканей)
- 2) **Фракционирование** (отделение белков от нуклеиновых кислот, мембран и тд) Чаще всего используется фракционирование осаждением:
  - сульфатом аммония
  - органическими растворителями (спирты – при комнатной температуре, ацетон – в холодильнике)
  - солями тяжёлых металлов (чаще всего – соли цинка)
  - нагревание до 50-70 °C
- 3) **Хроматография** (очистка ферментов) -

Гельпроникающая хроматография: молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор стационарной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры. Это хороший способ обессоливания белков.

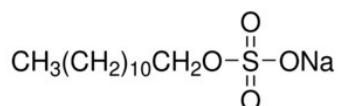
Ионообменная хроматография: разделение на основании зарядов разделяемых молекул.

Аффинная хроматография: в основе лежит реакция взаимодействия разделяемых примесей с лигандом (антитело), связанным с инертным носителем. Гидрофобная хроматография: основан на связывании гидрофобного участка на поверхности белковой глобулы с алифатической цепью адсорбента.

- 4) **Электрофорез и изоэлектрическая фокусировка** (качественная проверка очистки)

Электрофорез - перемещения частиц белковых растворов в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

- В денатурирующих условиях: пробы предварительно денатурируют. Используется обработка белка детергентом SDS, который связывается белком пропорционально его массе. Таким образом, белок пропорционально массе приобретает заряд. Чем больше белок, тем больше заряд.



- нативный электрофорез: разделяемые биологические макромолекулы в процессе электрофореза остаются в нативном состоянии.

Изоэлектрофокусирование: разделения белков по разнице в их изоэлектрических точках производят в геле (Рис. 73). Белок, который находится в pH-зоне ниже собственной изоэлектрической точки, будет положительно заряжен и будет перемещаться к катоду. В результате перемещения заряд молекулы будет снижаться, а перемещение — замедляться. В результате белки образуют четкие полосы, и каждый белок будет располагаться в градиенте значений pH в соответствии со своей изоэлектрической точкой.

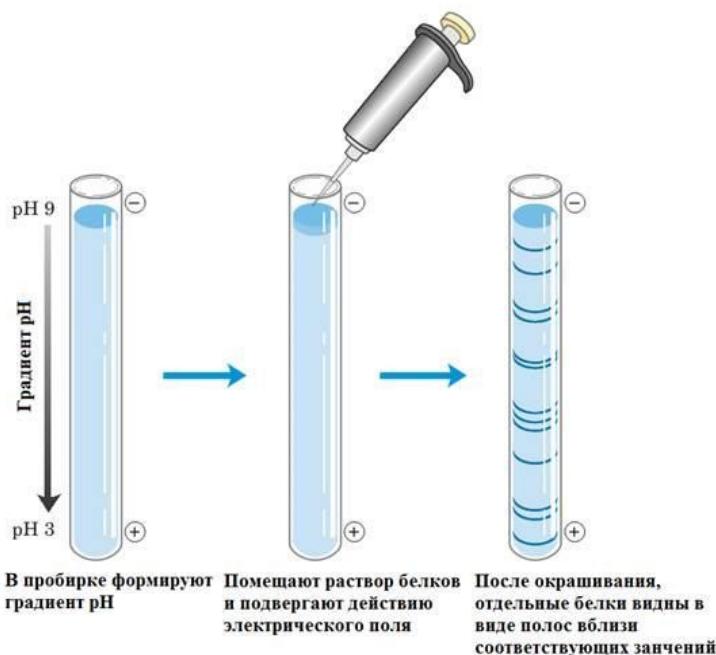


Рис. 73. Изоэлектрофокусирование

### Проблемы получения ферментных препаратов:

1. Низкое содержание целевого фермента в исходном биоматериале
2. Высокая степень удерживания
3. Низкая стабильность (собственная/отделение или удаление стабилизирующих факторов/повреждение молекулы/запуск действия инактиваторов)
4. Форма ферментного препарата

## Лекция 13. Белки и ферменты

Взаимодействия в белковой молекуле:

1) Ковалентные связи

- пептидные (изопептидные - важны в процессах агрегации белков)
- дисульфидные (образуют 2 цистеина)

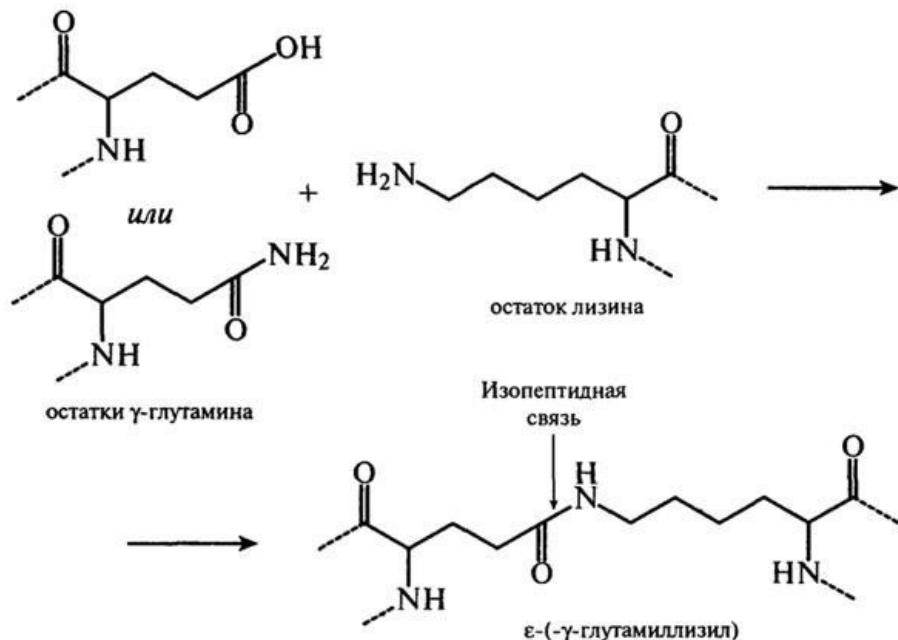


Рис. 74. Изопептидные связи

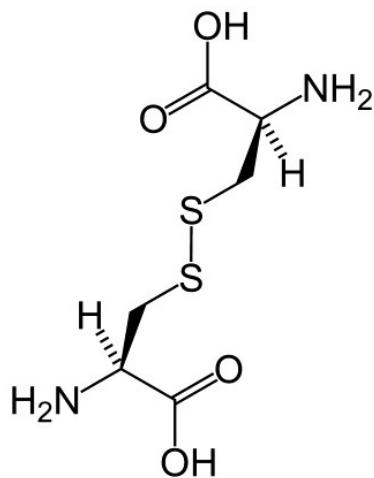


Рис. 75. Дисульфидные связи

1) Нековалентные связи (взаимодействия) – см. Лекцию 2

- водородные (формирование вторичной структуры белка)

- электростатические (определяются законом Кулона)

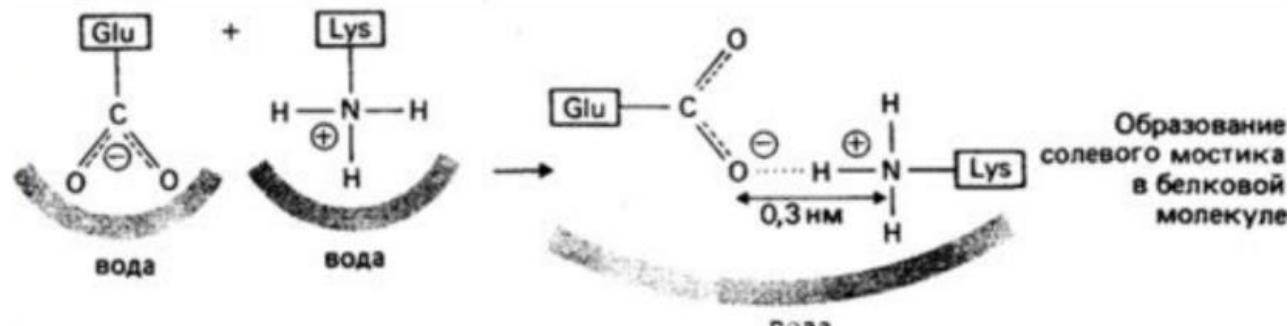


Рис. 76. Электростатические взаимодействия между карбоксильной группой глутаминовой/аспарагиновой кислот и аминной группы лизина

- гидрофобные. Молекулы воды способны образовать 4 водородных связей (если все образуется – получается лёд). В жидкой воде подвижное равновесие между упорядоченной водой (более 2 водородных связей) и неупорядоченной водой. Неполярные молекулы в воде стремятся окружить себя упорядоченной водой, что вызывает сдвиг равновесия в сторону упорядоченной воды. Это энергетически невыгодно, поэтому для гидрофобных веществ в воде характерно стремление к ассоциации (гидрофобное взаимодействие; Рис. 77).

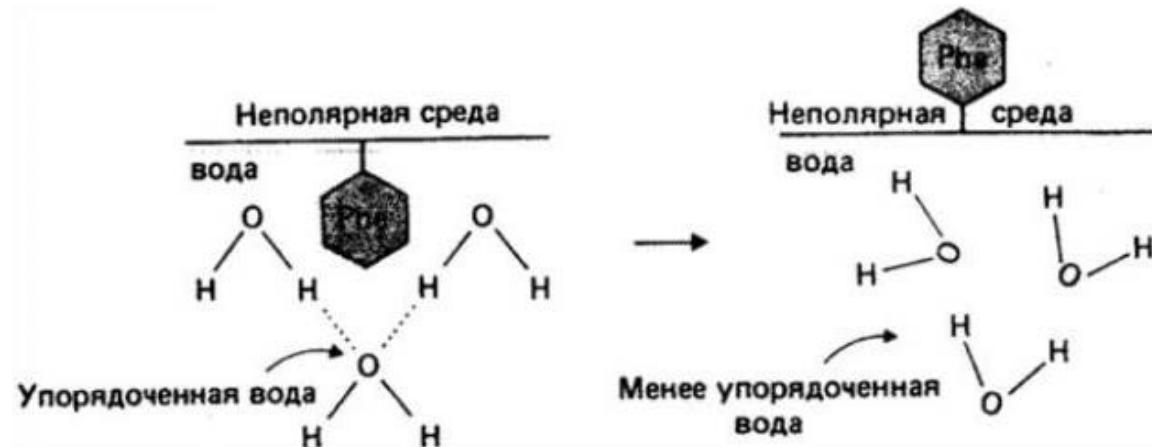


Рис. 77. Переход боковой цепи остатка Phe из раствора внутрь белковой молекулы

Ганш взял за основу процесс перехода из воды в неполярную среду, параллельно с которым происходит процесс дегидратации. Р — это парциальный коэффициент распределения группы R между водой и стандартным органическим растворителем (Рис. 78)

$$\Delta G = -RT \ln P = -RT \frac{[A]_{\text{окт}}}{[A]_{\text{вода}}}$$

Рис. 78. Параметр гидрофобности Ганша

**Уровни структурной организации белков** – см. Лекцию 2

**1) Первичная структура** – последовательность аминокислот. Пептидная связь образуется в результате реакции конденсации между аминогруппой одной аминокислоты и карбоксильной группой другой аминокислоты.

Аминокислоты, входящие в состав белков:

Неполярные алифатические R группы (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин) – малореакционноспособные, модификации мало подвержены.

Полярные незаряженные R группы (серин, треонин, цистеин, метионин, аспарагин, глутамин) – реакционная способность выше. Могут взаимодействовать с другими реагентами и модифицироваться. Положительно заряженные R группы (лизин, аргинин, гистидин)

Отрицательно заряженные R группы (аспартат, глутамат)

Ароматические R группы (фенилаланин, тирозин, триптофан) - тирозин наиболее подвержен модификации. Как правило, ароматические аминокислоты находятся на/вблизи поверхности белка, поскольку они образуют с белком  $\pi$ -комплексы.

**2) Вторичная структура**

- **Супервторичная** (взаимодействие  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -складки:  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\beta$ - $\beta$ )

**3) Третичная структура** (сворачивание в глобулу с гидрофобным ядром и окружённая полярными фрагментами) – важна для фермента!

- **Доменная** (независимый фрагмент). Часто активный центр фермента находится на стыке доменов.

**4) Четвертичная структура** (нескольких белков взаимодействующие за счёт электростатических взаимодействий, ионов металлов, гидрофобных взаимодействий) – характерна для сложных олигомерных ферментов. Четвертичная структура может быть прочной за счёт выдавливания молекул воды.

**Сборка ферментов:**

- 1) Сворачивание
- 2) Посттрансляционная модификация (гликозилирование, ацилирование жирными кислотами, фосфорилирование, ограниченный протеолиз,
  - a. активация зимогенов и тд)
- 3) Встраивание кофакторов (например, из витаминов)
- 4) Формирование активных центров (конформационные переходы, межсубъединичные взаимодействия)
- 5) Белок может существовать в многих состояниях в зависимости от условий. Всегда есть множественный выбор стабильных состояний. Путём модификации будет происходить перекачка фермента из одного состояния в другое. Уравнение Ламри-Эйринга описывает денатурацию структуры белка (Рис. 79). E (стабильное состояние) может переходить в денатурированное состояние (переход находится в равновесном состоянии). При переходе

же из денатурированного состояния может происходить необратимый процесс инактивации фермента –слипание цепей или химическая деструкция (состояние I).

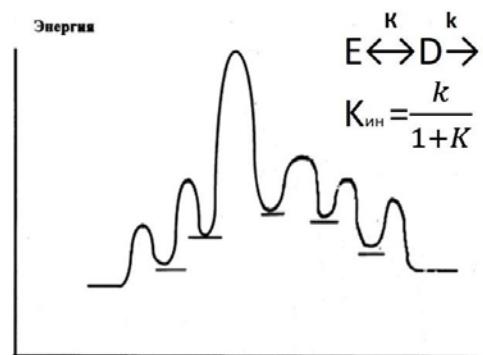


Рис. 79. Уравнение Ламри-Эйринга

**Химическая модификация белков** – метод получения белков с изменёнными свойствами и ферментов с изменённой катализитической активностью.

Способы модификации:

- Воздействие на структуру
- Изменение гидрофобно-гидрофильного баланса (HLB)
- Изменение рI (изменение общего заряда)
- Защита функциональных групп (активного центра)
- Введение новых функциональных групп
- Введение метки – репортёра (для исследовательских целей)
- Введение якорной группы (поиск места локализации и функционирования фермента)

Ввести вместо SH-группы заряженную группу легко. Так, например, SH-группы цистеина можно проалкилировать бромуксусной кислотой или этиленамином и получить либо карбоксильную («-») группу, либо аминогруппу («+»). При взаимодействии SH-группы с реагентом Элдмана SH-группа на белке модифицируется, а также высвобождается хромогенный продукт (нитробензойная кислота), по которому можно определить количество промодифицированных SH-групп (Рис. 81)

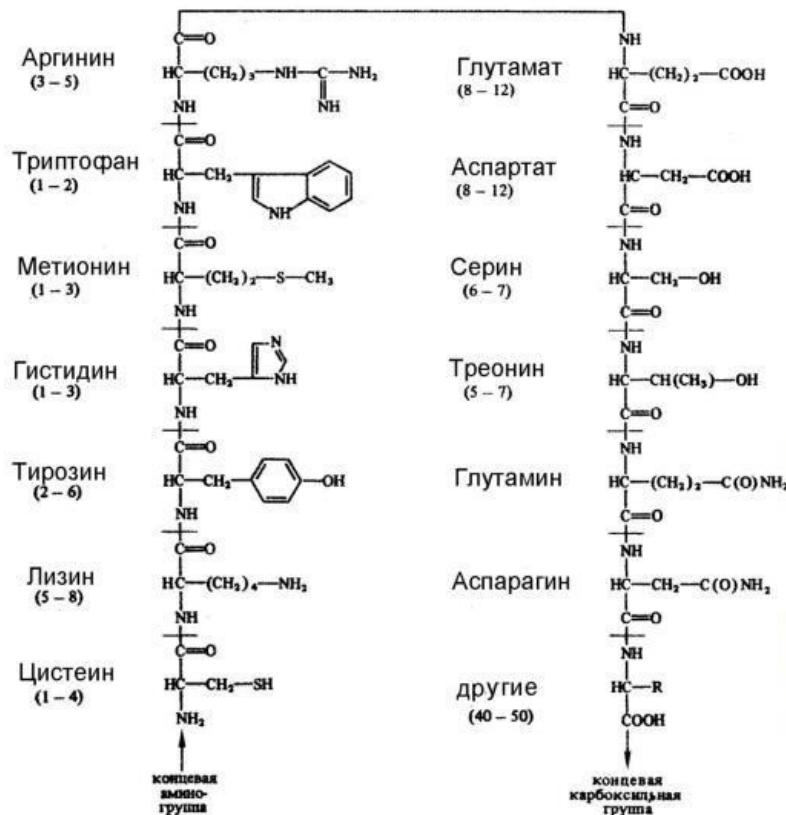


Рис. 80. Аминокислоты в порядке убывания реакционной способности



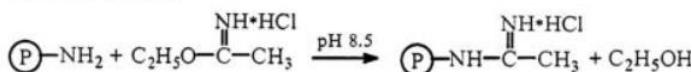
Рис. 81. Модификации SH - группы

Аминогруппы хорошо модифицируются имидоэфирами, которые позволяют получить прочную связь, за счёт которой можно пришить по аминогруппе к сшивирующему реагенту. Альдегиды в щелочных pH с аминогруппами образуют реактивы шиффа, которая

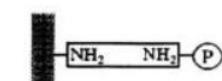
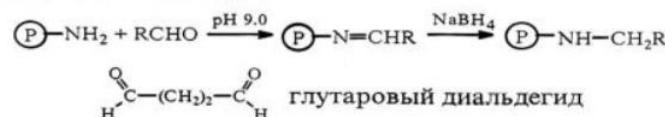
распадается в кислой среде или восстановлена в щелочной среде (+NaBH<sub>4</sub>) до вторичного амина. Широко используются бифункциональные реагенты (например, глутаровый диальдегид) для сшивания белков или пришивания белков к носителям.

**N- концевая  $\alpha$ -аминогруппа,  $\epsilon$  - аминогруппа лизина**

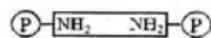
Имидоэфиры



Альдегиды с последующим восстановлением боргидридом натрия



Иммобилизация на носителях, содержащих аминогруппу



Получение коньюгатов белков

Ангидриды дикарбоновых кислот

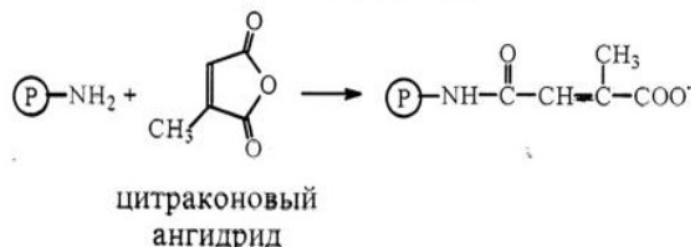


Рис.82. Модификация аминогруппы

Также аминогруппа легко ацилируется хлорангидридами и ангидридами кислот. Ацилирование аминогруппы цитраконовым ангидридом – классическая защита аминогруппы (Рис. 82).

Для активации карбоксильных групп в белковой химии используются карбодиимида, который заряжен. В результате реакции образуется мочевина и белок с активированной карбоксильной группой может связываться с носителем. Для активации карбоксильной группы может быть использован реагент Вудворда, либо нитрофениловый эфир.

Классификация ферментов:

Класс 1. **Оксидоредуктазы** – окислительно-восстановительные реакции

Класс 2. **Трансферазы** – перенос радикала от молекулы донора к молекуле акцептору

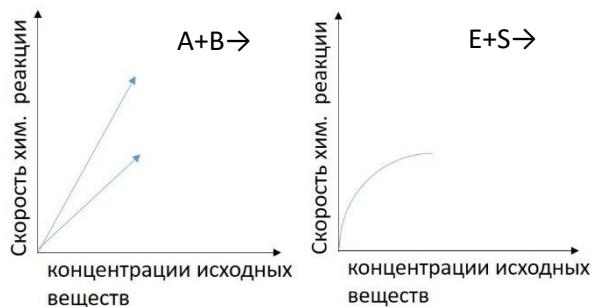
### Класс 3. Гидролазы – реакции гидролиза

Класс 4. Лиазы – негидролитическое расщепление субстрата с образованием кратной связи (в обратном направлении присоединение по кратной связи)

Класс 5. Изомеразы – реакции изомеризации

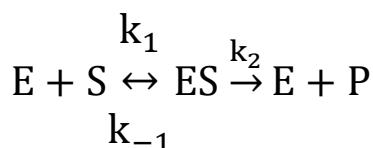
Класс 6. Лигазы – реакции конденсации, сопряжённые с гидролизом АТФ или ГТФ

## Лекция 14. Кинетика ферментативных реакций (часть 1)



По закону действующих масс скорость химической реакции линейно пропорционально концентрации реагентов. В случае ферментативных реакций зависимость не линейна.

Уравнение Михаэлиса-Ментен:



E – фермент, S – субстрат, ES – промежуточная стадия (фермент-субстратный комплекс), P – продукт k – константа скорости реакции

Выведем скорости изменения молярных концентраций веществ в течение реакции:

$$\frac{dP}{dt} = k_2 * ES \quad (1)$$

$$\frac{dES}{dt} = k_1 * E * S - (k_2 + k_{-1}) * ES \quad (2)$$

$$S_0 = S + ES + P \quad (3)$$

$$E_0 = E + ES \quad (4)$$

Возьмём начальную стадию реакции, когда продукта образовалось мало (т. к. продукт в большом количестве может ингибировать фермент), а также возьмём субстрата намного больше чем фермента ( $S_0 \gg E_0$ ). Тогда:  $S_0 = S$  (5)

Обратим внимание на то что концентрация ES, как промежуточное соединение, в течение реакции изменяется по параболе, то есть, есть некоторый оптимум, в котором  $dES/dt = 0$ . Учитывая, что в быстрых реакциях концентрация промежуточных соединений мала, считаем, что вокруг точки оптимума есть область, в которой  $dES/dt$  близка к 0. Таким образом, подставляя в уравнение (2):

$$\frac{dES}{dt} = k_1 * E * S - (k_2 + k_{-1}) * ES = 0 \quad \text{– условия стационарности}$$

$$ES = \frac{k_1 * E_0 * S_0}{k_2 + k_{-1} + k_1 * S_0}$$

Подставим в уравнение (1):

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2 * k_1 * E_0 * S_0}{k_2 + k_{-1} + k_1 * S_0} = v_0 - \text{начальная стационарная скорость образования продукта ферментативной реакции}$$

Поделим на  $k_1$ :

$$v_0 = \frac{k_2 * E_0 * S_0}{\frac{k_2 + k_{-1} + S_0}{k_1}} = \frac{V * S_0}{K_m + S_0} - \text{уравнение Михаэлиса-Ментена}$$

$V = k_2 * E_0$  – максимальная скорость реакции (отражает реакционную способность фермента),  $k_2 = k_{\text{катализитическая константа}}$

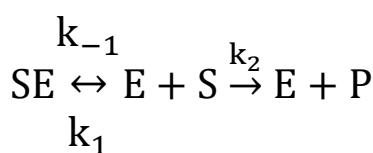
$K_m$  - константа Михаэлиса

$k_1$  – константа образования комплекса,  $k_{-1}$  – константа диссоциации комплекса.  $k_{-1}$  и  $k_1$  – диффузионные комплексы, определяются тепловым движением и вязкостью растворителя.  $k_2$  – хим. константа, определяется реакционной способностью. Можно предположить, что  $k_2$  значительно меньше  $k_{-1}$  и  $k_1$ , поэтому ею можно пренебречь.

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s \text{ (константа диссоциации ES)}$$

То есть,  $K_m$  - субстратная константа - определяет сродство фермента к субстрату (это не всегда так).

Рассмотрим схему реакции (схему Анри):



SE – побочный комплекс, отражение непродуктивного связывания.

$$v = k_2 * E * S_0 \quad (6)$$

$$E_0 = E + SE = E * \left(1 + \frac{S_0}{K_s}\right) \quad (7)$$

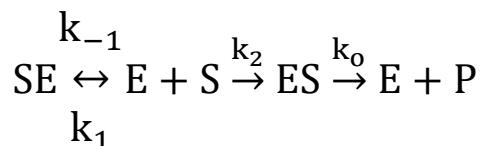
$$\text{Подставим (7) в (6): } v = \frac{k_2 * E_0 * S_0}{1 + \frac{S_0}{K_s}} \quad (8)$$

Домножим (8) на  $K_s'$ :

$$v = \frac{K_s' * k_2 * E_o * S_o}{K_s' + S_o}.$$

Получаем уравнение, похожее на уравнение Михаэлиса - Ментен, где в качестве  $K_m$  выступает константа образования непродуктивного комплекса ( $K_s'$ ). Таким образом, уравнение Михаэлиса - Ментен является универсальным для описания многих кинетических схем ферментативной реакции.

Рассмотрим комбинированную схему:

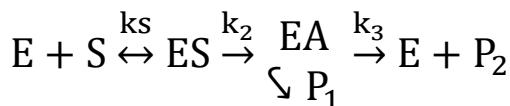


$$k_{\text{катализ}} = \frac{k_0 * K_s'}{K_s' + K_s}$$

$$K_m = \frac{K_s' * K_s}{K_s' + K_s}$$

Таким образом, непродуктивное связывание искажает реакционную способность фермента и субстратную константу, однако не оказывается на энергии переходного состояния. То есть можно рассчитывать эффективность ферментативной реакции по величине 2 порядка –  $V / K_m$ .

Рассмотрим ситуацию, когда реакция идёт последовательно в несколько стадий (трёхстадийная реакция). В двухстадийной реакции фермент атакует субстрат, образует с частью субстрата новый комплекс, другая часть отрезается.



$$\frac{dP_1}{dt} = k_2 * ES$$

$$\frac{dP_1}{dt} = k_3 * EA$$

Стационарное течение реакции предполагает, что  $\frac{dP_1}{dt} = \frac{dP_2}{dt}$ , то есть  $k_2 * ES = k_3 * EA$

Получаем, что  $EA = \frac{k_2}{k_3 * ES}$

$$v_0 = k_2 * E * \frac{S_o}{k_s}$$



$$E_0 = E + ES + EA = E + ES * \left(1 + \frac{k_2}{k_3}\right) = E + E * S_0 \frac{1 + k_2 / k_3}{k_s}$$

$$E = \frac{E_0}{1 + S_0 * \frac{k_2 + k_3}{k_s * k_3}}$$

$$v_0 = \frac{k_2 * E_0 * S_0}{k_s + S_0 \frac{k_2 + k_3}{k_3}}$$

$$k_{\text{катализ}} = \frac{k_2 * k_3}{k_2 + k_3}$$

$$K_m = k_s * \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

**При  $k_2 \gg k_3$ :**  $k_3$  – лимитирующая стадия,  $k_{\text{катализ}} = k_3$ ,  $K_m = k_s * \frac{k_3}{k_2}$

**При  $k_3 \gg k_2$ :**  $k_2$  – лимитирующая стадия,  $k_{\text{катализ}} = k_2$ ;  $K_m = k_s$

Смена лимитирующей стадии может быть, как и при смене субстрата, так и при изменении условий реакции. Рассмотрим график уравнения Михаэлиса – Ментен:  $v_0 = \frac{V * S_0}{K_m + S_0}$

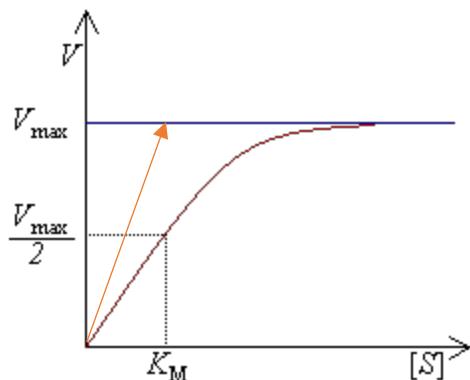


Рис.83. Зависимость скорости от концентрации субстрата.

График – гипербола. Насыщающая величина скорости реакции соответствует  $V$ , то есть, определяется концентрацией фермента. При равенстве концентраций свободного фермента и фермент-субстратного комплекса  $K_m$  соответствует концентрации субстрата.

То есть, в условиях, когда скорость равна  $V/2$ , концентрация субстрата указывает на  $K_m$ . Если взять линейный участок и провести прямую, соответствующую начальному линейному участку, где реализуется первый порядок реакции, то эта прямая пересечёт асимптоту в точке с координатой  $K_m$ .

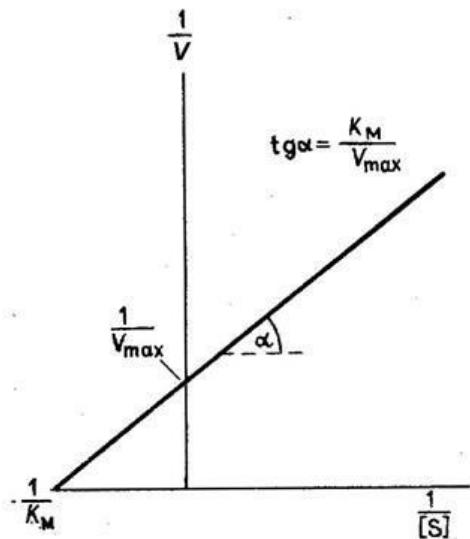


Рис. 84. Метод Лайнуивера-Берка

Для расчёта  $K_m$  необходимо знать  $V$  или провести биссектрису угла линейного участка реакции. Пересечение биссектрисы с экспериментальной кривой соответствует точке, где концентрация субстрата равна  $K_m$ . 2 асимптоты пересекаются в координатах ( $V$ ) и ( $-K_m$ ). В частности, метод Лайнуивера – Берка (Рис. 84). Уравнение Михаэлиса-Ментен преобразуют:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} * \frac{1}{S}$$

График имеет преимущество в том, что позволяет более точно определить  $V$ .

## Лекция 15. Кинетика ферментативных реакций (часть 2)

$E+S \rightarrow$ ; E – фермент; S – субстрат

Объем белковой молекулы можно посчитать, поделив молекулярную массу на плотность, а затем ещё поделив на число Авогадро.

Возьмём белковую молекулу среднего веса:

$$V (\text{белка}) = \frac{25 * 10^{13} * 10^{24} (\text{\AA})}{1,2 * 6 * 10^{23}} = 4/3 * \pi * r^3$$

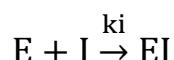
$$r = \sqrt[3]{8 * 10^3} = 20 \text{\AA}$$

$$\Pi (\text{площадь поверхности белка}) = 4 \pi r^2 = 5000 \text{\AA}^2$$

Акт образования фермент-субстратного комплекса – сорбция на поверхности фермента. На поверхности белка (фермента) находится небольшая часть поверхности, которая работает как активный центр. На нём происходит связывание и катализ (процесс превращения субстрата в продукт). Помимо субстратов существует большое количество веществ (ингибиторов), способное взаимодействовать с активным центром, блокируя его. То есть, ингибиторы – вещества, тормозящие реакцию путём связывания с активным центром фермента. Ингибиторы можно условно подразделить на **обратимые и необратимые**. Обратимость или необратимость ингибитора можно проверить практическим образом разбавляя образец с ферментом и связанным с ним ингибитором. В случае если при разбавлении часть ингибирования снимается, то мы имеем дело с обратимым ингибитором. Если при разбавлении ничего не меняется, то ингибитор необратим.

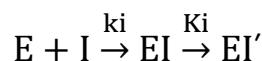
Среди **необратимых ингибиторов** выделяют:

### 1) Модификаторы



В одну стадию взаимодействуют с активным центром фермента и образуют неактивный комплекс.  $E = E_0 * e^{-kt}$ ;  $k = k_i * I_0$

### 2) Субстратоподобные



Сначала обратимо образуется нековалентный комплекс, затем образуется необратимая форма.  $E = E_0 * e^{-kt}$ ;  $k = k_i * \frac{I_0}{K_i + I_0}$

Многие отравляющие вещества, а также медпрепараты являются необратимыми ингибиторами.

Необратимые ингибиторы широко используются для:

- Определения природы функциональных групп
- Фиксации промежуточных соединений
- Инактивации протеолитических ферментов
- Титрования активных центров
- Введения метки-репортёра
- Установления взаимосвязи структуры и реакционной способности

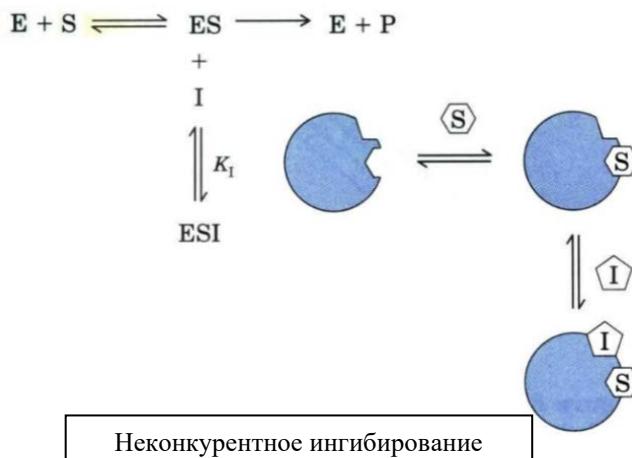
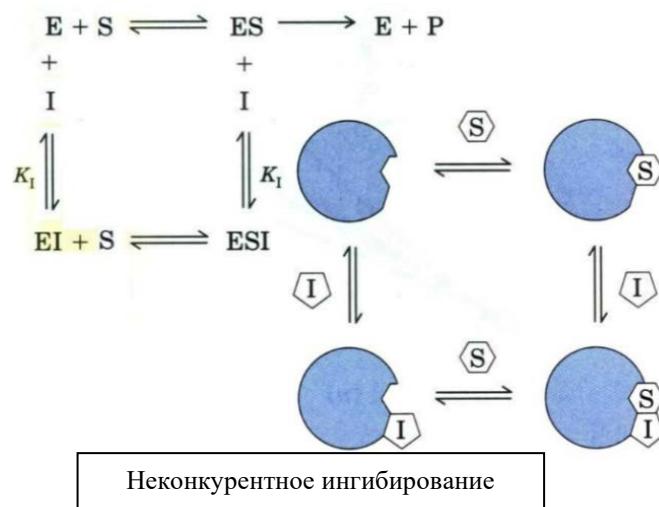
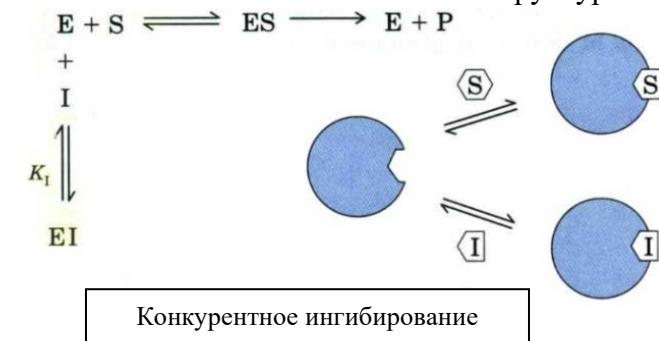


Рис.85. Различные типы ингибирования

**Обратимые ингибиторы:**

В случае простейшей ферментативной схемы возможно 3 типа ингибирования. Ингибитор может связываться (1) только со свободной формой фермента (E), (2) со свободной формой фермента (E) и фермент-субстратным комплексом (ES), (3) только с фермент-субстратным комплексом (ES)

**(1) – конкурентное ингибирование**

$$v_0 = k_o * E * S_0;$$

$$E_0 = E + ES + EI = E\left(1 + \frac{S_0}{k_s} + \frac{I_0}{k_i}\right)$$

$$v_0 = \frac{k_o * E_0 * S_0}{k_s \left(1 + \frac{I}{k_i}\right) + S_0}$$

**(2) – неконкурентное ингибирование**

$$k_{\text{катализ}} = \frac{k_o}{1 + \frac{I_0}{k_i}}$$

$$K_m = k_s$$

Эффект ингибирования обнаруживается на максимальной скорости, ингибитор снижает наблюдаемую  $k_{\text{катализ}}$

**(3) – бесконкурентное**

$$k_{\text{катализ}} = \frac{k_o}{1 + \frac{I_0}{k_i}}$$

Количественные параметры, характеризующие эффективность ингибирования –  $I_{50}$  и  $K_i$

В случае конкурентного обратимого ингибирования ингибитор не влияет на отношение параметров! Эффект ингибирования при больших концентрациях субстрата исчезает. Эффективность неконкурентный ингибитор одинакова при любой  $[S]$ . Эффективность бесконкурентного ингибитора при малой  $[S]$  не проявляется, а при увеличении  $[S]$  проявляется (Рис. 87).

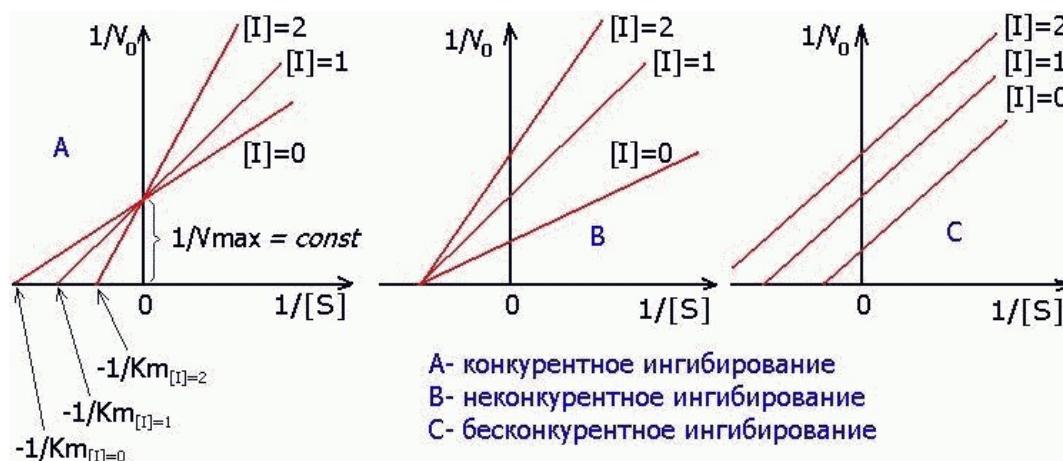


Рис.86. Графики Лайнувера-Берка при различных типах обратимого ингибиирования

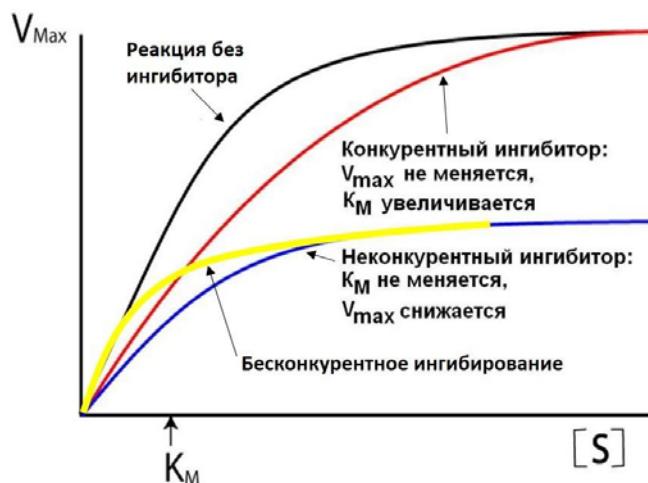
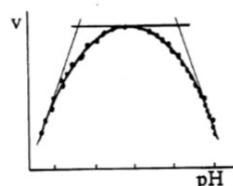


Рис.87. Графики обратимого ингибиирования

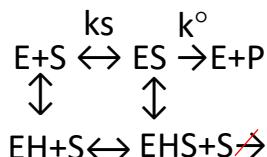
**pH-зависимости ферментативной активности**

Действие pH аналогично ингибираванию. Протон – ингибитор и активатор фермента. Простейшие случаи влияния pH на реакцию можно записать следующим образом:

$$k_{\text{катализ}} = \frac{k_0}{1 + \frac{[H^+]}{k_a}}$$



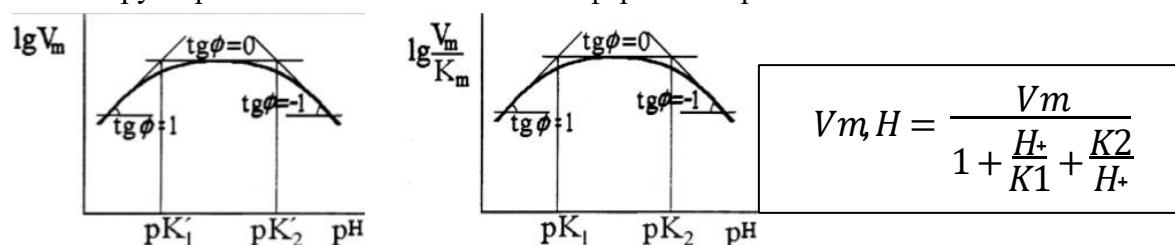
Рассмотрим схему реакции:



В обоих своих протонированных формах фермент способен связывать субстрат, но только депротонированный фермент обладает катализической активностью.

$$\text{Выводим: } v = \frac{k_{\text{катализ}} * E_0 * S_0}{K_m + S_0}$$

Для того, чтобы найти константы ионизации фермент-субстратного комплекса, мы анализируем pH-зависимость активности фермента при V.



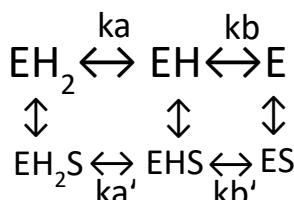
Для определения pKa функциональных групп фермента и фермент-субстратного комплекса также необходимо проследить зависимость pH от  $\lg(V/K_m)$ .

Существует 4 приёма анализа pH-зависимости:

$$\text{Используем } k_{\text{катализ}}^{-1} = k_0^{-1} + k_0^{-1} * H/k_a$$

- 1) Линейные ароморфозы (анализируем  $k_{\text{катализ}}^{-1}$  от  $H^+$ )
- 2) Полулогарифмические зависимости ( $k_{\text{катализ}}$  от pH)
- 3) Логарифмические зависимости ( $\lg(k_{\text{катализ}})$  от pH)  $\lg k_{\text{катализ}} = \lg(k_0) + pH - pK_a$
- 4) Метод последовательного приближения (компьютерный метод)

Считаем, что существует 3 формы фермента:



EHS – активная форма,  $v_0 = k_o * EH * S_0 / k_s$

Таким образом, график, описывающий зависимость активности фермента от pH имеет куполообразную зависимость.

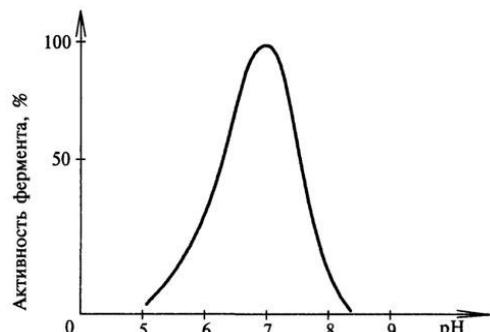


Рис.88. Зависимость активности фермента от pH

### Зависимость активности фермента от температуры

Любая химическая реакция ускоряется при повышении температуры. Однако ферменты, будучи нестабильными соединениями, при повышении температуры могут разрушаться или инактивироваться. Для описания температурной зависимости необходимо знать уравнения Вант-Гоффа (для констант равновесия), уравнение Аррениуса (для констант скорости) и уравнение абсолютных скоростей:



$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{ass} = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

$$\Delta G^\neq = -RT \ln \{k_R / (k_B T/h)\} = \Delta H^\neq - T\Delta S^\neq$$

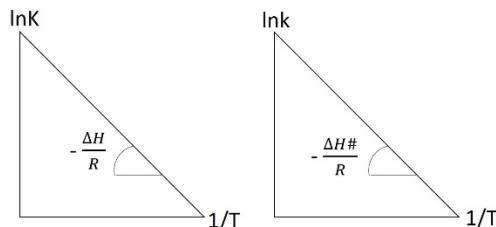
Теория абсолютных скоростей:

$$k_r = (k_B T/h) e^{-(\Delta G^\neq / RT)}$$

Уравнение Аррениуса:

$$k_r = k_0 e^{-(E_a / RT)} \quad E_a = \Delta H^\neq + RT$$

В соответствии с уравнением Вант-Гоффа и уравнением Аррениуса соответственно откладываем:



## Лекция 16. Катализ и его виды

Чтобы реакция прошла, реагентам необходимо образовать комплекс и преодолеть энергетический барьер. Эффективность ферментативного катализа обусловлена тем, что энергия активированного состояния ниже, чем в обычной реакции. Структура переходных состояний в каталитической реакции и обычной реакции разные.



Рис. 89. Подцентры активного центра фермента

Факторы (эффекты) ускорения химических (ферментативных) реакций:

- 1) Сближение (концентрирование)
- 2) Ориентация
- 3) Эффекты среды (благоприятные условия)

На ферменте существует активный центр, который содержит каталитический и сорбционный подцентры (Рис. 90). Каталитический подцентр отвечает за правильную ориентацию субстрата, сорбционный подцентр отвечает за связывание (концентрирование).

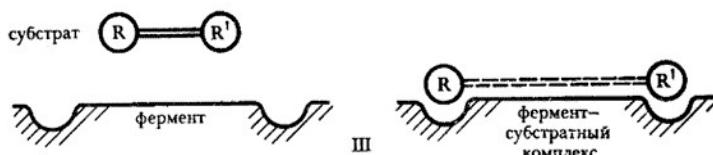
**Теории ферментативного катализа:**

### 1) Концепция «ключ-замок»



- не объясняет ускорения реакции

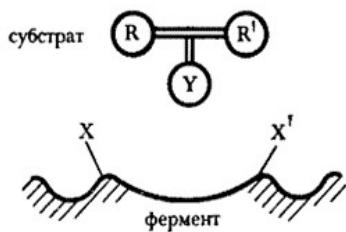
### 2) Теория напряжения (дыбы)



Фермент жёсткий, субстрату для взаимодействия необходимо растянуться и таким образом напрячь связь.

**3) Теория индуцированного соответствия**

а)



б)



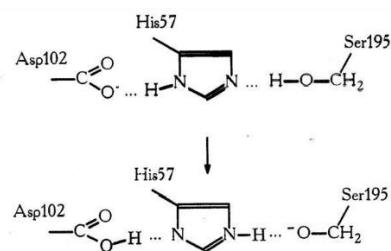
Субстрат жёсткий, фермент принимает различные конформации. При образовании фермент-субстратного комплекса субстрат индуцирует фермент принять конформацию, при которой катализическая активность максимальна.

Мы допускаем, что фермент активно связывает не субстрат, а активированный комплекс. В таком случае, равновесие смещается в сторону комплекса и уже формируются основные элементы комплекса. За счёт этого энергия активации снижается.

**Кислотно-основной катализ:**

- Специфический кислотный ( $\text{H}_3\text{O}^+$ )
- Общий кислотный (доноры протона, кислоты Бренстеда)
- Электрофильный (акцепторы электронной пары, кислоты Льюиса)
- Специфический основной ( $\text{OH}^-$ )
- Общий основной (акцепторы протона, основания Бренстеда)
- Нуклеофильный (доноры электронной пары, основания Льюиса)

Прототропные группы ферментов: аминогруппы белка, кислотные группы белка, -SH группа цистеина и тд



*Рис. 90.. Каталитическая триада*

Преимущество фермента в том, что фермент формирует подходящие ансамбли функциональных групп. Например, триада (Рис. 91). Протон серина оттягивается азотом имидазола. NH-группа даёт протон на карбоксильную группу аспарагиновой кислоты. Такая триада присутствует в большом количестве протеолитических ферментов. Увеличение реакционной способности в  $10^6$  раз.

Триада из серина, имидазола гистидина и карбоксилата аспарагиновой кислоты (Рис. 91) можно рассматривать как цепь переноса протона: от гидроксила серина на карбоксилат аспарагиновой кислоты. В результате образуется карбоновая кислота и алcoxил (мощный нуклеофил).

### Молекулярные механизмы действия ферментов

Химотрипсин – протеаза, катализирующая гидролиз пептидной связи.

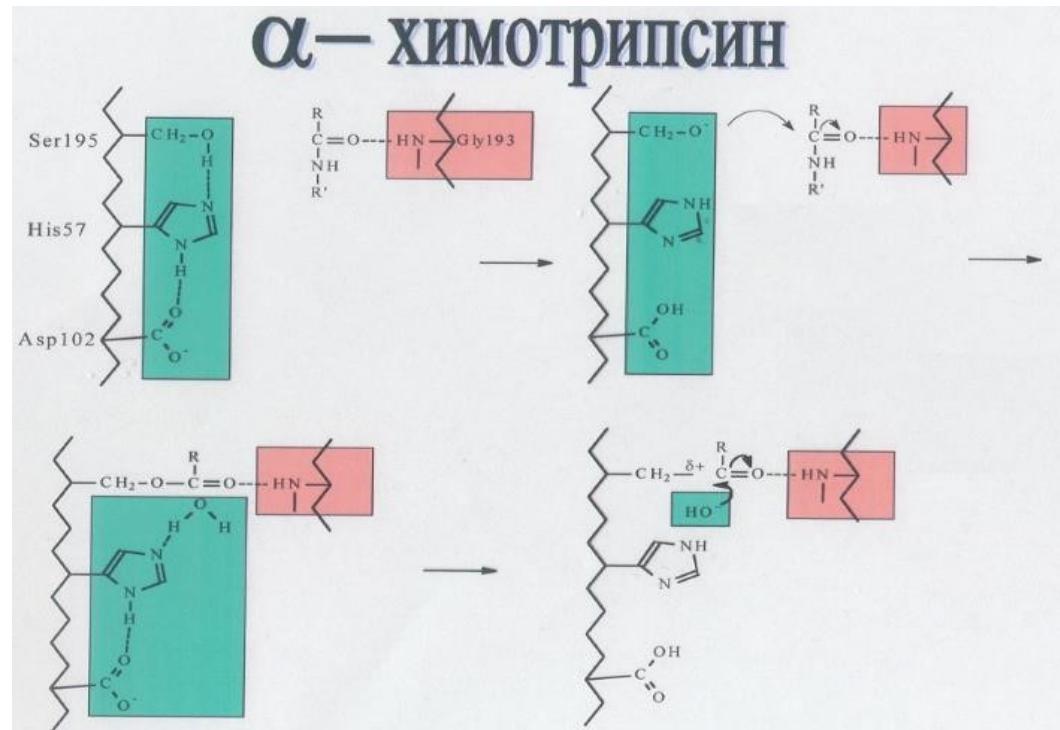


Рис.91. Механизм действия химотрипсина

**Механизм действия химотрипсина** (Рис. 91): в собранном виде триада располагается в каталитическом участке активного центра. Субстрат связывается гидрофобной группой. Каталитический цикл состоит из двух фаз, в первой из которых разрывается пептидная связь субстрата и образуется эфирная связь между карбонильным углеродом пептида и OH-группой серина: формируется ацилфермент. Во второй фазе происходит гидролиз эфирной связи регенерация свободного фермента. Взаимодействие серина и гистидина приводит к образованию сильного нуклеофила (электронная пара кислорода), который атакует карбонильную группу пептида, образуя тетраэдрический ацилфермент (ES). Нестабильность, обусловленная наличием заряда на карбонильном кислороде субстрата, приводит к распаду тетраэдрического комплекса с восстановлением двойной связи кислорода с углеродом и разрыву пептидной связи. Уходящая иминогруппа (продукт) протонируется гистидином и растворяется в воде. Оставшаяся часть полипептидной цепи остается связанной с серином ковалентной связью (ацилфермент). Приходящая молекула воды депротонируется за счет

взаимодействия с гистидином, образуя нуклеофильный гидроксид-ион. Этот ион атакует эфирную связь ацилфермента. Далее происходит деацетилирование: молекулы воды активируются имидазолом и аспарагиновой кислотой, происходит гидролиз. При распаде выходит второй продукт и происходит регенерация свободного фермента.

Существует много различных сериновых протеаз. Их каталитические участки активного центра устроены по единому принципу. Однако участки связывания могут сильно различаться. Так, например, у химотрипсина глубокий гидрофобный карман, куда заходят ароматические группы аминокислот. У эластазы гидрофобный карман значительно меньше, в него может заходить только метильная группа. У трипсина в гидрофобном кармане присутствует отрицательный заряд (Рис. 93).

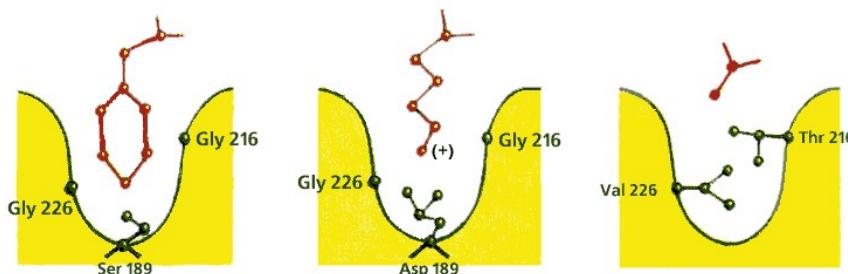


Рис.92. Строение разных сериновых протеаз

**Папаин** – протеолитический растительный фермент, катализирующий гидролиз белков, пептидов, амидов и сложных эфиров основных аминокислот. По механизму действия папаин схож с химотрипсином. Триады в каталитическом участке нет. Нуклеофильность увеличивается за счёт SH-группы цистеина.

**Пепсин** – протеолитический фермент, присутствующий в желудочном соке (в кислой среде). Осуществляет расщепление белков пищи до пептидов. У пепсина в механизме двойного замещения роль нуклеофила выполняет карбоксилат-ион, а донором протона по отношению к уходящей группе служит вторая карбоксильная группа (Рис. 94)

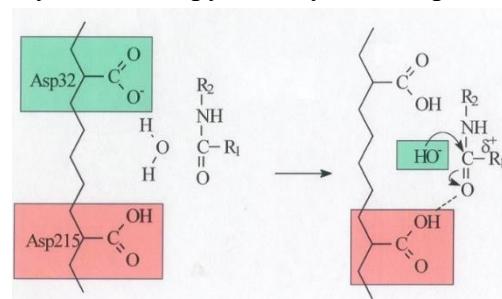
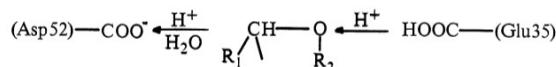


Рис. 93. Механизм действия пепсина

**Лизоцим** – фермент, разрушающий клеточные стенки бактерий гидролизом пептидогликана. Присутствует в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, слёзной жидкости и т. д. Лизоцим работает аналогично пепсину.

Цепь переноса заряда



Общий основной катализ      Общий кислотный катализ

Продукты

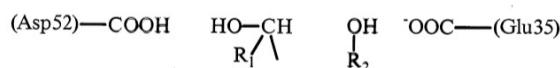


Рис. 94. Механизм действия лизоцима

**Механизм действия лизоцима:**

цепь переноса заряда происходит от глутаминовой кислоты до аспартата. Протон взаимодействует с эфирным кислородом, ослабляя эфирную связь. Вода активируется путём отрыва протона на карбоксилат. В результате образуется 2 спирта и (Рис. 94).

**Карбоксипептидазы** -протеолитические ферменты, которые гидролизуют (разрывают) пептидную связь аминокислотного остатка на С-конце. Находятся на мембране клеток стенки кишечника. В активном центре работает ион Zn, который может образовывать комплекс как с субстратом, так и с водой. Субстрат активируется за счёт перехода электронной пары на цинк. У воды отщепляется протон, образуется гидроксильная группа, которая атакует карбонильный углерод. Происходит гидролиз и отщепляется аминокислота.

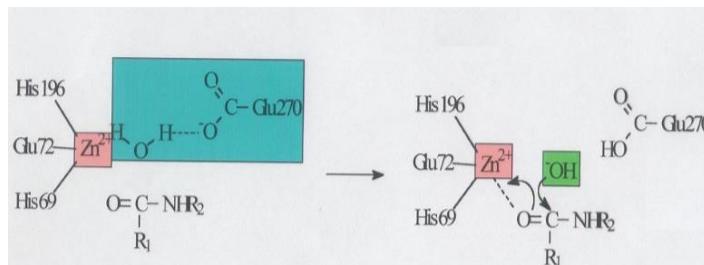


Рис. 95. Механизм действия карбоксипептидазы

**Рибонуклеаза** - фермент, катализирующий протеолитические ферменты. В активном центре 2 имидазола, которые активируют 2 гидроксил на рибозе РНК, отрывая от него протон. Тем самым образуется мощный нуклеофил, который атакует фосфат в составе РНК и формирует промежуточный метафосфат. Второй имидазол активирует воду, превращая её в гидроксильную группу. Гидроксил гидролизует метафосфат и РНК расщепляется.

**Карбоангидраза** – фермент, который катализирует обратимую гидратацию диоксида углерода. В активном центре располагается цинк, который присоединяет в лигандную сферу воду, активируя её до гидроксильной группы. Также в лигандной сфере связывается CO<sub>2</sub>. В результате образуется карбогидрат, который уходит в раствор.

**Лекция 17. Ферменты в биотехнологии**

1) Пещерно-незапамятная (естественная)-человек использует природные ресурсы

- 2) Традиционная (искусственная)- человек создаёт замены природным ресурсам в целях удовлетворения своих потребностей
- 3) Современная («научная»)

Человек всегда в чём-то нуждался, в связи с чем, биотехнология (в виде сельского хозяйства) появилась с древнейших времён. Сначала человек использовал только природные ресурсы для удовлетворения своих потребностей. Со временем человек научился создавать (синтезировать) замены природным ресурсам. Научились синтезировать ткань для одежды, пищу, удобрения и тд. В середине 20 века человечество осознано, что продолжать в таком духе нельзя. На Земле накопилось слишком много синтезированных неприродных материалов. Появились новые болезни. Огромные участки суши оказались отравлены химическими ядовитыми веществами. Было принято решение в химии использовать как можно больше элементов биотехнологии, развивать сельское хозяйство, прекратить слив отходов в водоёмы, построить очистительные сооружения и тд.

На сегодняшний день практически всех домашних животных кормят синтетическим кормом. Так, например, в корм коров входят: аминокислоты, белки, витамины, пигменты, факторы роста, агенты силосования и антибиотики (в большом количестве). В сыре, хлебе – огромное количество продуктов ферментации, вино, пиво и крепкие напитки – также являются продуктами ферментации.

Ферменты используются в множестве сфер деятельности. Самый большой вклад ферментов – в пищевой промышленности (сыроделие, сбраживание молока и тд).

*Таблица 5. Рынок ферментов в США*

Сфера применения	1990г.	1991г.	1995г.	Среднегодовой прирост, %
1. Медицина	186,6	233,2	568,2	25,0
2. Химия	15,2	17,3	28,8	13,7
3. Экология	33,0	37,2	60,0	12,7
4. Моющие средства	75,0	82,5	120,0	10,0
5. Биотехнология, исследования	80,0	86,9	119,8	8,6
6. Пищевая промышленность, текстиль, кожа, бумага	190,0	194,8	215,4	2,5
7. Диагностика	21,4	22,1	25,0	0,9
<b>ИТОГО:</b>	<b>601,2</b>	<b>674,0</b>	<b>1137,2</b>	<b>13,5</b>

Долгое время на пути развития энзимологии стоял барьер – низкая стабильность ферментов. Однако данная проблема была решена путём использования **иммобилизованных** ферментов.

**Иммобилизация** – подавление подвижности молекулы или части молекулы фермента. Ферменты искусственно связывают с нерастворимым носителем, вследствие чего фермент теряет подвижность, но сохраняет свои каталитические свойства.

**Иммобилизация:**

- Физическая (фермент физически взаимодействует с носителем)
- Химическая (взаимодействие с носителем путём образования химической связи)
- (Физикохимическая)

**Носители, используемые для иммобилизации ферментов: 1) Неорганические**

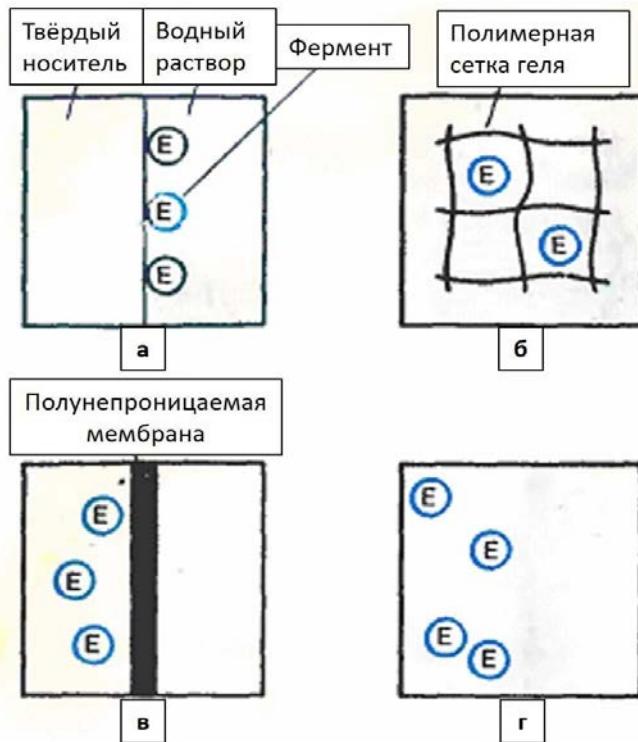
- металлы (Au)
- Оксиды металлов ( $TiO_2$ )
- Неметаллы (графит)
- Оксиды неметаллов ( $SiO_2$ )
- Гидроксиды, соли, силикаты, алюмосиликаты, цеолиты

**Органические**

- Синтетические полимеры (любые, чаще – полимеры с функциональными группами, например, полиамиды)
- Природные полимеры (белки, углеводы)
- Молекулярные агрегаты (синтетический пав, липиды (липосомы), фосфолипиды)

### **Физическая иммобилизация**

Физическую иммобилизацию можно осуществить при адсорбции фермента на поверхности твёрдого носителя (Рис. 98а) или при абсорбции фермента по всем объёму носителя (чаще всего – в порах полимерного геля; Рис. 96б). Можно использовать полупроницаемую мембрану, чтобы огораживать часть реакционного сосуда, субстрат и продукт могут распределяться по всей системе, тогда как фермент будет концентрироваться в одной части реактора (Рис. 96в). Также можно использовать многофазную реакционную среду (например, вода и эфир): фермент будет находиться в водной фазе, а субстрат и продукт в эфирной фазе (Рис. 96г).

*Рис. 96. Принципы физической иммобилизации*

В промышленности часто используются гранулирование и капсулирование. Гранулы с катализатором получаются либо путём дробления блока-сополимера с ферментом, либо путём эмульсионной полимеризации (образуются шарики заданного размера). Ферменты включают в липосомы, в полые волокна и в другие различные носители (в частности, в капсулы).

### Химическая иммобилизация

Химическая иммобилизация предполагает участие трёх компонентов: носителя (с функциональными группами), фермента (с функциональными группами) и сшивающего агента. Можно выделить 3 ситуации:

- 1) Берут фермент и носитель. С помощью сшивающего агента пришивают фермент к носителю (Рис. 97а)
- 2) Берут фермент, носитель и сшивающий агент. Образуется спейсер: можно пространственно отделить носитель от фермента; Рис. 97б)
- 3) Берут только фермент и сшивающий агент. Образуется сетка из фермента и сшивающего агента (Рис. 97в).

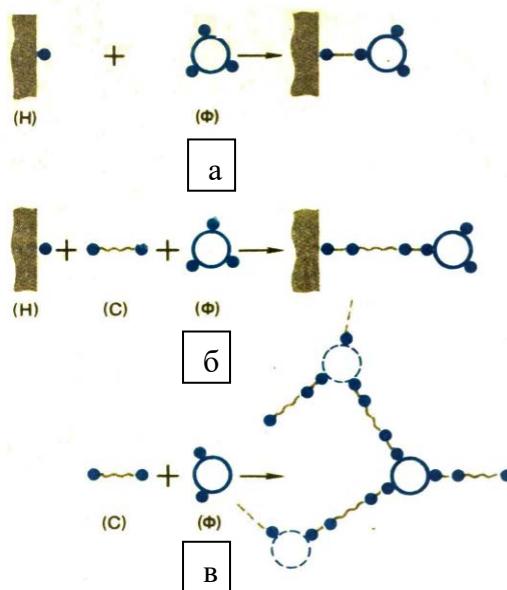
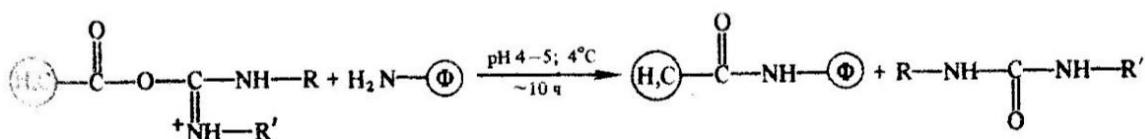
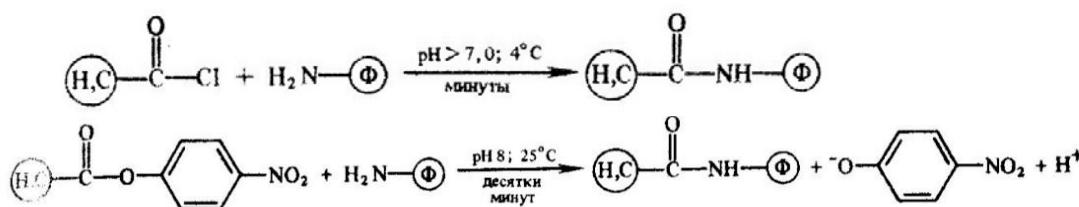
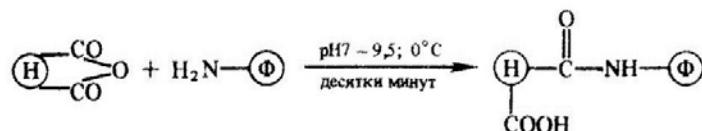


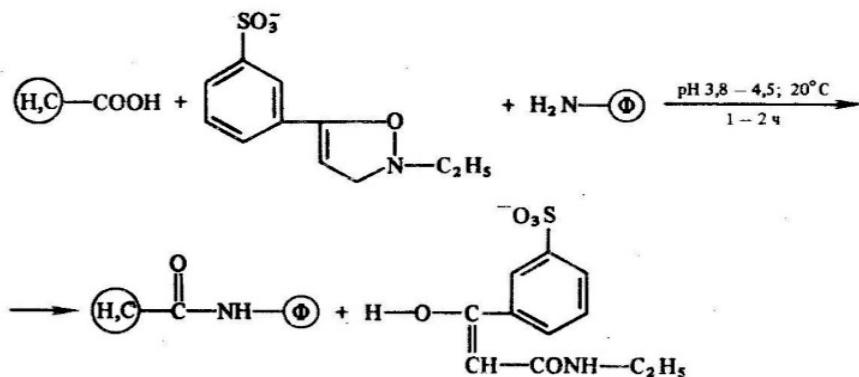
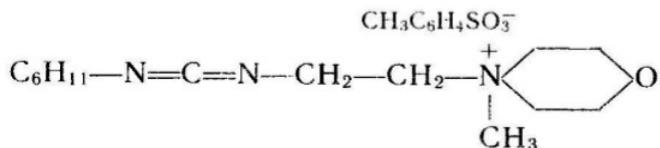
Рис. 97. Различные типы химической иммобилизации

**Методы химической (ковалентной) модификации ферментов:**

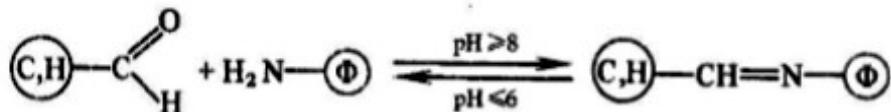
- Реакции образования амидной связи



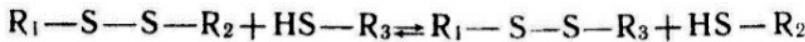
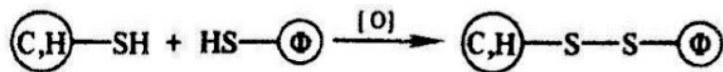
- Реакции азотосочетания
- Реакции образования карбамидной связи (реакция с карбоксильной группой носителя)



- Реакции образования оснований Шиффа и вторичных аминов



- Реакции тиол-дисульфидного обмена



### Преимущества иммобилизованных ферментов:

- Технологичность
- Простота манипуляций
- Повышенная стабильность (термостабильность и стабильности при хранении)

#### Недостатки иммобилизованных ферментов:

- Пониженная каталитическая активность
- Изменённая субстратная специфичность
- Диффузионные ограничения

### Применение энзимологии (инженерная энзимология):

- Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)
- Ферменты в пищевой промышленности (пищевые добавки, производство продуктов питания, кормовые добавки)
- Ферменты в медицине (препараты на основе ферментов, диагностические наборы и устройства)
- Аналитические системы и устройства; биосенсоры
- Ферменты в бытовой химии, в стиральных и моющих средствах
- Ферменты в конверсии вещества и энергии
- Мониторинг окружающей среды и биоремедиация

## Лекция 18. Использование ферментов и катализитических процессов в биотехнологии

### **Стратегия производства:**

фундаментальные исследования → технология → промышленность → продукт

Развитие биотехнологии сильно подталкивали растущее количество отходов и заканчивание невозобновляемого сырья. Часто происходящие загрязнения и отклонения в области промышленности связаны с тем, что не имеют базового фундаментального исследования. Идея использования биотехнологии и ферментов строилась на переходе от невозобновляемого сырья к возобновляемому, а также на использовании нетрадиционного сырья. Также очень важный вопрос – утилизация отходов. Многие отходы на данный момент разлагаются ферментами и микроорганизмами, которые были специально выделены.

### **Основные и наиболее важные направления использования ферментов в химии:**

- **Гидролиз биополимеров** (полисахариды, белки)

Часто крахмал гидролизуют до глюкозы, которую потом используют в продуктах питания. Питьевой спирт – результат сбраживания сахаров или крахмалов до спирта.

- **Гидролиз и переэтерификация жиров**

Использование мыла, получение основы для маргаринов и тд. Также часто жиры используют как дизельное топливо (путём замены длинноцепочечных цепей жирных кислот на короткоцепочечные). Стоимость масел сильно зависит от обработки и редкости растения, из которого масло выделяют. Так, например, пальмовое и подсолнечное масла дешёвые, тогда как масло какао, используемое в косметической и пищевой сфере, стоит дороже. На данный момент из пальмового масла можно получить масло какао путём переэтерификации.

- **Окисление, биодеградация углеводородов**

В основном – биодеградация углеводородов нефти. Человечество довольно активно использует растительные углеводороды (например, каучук). Активно пытаются исследовать микроорганизмы, которые синтезируют углеводороды.

- **Синтез оптически-активных соединений** (стереоспецифический синтез, введение метки)

Используется для получения определённых аминокислот (например, лизина), трансформации антибиотиков (для понижения резистентности), стереоспецифической трансформации стероидов (регуляторов большого количества биопроцессов).

## Ферменты в анализе

В аналитической химии часто используются кинетические методы анализа, когда анализируется скорость реакции, по которой можно определить концентрации реагентов.

**Аналитом** в ферментативной реакции может быть:

- Фермент (определяется по скорости реакции)

Например, тест на инфаркт у пациента – проверка активности в крови фермента лактатдегидрогеназы. В норме в крови активность лактатдегидрогеназы очень низкая. При инфаркте происходит разрыв клеток миокарда и фермент попадает в кровь.

- Субстрат
- Ингибитор
- Антиген (антитело) Методы детекции:

- Фотометрические
- Хеми- и биолюминесцентные
- Электрохимические
- Иммунохимические – наиболее распространённый метод
- Атомно-силовая микроскопия
- Нанотехнологические

} Классические



Рис. 98. Иммунохимический анализ

- IgG – отвечает за общий инфекционный иммунитет
- IgM – отвечает за общий инфекционный иммунитет
- IgA – отвечает за общий и местный инфекционный иммунитет
- IgD – рецептор В-лимфоцитов
- IgE – отвечает за аллергические реакции

Рис. 99. Основные классы иммуноглобулинов

Иммунный ответ: антитела образуются в живом организме в ответ на попадание внутрь чужеродного тела(антисыворотки). Антитела связываются с антигенами, образуя комплекс. Детектировать комплексы можно визуально или с помощью физико-химическими метода. Важно уметь различать связанные (в комплексе) и свободные антигены и антитела. Для этого антиген или антитело метят (Рис. 98).

Существуют различные классы антител (Рис. 99). Каждый класс делится на подклассы. То есть, существует огромное количество антител, каждый из которых высокоспецифичен к определённому антигену.

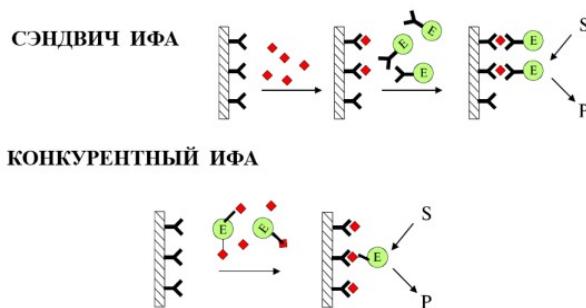


Рис. 100. Различные схемы ИФА

### Иммуноферментный анализ (ИФА)

Наносят антитела на подложку (полистерольную), образуются иммобилизованные антитела.

- 1) **Конкурентный ИФА** (Рис. 100) – при добавлении на подложку смеси с меченным ферментом и немеченным анализатором. Определяемые антигены или антитела конкурируют с аналогичными меченными антигенами или антителами коньюгата за места связывания с иммunoносорбентом. Далее запускают ферментсубстратную реакцию и анализируют количество фермента. Чем больше фермента связалось, тем меньше анализатора в смеси.
- 2) **Сэндвич ИФА** (Рис. 100) – вариант неконкурентного ИФА. На подложку добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем на носитель добавляют меченные ферментом другие специфические антитела. После второй инкубации и удаления избытка коньюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена.

В качестве **маркёров** в иммуноферментном анализе используют:

- Пероксидаза
- Щелочная
- Фосфатаза
- Пенициллаза

**Биосенсоры** - аналитические устройства, использующие биологические материалы для “узнавания” определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

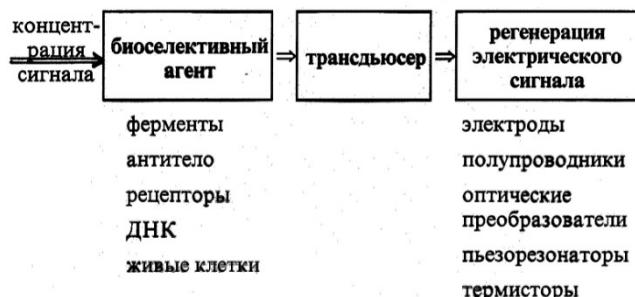


Рис. 101.Механизм передачи сигнала с помощью биосенсора

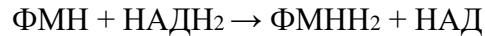
Чаще всего для регенерации электросигнала используются селективные электроды. Наиболее популярным является ферментный электрод на глюкозу (глюкозоанализатор). Глюкозооксидаза располагается на поверхности электрода. Берут каплю крови. Если в крови есть глюкоза, то под воздействием глюкозооксидазы она превращается в глюкозовую кислоту.

Существуют как прямые методы переноса электрона с активного центра фермента на электрод, так и методы переноса посредством медиатора. Биолюминисцентные методы:

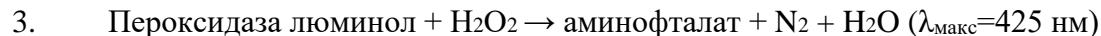


(λ<sub>макс</sub>=560 нм)

2. Бактериальные люциферазы



ФМНН<sub>2</sub> + деканаль + O<sub>2</sub> → ФМН + кислота + hν (λ<sub>макс</sub>=490 нм)



## Лекция 19. Ферменты в медицине

Использование ферментов в медицине:

1. Ферменты и антиферменты (ингибиторы) как лекарственные препараты
  - A) *Патогенетическая (заместительная) терапия* - направлена на устранение или подавление механизмов развития болезни
  - Б) *Этиотропная терапия* - направлена на устранение причины болезни
  - В) Наружные средства
2. Диагностика и диагностические наборы
3. Фармацевтическая промышленность Лекарственные средства бывают:
  - Системные
  - Антимикробные
  - Противовирусные
  - Иммуностимуляторы и иммуномодуляторы
  - Пищевые добавки (огромное количество лекарственных веществ названы пищевыми добавками, так как пищевые добавки проще выдвинуть на продажу)

Классификация лекарственных средств по типам назначения и применения:

### 1) Внутренние

- Интраназальные (через нос)
- Пероральные (через рот)
- Парентеральные (введение в кровь, например – тромболитические ферменты)
- Аэрозольные (через лёгкие)
- Интракорпоральные

### 2) Наружные (мази, кремы, повязки, аппликации, пластиры)

При наружном применении крайне важны трансдермальный перенос (через кожу) и трансмукозный перенос (через слизистую). и трансмукозный перенос (через слизистую).

Для рассмотрения поведения ферментов в организме необходимо рассмотреть пищеварение, кровь и систему кровообращения, защитные системы и иммунитет, системы и средства транспорта.

## Пищеварение

Начинается с ротовой полости, в которой есть ферменты (амилаза – разлагает крахмал). Первичное пищеварение происходит в желудке. Из стенок желудка синтезируется пепсин (разлагает пептиды), липазы, желчные соли. Основное пищеварение происходит в кишечнике. В кишечнике работают протеолитические ферменты и инсулин (связывается с рецепторами мышечных клеток и стимулирует клетки транспортировать глюкозу внутрь)

## Транспорт

### Типы транспорта:

- Пассивный
- Облегчённый (медиаторный)
- Активный (Пример, Na-K насос. АТФаза закачивает  $K^+$  внутрь клетки против градиента, выбрасывая  $Na^+$  наружу. Для перекачки ионов требуется затрата АТФ (Рис.102))

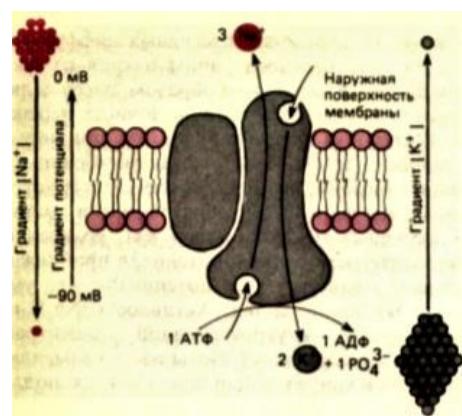


Рис. 102. Активный транспорт

### Средства транспорта:

- Система кровотока (транспорт гидрофильных веществ)
- Лимфатическая система (транспорт гидрофобных веществ)
- Поры и каналы клеток
- Рецепция
- Эндо- и экзоцитоз

Эндоцитоз происходит путём втячивания мембраны внутрь клетки, образуя эндосому с транспортируемым веществом.

В процессе пищеварения различные вещества всасываются в кровь. Всасывание происходит, в основном, в кишечнике. Обратно из крови также выбрасываются вещества в кишечник (выделение). Почки только всасывают растворы веществ из крови.

Объём плазмы крови составляет 3 л, межклеточной жидкости – 10 л, внутриклеточной жидкости – 30 л.

## Кровь и система кровообращения

Кровеносная система переносит питательные вещества, кислород и углекислый газ. В крови содержится большое количество различных клеток (эритроциты, тромбоциты, лимфоциты и

тд). - и В-лимфоциты – элементы крови, обеспечивающие клеточный (Тлимфоцитами) и гуморальный иммунитет (В-лимфоцитами).

При повреждении сосудов активируются сразу 2 системы:

- 1) *Система агрегации тромбоцитов.* Ключевой фактор – циклооксигеназа, использующий арахидоновую кислоту и активирующий тромбоксан, который осуществляет активацию фосфолипопротеинов (рис. 104)
- 2) *Фибриновая система.* Тромбокиназа катализирует реакцию превращения протромбина в тромбин, который в свою очередь вызывает реакцию образования фибринова из фибриногена. Образуется фибриновый сгусток, который закупоривает повреждение в сосуде (Рис. 103)

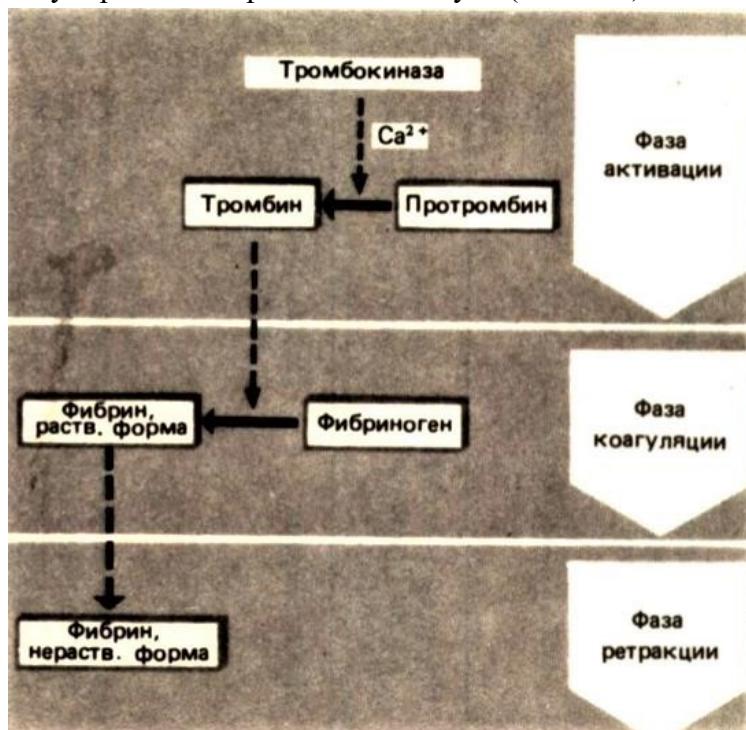


Рис. 103. Фибриновая система

При определённых условиях тромбы могут образовываться в кровотоке даже без повреждения сосудов. Такие сгустки невероятно опасны для жизни, так как они могут застрять в сосуде и перекрыть ток, что в конечном счёте может привести к смерти. Систему агрегации тромбоцитов можно ингибиовать аспирином, дипиридамолом, эпопростенолом (**антиагреганты**). Антитромбин предотвращает образование фибринового сгустка путём связывания с тромбином, образуя комплексы. Также тромбообразование подавляют гепарин, варфарин (**антикоагулянты**). Гепарин – отрицательно заряженный полисахарид, который не даёт элементам крови слипаться. Сгусток фибрина может быть растворён плазмином, который активируется стрептокиназой, альтеплазой, анистреплазой (**фибринолитические**

средства; Рис. 105) Пиявки также способствуют рассасыванию тромбов, однако это не используется в медицине.



Рис. 104. Система агрегации тромбоцитов

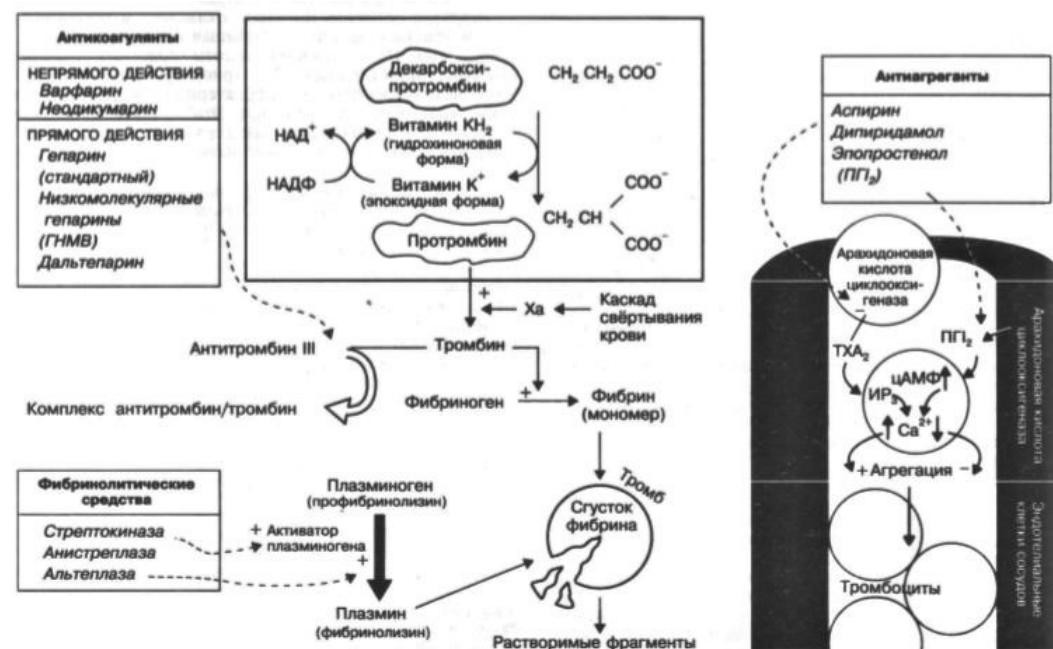


Рис. 105. Методы подавления свёртывания крови

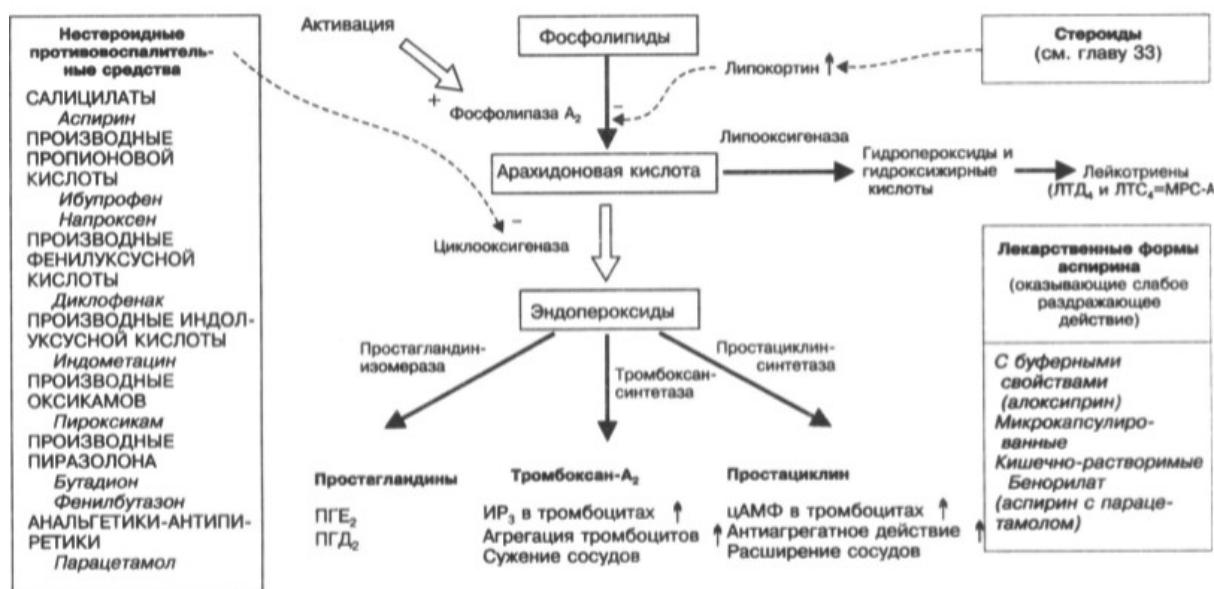


Рис. 106. Нестероидные противовоспалительные средства

Диабет развивается при относительной или абсолютной недостаточности гормона поджелудочной железы - инсулина. Диабет опасен тем, что может вызвать повреждение как мелких, так и крупных сосудов. Поражение крупных сосудов может вызвать инфаркт, инсульт, поражение крупных сосудов нижних периферических конечностей. Для борьбы с диабетом используют препараты инсулина (короткого действия, средней продолжительности действия, длительного действия), пероральные антидиабетические средства.

### Лекарственные средства:

- Ферменты
- Субстраты и кофакторы
- Ингибиторы ферментов
- Инактиваторы ферментов
- Агонисты, антагонисты и блокаторы рецепторов
- Антимикробные препараты (протеазы, карбогидразы)

## Лекция 20. Сфера применения ферментов и их разнообразие

Катализ был открыт в России Киргоффом Константином Сигизмундовичем. Он открыл реакцию гидролиза крахмала под действием минеральных и органических кислот. Более того, было показано, что в течение реакции кислота не расходуется. Термин «катализ» был введён Берцелиусом в 1836 году.

На сегодняшний день ферменты – наиболее распространённые, наиболее доступные, изученные и широко используемые катализаторы.

### Индустрия ферментов (крупнотоннажные процессы):

- Пищевая промышленность
- Моющие, дезинфицирующие и отбеливающие средства
- Тонкий органический синтез
- Биотоплива
- Биопластики

### Индустрия ферментов (химический и биомедицинский анализ):

- Клинический биохимический анализ
- Иммуноферментный анализ
- Биосенсоры
- Анализ отравляющих веществ и пестицидов

### Индустрия ферментов (медицина):

- Ферменты-лекарственные препараты
- Мишени для большинства лекарств

На данный момент изучать структуру и функционирование можно с помощью суперкомпьютера. За 10 лет производительность компьютеров выросла почти в 1000 раз. Можно конструировать новые ферменты.

Основа компьютерного подхода конструирования лекарств:

- Знание структуры белка-мишени
- Библиотека возможных структур-лигандов (потенциальных лекарственных средств)
- Вычислительные технологии высокой производительности, описывающие взаимодействия мишень-лиганд на основе законов молекулярной механики
- Исследования до миллиона структур потенциальных лекарственных препаратов с выбором наиболее эффективно взаимодействующих с активным центром мишени

Суперкомпьютерные технологии в биохимической физике и молекулярной медицине:

- Молекулярная механика белковых молекул (ММ)
- Молекулярная динамика с квантово-химическим приближением (MD-QM)

- Квантово-химическое молекулярно – механическое описание процессов в белковой молекуле (QM – MM)

Суперкомпьютерные технологии выявили молекулярный полиморфизм – вариабельность структуры белка – генетически предопределённая предрасположенность к различным заболеваниям (сердечно-сосудистые, онкология, респираторные, диабет, инфекции). Суперкомпьютерные вычисления (MM, MD-QM, QM – MM – методы) могут предсказать влияние полиморфных замен на структуру и каталитическую активность ключевых белков. Большинство современных лекарственных препаратов прошло стадию компьютерного дизайна. Суперкомпьютерные технологии заложили основу персонифицированной медицины, когда каждому пациенту персонально подбирают лекарственный препарат.

Молекулярный докинг – это метод молекулярного моделирования, который позволяет на основе о представлениях о различных физических и химических взаимодействиях предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и конформацию одной молекулы (лиганда) в центре связывания другой (рецептора).

Примеры препаратов, выделенных с помощью компьютерного дизайна – Captopril (регулятор кровяного давления), Saquinavir (ингибитор протеазы ВИЧ-1), Zanamivir (противовирусное против гриппа) и т. д.

#### **QM – MM – метод:**

- Расчёт многоразмерных поверхностей потенциальной энергии
- Исследование и идентификация минимумов и переходных состояний
- Построение энергетических профилей химической реакции
- Идентификация молекулярного механизма реакции

Так, например, при изучении ферментативного катализа N-Ацетиласпартата гидролазы были структурно идентифицированы все лабильные промежуточные соединения и все переходные состояния, а также были определены константы скорости всех элементарных стадий.

Молекулярный полиморфизм – генетическое предопределение различных заболеваний, основанное на наличии структурных вариантах одного и того же белка.

Болезнь Канаван – умственная отсталость, макроцефалия и т.д. У пациентов была выявлена повышенная концентрация NAA, реакционная способность аспартоацилазы сильно ниже нормы. С помощью компьютерных технологий были выявлены критические единичные замены аминокислот в структуре аспартоацилазы при болезни Канаван.

Предрасположенность к заболеваниям, заложенная в структурных вариациях белка передаётся по наследству. К таким болезням относятся сердечно-сосудистые заболевания, онкология, респираторные заболевания, диабет и инфекции (например, ВИЧ-инфекции).

Молекулярная медицина – понимание причин патологии на основе знания структуры и реакционной способности ключевых белков.

### **Индивидуальная чувствительность к ядам и лекарствам:**

Существуют фосфоорганические соединения –лекарства: пестициды, нервные яды, индустриальные токсиканты. Существуют ингибиторы фосфоорганических соединений, например, ингибиторы бутирилхолинэстеразы. В гастроскопии, чтобы не сокращался пищевод, используют миостатик сукцинилхолин. Пациенты с «молчащей» или малоактивной бутирилхолинэстеразой страдают от длительного нарушения дыхания. Asp70Gly замена ведёт к значительному падению каталитической активности. Таким образом, суперкомпьютерные методы позволяют проверить активность бутирилхолинэстеразы, чтобы понять если опасность при анестезии.

### **Персонифицированная медицина:**

- Предварительный диагноз
- Секвенирование группы критических генов
- Идентификация гено-патологических структурных замен в белках
- Суперкомпьютерные вычисления последствий единичных замен, создание обобщённой базы данных
- Уточнение диагноза
- Выбор индивидуальных препаратов для лечения

### **Жизнь молекулы в экстремальных условиях**

Существуют организмы, живущие в условиях очень высоких температур. Обычные белки при таких температурах денатурируют, при 60-70 °C ДНК плавится. Как же термофильные организмы живут в таких условиях (90°C)? Белки термофилов стабильны за счёт того, что они содержат повышенное количество заряженных аминокислот, которые взаимодействуют друг с другом. ДНК-стабилизация осуществляется за счёт повышенного количества G-C пар. Стабильность липидов обеспечена химическим спирением. Сейчас термофильные белки можно сконструировать. Также существуют химические методы: сжатие белка в гель.

## Лекция 21. Ферменты и их свойства в не водной среде

В химической реакции происходит переход от исходных веществ к конечным через энергетический барьер, определяющий скорость реакции (Рис. 110). Чтобы снизить энергетический барьер необходимо использовать катализатор, который влияет на скорость реакции, но не на равновесие.



Рис. 107. Изменение энергии Гиббса в течение реакции

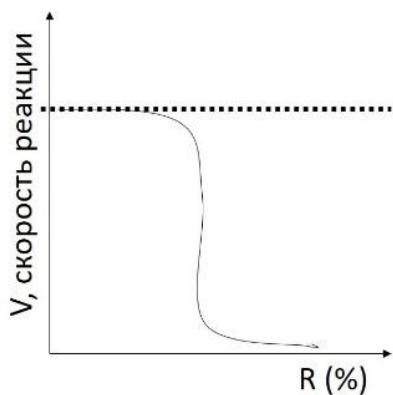


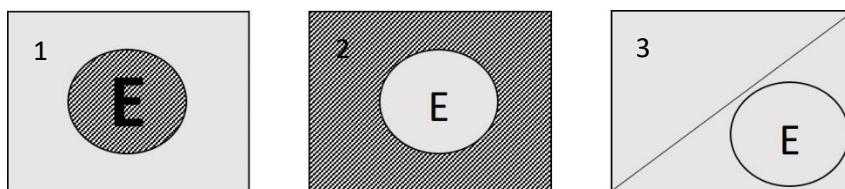
Рис. 108. Зависимость скорости ферментативной реакции от содержания растворителя

Существует зависимость скорости ферментативной реакции от содержания растворителя (Рис. 111). При добавлении растворителя фермент переходит в неактивное состояние. Раньше считалось, что ферменту для работы необходима вода. Однако сейчас известно, что есть ферменты, активные в безводной среде. Было показано, что если добавлять спирт в раствор с глюкозой и ферментом глюкозидазой, то при 20% содержании спирта в растворе

глюкозидаза перешла в неактивное состояние, однако в 96% растворе появляется активность ферментативной реакции. Таким образом, была открыта первая система ферментов в органике. Однако на эту работу не обратили внимание.

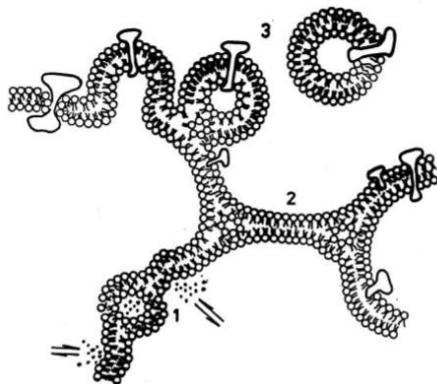
Рассмотрим систему из 2 элементов: фермент и растворитель. Теоретически возможны 3 сочетания (Рис. 109):

- 1) Фермент жёстко закреплён на растворителе
- 2) Растворитель жёстко закрепляют, фермент свободный
- 3) Фермент и растворитель пространственно отделяют друг от друга



*Рис. 109. Различные сочетания фермента и растворителя*

Самая удачная система – 3 система – гетерогенная система, где происходит самостабилизация. Так, в 96 % спирте фермент высаживается на поверхность и не денатурируется. 100% растворители, перемешивающиеся с водой, также можно использовать. Таким образом, система фермента в неводной среде даёт много преимуществ.



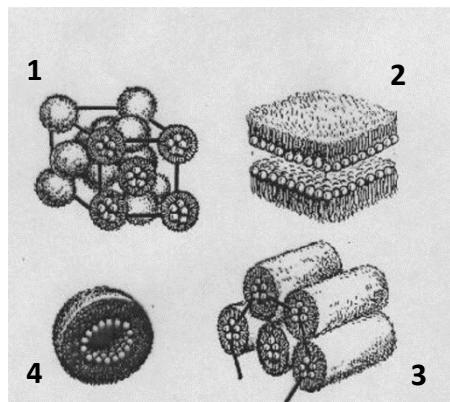
*Рис. 110. Метаморфно-мозаичная модель мембранны*

Использование ферментов в микроЭмульсиях:

В природе фермент окружён различными компонентами (белки, молекулы воды и т.д.). При выделении ферменты из природного окружения фермент может потерять компоненты, влияющие на его основные свойства. Таким образом, ферментные препараты могут отличаться от ферментов в клетке. Узнать, потерял ли что-то выделенный фермент, можно путём реконструкции – добавить компоненты, которые были удалены.

Помимо жидкого-мозаичной модели (бислойная мембрана) существует метаморфомозаичную модель мембранны (Рис. 110). Модель предполагает существование бислойных и не

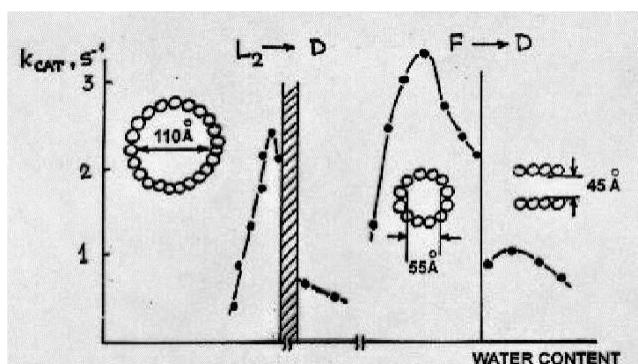
бислойных участков мембранны. Трансмембранный перенос осуществляется за счёт не бислойных элементов.



*Рис. 111. Типы мицелл*

На рисунке 111 представлены различные типы мицелл:

- 1 – кубическая упаковка мицелл
- 2 – цилиндрические мицеллы
- 3 – Ламеллярная мицелла
- 4 – сферическая мицелла (обратная)



*Рис. 112. Активность алкогольдегидрогеназы в различных фазах*

Ферменты активны в различных типах мицелл. Алкогольдегидрогеназа имеет эллипсоидную форму. Было показано, что алкогольдегидрогеназа работает в обратных мицеллах (оптимум наблюдается в обратной мицелле, размер которой соответствует большому диаметру эллипсоида). Обратные мицеллы легко меняют свой размер. В цилиндрических мицеллах оптимум наблюдается, когда средняя ось соответствует диаметру. В ламеллярных мицеллах оптимум при контакте с малой осью фермента.

Ферменты используются в медицине. Все крема имеют эмульсионную природу (в мицеллах фермент сохраняет активность в течение нескольких месяцев). Также широко используется модификация фермента. Фермент модифицируют гидрофобными компонентами. Немодифицированный фермент проходит через мембрану и попадает в клетку. Модифицированный фермент застревает в мембране и может диссоциировать с разных сторон мембранны. Сильно модифицированный фермент встраивается в мембрану (Рис. 113). Таким образом, можно регулировать транслокацию ферментов.

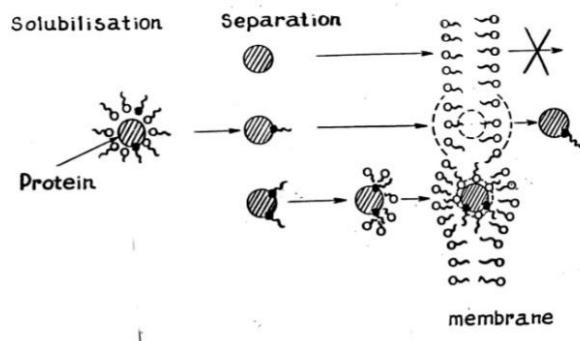


Рис. 113. Модификация фермента гидрофобными компонентами



ХИМИЧЕСКИЙ  
ФАКУЛЬТЕТ  
МГУ ИМЕНИ  
М.В. ЛОМОНОСОВА



*teach-in*  
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ