УДК 578.1
ББК 28.072я73
Н49

Серия основана в 2006 г.

Нельсон Д.

Н49 Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. Т. 2 : Биоэнергетика и метаболизм / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. — 636 с. : ил. — (Лучший зарубежный учебник).

ISBN 978-5-94774-366-1 (Т. 2)
ISBN 978-5-94774-364-7

В учебном издании, написанном американскими учеными, которые получили всеобщее признание как талантливые преподаватели университетского уровня, рассмотрены современные концепции биохимии в соответствии с изменившейся идеологией этой науки.

В том 2 вошла часть II «Биоэнергетика и метаболизм». Даны общие термодинамические понятия применительно к биологическим системам, классификация химических реакций, происходящих в живых организмах, подробно рассмотрены основные метаболические пути — гликолиз, глюконеогенез, пентозофосфатный путь, цикл лимонной кислоты, катаболизм жирных кислот и аминокислот, окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование, процессы биосинтеза и деградации основных биомолекул, в том числе жиров, а также принципы регуляции метаболизма.

Для студентов биологических, химических и медицинских вузов, а также научных работников.

УДК 578.1
ББК 28.072я73

Первый тираж осуществлен при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований по проекту № 06-04-62066

Учебное издание

Серия: «Лучший зарубежный учебник»

Нельсон Дэвид, **Кокс** Майкл

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА

В трех томах

Том 2

БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*. Редактор канд. биол. наук *Т. Е. Толстихина*
Художник *Н. А. Новак*. Технический редактор *Е. В. Денюкова*. Корректор *Д. И. Мурадян*
Компьютерная верстка: *Т. Э. Внукова*

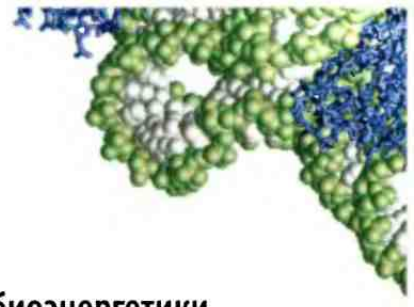
Подписано в печать 27.08.13. Формат 84×108/16.
Усл. печ. л. 67,20. Тираж 1700 экз. Заказ

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»
125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3
Телефон: (499) 157-5272, e-mail: binom@Lbz.ru, http://www.Lbz.ru

First published in the United States by
W. H. FREEMAN AND COMPANY,
New York
Copyright © 2008 by W. H. Freeman and Co.
All rights reserved.
© Перевод на русский язык,
БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014

ISBN 978-5-94774-366-1 (Т. 2)
ISBN 978-5-94774-364-7

ЧАСТЬ II



Биоэнергетика и метаболизм

13 Основы биоэнергетики. Типы химических реакций 11
14 Гликолиз, глюконеогенез и пентозофосфатный путь 65
15 Принципы регуляции метаболизма 121
16 Цикл лимонной кислоты 181
17 Катаболизм жирных кислот 225
18 Окисление жирных кислот и образование мочевины 261
19 Окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование 305
20 Биосинтез углеводов у растений и бактерий 403
21 Биосинтез липидов 445
22 Биосинтез аминокислот, нуклеотидов и связанных с их метаболизмом молекул 505
23 Интеграция и гормональная регуляция метаболизма у млекопитающих 565

Метаболизм — это высококоординированная деятельность клетки, при которой происходит кооперативное взаимодействие многих мультиферментных систем (метаболические пути) для того, чтобы: (1) извлечь химическую энергию из окружающей среды (либо путем поглощения энергии солнечного света, либо при деградации богатых энергией питательных веществ); (2) превратить молекулы питательных веществ в собственные, характерные для клетки молекулы, включая предшественники макромолекул; (3) из предшественников-мономеров провести сборку макромолекул: белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов; и (4) осуществить синтез и деградацию биомолекул, необходимых клетке для выполнения ее функций, — липидов мембран, внутриклеточных мессенджеров и пигментов.

Метаболизм включает сотни различных катализируемых ферментами реакций. В этой части книги (часть II) мы рассмотрим центральные метаболические пути, которые совсем не столь многочисленны и удивительно сходны у всех живых форм. Живые организмы можно разделить на две большие группы в зависимости от того, в виде каких молекул они получают углерод из окружающей среды. **Автотрофы** (такие как фотосинтезирующие бактерии и сосудистые растения) в качестве единственного источника углерода мо-

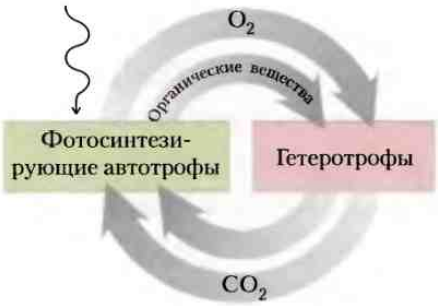


Рис. 1. Круговорот углекислого газа и кислорода между автотрофным (фотосинтезирующим) и гетеротрофным доменами (экосистемами) биосферы. В этот круговорот вовлечены огромные массы веществ; биосферный оборот оценивается в ~$4 \cdot 10^{11}$ т углерода в год.

гут использовать диоксид углерода атмосферы, из которого они строят все свои углеродсодержащие биомолекулы (см. рис. 1-5). Некоторые автотрофные организмы, например цианобактерии, могут также использовать атмосферный азот для того, чтобы производить все свои молекулы, которые содержат азот. **Гетеротрофы** не могут использовать углекислый газ атмосферы и должны получать углерод из окружающей среды в форме относительно сложных органических молекул, таких как глюкоза. Многоклеточные животные и большинство микроорганизмов — гетеротрофы. Автотрофные клетки и организмы относительно самодостаточны, в то время как гетеротрофные клетки и организмы для удовлетворения своих потребностей в углероде нуждаются в более сложных органических молекулах и поэтому должны питаться продуктами жизнедеятельности других организмов.

Многие автотрофные организмы используют фотосинтез, где в качестве источника энергии работает солнечный свет. Гетеротрофные организмы получают энергию при расщеплении органических питательных веществ, образуемых автотрофами. В биосфере автотрофы и гетеротрофы живут вместе в большом взаимозависимом цикле. Автотрофные организмы для построения своих органических биомолекул используют углекислый газ атмосферы. В этом процессе некоторые автотрофы генерируют кислород из воды. Гетеротрофы в качестве питательных веществ используют органические продукты, образуемые автотрофами, и выделяют в атмосферу углекислый газ. Для некоторых окислительных реакций с образованием диоксида углерода необходим кислород, который в реакциях окисления превращается в воду. Таким образом, между гетеротрофным и автотрофным естественными экосистемами постоянно происходит круговорот углерода, кислорода и воды. Движет этим глобальным процессом солнечная энергия **(рис. 1)**.

Все живые организмы нуждаются также в источнике азота, который необходим для синтеза аминокислот, нуклеотидов и других соединений. Растения в качестве источника азота используют главным образом аммиак или нитраты. Позвоночные животные должны получать азот в форме аминокислот или других органических соединений. Только некоторые организмы — цианобактерии и многие виды почвенных бактерий, обитающих в качестве симбионтов на корнях некоторых растений, — способны превращать (фиксировать) атмосферный азот N_2 в аммиак. Другие бактерии (нитрифицирующие бактерии) окисляют аммиак до нитритов и нитратов, но есть и такие, которые превращают нитраты в свободный азот N_2. Таким образом, в дополнение к глобальному круговороту углерода и кислорода в биосфере происходит круговорот азота, в котором участвует огромное количество этого элемента **(рис. 2)**. Круговороты кислорода, углерода и азота, в которые в конеч-

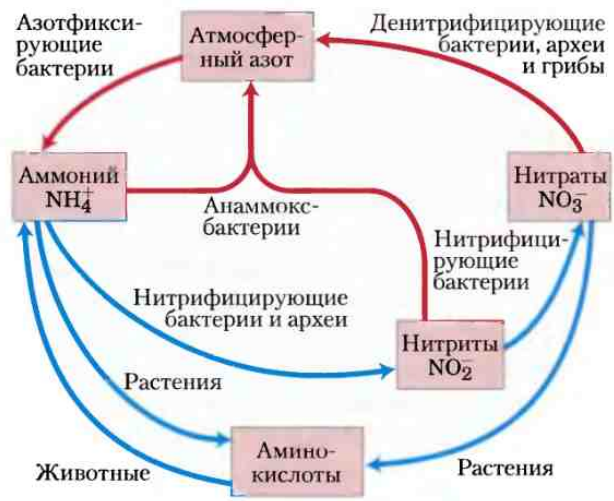


Рис. 2. Круговорот азота в биосфере. Газообразный азот N_2 составляет 80% земной атмосферы.

ном счете вовлекаются все виды, зависит от естественного баланса между активностью продуцентов (автотрофов) и консументов (гетеротрофов) в нашей биосфере.

Круговороты этих элементов приводятся в движение громадным потоком энергии, поступающим в биосферу извне, а затем преобразуемым в биосфере; все начинается с поглощения солнечной энергии фотосинтезирующими организмами с последующим использованием этой энергии для создания богатых энергией углеводов и других органических соединений. Эти питательные вещества выступают в качестве источника энергии для гетеротрофных организмов. В метаболических процессах и при любых превращениях энергии часть свободной энергии теряется путем выделения тепла в окружающую среду и увеличения энтропии системы. Таким образом, в биосфере материя участвует в непрекращающемся круговороте веществ, а энергия утилизируется — организмы не способны регенерировать энергию, которая рассеивается в виде теплоты и энтропии. Круговорот углерода, кислорода и азота осуществляется непрерывно, в то время как энергия постоянно превращается в форму, в которой она уже не может быть использована, — в тепловую энергию.

Метаболизм — совокупность всех химических превращений, которые происходят в клетке или организме и осуществляются посредством серии последовательных катализируемых ферментами реакций, называемых **метаболическими путями**. Реакции (стадии) метаболического пути следуют друг за другом в определенном порядке и на каждой стадии в систему привносится небольшое специфическое изменение ее химического состава. Обычно при этом происходит удаление, перемещение или добавление одного атома или функциональной группы. Превращение предшественника в конечный продукт идет через серию промежуточных продуктов метаболизма, называемых **метаболитами.** Термин **промежуточный метаболизм** часто применяют к совокупности ферментативных реакций всех метаболических путей, в которых происходит взаимное превращение предшественников, метаболитов и низкомолекулярных веществ (обычно с $M_r < 1000$).

Катаболизм объединяет процессы деградации, при которых органические молекулы пищи (углеводы, жиры и белки) превращаются в низкомолекулярные и более простые конечные продукты (такие как молочная кислота, CO_2, NH_3). Катаболизм сопровождается высвобождением энергии, которая запасается в форме ATP и восстановленных переносчиков водорода (NADH, NADPH, $FADH_2$). Остаток энергии рассеивается в виде тепла. **Анаболизм**, называемый также биосинтезом, включает процессы, при которых из мелких простых предшественников синтезируются более крупные и сложные молекулы, в том числе жиры, полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Реакции анаболизма протекают с потреблением энергии, обычно получаемой при разрыве фосфатных связей ATP и восстановлении NADH, NADPH, $FADH_2$ **(рис. 3)**.

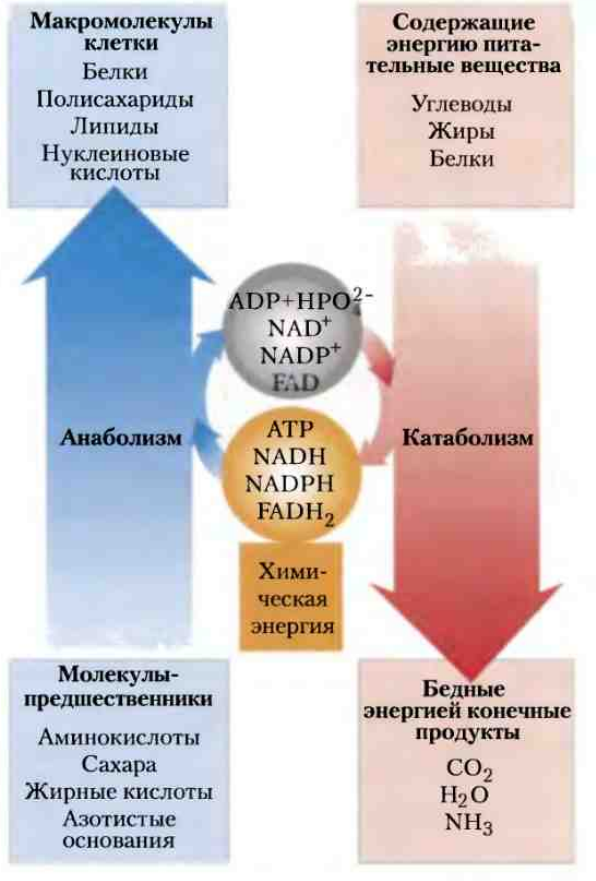


Рис. 3. Энергетическое сопряжение путей катаболизма и анаболизма. Катаболические пути поставляют химическую энергию в форме ATP, NADH, NADPH и $FADH_2$. Эти переносчики энергии «работают» в анаболических путях, где происходят превращения низкомолекулярных веществ в макромолекулы.

Одни метаболические пути представлены линейной цепочкой последовательных превращений. Другие метаболические пути имеют разветвления, т. е. из одного предшественника создается множество полезных конечных продуктов, или из нескольких исходных веществ образуется один продукт. Вообще, катаболические пути *конвергентны*, тогда как анаболические — *дивергентны* **(рис. 4)**. Некоторые пути представляют собой реакционные циклы, когда молекула исходного вещества регенерируется в серии реакций, при этом несколько молекул, образованных из исходного реагента, вновь дают исходное вещество как продукт. В следующих главах рассмотрены примеры различных метаболических путей.

У большинства клеток есть ферменты для проведения как реакций распада, так и реакций синтеза важных групп биомолекул, например жирных кислот. Однако одновременное протекание синтеза и распада жирных кислот было бы расточительно, это предотвращается взаимной регуляцией анаболических и катаболических последовательностей реакций — когда одна реакционная цепочка активизируется, другая подавляется. Такая регуляция не могла бы осуществляться, если бы анаболические и катаболические пути катализировались одним и тем

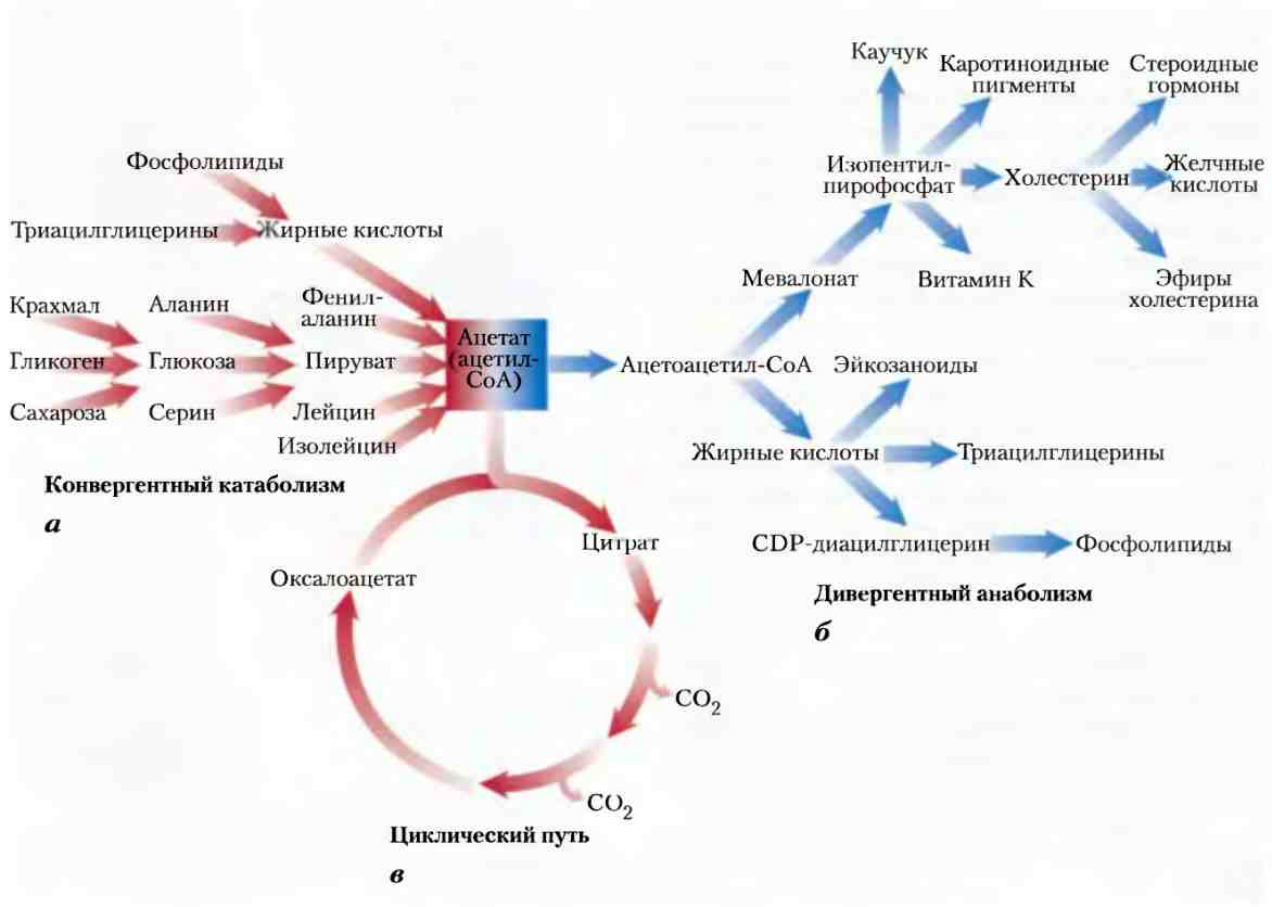


Рис. 4. Три типа нелинейных метаболических путей. *а* — конвергентный катаболический путь; *б* — дивергентный анаболический путь; *в* — циклический путь, в котором одно из исходных веществ (в данном случае оксалоацетат) регенерируется, и цикл вновь начинается. Ацетат — ключевой промежуточный продукт метаболизма — возникает при распаде целого ряда богатых энергией молекул (*а*); он служит в качестве предшественника многих продуктов (*б*) и поглощается в катаболическом пути, известном как цикл лимонной кислоты (*в*).

же набором ферментов, действующих в одном направлении для анаболизма и в противоположном — для катаболизма. Ингибирование фермента, вовлеченного в катаболизм, привело бы к ингибированию последовательности реакций анаболического направления. Катаболические и анаболические пути, которые имеют одинаковые концевые точки (например, глюкоза →→ пируват и пируват →→ глюкоза) могут использовать множество одинаковых ферментов. Но вот что обязательно — по крайней мере одна из стадий катаболического и анаболического путей катализируется разными ферментами и имеет различные механизмы регуляции; эти ферменты и являются местами отдельной регуляции. Более того, чтобы анаболический и катаболический пути были необратимыми, уникальные для каждого направления последовательности реакций должны включать хотя бы одну реакцию, которая термодинамически весьма благоприятна, другими словами, обратная ей реакция термодинамически невыгодна. Независимость регуляции катаболических и анаболических процессов усиливается и тем, что парные катаболический и анаболический пути обычно происходят в разных участках клетки. Например, катаболизм жирных кислот происходит в митохондриях, а синтез — в цитоплазме. Концентрации промежуточных метаболитов, ферментов и регуляторов могут поддерживаться в различных участках клетки на разных уровнях. Благодаря тому, что метаболические пути кинетически контролируются концентрацией субстрата, отдельные промежуточные продукты анаболизма и катаболизма тоже контролируют скорость метаболических процессов. Механизмам таких анаболических и катаболических процессов мы уделим особое внимание.

Метаболические пути регулируются на нескольких уровнях, как внутри клетки, так и внеклеточно. Наиболее быстро метаболические процессы реагируют на наличие субстрата. В общем случае внутриклеточная концентрация субстрата меньше K_M; при этом скорость реакции определяется концентрацией субстрата (см. рис. 6-11). Второй способ внутриклеточно управлять скоростью метаболических процессов связан с аллостерической регуляцией (т. 1, с. 220) промежуточным продуктом метаболизма или коферментом, например аминокислотой или АТР, которые сигнализируют о состоянии метаболизма внутри клетки. Когда клетка содержит достаточное для своих насущных потребностей количество, скажем, аспартата или когда уровень АТР в клетке такой, что дальнейшее потребление энергии в данный момент не нужно, эти сигналы аллостерически ингибируют активность одного или более ферментов в соответствующей последовательности реакций. У многоклеточных организмов метаболическая активность различных тканей регулируется и интегрируется ростовыми факторами и гормонами, которые действуют снаружи клетки. В некоторых случаях эта регуляция происходит фактически мгновенно (иногда быстрее, чем за миллисекунду) через изменения содержания внутриклеточных мессенджеров, которые изменяют активность ферментов путем аллостерической регуляции или их ковалентной модификации, например при фосфорилировании. В других случаях внеклеточный сигнал приводит к изменению концентрации фермента в клетке, влияя на скорость его синтеза или распада. Такой эффект проявляется только через минуты или часы.

Часть II мы начинаем с описания основных энергетических закономерностей метаболизма (гл. 13). Затем обсудим главные пути катаболизма, по которым клетка получает энергию, окисляя разнообразные вещества (гл. 14–19). Подробно энергетические аспекты метаболизма рассмотрены в гл. 19. Она посвящена хемиосмотическому сопряжению энергии — универсальному механизму, по которому синтез АТР определяется трансмембранным электрохимическим потенциалом, возникающим либо в процессе окисления субстрата, либо в процессе поглощения солнечной энергии.

В гл. 20–22 рассматриваются главные анаболические пути, где за счет энергии АТР из более простых молекул-предшественников синтезируются углеводы, липиды, аминокислоты и нуклеотиды. В гл. 23 мы перейдем к детальному обсуждению метаболических путей у различных организмов, начиная с *Echerichia coli* и заканчивая человеком, и гормональных механизмов их регуляции и интеграции у млекопитающих.

И после этого мы, наконец, перейдем к изучению промежуточного метаболизма. Изучая клеточный метаболизм, надо помнить, что мно-

гочисленные реакции, описанные в этой книге, действительно происходят и играют решающую роль в живых организмах. Всегда старайтесь понять, какова роль того или иного химического процесса (реакции или всего метаболического пути) в организме. Каким образом изучаемые реакции связаны с другими реакциями, непрерывно происходящими в той же самой клетке с целью получения энергии и веществ, необходимых для поддержания жизнеспособности клетки? Как многоуровневые механизмы регуляции приводят в равновесие поглощение и выделение веществ и энергии, т. е. обеспечивают достижение стационарно-динамического состояния всего организма? Изучая метаболизм с таких позиций, вы испытаете захватывающее и вполне поучительное погружение в основы самой жизни, и полученные вами глубокие знания, безусловно, найдут множество применений в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологиях.

Общая энергия вселенной остается постоянной; общая энтропия непрерывно увеличивается.

Рудольф Клаузиус, The Mechanical Theory of Heat with Its Applications to the Steam-Engine and to the Physical Properties of Bodies (Механическая теория тепла в приложении к паровому двигателю и физическим свойствам тел), *1865*

Благодаря изоморфизму энтропии и информации можно установить взаимосвязи между двумя формами энергии: энергией совершать действие и энергией направлять действие, которое совершается.

Франсуа Жакоб, La logique du vivant: une hitoire de I'heredite (Логика жизни: история наследственности), *1970*

13

Основы биоэнергетики. Типы химических реакций

13.1. Биоэнергетика и термодинамика 12

13.2. Химические основы биохимических реакций 20

13.3. Перенос фосфатных групп и АТР 28

13.4. Окислительно-восстановительные реакции в биологических системах 43

Живые клетки и организмы должны осуществлять процессы поддержания жизни, роста и размножения. Способность извлекать и преобразовывать энергию, которая расходуется на биологические процессы, является фундаментальным свойством всех живых организмов. Эта свойство было приобретено на ранней стадии клеточной эволюции. В современных организмах совершается множество разнообразных преобразований энергии, превращений одной формы энергии в другую. Живые организмы используют химическую энергию клеточных «топливных» молекул для синтеза сложных высокоупорядоченных макромолекул из простых молекул-предшественников. Они также превращают химическую энергию клеточного «топлива» в градиенты концентраций и градиенты электрических потенциалов, в движение и тепло. Немногие организмы, такие как светляки и некоторые глубоководные морские рыбы, способны излучать свет. Фотосинтезирующие организмы преобразуют световую энергию в другие формы энергии.

Антуан Лавуазье, 1743–1794

Химические механизмы, которые лежат в основе биологических преобразований энергии, в течение столетий зачаровывали биологов и бросали им вызов. Французский химик Антуан Лавуазье заметил, что животные каким-то образом превращают химическое «топливо», т. е. вещества из пищи, в тепло, и сделал вывод, что дыхание — жизненно важный процесс.

> ...в общем, дыхание не что иное, как медленное горение углерода и водорода, которое очень похоже на процесс, происходящий в керосиновой лампе или свече. С этой точки зрения животные, которые дышат, являются

настоящими топливными котлами, которые сжигают и пожирают сами себя. Можно сказать, что эта аналогия между горением и дыханием не избежала внимания поэтов — правильнее, философов древности. Этот огонь, украденный с небес, этот факел Прометея не только идея, рожденная в головах инженеров и поэтов, он является верным описанием процессов, происходящих в природе, по крайней мере, в случае животных, которые дышат. Поэтому, следуя античным творениям, можно и нам пофилософствовать, сказав, что *факел жизни* зажигается в тот момент, как только младенец начинает дышать, и он не гаснет до тех пор, пока не наступает смерть.*

В XX в. человечество достигло начального понимания большинства химических процессов «факела жизни». Превращения энергии в биологических системах подчиняются тем же физическим законам, которые управляют и всеми другими природными процессами. Поэтому студентам-биохимикам очень важно понять эти законы, а также то, как эти законы применимы к потоку энергии в биосфере.

В этой главе мы сначала обсудим законы термодинамики и количественные соотношения между свободной энергией, энтальпией и энтропией. Далее рассмотрим типы происходящих в живых клетках основных биохимических реакций, которые необходимы для использования, хранения, передачи и высвобождения энергии, воспринимаемой организмом из окружающей среды. Затем мы подробнее остановимся на тех реакциях, которые играют особую роль в биологических процессах энергетического обмена, в частности на реакциях с участием АТР. И наконец, перейдем к рассмотрению важных окислительно-восстановительных реакций в живых клетках, энергетических закономерностей переноса электронов в биологических системах, а также тех переносчиков электронов, которые наиболее часто работают в этих процессах в качестве кофакторов.

* Из мемуаров Армана Сегена и Антуана Лавуазье, датированных 1789 г.; цитировано по книге [Lavoiser A. (1862) *Oeuvres de Lavoisier*, Imprimerie Imperiale, Paris].

13.1. Биоэнергетика и термодинамика

Биоэнергетика изучает количественные стороны **преобразований энергии** из одной формы в другую, которые происходят в живых клетках, а также химические процессы, лежащие в основе этих преобразований. Хотя законы термодинамики уже обсуждались в предыдущих главах, а возможно, хорошо были изучены вами ранее, здесь будет весьма полезно в общих чертах вспомнить некоторые количественные аспекты.

Преобразования энергии в биологических системах подчиняются законам термодинамики

Многочисленные количественные исследования по взаимопревращению различных форм энергии, выполненные физиками и химиками, позволили в XIX в. сформулировать два основных закона термодинамики. Первый закон — это закон сохранения энергии: *при любом физическом или химическом изменении общее количество энергии во вселенной остается постоянным; энергия может переходить из одной формы в другую или может перераспределиться, но не может исчезнуть*. Второй закон термодинамики о том, что все процессы во вселенной стремятся к увеличению беспорядка (дезорганизации): *в результате любых естественных процессов энтропия вселенной возрастает*.

«Итак, по *второму* закону термодинамики...»

Живые организмы — это некая совокупность молекул, однако совокупность гораздо более высокоорганизованная, чем окружающие их вещества. Организмы способны создавать и поддерживать свойственную им упорядоченность, что, казалось бы, противоречит второму закону термодинамики. Однако на самом деле живые организмы тоже подчиняются этому закону и действуют строго в его рамках. Прежде чем начать обсуждение второго закона термодинамики в приложении к биологическим системам, следует дать определение этим системам и ввести такое понятие, как окружающая среда.

Под реакционной системой понимают совокупность веществ, которые подвергаются данному химическому или физическому процессу. Такой системой может быть организм, клетка или два реагирующих друг с другом соединения. Совокупность реакционной системы и окружающей среды составляет вселенную. В лаборатории некоторые химические или физические процессы могут протекать в изолированных или в закрытых системах, не способных к обмену веществ и энергии с окружающей средой. Однако живые клетки и организмы являются открытыми системами, которые обмениваются и веществами, и энергией с окружающей средой. Живые системы никогда не приходят к равновесию с окружающей средой. Постоянные взаимодействия между системой и окружающей средой объясняют, каким образом организмы могут поддерживать внутреннюю упорядоченность и при этом действовать в рамках второго закона термодинамики.

В гл. 1 (т. 1, с. 22) мы дали определение трем количественным термодинамическим функциям, с помощью которых можно выразить энергетические изменения, происходящие в химической реакции:

Свободная энергия Гиббса G — это та часть энергии, которая способна производить работу в реакции, протекающей при постоянной температуре и постоянном давлении. В тех случаях, когда реакция протекает с высвобождением свободной энергии (т. е. изменения в системе происходят с уменьшением свободной энергии), изменение свободной энергии ΔG — отрицательная величина, и такая реакция называется экзергонической. В эндергонических реакциях система приобретает (повышает) свободную энергию и $\Delta G > 0$.

Энтальпия H — это так называемое «теплосодержание» реакционной системы. Она отражает количество и природу химических связей в веществах, вступающих в реакцию, и в веществах — продуктах реакции. Химическая реакция, при которой происходит выделение тепла, называется экзотермической. Если энтальпия образования $H_{обр}$ продуктов реакции меньше, чем для веществ, вступающих в реакцию, $\Delta H < 0$. Реакционные системы, которые получают тепло от окружающей среды, называются эндотермическими; для них ΔH — положительная величина.

Энтропия S — мера хаотичности (или неупорядоченности) системы (см. доп. 1-3). Когда продукты реакции менее сложные и более неупорядоченные, чем исходные вещества, считается, что реакция протекает с увеличением энтропии.

Единицы измерения ΔG и ΔH — Дж/моль (джоуль на моль) и кал/моль (калории на моль). Напомним, 1 кал = 4,184 Дж. Единицы энтропии S — Дж/(моль · К) (джоуль на моль и на кельвин) (табл. 13-1).

В условиях, характерных для биологических систем (постоянная температура и давление), из-

Таблица 13-1 **Некоторые физические постоянные и размерности некоторых термодинамических параметров**

Константа Больцмана, $\mathbf{k} = 1{,}381 \cdot 10^{-23}$ Дж/К
Число Авогадро, $N = 6{,}022 \cdot 10^{23}$ моль$^{-1}$
Константа Фарадея, $J = 96\,480$ Дж/(В · моль)
Газовая постоянная, $R = 8{,}315$ Дж/(моль · К) (= 1,987 кал/(моль · К))
Размерность ΔG и ΔH — Дж/моль (или кал/моль)
Размерность ΔS — Дж/(моль · К) (или кал/(моль · К)) 1 кал = 4,184Дж
Размерность абсолютной температуры T — К (кельвины) 25 °С = 298 К
При 25 °С RT = 2,479 кДж/моль (= 0,592 ккал/моль)

менения свободной энергии, энтальпии и энтропии связаны количественно друг с другом следующим уравнением:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (13\text{-}1)$$

где ΔG — изменение свободной энергии реакционной системы, ΔH — изменение энтальпии реакционной системы, T — температура (в кельвинах, К) и ΔS — изменение энтропии системы. Условимся, что $\Delta S > 0$, когда энтропия увеличивается, и, как отмечалось выше, $\Delta H < 0$, когда реакционная система отдает тепло окружающей среде. Для самопроизвольно (спонтанно) протекающих реакций и природных процессов всегда $\Delta G < 0$.

По второму закону термодинамики при химических реакциях или физических процессах энтропия *вселенной* увеличивается. Из этого закона, однако, не следует, что возрастание энтропии должно происходить обязательно в самой *реакционной системе*. Внутриклеточная упорядоченность, которая создается в процессе роста и деления клеток, более чем компенсируется возникающей при этом неупорядоченностью в окружающей среде. Коротко говоря, живые организмы сохраняют внутреннюю упорядоченность, получая из окружающей среды свободную энергию в виде питательных веществ или солнечного света и возвращая в нее такое же количество энергии в виде тепла и энтропии.

Клеткам необходимы источники свободной энергии

Клетки — изотермические системы, они функционируют при постоянной температуре (а также при постоянном давлении). Тепло (нагревание) не может служить источником энергии для клеток, поскольку тепло способно производить работу лишь в том случае, когда оно переходит от более нагретого тела к более холодному или из области с более высокой температурой в область с более низкой температурой. Клетки могут и должны использовать свободную энергию Гиббса G, которая связана с прочностью химических связей между атомами, определяет состояние равновесия и направление химических реакций; это та теоретически возможная химическая энергия системы, которая может быть превращена в работу, т. е. выделена во вселенную в виде тепла и энтропии при протекании химической реакции при постоянной температуре и постоянном давлении. Гетеротрофные клетки извлекают необходимую свободную энергию из молекул питательных веществ, а фотосинтезирующие клетки поглощают энергию солнечного света. И те, и другие переводят свободную энергию в ATP и другие «энергетические» соединения, которые способны запасать энергию для выполнения работы (биологических процессов) в условиях постоянной температуры.

Изменение стандартной свободной энергии непосредственно связано с константой равновесия

Состав реакционной системы (смесь веществ, вступающих в реакции, и продуктов реакции) меняется до тех пор, пока не устанавливается равновесие. По достижении равновесия концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции не меняются, скорости прямой и обратной реакций становятся равными и дальнейшие изменения в системе прекращаются. Концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции *в состоянии равновесия* определяют константу равновесия K_{eq} (т. 1, с. 24). Запишем для обобщенной реакции

$$a\mathrm{A} + b\mathrm{B} \rightleftarrows c\mathrm{C} + d\mathrm{D}$$

где a, b, c и d — число молекул A, B, C и D, константу равновесия

$$K_{eq} = \frac{[\mathrm{C}]^c[\mathrm{D}]^d}{[\mathrm{A}]^a[\mathrm{B}]^b} \qquad (13\text{-}2)$$

где [A], [B], [C] и [D] — молярные концентрации веществ в состоянии равновесия.

Неравновесная реакционная система всегда самопроизвольно стремится к установлению равновесного состояния при заданных условиях (концентрация, температура, давление); при этом происходит изменение свободной энергии реакции ΔG. При стандартных условиях, т. е. при температуре T = 298 К = 25 °С, исходных концентрациях всех компонентов реакции 1 моль/л (или М), или для газообразных веществ парциальном давлении 101,3 кПа (килопаскаль) = 1 атм, движущая сила системы к состоянию равновесия определяется изменением стандартной свободной энергии $\Delta G°$. Стандартными условиями для реакций с участием ионов водорода является $[H^+]$ = 1 М, или pH 0.

Большинство биохимических реакций происходит в разбавленных буферных растворах при pH ≈ 7. При этом и pH, и концентрацию воды (для чистой воды $[H_2O] = 55{,}5$ М) можно считать постоянными. Для удобства расчетов в качестве стандартных условий для биохимических процессов приняты следующие: концентрация водородных ионов 10^{-7} М (pH 7), концентрация воды 55,5 М и концентрация Mg^{2+} 1 мМ (для реакций, протекающих с участием ионов Mg^{2+}, включая большинство реакций, где взаимодействует ATP).

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Для удобства в качестве стандартного состояния (стандартных условий) биохимических систем выбраны условия, отличные от тех, что приняты в химии и физике. А именно, в биохимии стандартное состояние соответствует $[H^+] = 10^{-7}$ М (pH 7) и $[H_2O] = 55{,}5$ М. Для реакций с участием ионов Mg^{2+} (к которым относятся многие реакции с участием ATP) концентрация Mg^{2+} в растворе обычно считается постоянной и равной 1 мМ. ■

Физические параметры, относящиеся к биохимическому стандартному состоянию, называются **стандартными приведенными параметрами** и пишутся со штрихом (например, $\Delta G'^\circ$ и K'_{eq}) для того, чтобы отличать их от неприведенных параметров, используемых химиками и физиками. Заметим, что в других учебниках биохимии чаще используется обозначение $\Delta G^{\circ\prime}$ (а не $\Delta G'^\circ$, как мы ввели выше). Параметр $\Delta G'^\circ$ рекомендован Международным союзом химиков и биохимиков с целью подчеркнуть, что неприведенный параметр G' — это критерий равновесия. Для простоты здесь и далее будем называть эти приведенные параметры **стандартными изменениями свободной энергии**.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Согласно другой договоренности, если H_2O, H^+ и/или Mg^{2+} выступают в качестве исходных веществ или продуктов реакции, их концентрации не включаются в уравнения, такие как (13-2), а вместо этого входят в константы K'_{eq} и $\Delta G'^\circ$. ■

Итак, для реакции характерна константа равновесия K'_{eq}, отсюда и $\Delta G'$ — это характеристический параметр реакции. Как мы отмечали в гл. 6, K'_{eq} и $\Delta G'^\circ$ связаны простым соотношением:

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq} \qquad (13\text{-}3)$$

Это просто один из возможных способов расчета константы равновесия реакции через изменение стандартной свободной энергии химической реакции. В табл. 13-2 приведены значения $\Delta G'^\circ$ и K'_{eq}. Если $K'_{eq} = 1{,}0$, то $\Delta G'^\circ = 0{,}0$ (так как $\ln 1{,}0 = 0$). Если $K'_{eq} > 1{,}0$, то $\Delta G'^\circ < 0$. Если же $K'_{eq} < 1{,}0$, $\Delta G'^\circ > 0$. Поскольку зависимость $\Delta G'^\circ$ от K'_{eq} логарифмическая, относительно небольшие изменения $\Delta G'^\circ$ приводят к сильным изменениям K'_{eq}.

Полезно также определить изменение свободной энергии и другим путем. $\Delta G'^\circ$ — это разность между свободной энергией продуктов реакции и свободной энергией исходных веществ. Когда $\Delta G'^\circ < 0$, свободная энергия образования $G_{обр}$ (продуктов реакции) < $G_{обр}$ (реагентов); такая реакция при стандартных условиях происходит самопроизвольно (спонтанно), поскольку все химические реакции стремятся идти в направлении, соответствующем уменьшению свободной энергии системы. Если $\Delta G'^\circ > 0$, то $G_{обр}$ (продуктов реакции) > $G_{обр}$ (реагентов). При концентрациях исходных компонентов 1,0 М (стандартные условия) такая реакция идет в обратном направлении. В табл. 13-3 обобщены эти положения.

Таблица 13-2 Константы равновесия и изменения стандартной свободной энергии реакции

	$\Delta G'^\circ$	
K'_{eq}	кДж/моль	ккал/моль*
10^3	−17,1	−4,1
10^2	−11,4	−2,7
10^1	−5,7	−1,4
1	0,0	0,0
10^{-1}	5.7	1,4
10^{-2}	11,4	2,7
10^{-3}	17,1	4,1
10^{-4}	22,8	5,5
10^{-5}	28,5	6,8
10^{-6}	34,2	8,2

* В СИ размерность энергии — джоуль (и килоджоуль); сокращенно Дж (и кДж). Однако биохимики чаще всего приводят $\Delta G'^\circ$ в ккал/моль (килокалория на моль). 1 кДж = 4,184 ккал.

Таблица 13-3 K'_{eq}, $\Delta G'^{\circ}$ и направление химических реакций при стандартных условиях

K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$	При начальной концентрации всех веществ 1 М
> 1,0	< 0	Прямая реакция
1,0	0	Равновесное состояние
< 1,0	> 0	Обратная реакция

Пример 13-1 РАСЧЕТ $\Delta G'^{\circ}$

Найдите изменение свободной энергии реакции, катализируемой ферментом фосфоглюкомутазой:

Глюкозо-1-фосфат ⇄ глюкозо-6-фосфат

В начале реакции концентрация глюкозо-1-фосфата составляла 20 мМ, а глюкозо-6-фосфат в реакционной среде отсутствовал; в равновесной смеси при 25 °С и pH 7,0 содержится 1,0 мМ глюкозо-1-фосфата и 19 мМ глюкозо-6-фосфата. Потерей или увеличением свободной энергии сопровождается реакция, идущая в направлении образования глюкозо-6-фосфата?

Решение. Следует рассчитать константу равновесия:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}]}{[\text{глюкозо-1-фосфат}]} = 19\ \text{мМ}/1{,}0\ \text{мМ} = 19$$

Теперь можно найти стандартное изменение свободной энергии:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{eq}$$
$$= -(8{,}315\ \text{Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})\ (298\ \text{К})\ (\ln 19)$$
$$= -7{,}3\ \text{кДж/моль}$$

$\Delta G'^{\circ} < 0$, т. е. превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат сопровождается уменьшением (потерей, высвобождением) свободной энергии. В обратной реакции изменение свободной энергии равно по величине, но *противоположно* по знаку, т. е. $\Delta G'^{\circ} > 0$.

Таблица 13-4 Изменение стандартной свободной энергии в некоторых химических реакциях при pH 7,0 и 25 °С (298 К)

Реакция	$\Delta G'^{\circ}$, кДж/моль	$\Delta G'^{\circ}$, ккал/моль
Гидролиз		
Кислотный гидролиз		
Уксусный ангидрид + H_2O → 2 ацетата	−91,1	−21,8
ATP + H_2O → ADP + P_i	−30,5	−7,3
ATP + H_2O → AMP + PP_i	−45,6	−10,9
PP_i + H_2O → 2P_i	−19,2	−4,6
UDP-глюкоза + H_2O → UMP + глюкозо-1-фосфат	−43,0	−10,3
Гидролиз эфиров		
Этилацетат + H_2O → этанол + ацетат	−19,6	−4,7
Глюкозо-6-фосфат + H_2O → глюкоза + P_i	−13.8	−3.3
Гидролиз амидов и пептидов		
Глутамин + H_2O → глутамат + NH_4^+	−14.2	−3.4
Глицилглицин + H_2O → 2 глицина	−9,2	−2,2
Гидролиз гликозидов		
Мальтоза + H_2O → 2 глюкозы	−15,5	−3,7
Лактоза + H_2O → глюкоза + галактоза	−15.9	−3,8
Внутримолекулярные перегруппировки		
Глюкозо-1-фосфат → глюкозо-6-фосфат	−7.3	−1,7
Фруктозо-6-фосфат → глюкозо-6-фосфат	−1,7	−0,4
Отщепление воды		
Малат → фумарат + H_2O	3,1	0,8
Окисление молекулярным кислородом		
Глюкоза + $6O_2$ → $6CO_2$ + $6H_2O$	−2,840	−686
Пальмитат + $23O_2$ → $16CO_2$ + $16H_2O$	−9,770	−2,338

В табл. 13-4 приведены численные значения изменений стандартной свободной энергии некоторых важных химических реакций. Отметим, что гидролиз простых эфиров, амидов пептидов и гликозидов, как и внутримолекулярные перегруппировки и элиминирование, сопровождаются небольшим изменением стандартной свободной энергии, в то время как при гидролизе ангидридов кислот происходит значительное уменьшение стандартной свободной энергии. Полное окисление органических веществ, таких как глюкоза или пальмитиновая кислота, до CO_2 и H_2O, протекающее в клетках многоступенчато, приводит к очень большому уменьшению стандартной свободной энергии. Данные, приведенные в табл. 13-4, относятся к *стандартным условиям*. Параметры реакций, происходящих в клетке, можно получить, приведя величины в стандартных условиях к реальным условиям (в клетке).

Изменения свободной энергии в реальных системах зависят от концентраций исходных веществ и продуктов реакции

Мы должны четко уяснить, что изменение свободной энергии ΔG и изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^\circ$ численно различаются. Каждая химическая реакция характеризуется определенным изменением стандартной свободной энергии, которое может быть положительным, отрицательным или равным нулю в зависимости от константы равновесия данной реакции. По изменению стандартной свободной энергии можно судить о том, в каком направлении протекает данная реакция и как далека она от равновесия *при исходных концентрациях всех компонентов 1,0 М*, pH 7,0, температуре 25 °С и давлении 101,3 кПа. Таким образом, $\Delta G'^\circ$ — характеристический параметр (константа) данной реакции. Однако в реальных условиях изменение свободной энергии ΔG зависит от концентраций исходных веществ и продуктов реакции, а также от изменения температуры по ходу реакции. Реальные условия могут не совпадать со стандартными. Более того, ΔG любой реакции, спонтанно стремящейся к равновесию, всегда отрицательная величина, и по мере протекания реакции ΔG увеличивается, стремясь в пределе к нулю. В момент установления равновесия $\Delta G = 0$ — в данной реакции больше не может быть совершено никакой работы.

Для любой реакции $aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$ ΔG и $\Delta G'^\circ$ связаны уравнением

$$\Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (13\text{-}4)$$

в котором параметры, выделенные красным, *преобладающие* в данной системе. Концентрации в уравнении 13-4 принято называть действующими массами, а отношение $[C]^c[D]^d/[A]^a[B]^b$ выражает **закон действующих масс** $\boldsymbol{Q}$. В качестве примера давайте предположим, что реакция $A + B \rightleftharpoons C + D$ протекает при стандартных условиях температуры (25 °С) и давления (101,3 кПа), но что концентрации [A], [B], [C] и [D] *не* равны между собой и ни одна из них *не* равна стандартной концентрации 1,0 М. Чтобы найти изменение свободной энергии ΔG реакции, протекающей слева направо, при этих нестандартных условиях, подставим численные значения концентраций компонентов A, B, C и D в уравнение 13-3. Параметры R, T и $\Delta G'^\circ$ относятся к стандартным условиям. $\Delta G < 0$ и по мере протекания реакции этот параметр стремится к нулю из-за того, что вещества A и B расходуются ([A] и [B] уменьшаются), а вещества C и D нарабатываются ([C] и [D] увеличиваются). Отметим, что в состоянии равновесия $\Delta G = 0$ и уравнение 13-4 упрощается:

$$0 = \Delta G = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[C]_{eq}[D]_{eq}}{[A]_{eq}[B]_{eq}}$$

$$\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq}$$

т. е. мы снова получили уравнение 13-3, связывающее изменение стандартной свободной энергии и константу равновесия.

Критерий самопроизвольности реакции связан с ΔG, а не с $\Delta G'^\circ$. При $\Delta G'^\circ > 0$ реакция идет только при условии, что $\Delta G < 0$. Такое возможно, когда в уравнении 13-4 $0 < RT \ln$ ([продукты реакции]/[исходные вещества]) $> \Delta G'$. Например, при немедленном удалении продуктов реакции отношение [продукты реакции]/[исходные вещества] $\ll 1$, так что $RT \ln$ [продукты реакции]/[исходные вещества] < 0 (большое отрицательное число). Величины ΔG и $\Delta G'^\circ$ выражают *максимальное* количество свободной энергии, которое *теоретически* данная реакция может предоставить, т. е. количество энергии, которое

могло быть реализовано, если бы имелся высокоэффективный механизм ее использования. Поскольку такого механизма нет (во время любого процесса, какая-то часть свободной энергии всегда теряется в виде энтропии), количество работы, выполненное за счет данной реакции при постоянной температуре и постоянном давлении, всегда меньше теоретически ожидаемого.

Другой важный момент заключается в том, что некоторые благоприятные в термодинамическом отношении реакции (а именно, реакции, для которых $\Delta G'^{\circ} \ll 0$) происходят с недостаточно большой скоростью. Например, горение (реакция окисления) дров до CO_2 и H_2O термодинамически очень выгодно. Однако дрова хранятся годами — горение начинается не самопроизвольно, поскольку энергия активации (см. рис. 6-2 и 6-3) реакции горения выше, чем доступная при комнатной температуре энергия. Если предоставить необходимую энергию активации (например, от зажженной спички), начнется процесс горения, превращающий дерево в более стабильные продукты CO_2 и H_2O и высвобождающий энергию в виде тепла и света. Теплота, выделенная при этой экзотермической реакции, обеспечивает энергию активации для горения следующих порций дров, и таким образом процесс горения может продолжаться непрерывно.

В живых клетках химические реакции протекали бы чрезвычайно медленно, если бы там *не было эффективных катализаторов* — ферментов, которые вовсе не обеспечивают реакционную систему дополнительным теплом (энергией), а понижают *энергию активации*. Фермент «предлагает» альтернативный путь реакции с более низкой энергией активации, чем в случае некатализируемой реакции, для того чтобы энергия большинства молекул субстрата при комнатной температуре оказалась достаточной для преодоления энергетического барьера — энергии активации. Благодаря ферментативному катализу скорость реакции увеличивается во много раз. *Изменение свободной энергии реакции не зависит от пути, по которому реакция протекает*, а зависит только от природы и концентрации исходных веществ и конечных продуктов реакции. *При ферментативном катализе не изменяется величина константы равновесия реакции*; но под действием ферментов может увеличиваться и действительно увеличивается скорости прямой и обратной реакций и процесс идет в термодинамически разрешенном направлении (знаком изменения свободной энергии).

Изменения стандартной свободной энергии аддитивны

Рассмотрим последовательные реакции A ⇄ B и B ⇄ C. Каждая реакция имеет собственную константу равновесия и характеризуется определенным изменением стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}_1$ и $\Delta G'^{\circ}_2$. Поскольку эти две реакции протекают последовательно, компонент B можно исключить из обсуждения. Тогда рассмотрим суммарную реакцию A ⇄ C, которая характеризуется константой равновесия и, следовательно, изменением стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}_{\text{общ}}$. *Для последовательных химических реакций* $\Delta G'^{\circ}$ *аддитивны.* Для суммарной реакции A ⇄ C общее изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}_{\text{общ}}$ равно сумме изменений стандартных свободных энергий $\Delta G'^{\circ}_1$ и $\Delta G'^{\circ}_2$ двух реакций: $\Delta G'^{\circ}_{\text{общ}} = \Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$

(1)	A → B	$\Delta G'^{\circ}_1$
(2)	B → C	$\Delta G'^{\circ}_2$
Итого:	A → C	$\Delta G'^{\circ}_1 + \Delta G'^{\circ}_2$

Этот принцип биоэнергетики объясняет, как реакция (эндергоническая реакция), не выгодная термодинамически, может быть проведена в прямом направлении при сопряжении с высокоэкзергонической реакцией через общий промежуточный продукт. Например, у многих организмов синтез глюкозо-6-фосфата является первой стадией при усвоении глюкозы:

$$\text{Глюкоза} + P_i \rightarrow \text{глюкозо-6-фосфат} + H_2O$$
$$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8 \text{ кДж/моль}$$

Для этой реакции $\Delta G'^{\circ} > 0$, и при стандартных условиях реакция самопроизвольно не происходит в указанном направлении. Другой процесс в клетке — гидролиз ATP до ADP и P_i — наоборот высокоэкзергонический:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$
$$\Delta G'^{\circ} = -30{,}5 \text{ кДж/моль}$$

Эти две реакции связаны общими промежуточными продуктами P_i и H_2O и их можно представить как последовательные реакции:

(1) Глюкоза + P_i → глюкозо-6-фосфат + H_2O

(2) ATP + H_2O → ADP + P_i

Итого: ATP + глюкоза → ADP + глюкозо-6-фосфат

Общее изменение стандартной свободной энергии можно получить как сумму $\Delta G'^\circ$ отдельных реакций:

$$\Delta G'^\circ = 13{,}8 \text{ кДж/моль} + (-30{,}5 \text{ кДж/моль}) = \\ = -16{,}7 \text{ кДж/моль}$$

Суммарная реакция экзергоническая, и энергия, запасенная в ATP, используется для синтеза глюкозо-6-фосфата, хотя образование этого соединения из глюкозы и неорганического фосфата P_i — эндергонический процесс. *Реальный путь* образования глюкозо-6-фосфата в клетке путем переноса фосфатной группы от ATP отличается от приведенных выше реакций (1) и (2), но конечный результат получается тот же самый, что и при суммировании этих двух реакций. В термодинамических расчетах состояния системы в начале и конце процесса представлены этими веществами. А путь между начальным и конечным состояниями не важен.

Мы уже говорили о том, что $\Delta G'^\circ$ — способ выражения константы равновесия реакции. Для реакции (1)

$$K'_{eq_1} = \frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}]}{[\text{глюкоза}]\,[P_i]} = 3{,}9 \cdot 10^{-3}\ \text{M}^{-1}$$

Заметим, что H_2O не входит в это выражение, поскольку концентрация воды (55,5 M) не изменяется в ходе реакции. Константа равновесия реакции гидролиза ATP равна

$$K'_{eq_2} = \frac{[\text{ADP}][P_i]}{[\text{ATP}]} = 2{,}0 \cdot 10^5\ \text{M}$$

а константа равновесия двух сопряженных реакций

$$K'_{eq_3} = \frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}][\text{ADP}][P_i]}{[\text{глюкоза}]\,[P_i][\text{ATP}]} = \\ = (K'_{eq_1})\,(K'_{eq_2}) = (3{,}9 \cdot 10^{-3}\ \text{M}^{-1})\,(2{,}0 \cdot 10^5\ \text{M}) \\ = 7{,}8 \cdot 10^2$$

Здесь следует обратить внимание на важный момент, касающийся константы равновесия. Хотя $\Delta G'^\circ$ двух реакций, из которых слагается третья, *аддитивны*, K'_{eq} суммарной реакции равна *произведению* K'_{eq} этих отдельных реакций. Говорят, что константы равновесия реакций *мультипликативны*. Благодаря сопряжению гидролиза ATP с синтезом глюкозо-6-фосфата K'_{eq} увеличивается в $2{,}0 \cdot 10^5$ раза.

Эта стратегия, где при синтезе вторичных метаболитов и клеточных компонентов присутствует общий промежуточный продукт, встречается во всех живых клетках. Очевидно, что она работает только при условии постоянного наличия таких соединений, как ATP. В следующих главах мы обсудим некоторые из наиболее важных путей синтеза ATP.

Краткое содержание раздела 13.1 БИОЭНЕРГЕТИКА И ТЕРМОДИНАМИКА

- Живые клетки постоянно выполняют работу. Для поддержания своих высокоорганизованных структур, синтеза клеточных компонентов и многих других процессов клеткам необходима энергия.

- Биоэнергетика занимается количественным изучением превращений энергии в биологических системах. Биологические превращения энергии подчиняются законам термодинамики.

- На ход любой химической реакции влияют два фактора: стремление к состоянию с наибольшей устойчивостью (прочностью) связей (характеризуется энтальпией H) и стремление к наивысшей неупорядоченности системы (характеризуется энтропией S). Суммарной движущей силой реакции является изменение свободной энергии ΔG; этот термодинамический параметр учитывает общий эффект этих двух факторов: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

- Изменение стандартной свободной энергии — характеристический физико-химический параметр данной реакции; его можно рассчитать из константы равновесия: $\Delta G'^\circ = -RT \ln K'_{eq}$.

- В реальной системе изменение свободной энергии ΔG не константа, а зависит от $\Delta G'^{\circ}$ и от концентраций исходных веществ и продуктов реакции:

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \left[\frac{\text{продукты реакции}}{\text{исходные вещества}} \right]$$

- Когда $\Delta G \ll 0$, реакция протекает слева направо (т. е. в прямом направлении); когда $\Delta G \ll 0$, реакция стремится идти в обратном направлении; и когда $\Delta G = 0$, система находится в состоянии равновесия.

- Изменение свободной энергии реакции не зависит от пути протекания реакции. Изменение свободной энергии нескольких последовательных реакций (стадий) — аддитивный параметр; общее изменение свободной энергии суммарной химической реакции, которая является результатом последовательных реакций с общим промежуточным продуктом, равно сумме ΔG отдельных реакций.

13.2. Химические основы биохимических реакций

Биологические процессы с передачей энергии, о которых мы говорим здесь, представляют собой определенные химические реакции. В клетке происходят не все типы реакций, с которыми обычно знакомятся в общем курсе органической химии. То, какие реакции протекают в биологических системах, а какие нет, определяется 1) их ролью в конкретной биологической системе и 2) их скоростями. Оба этих фактора имеют важное значение в формировании метаболических путей, о которых мы будем говорить далее. Значимая реакция — это та реакция, которая использует имеющийся в наличии субстрат и превращает его в нужный продукт. Однако даже эти значимые (потенциально) реакции не всегда могут протекать в клетке. Некоторые химические превращения настолько замедленны (т. е. имеют настолько высокие энергии активации), что не могут происходить в живых системах даже в присутствии мощных катализаторов — ферментов. Те реакции, которые действительно протекают в живых клетках, представляют собой возникший в процессе эволюции набор химических «инструментов», позволяющий обходить «невозможные» реакции. Для хорошего понимания биохимии клетки необходимо уметь распознавать те реакции, протекание которых возможно.

Несмотря на все указанные ограничения, количество метаболических превращений в обычной клетке огромно. Большинство клеток обладают способностью осуществлять тысячи специфических ферментативных реакций, например превращать простое вещество, такое как глюкоза, в аминокислоты, нуклеотиды или липиды, извлекать энергию из веществ, поступающих с пищей, путем их окисления или проводить полимеризацию мономерных молекул с образованием макромолекул.

Чтобы изучить все эти реакции, необходим систематический подход. Химические реакции, происходящие в живых организмах, можно разделить на типы, и тогда не понадобится изучать каждую отдельную реакцию, чтобы понять «логику», заложенную в биохимических процессах. Множество реакций в живых клетках можно классифицировать, выделив пять типов: 1) реакции, идущие с образованием или разрывом связи углерод–углерод; 2) внутримолекулярные перегруппировки, изомеризация и элиминирование; 3) реакции с участием свободных радикалов; 4) реакции с переносом функциональных групп; 5) окислительно-восстановительные реакции. Далее мы подробнее обсудим различные типы реакций на конкретных примерах биохимических превращений. Заметьте, что реакции, относящие с разному типу, не исключают друг друга, например реакция изомеризации может идти по свободно-радикальному механизму.

Однако прежде чем продолжить обсуждение типов реакций, нам следует вспомнить два главных химических принципа. Первый принцип заключается в том, что ковалентная химическая связь образуется в результате обобществления пары электронов, а разрыв этой связи может происходить двумя путями (**рис. 13-1**). При **гомолитическом разрыве** каждый атом, участвовавший в образовании связи, превращается в свободный **радикал**, несущий один неспаренный электрон. При **гетеролитическом разрыве**, который происходит гораздо чаще, оба электрона остаются связанными с одним из двух атомов. На рис. 13-1 изображены частицы, которые наиболее часто образуются при расщеплении связей C—C и C—H. Карбанионы,

карбокатионы и гидрид-ионы очень нестабильны, и, как мы видим далее, это свойство во многом и определяет химические свойства этих ионов.

Второй принцип состоит в том, что многие биохимические реакции происходят при взаимодействии **нуклеофилов** (функциональных групп, которые богаты электронами и способны отдавать их другим атомам и группам атомов) и **электрофилов** (электронодефицитных групп, способных принимать электроны от других групп). Нуклеофилы, взаимодействуя с электрофилами, отдают им электроны. Часто встречающиеся в биологических системах нуклеофилы и электрофилы представлены на **рис. 13-2**. Обратите внимание, что атом углерода может выступать как в роли нуклеофила, так и в роли электрофила в зависимости от того, какие химические связи и функциональные группы его окружают.

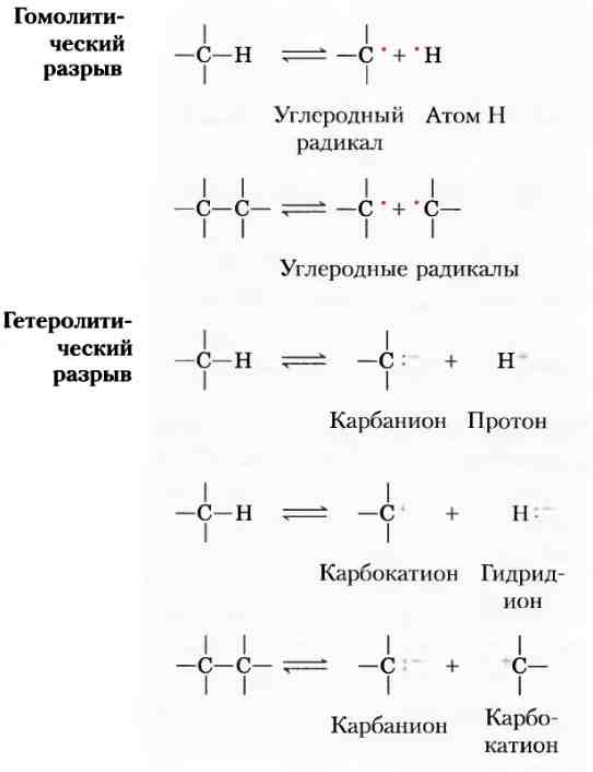


Рис. 13-1. Два механизма разрыва связей С—С и С—Н. При *гомолитическом разрыве* связи каждый атом сохраняет за собой один электрон, что приводит к образованию углеродного радикала (углерод имеет неспаренный электрон) или незаряженного атомарного водорода. При *гетеролитическом разрыве* связи оба электрона остаются связанными с одним из атомов. При этом образуются карбанионы, карбокатионы, протоны или гидрид-ионы.

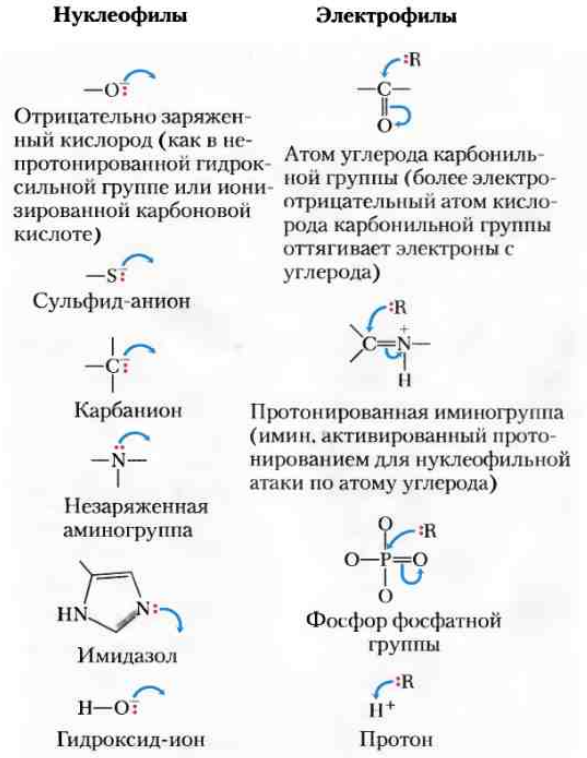


Рис. 13-2. Наиболее распространенные нуклеофилы и электрофилы в биохимических реакциях. В схемах механизмов химических реакций, при которых происходит образование или разрыв ковалентных связей, электроны изображают точками, а изогнутые стрелки показывают направление перемещения электрона или пары электронов. Ковалентная связь образуется в результате обобществления пары электронов. Не участвующие в образовании химической связи электроны, если они важны для понимания механизма реакции, изображают парой точек (:). Изогнутые стрелки (↷) показывают направление смещения пары электронов. Перемещение одного электрона (как в свободнорадикальных реакциях) изображают стрелкой, похожей на рыболовный крючок (↶). Во многих процессах участвует неподеленная пара электронов.

Реакции, протекающие с образованием или разрывом связи углерод–углерод. Гетеролитический разрыв связи С—С приводит к образованию карбаниона и карбокатиона (рис. 13-1). Образование же связи С—С происходит в результате соединения нуклеофильного карбаниона и электрофильного карбокатиона. Карбанионы и карбокатионы обычно настолько нестабильны, что их образование в качестве промежуточных продуктов химической реакции, даже при уча-

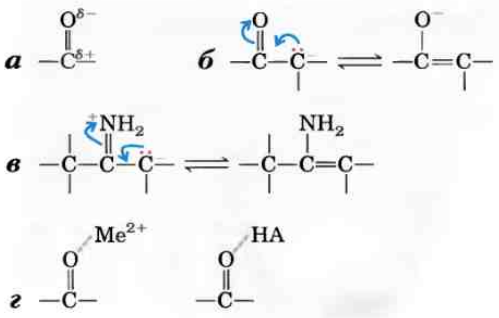


Рис. 13-3. Химические свойства карбонильной группы. *а* — атом углерода карбонильной группы обладает электрофильными свойствами, что связано со способностью электроноакцепторного атома кислорода оттягивать на себя электроны. В результате возникает гибридная резонансная структура, в которой атом углерода несет частичный положительный заряд. *б* — делокализация электронов на карбонильной группе способствует стабилизации карбаниона на соседнем атоме углерода и облегчает его образование. *в* — имины выполняют ту же функцию, что и карбонильная группа, облегчая делокализацию электронов. *г* — карбонильная группа не всегда действует в одиночку; ее способность оттягивать на себя электроны часто увеличивается благодаря присутствию иона металла (Me^{2+}, например, Mg^{2+}) или кислоты (HA).

стии ферментов, энергетически очень невыгодно. В условиях клетки эти реакции просто не могут протекать, если только на «помощь» не приходит какая-либо функциональная группа, содержащая электроотрицательные атомы (O или N), способные изменить электронное состояние соседних атомов углерода и стабилизировать его таким образом, чтобы облегчить образование карбанионов и карбокатионов.

Карбонильные группы играют очень важную роль в химических реакциях, задействованных в различных метаболических путях. Атом углерода карбонильной группы несет частичный положительный заряд, что связано с электроноакцепторными свойствами кислорода карбонильной группы, поэтому такой атом углерода выступает в роли электрофила (**рис. 13-3, *а***). Таким образом, карбонильная группа может облегчать образование карбаниона на соседнем атоме углерода путем делокализации отрицательного заряда (рис. 13-3, *б*). Иминогруппа $C{=}{}^{+}NH_2$ может выполнять аналогичную функцию (рис. 13-3, *в*). Способность карбонильных и иминогрупп делокализовать электроны может быть дополнительно усилена общим кислотным катализатором или ионом металла, таким как Mg^{2+} (рис. 13-3, *г*; см. также рис. 6-21 и 6-23).

Карбонильные группы играют особенно важную роль в реакциях трех основных типов, происходящих с образованием или разрывом связей C—C (**рис. 13-4**), а именно при альдольной конденсации, конденсации Кляйзена и в реакциях декарбоксилирования. В этих реакциях образующийся карбанион стабилизирован карбонильной группой, причем достаточно часто другой карбонил выступает в роли электрофила, с которым реагирует нуклеофил — карбанион.

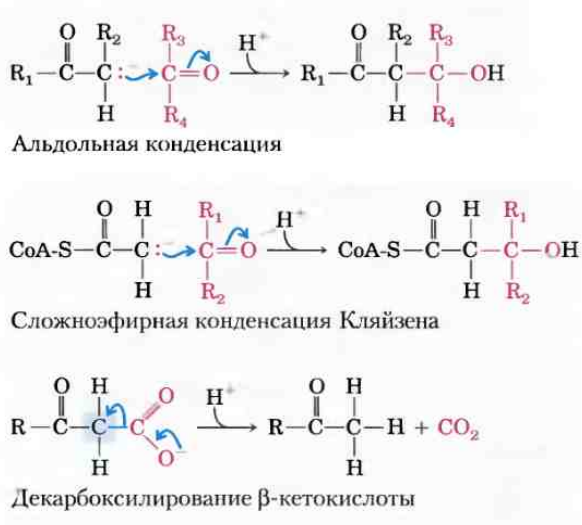


Рис. 13-4. Примеры реакций с разрывом или образованием связи C—C в биологических системах. В альдольной конденсации и конденсации Кляйзена карбанион выполняет функцию нуклеофила, а углерод карбонильной группы выступает в роли электрофила. В обоих случаях карбанион стабилизирован другой карбонильной группой при соседнем атоме углерода. В реакции декарбоксилирования в результате отщепления CO_2 (этот атом углерода выделен синим) образуется карбанион. Эта реакция не могла бы происходить со сколько-нибудь заметной скоростью без стабилизирующего эффекта карбонильной группы, расположенной рядом с карбанионом. Каждый раз, когда изображают карбанион, подразумеваются стабилизирующие резонансные структуры с участием соседней карбонильной группы, как показано на рис. 13-3, *б*. В стабилизации карбаниона вместо карбонильной группы может принимать участие иминогруппа (рис. 13-3, *в*) или другая электроноакцепторная группа, включая некоторые кофакторы ферментов, например пиридоксаль.

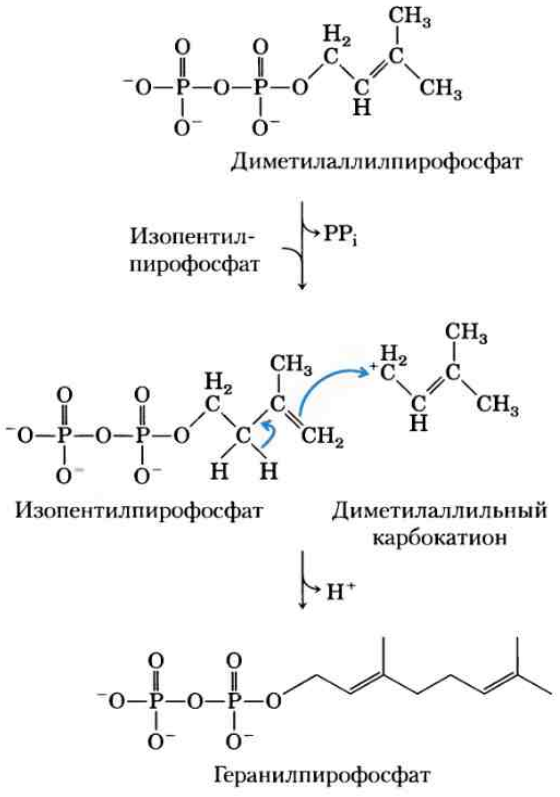


Рис. 13-5. Возникновение карбокатиона при образовании связи углерод–углерод. На одной из ранних стадий биосинтеза холестерина фермент пренилтрансфераза катализирует конденсацию изопентенилпирофосфата с диметилаллилпирофосфатом с образованием геранилпирофосфата (см. рис. 21-36). Реакция начинается с отщепления пирофосфатной группы из диметилаллилпирофосфата, в результате чего возникает карбокатион, стабилизируемый за счет резонанса с соседней связью C=C.

Альдольная конденсация достаточно часто используется для образования связи C—C; при гликолизе альдолаза катализирует обратную реакцию превращения шестиуглеродного соединения в два трехуглеродных соединения (см. рис. 14-5). При **конденсации Кляйзена** карбанион стабилизируется карбонильной группой соседнего тиоэфира; пример — синтез цитрата в цикле лимонной кислоты (см. рис. 16-9). При декарбоксилировании также достаточно часто образуется карбанион, стабилизированный карбонильной группой; пример — катализируемая ацетоацетатдекарбоксилазой реакция образова-ния кетоновых тел при катаболизме жирных кислот (см. рис. 17-18). С введением карбонильных групп в специфическое окружение, позволяющее осуществлять образование или разрыв связей углерод–углерод, могут быть связаны целые метаболические пути. В некоторых случаях электроноакцепторную функцию карбонильной группы выполняет иминогруппа или специализированный кофактор, например пиридоксальфосфат.

Карбокатион как промежуточное соединение в некоторых реакциях образования или разрыва связи углерод–углерод возникает в результате удаления хорошей уходящей группы, такой как пирофосфат (см. ниже раздел, посвященный реакциям переноса групп). В качестве примера можно привести реакцию, катализируемую пренилтрансферазой **(рис. 13-5)**, происходящую на начальных стадиях биосинтеза холестерина.

Внутримолекулярные перегруппировки, изомеризация и элиминирование. Другой распространенный тип клеточных реакций — внутримолекулярные перегруппировки, при которых перераспределение электронов приводит к структурным изменениям, не затрагивая общего окислительного состояния. Например, различные функциональные группы могут претерпевать окислительно-восстановительные превращения, но вся молекула в целом не меняет свое окислительное состояние. Группы, находящиеся при атомах углерода, соединенных двойной связью, могут претерпевать *цис-транс*-переходы, что может сопровождаться переносом самой двойной связи. Пример изомеризации в результате окислительно-восстановительной реакции — образование фруктозо-6-фосфата из глюкозо-6-фосфата при гликолизе **(рис. 13-6**; эта реакция подробно обсуждается в гл. 14): C-1 восстанавливается (альдегид превращается в спирт), а C-2 окисляется (спирт превращается в кетон). На рис. 13-6, *б* показан перенос электронов при этой изомеризации. *Цис-транс*-превращения проиллюстрированы на примере реакции, катализируемой пролил-*цис-транс*-изомеразой, участвующей в фолдинге некоторых белков (см. рис. 4-7, *б*). Простой перенос связи C=C происходит при метаболизме олеиновой кислоты, весьма распространенной жирной кислоты (см. рис. 17-9). Интересные примеры реакций с переносом двойной связи можно наблюдать при биосинтезе холестерина (см. рис. 21-33).

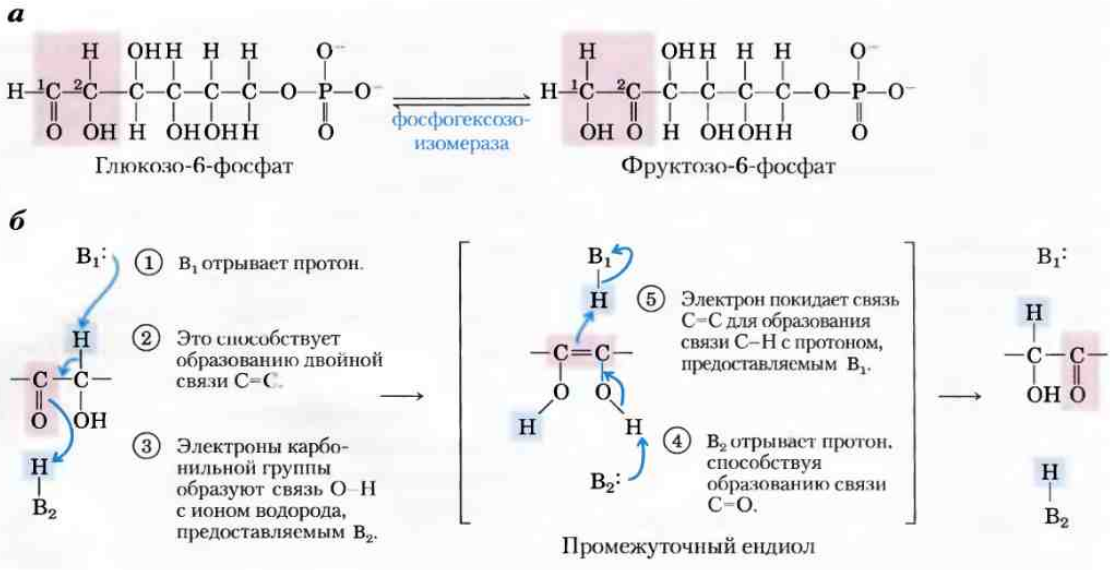
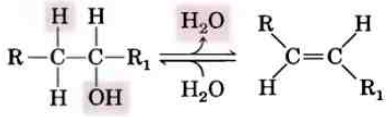


Рис. 13-6. Реакции изомеризации и элиминирования. *а* — превращение глюкозо-6-фосфата в фруктозо-6-фосфат, катализируемое фосфогексозоизомеразой. *б* — реакция протекает через образование ендиола. Изогнутыми синими стрелками показано перемещение связывающих электронных пар. Розовым цветом указан ход окисления слева направо. B_1 и B_2 — ионизируемые группы фермента, они в ходе реакции способны принимать и отдавать протоны (т. е. выступают в роли кислот или оснований). Розовым цветом выделены нуклеофильные группы, синим — электрофильные.

Рис. 13-7. Реакции декарбоксилирования, инициируемые свободными радикалами. Биосинтез гема (см. рис. 22-24) в клетках *Escherichia coli* включает стадию декарбоксилирования, при которой пропионильные боковые группы копропорфириногена III превращаются в винильные группы протопорфириногена IX. При росте бактерии в анаэробных условиях фермент кислород-независимая копропорфириноген-III-оксидаза, называемая также белком HemN, стимулирует декарбоксилирование по изображенному здесь свободнорадикальному механизму. Акцептор высвобождающихся электронов неизвестен. Для простоты показаны только важные для описания механизма реакции участки молекул, а полностью структуры представлены на рис. 22-24. При росте *E. coli* в присутствии кислорода эта реакция заменяется окислительным декарбоксилированием, катализируемым другим ферментом.

Пример реакции элиминирования, происходящей без изменения общего окислительного состояния молекулы, — отщепление воды от спирта с образованием двойной связи C=C.



Похожие реакции элиминирования происходят в аминах.

Реакции с участием свободных радикалов. Ранее считалось, что гомолитический разрыв ковалентной связи с образованием свободных радикалов происходит достаточно редко, однако это было обнаружено в очень разных биохимических процессах. Среди них — изомеризация с участием аденозилкобаламина (витамина B_{12}) или S-аденозилметионина, инициируемая 5′-дезоксиаденозильным радикалом (см. реакцию, катализируемую метилмалонил-CoA-мутазой, в доп. 17-2), некоторые инициируемые радикалами реакции декарбоксилирования (**рис. 13-7**), некоторые реакции редуктаз, например реакция, катализируемая рибонуклеотидредуктазой (см. рис. 22-41), а также некоторые перегруппировки, например реакция, катализируемая ДНК-фотолиазой (см. рис. 25-27).

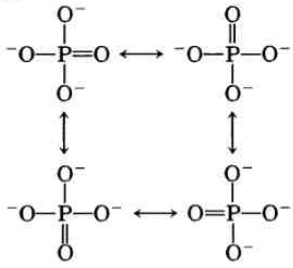
Реакции с переносом функциональных групп. В живых организмах часто происходят реакции с переносом ацильной, гликозильной или фосфорильной группы от одного нуклеофила к другому. Перенос ацильной группы обычно сопровождается присоединением нуклеофила к карбонильному углероду ацильной группы с образованием промежуточного тетраэдрического интермедиата:

Примером может служить реакция, катализируемая химотрипсином (см. рис. 6-21). В принципе, замещение может происходить как по механизму S_N1, так и по механизму S_N2, как показано на рис. 6-25 для лизоцима.

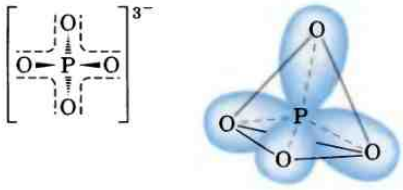
Особую роль в метаболизме играют рекакации с переносом фосфорильной группы; эти реакции рассматриваются в разд. 13.3. Важную роль при метаболизме играют реакции присоединения хороших уходящих групп к промежуточным продуктам метаболизма, что служит для их «активации»в дальнейших превращениях. К хорошим уходящим группам в реакциях нуклеофильного замещения относятся неорганический ортофосфат (анионы фосфорной кислоты H_3PO_4 — смесь $H_2PO_4^-$ и HPO_4^{2-}, которую обычно сокращенно обозначают как P_i) и неорганический пирофосфат ($P_2O_7^{4-}$, сокращенно обозначаемый как PP_i); эфиры и ангидриды фосфорной кислоты достаточно активированы для дальнейшей реакции. Кроме того, нуклеофильному замещению способствует присоединение фосфорильной группы к такой плохой уходящей группе, как гидроксильная группа. Нуклеофильное замещение, при котором фосфорильная группа PO_3^{2-} выступает в качестве уходящей группы, происходит в сотнях метаболических реакций.

Фосфор может образовывать пять ковалентных связей. Неорганический ортофосфат P_i (**рис. 13-8, *а***) обычно изображают с тремя простыми (одинарными) связями P—O и одной двойной связью P=O; это удобно, но далеко не точно. На самом деле в ортофосфате P_i все четыре связи фосфор–кислород эквивалентны и имеют в какой-то степени характер двойной связи, так что структура этого аниона тетраэдрическая (рис. 13-8, *б*). Поскольку у кислорода более выражены электроноакцепторные свойства, чем у фосфора, электронная пара не в равной степени принадлежит обоим атомам: расположенный в центре структуры атом фосфора несет частичный положительный заряд и поэтому может выступать в качестве электрофила. Во множестве реакций метаболизма фосфорильная группа PO_3^{2-} переносится от молекулы ATP на молекулу спирта, в результате чего образуется фосфат (эфир) (рис. 13-8, *в*), или на карбоновую кислоту с образованием смешанного ангидрида. При атаке нуклеофила на электрофильный атом фосфора молекула ATP превращается в достаточно стабильный промежуточный продукт, в котором фосфор пятивалентен (рис. 13-8, *г*). Перенос фосфорильной группы завершается отщеплением уходящей

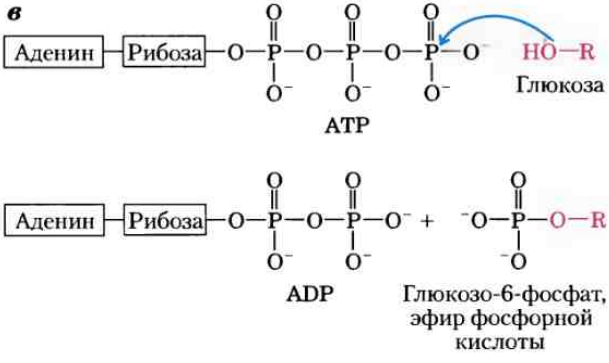
а



б



в



г

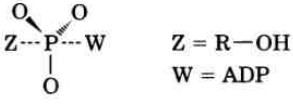


Рис. 13-8. Альтернативные варианты изображения структуры неорганического ортофосфата. *а* — три атома кислорода связаны с атомом фосфора одинарными связями, а четвертый присоединен двойной связью; можно построить четыре различные резонансные структуры. *б* — более точные резонансные структуры, если все четыре связи кислород–фосфор имеют природу отчасти двойной связи; при этом гибридные орбитали образуют тетраэдр с атомом фосфора в центре. *в, г* — при атаке нуклеофила Z (здесь OH-группа при C-6 в глюкозе) на ATP происходит замещение с образованием ADP (здесь W). В этой S_N2-реакции образуется промежуточное соединение с пятивалентным фосфором P.

группы (ADP). Большое семейство ферментов, катализирующих перенос фосфорильной группы от молекулы ATP, называют **киназами** (от греч. *kinein* — двигать). Например, гексокиназа «передвигает» фосфорильную группу от ATP на молекулу глюкозы.

Однако не только фосфорильные группы активируют молекулы для последующей реакции. Тиоспирты (тиолы), в которых атом кислорода спиртовой группы заменен на серу, также являются хорошими уходящими группами. Тиолы активируют карбоновые кислоты путем образования тиоэфиров. В последующих главах мы рассмотрим несколько реакций, включая реакции синтеза липидов, катализируемые синтетазами жирных кислот (см. рис. 21-2), при которых нуклеофильное замещение по карбонильному углероду тиоэфира приводит к переносу ацильной группы на другой остаток.

Окислительно-восстановительные реакции. В биомолекулах углерод может существовать в пяти окислительных состояниях в зависимости от тех элементов, с которыми он делит электроны (**рис. 13-9**), а переходы между этими состояниями играют важнейшую роль в метаболизме (окислительно-восстановительным реакциям посвящен разд. 13.4). Во многих окислительных процессах в биологии соединения теряют два электрона и два иона водорода (упрощая, будем говорить два водорода). Такие реакции обычно называют реакциями дегидрирования, а ката-

Рис. 13-9. Окислительные состояния углерода в биомолекулах. Ряд органических соединений, каждое из которых можно получить путем окисления атома углерода (выделен красным цветом) в предшествующем соединении. Диоксид углерода — наиболее окисленная форма углерода, встречающаяся в живых системах.

Рис. 13-10. Окислительно-восстановительная реакция. Представлена реакция окисления лактата до пирувата. Происходит дегидрирование — удаление двух электронов и двух ионов водорода (что эквивалентно удалению двух атомов водорода) от атома С-2 лактата с образованием пирувата (кетона). В клетках эту реакцию катализирует лактатдегидрогеназа, а электроны переносятся на кофактор никотинамидадениндинуклеотид (NAD). Реакция обратима; пируват может восстанавливаться электронами от кофактора.

лизирующие их ферменты — **дегидрогеназами (рис. 13-10)**. В некоторых, хотя и не во всех, биохимических реакциях окисления атом углерода связывается с атомом кислорода ковалентной связью. Ферменты, катализирующие такие процессы, называют **оксидазами**, а если при этом атом кислорода берется непосредственно из молекулярного кислорода (O_2), то такие ферменты называют **оксигеназами**.

Любой процесс окисления обязательно сопровождается восстановлением, при котором акцептор электронов принимает электроны, удаленные при окислении. Реакции окисления обычно происходят с выделением энергии (вспомните костер: вещества, из которых состоит древесина, окисляются молекулярным кислородом из воздуха). Большинство живых клеток получают необходимую им энергию путем окисления «топливных» молекул, таких как углеводы или жиры (фотосинтезирующие организмы используют солнечную энергию, поглощая свет). Описанные в гл. 14–19 катаболические процессы (т. е. процессы, сопровождаемые выделением энергии) представляют собой последовательности окислительных реакций, где перенос электронов от топливных молекул к кислороду осуществляется с помощью переносчиков электронов. Высокое сродство молекулярного кислорода к электронам делает весь процесс переноса электронов экзергоническим и обеспечивает необходимую энергию для синтеза ATP, что является основной задачей реакций катаболизма.

Многие реакции всех пяти рассмотренных здесь типов происходят в присутствии кофакторов в форме коферментов или ионов металлов (примеры — витамин B_{12}, S-аденозилметионин, фолат, никотинамид, железо). Кофакторы связываются с ферментами (обратимо или же практически необратимо), благодаря чему и осуществляется катализ определенных химических превращений (см. разд. 6.1, т. 1). Большинство кофакторов участвуют в определенной достаточно узкой группе родственных реакций. В последующих главах мы обсудим наиболее важные кофакторы. Если положить в основу кофакторы, изучение биохимических процессов можно организовать совсем по-другому, поскольку все реакции с участием конкретного кофактора взаимосвязаны.

Биохимические и химические уравнения вовсе не одно и то же

Биохимики записывают реакции метаболизма с помощью упрощенных схем, что особенно заметно, например, в случае реакций с участием ATP. Фосфорилированные соединения могут находиться в нескольких состояниях ионизации и, как мы обсуждали выше, связывать при этом ионы магния. Например, при pH 7,0 и концентрации Mg^{2+} 2 мМ ATP существует в виде ATP^{4-}, $HATP^{3-}$, H_2ATP^{2-}, $MgHATP^{-}$ и Mg_2ATP. Однако рассуждая о биологической роли ATP, мы далеко не всегда интересуемся подобными деталями и при этом не рассматриваем ATP как некую сумму веществ. И поэтому реакцию гидролиза ATP биохимик записывает в виде следующей схемы:

$$ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$$

где на самом деле ATP, ADP и P_i — некоторая сумма (смесь) веществ. В то же время константа равновесия $K'_{eq} = [ADP][P_i]/[ATP]$ зависит от pH и от концентрации свободных ионов Mg^{2+}. Обратите внимание, что в биохимическом уравнении (в приведенной схеме) не фигурируют ионы водорода и Mg^{2+}, поскольку их концентрации постоянны (не меняются при протекании биохимической реакции). Таким образом, в биохимическом уравнении нет необходимости уравнивать число атомов H и Mg, а также заряды, а вот в химическом уравнении обязатеьно надо уравнивать число всех элементов, участвующих в реакции (в данном примере C, N, O и P).

Для сравнения мы может записать химическое уравнение, в котором уравниваются *все* элементы и заряды. Например, в отсутствие магния гидролиз ATP при pH > 8,5 можно записать следующим образом:

$$ATP^{4-} + H_2O \rightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

Соответствующая константа равновесия (K'_{eq} = $[ADP^{3-}]$ $[HPO_4^{2-}][H^+]/[ATP^{4-}]$) зависит только от температуры, давления и ионной силы раствора.

В биохимии используются оба способа записи уравнений реакций метаболизма. Химическая форма записи необходима в тех случаях, когда мы хотим учесть все атомы и все заряды, что бывает нужно при описании механизма химической реакции. Биохимическая форма записи используется для определения направления самопроизвольного протекания реакции при заданных значениях pH и $[Mg^{2+}]$, а также для расчета константы равновесия.

В данной книге мы в основном используем биохимическую форму записи реакций, за исключением тех случаев, когда речь идет о механизме реакции; значения $\Delta G'^{\circ}$ и K'_{eq} соответствуют pH 7 и концентрации ионов Mg^{2+} 1 мМ.

Краткое содержание раздела 13.2 ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ

- Множество химических реакций, которые происходят в живых организмах, можно разделить на пять основных типов.

- Карбонильная группа играет важную роль в реакциях образования и разрыва связи С—С. Часто в качестве промежуточного соединения образуется карбанион, стабилизированный соседними карбонильными группами или (реже) иминогруппами или кофакторами.

- Перераспределение электронов может приводить к внутримолекулярным перегруппировкам, изомеризации и элиминированию (отщеплению) функциональных групп. К таким реакциям относятся внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, *цис-транс*-перегруппировки при двойной связи и перенос двойной связи.

- Гомолитический разрыв ковалентной связи с образованием свободных радикалов происходит в некоторых реакциях метаболизма, таких как изомеризация, декарбоксилирование и реакции, катализируемые редуктазами.

- Особенно важную роль в клетке играют реакции с переносом фосфорильной группы; это способ активации молекул, которые без подобной активации не могли бы претерпевать дальнейших химических превращений.

- Окислительно-восстановительные реакции сопровождаются потерей и приобретением электронов: одно вещество получает электроны и восстанавливается, а другое вещество отдает электроны и при этом окисляется. Реакции окисления обычно протекают с высвобождением энергии и играют важную роль в процессах катаболизма.

13.3. Перенос фосфатных групп и ATP

Познакомившись с некоторыми фундаментальными закономерностями изменений энергии в химических системах, мы теперь можем рассмотреть энергетический цикл в клетках и особую роль ATP как энергетического посредника, связывающего процессы катаболизма и анаболизма (см. рис. 1-28, т. 1). Гетеротрофные клетки получают свободную энергию в химической форме в процессе катаболизма молекул питательных веществ и используют эту энергию для синтеза ATP из ADP и неорганического фосфата P_i. Затем ATP отдает часть своей химической энергии в эндергонических процессах, таких как синтез промежуточных продуктов метаболизма и макромолекул из более мелких предшественников, перенос веществ через мембраны против градиента концентраций и молекулярная динамика. Такая передача энергии от ATP в конце концов приводит к распаду ATP на ADP и P_i, а в некоторых случаях до AMP и 2 P_i. Мы обсудим здесь химические основы больших изменений

свободной энергии, которыми сопровождается процесс гидролиза ATP и других высокоэнергетических фосфатных соединений, и покажем, что в большинстве реакций передачи энергии от ATP происходит перенос групп, а не простой гидролиз ATP. Для иллюстрации энергетических превращений, в которых ATP поставляет энергию, рассмотрим синтез информационных макромолекул, транспорт растворов через мембраны и сокращение мышц.

При гидролизе ATP изменение свободной энергии выражается отрицательным числом, большим по абсолютной величине

Почему же при гидролизе ATP стандартная свободная энергия настолько отрицательна? Рассмотрим химические основы этого процесса, воспользовавшись **рис. 13.11**. Гидролитическое отщепление концевого фосфата с разрывом фосфоангидридной связи в ATP приводит к незначительному уменьшению электростатического напряжения в структуре молекулы ATP, обусловленного электростатическими взаимодействиями. Высвободившийся P_i (HPO_4^{2-}) стабилизируется путем образования резонансных структур, существование которых невозможно в ATP. ADP^{2-} — другой прямой продукт гидролиза ATP немедленно ионизируется, высвобождая в среду ионы водорода в очень низкой концентрации, $[H^+] \approx 10^{-7}$ M. Концентрации прямых продуктов гидролиза ATP в клетке значительно ниже их концентраций в равновесной системе (табл. 13-5); таким образом, по закону действующих масс в клетке имеются благоприятные условия для гидролиза ATP.

Для гидролиза ATP в стандартных условиях изменение свободной энергии составляет −30,5 кДж/моль, однако в живых клетках этот параметр существенно отличается от этой величины, поскольку клеточные концентрации ATP, ADP и P_i не равны между собой и гораз-

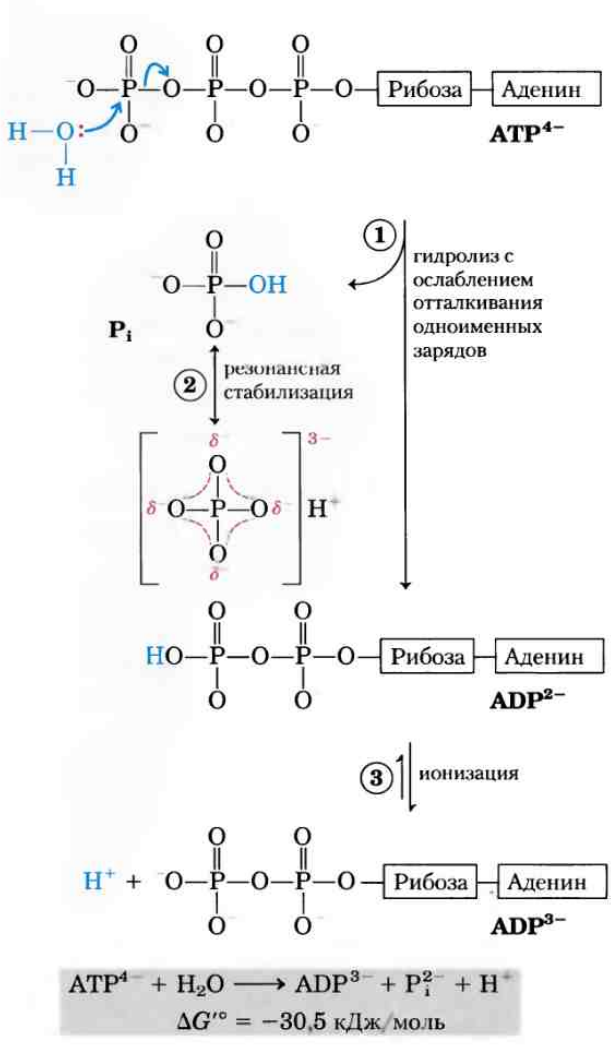


Рис. 13-11. Химические основы очень существенного изменения свободной энергии при гидролизе ATP. ① Разрыв концевой фосфатной связи при гидролизе снимает электростатическое напряжение молекулы ATP с четырьмя отрицательными зарядами. ② Продукт реакции неорганический фосфат P_i стабилизируется путем образования гибридной резонансной структуры, в которой каждая из четырех связей фосфор–кислород содержит некоторую степень двойной связи, а водородный ион не связан постоянно ни с одним из атомов кислорода. (Резонансная стабилизация происходит и в фосфатах, участвующих в эфирной, или ангидридной, связи, однако для них может реализоваться меньшее число резонансных форм, чем для P_i.) ③ Продукт ADP^{2-} сразу же ионизируется, высвобождая в среду протоны в очень низкой концентрации (pH 7). Четвертый фактор (на рисунке не отражен), который благоприятствует гидролизу ATP, — это более высокая степень сольватации (в данном случае гидратации) продуктов P_i и ADP по сравнению с исходным ATP, из-за чего продукты реакции становятся устойчивее, чем исходные вещества.

Таблица 13-5 **Концентрации адениновых нуклеотидов, неорганических фосфатов и креатинфосфатов в некоторых клетках**

Клетки	Концентрация (мМ)[а]				
	ATP	ADP[б]	AMP	P_i	PCr
Гепатоциты крыс	3,38	1,32	0,29	4,8	0
Миоциты крыс	8,05	0,93	0,04	8,05	28
Нейроны крыс	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Эритроциты человека	2,25	0,25	0,02	1,65	0
Клетки *E. coli*	7,90	1,04	0,82	7,9	0

[а] Для эритроцитов приведены концентрации в цитозоле (у эритроцитов человека нет ни ядра, ни митохондрий). Во всех других случаях имеется в виду общее содержание в клетке, концентрация ADP в цитозоле сильно отличается. PCr — креатинфосфат (обсуждается на с. 33).
[б] Приведена суммарная концентрация ADP; содержание свободного ADP может быть гораздо ниже (см. с. 30–31).

до ниже стандартных концентраций, равных 1,0 М (табл. 13-5). Более того, в цитозоле с ATP и ADP связываются ионы Mg^{2+} (**рис. 13-12**), и в большинстве ферментативных реакций, в которых ATP участвует в качестве донора фосфорильной группы, активной формой ATP является именно его комплекс с магнием $MgATP^{2-}$. Поэтому правильнее говорить о $\Delta G'^{\circ}$ гидролиза $MgATP^{2-}$. В доп. 13-1 приведен расчет ΔG гидролиза ATP в интактных эритроцитах с использованием данных, приведенных в табл. 13-5. В интактных клетках величина ΔG гидролиза ATP, обычно обозначается ΔG_p и называется **потенциалом фосфорилирования**.

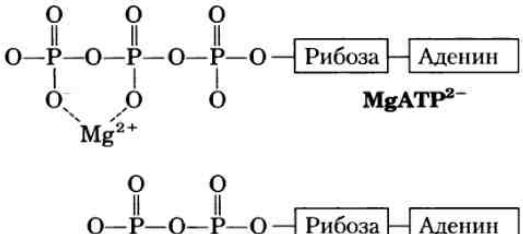


Рис. 13-12. Mg^{2+} и ATP. При образовании комплексов с Mg^{2+} отрицательные заряды на кислородных атомах частично нейтрализуются, что влияет на конформацию фосфатных групп в таких нуклеотидах, как ATP и ADP.

Поскольку в клетках разных типов концентрации ATP, ADP и P_i варьируют (см. табл. 13-5), величины ΔG_p гидролиза ATP в них также различны. Более того, в любой клетке ΔG_p может изменяться во времени в зависимости от условий метаболизма, на которые влияют концентрации ATP , ADP, P_i и H^+ (pH). Мы можем рассчитать ΔG_p любой реакции метаболизма в клетке, если известны концентрации всех исходных веществ и продуктов реакции, а также другие параметры (pH, температура и концентрация ионов Mg^{2+}).

Расчеты усложняются тем, что суммарные концентрации ATP, ADP, P_i и H^+ могут быть существенно выше, чем соответствующие *свободные* концентрации, которые входят в термодинамические расчеты, ведь часть ATP, ADP, и P_i связано с клеточными белками. Например, по различным данным, в расслабленной мышце концентрация свободных молекул ADP варьирует от 1 до 37 мкМ. В примере 13-2, если использовать концентрацию 25 мкМ, получим $\Delta G_p = -64$ кДж/моль. Возможно, этот расчет ΔG_p не столь уж поучителен; однако надо помнить наш вывод относительно изменений свободной

Пример 13-2. РАСЧЕТ ΔG_p

Вычислите свободную энергию гидролиза ATP (ΔG_p) в эритроцитах человека. Стандартная свободная энергия гидролиза ATP равна –30,5 кДж/моль, а концентрации ATP, ADP и P_i в эритроцитах приведены в табл. 13-5; pH 7,0, температура тела 37 °C. Что можно сказать о количестве энергии, необходимом для *синтеза* ATP в таких условиях?

Решение. В эритроцитах человека концентрации ATP, ADP и P_i равны 2,25 мМ, 0,25 мМ и 1,65 мМ соответственно. Свободная энергия гидролиза ATP в эритроцитах при стандартных условиях (см. уравнение 13-4)

$$\Delta G_p = \Delta G'^\circ + RT \ln \frac{[ADP][P_i]}{[ATP]}$$

Подставляя численные значения, получаем

$$\Delta G_p = -30{,}5 \text{ кДж/моль} + \left[(8{,}315 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К})(298 \text{ К}) \ln \frac{(0{,}25 \cdot 10^{-3})(1{,}65 \cdot 10^{-3})}{2{,}25 \cdot 10^{-3}}\right] =$$

$$= -30{,}5 \text{ кДж/моль} + (2{,}48 \text{ кДж/моль}) \ln 1{,}8 \cdot 10^{-4} =$$

$$= -30{,}5 \text{ кДж/моль} - 21 \text{ кДж/моль} = -52 \text{ кДж/моль}$$

(Обратите внимание, что ответ округлен (52,5 округлили до 52) по правилам округления цифры 5 до ближайшего меньшего (а не большего) целого числа, чтобы избежать завышения значений.) Таким образом, в интактных эритроцитах ΔG_p гидролиза ATP (–52 кДж/моль) существенно выше, чем $\Delta G'^\circ$ = –30,5 кДж/моль.

Итак, для *синтеза* ATP из ADP и P_i в эритроцитах требуется 52 кДж/моль.

энергии: *in vivo* энергия, высвобождаемая при гидролизе ATP, выше изменения стандартной свободной энергии $\Delta G'^\circ$.

В дальнейшем для гидролиза ATP мы будем приводить величину $\Delta G'^\circ$, так как это позволит сравнивать энергетику разных реакций в клетке. Но не забывайте, что в живой клетке ΔG гидролиза ATP, а также многих других реакций может очень сильно отличаться от $\Delta G'^\circ$.

Здесь следует сделать одно важное замечание, касающееся содержания ATP в клетках. Мы показали (и еще обсудим далее), какие химические свойства ATP делают эту молекулу удобным энергетическим ресурсом клетки. Однако ATP управляет реакциями метаболизма и другими энергозатратными процессами не только благодаря своим химическим свойствам. Более важную роль сыграло то, что в ходе эволюции выработались такие регуляторные механизмы, которые *поддерживают внутриклеточную концентрацию ATP на значительно более высоком уровне, чем равновесные концентрации* в реакциях гидролиза. При снижении концентрации ATP уменьшается не только *количество* топлива, но само топливо *теряет свою мощность*: снижается ΔG гидролиза этой молекулы (т. е. потенциал фосфорилирования, ΔG_p). Как мы увидим при обсуждении метаболических процессов, протекающих с образованием и расходованием ATP, живые клетки выработали тонкие механизмы (которые, как может показаться на первый взгляд, снижают эффективность процессов и противоречат здравому смыслу) для поддержания высокой концентрации ATP.

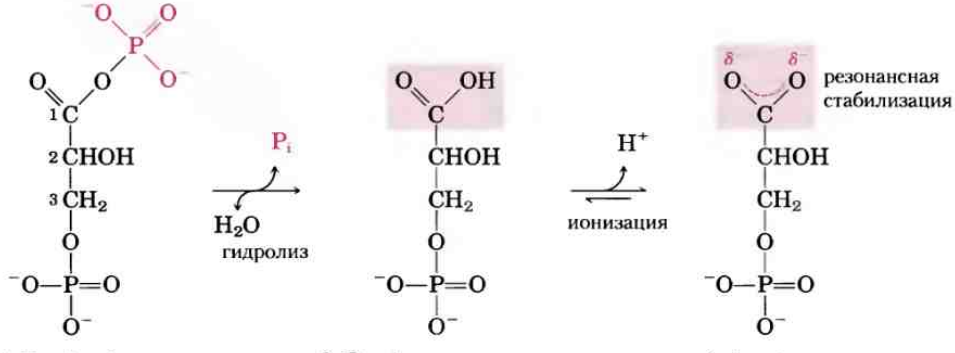
Свободная энергия других фосфорилированных соединений и тиоэфиров тоже велика

Фосфоенолпируват (ФЕП; **рис. 13-13**) содержит фосфоэфирную связь, которая подвергается гидролизу с образованием енольной формы пирувата, и этот прямой продукт реакции может сразу же в результате таутомеризации переходить в более устойчивую кетоформу. Благодаря тому, что исходный ФЕП имеет только одну форму (енольную), а продукт (пируват) может существовать в двух формах (енольной и кетоформе), продукт реакции более стабилен по сравнению с исходным веществом. Это в основном и определяет большую величину стандартной свободной энергии гидролиза фосфоенолпирувата: $\Delta G'^{\circ} = -61{,}9$ кДж/моль.

Другое трехуглеродное соединение 1,3-бисфосфоглицерат **(рис. 13-14)** содержит ангидридную связь между карбоксильной группой

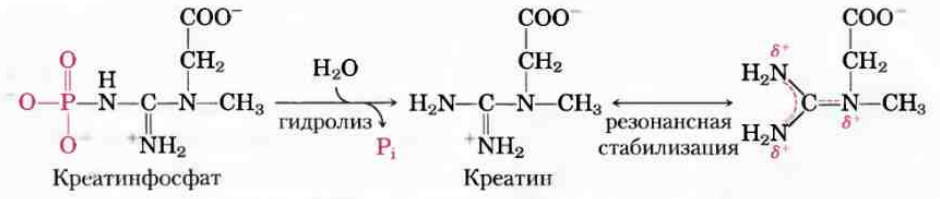
$$\text{ФЕП}^{3-} + H_2O \longrightarrow \text{пируват}^{-} + P_i^{2-}$$
$$\Delta G'^{\circ} = -61{,}9 \text{ кДж/моль}$$

Рис. 13-13. Гидролиз фосфоенолпирувата (ФЕП). Реакция катализируется пируваткиназой и сопровождается последующей таутомеризацией пирувата. Таутомеризация ФЕП невозможна, и поэтому продукты гидролиза более стабильны, чем исходные вещества. Как показано на рис. 13-11, происходит также резонансная стабилизация неорганического фосфата P_i.



$$\text{1,3-Бисфосфоглицерат}^{4-} + H_2O \longrightarrow \text{3-фосфоглицерат}^{3-} + P_i^{2-} + H^+$$
$$\Delta G'^{\circ} = -49{,}3 \text{ кДж/моль}$$

Рис. 13-14. Гидролиз 1,3-бисфосфоглицерата. Прямым продуктом гидролиза является 3-фосфоглицериновая кислота, содержащая неионизированную карбоксильную группу, которая, однако, тут же диссоциирует. Благодаря ионизации и образованию резонансных структур продукт реакции более стабилен по сравнению с исходными веществами. Кроме того, отрицательному изменению свободной энергии способствует резонансная стабилизация P_i.



Креатинфосфат$^{2-}$ + H_2O ⟶ креатин + P_i^{2-}
$\Delta G'^{\circ} = -43{,}0$ кДж/моль

Рис. 13-15. Гидролиз креатинфосфата. Разрыв связи P–N в креатинфосфате приводит к образованию креатина, который стабилизируется образованием гибридной резонансной структуры. Другой продукт реакции P_i также резонансно стабилизирован.

при С-1 и фосфатным остатком. Гидролиз этого ацилфосфата сопровождается значительным отрицательным изменением стандартной свободной энергии ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3$ кДж/моль), что можно объяснить, исходя из структурных особенностей исходного вещества и продуктов реакции. Когда вода присоединяется по ангидридной связи 1,3-бисфосфоглицерата, один из прямых продуктов реакции 3-фосфоглицериновая кислота может быстро терять протон, образуя 3-фосфоглицерат (карбоксилат-ион), имеющий две одинаково возможные резонансные формы (рис. 13-14). Протеканию реакции в прямом направлении благоприятствует удаление прямого продукта реакции (3-фосфоглицериновой кислоты) и образование резонансно стабилизированного иона.

В креатинфосфате (**рис. 13-15**) связь P—N может подвергаться гидролизу с образованием свободного креатина и P_i. Выделение P_i и резонансная стабилизация креатина способствуют протеканию реакции в прямом направлении. Изменение стандартной свободной энергии гидролиза креатинфосфата снова оказывается большим (–43,0 кДж/моль).

Во всех этих реакциях, где происходит выделение фосфата, образование нескольких резонансных форм P_i приводит к повышению устойчивости продукта реакции по сравнению с исходным веществом, что также является важной причиной большой отрицательной величины изменения свободной энергии. В табл. 13-6 приведена стандартная свободная энергия гидролиза нескольких фосфорилированных соединений.

Таблица 13-6 **Стандартные свободные энергии гидролиза некоторых фосфорилированных соединений и ацетил-CoA (тиоэфир)**

	$\Delta G'^{\circ}$	
	кДж/моль	ккал/моль
Фосфоенолпируват	–61,9	–14,8
1,3-Бисфосфоглицерат (→ 3-фосфоглицерат + P_i)	–49,3	–11,8
Креатинфосфат	–43,0	–10,3
ADP (→ AMP + P_i)	–32,8	–7,8
ATP (→ ADP + P_i)	–30,5	–7,3
ATP (→ AMP + PP_i)	–45,6	–10,9
AMP (→ аденозин + P_i)	–14,2	–3,4
PP_i (→ 2 P_i)	–19.2	–4.0
Глюкозо-1-фосфат	–20,9	–5,0
Фруктозо-6-фосфат	–15,9	–3,8
Глюкозо-6-фосфат	–13,8	–3,3
Глицерин-1-фосфат	–9,2	–2,2
Ацетил-CoA	–31,4	–7,5

Источник. Данные взяты в основном из Jencks, W. P. (1976) in *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman, G. D., ed.), *Physical and Chemical Data*, Vol. 1, pp. 296–304, CRC Press, Boca Raton, FL. Для гидролиза пирофосфата — из Frey, P. & Arabshahi, A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11 307–11 310.

Тиоэфиры, в молекулах которых в эфирной связи вместо обычного кислорода содержится сера, также характеризуются большой отрицательной стандартной свободной энергией ги-

$$\text{Ацетил-CoA} + H_2O \longrightarrow \text{ацетат}^- + \text{CoA} + H^+$$
$$\Delta G'^\circ = -31{,}4 \text{ кДж/моль}$$

Рис. 13-16. Гидролиз ацетилкофермента А. Гидролиз тиоэфира ацетил-CoA характеризуется большой отрицательной стандартной свободной энергией. В тиоэфирах сера занимает место кислорода в сложноэфирной связи. Полная структурная формула кофермента А (CoA или CoASH) приведена на рис. 8-41, т. 1.

дролиза. Ацетилкофермент А, или ацетил-CoA **(рис. 13-16)**, — один из тиоэфиров, играющих важную роль в метаболизме. Ацильная группа этих соединений активируется в реакциях переацилирования, конденсации или окислительно-восстановительных реакциях. Тиоэфиры гораздо меньше подвержены резонансной стабилизации, чем кислородные эфиры. Поэтому разность свободных энергий исходных веществ и продуктов гидролиза, которые резонансно стабилизируются, в случае тиоэфиров еще больше, чем в случае аналогичных кислородных эфиров **(рис. 13-17)**. В обоих случаях гидролиз эфира приводит к образованию карбоновой кислоты, которая может ионизироваться и давать несколько резонансных форм. Вместе оба этих фактора обусловливают большую отрицательную величину $\Delta G'^\circ$ (−31,4 кДж/моль) гидролиза ацетил-CoA.

Подводя итог, отметим, что в реакциях гидролиза, которые характеризуются большими отрицательными величинами изменений стандартной свободной энергии, продукты реакций стабильнее, чем исходные вещества. Это обусловлено одной или несколькими следующими причинами: (1) в реагентах вследствие электростатического отталкивания при разделении зарядов

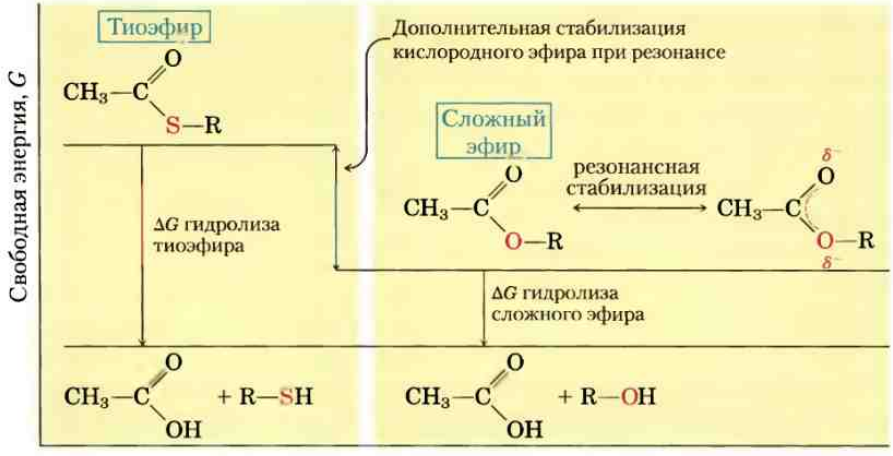


Рис. 13-17. Свободная энергия гидролиза сложных эфиров и тиоэфиров. *Продукты* реакций гидролиза этих эфиров характеризуются приблизительно одинаковой свободной энергией (*G*), однако свободная энергия тиоэфира выше, чем у «кислородного» эфира. Частичное перекрывание орбиталей атомов O и C обеспечивает резонансную стабилизацию кислородных эфиров; орбитали атомов S и C перекрываются плохо, что приводит к незначительной резонансной стабилизации тиоэфиров.

напряжение связи ослабевает, как в случае с АТР; (2) продукты реакции стабилизируются путем ионизации, как АТР, ацилфосфаты и тиоэфиры; (3) продукты реакции стабилизируются при изомеризации (таутомеризации), как фосфоенолпируват; и/или (4) продукты реакции стабилизируются благодаря существованию резонансных форм, как в случае креатина, высвобождаемого из фосфокреатина, карбоксилат-иона (из ацилфосфатов и тиоэфиров) и фосфата P_i (из ангидридных и эфирных соединений).

АТР поставляет энергию благодаря переносу групп, а не просто гидролиза

На протяжении всей книги будут встречаться реакции или процессы, где используется энергия АТР, и участие АТР в этих реакциях обычно обозначается, как на **рис. 13-18, *а***, изогнутой стрелкой, показывающей превращение АТР в ADP и P_i (или в некоторых случаях АТР в AMP и пирофосфат PP_i). При таком обозначении реакции кажутся простым гидролизом, при котором вода вытесняет P_i (или PP_i), и хочется сказать, что АТР-зависимые реакции «протекают за счет гидролиза АТР». На самом деле, *это не так*. Гидролиз АТР обычно не приводит ни к чему иному, кроме выделения тепла, что не может управлять химическим процессом в изотермической системе. Одна-единственная стрелка в схеме реакции на рис. 13-18, *а* и в других схемах почти всегда обозначает двухстадийный процесс (рис. 13-18, *б*), в котором часть молекулы АТР, а именно фосфорильная или пирофосфорильная группа или аденилатный фрагмент (AMP) из АТР, вначале переносится на молекулу субстрата или на аминокислотный остаток в составе фермента, ковалентно с ним связываясь и увеличивая его свободную энергию. Затем на второй стадии фосфатсодержащий фрагмент, образованный на первой стадии, замещается с образованием P_i, PP_i или AMP. Таким образом, АТР *ковалентно* участвует в ферментативной реакции, превнося свободную энергию.

Однако в некоторых процессах действительно происходит прямой гидролиз АТР (или GTP). Например, нековалентное связывание АТР (или GTP) с последующим гидролизом до ADP (или GDP) и P_i может обеспечивать энергией цикл

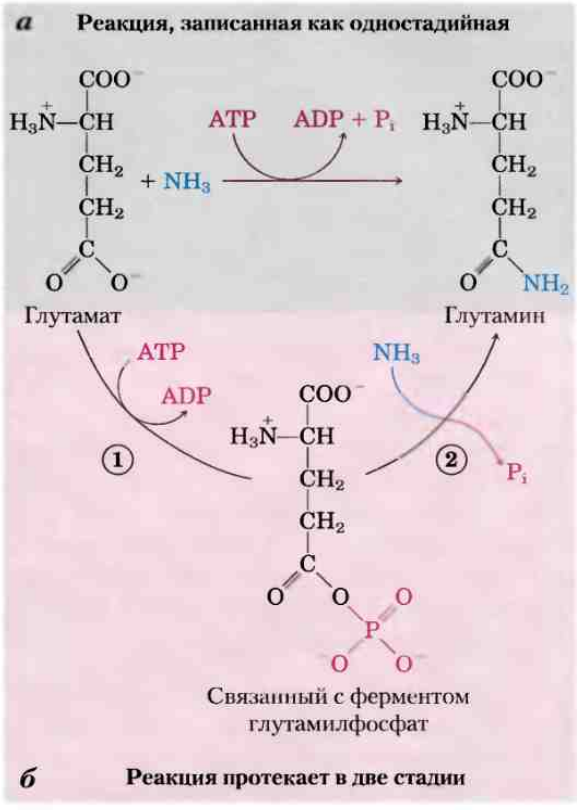


Рис. 13-18. Две стадии гидролиза АТР. *а* — участие АТР в реакции часто изображается как одна стадия, однако этот процесс почти всегда двухстадийный. *б* — реакция, катализируемая АТР-зависимой глутаминсинтетазой. ① Фосфорильная группа от АТР переносится к глутамату, затем ② фосфорильная группа замещается на NH_3 и высвобождается в виде P_i.

конформационных изменений некоторых белков, осуществляющих механическое движение. Это происходит при мышечном сокращении и при перемещении ферментов вдоль ДНК или смещении матричной РНК относительно рибосомы. Прямой гидролиз фосфоангидридных связей снабжает энергией также реакции, которые катализируются хеликазами, RecA-белками и некоторыми топоизомеразами (гл. 25). Действующие в сигнальных путях GTP-связывающие белки непосредственно гидролизуют GTP, что приводит к конформационным изменениям, блокируя сигналы, запускаемые гормонами или другими внеклеточными агентами (гл. 12).

На основании величины стандартной свободной энергии гидролиза фосфатные соединения, обнаруженные в живых организмах, условно можно разделить на две группы (**рис. 13-19**). У «высокоэнергетических» соединений $\Delta G'^{\circ}$ гидролиза меньше –25 кДж/моль; у «низкоэнергетических» $\Delta G'^{\circ}$ выше. По этому критерию АТР ($\Delta G'^{\circ}$ гидролиза –30,5 кДж/моль = –7,3 ккал/моль) — высокоэнергетическое соединение; глюкозо-6-фосфат ($\Delta G'^{\circ}$ –13,8 кДж/моль = –3,3 ккал/моль) — низкоэнергетическое соединение.

Выражение «высокоэнергетическая фосфатная связь» давно используется биохимиками при описании связи P—O, разрыв которой происходит в реакциях гидролиза; но это не совсем корректно — можно неправильно понять, что энергия заключена в самой связи. В действительности, разрыв любой химической связи требует *затраты* энергии. Свободная энергия, высвобождаемая при гидролизе фосфатных соединений, обязана своим происхождением не разрыву специфической связи, а тому, что продукты реакции обладают более низкой свободной энергией, чем реагенты. Для простоты мы иногда будем пользоваться выражением «высокоэнергетическое фосфатное соединение» применительно к АТР или другим фосфатным соединениям с большой отрицательной стандартной свободной энергией гидролиза.

Из аддитивности изменений свободной энергии последовательных реакций следует, что любое фосфорилированное соединение может быть образовано при сопряжении реакции синтеза с распадом другого фосфорилированного соединения с более низкой отрицательной свободной энергией гидролиза. Например, благодаря тому, что при отщеплении P_i от фосфоенолпирувата (ФЕП) освобождается больше энергии, чем не-

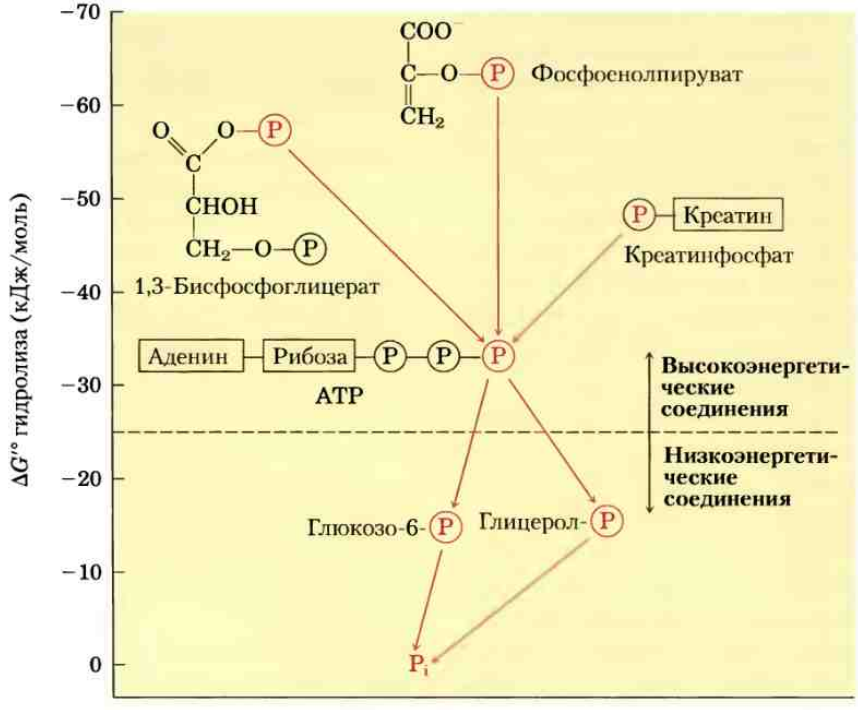


Рис. 13-19. Оценка биологических фосфатных соединений на основании величин стандартной свободной энергии гидролиза. Показан перенос фосфорильных групп, обозначенных Ⓟ, от высокоэнергетических фосфорильных доноров через АТР к молекулам акцепторов (например, глюкозе и глицерину) с образованием их низкоэнергетических фосфатных производных. Во внутриклеточных условиях такой перенос фосфорильных групп, катализируемый ферментами киназами, происходит с потерей свободной энергии на каждой стадии. При гидролизе низкоэнергетических фосфатных соединений высвобождается P_i, который обладает еще более низким потенциалом передачи фосфорильной группы (см. текст).

обходимо для проведения конденсации P_i с ADP, термодинамически возможен прямой перенос фосфорильной группы от ФЕП на ADP:

		$\Delta G'^{\circ}$, (кДж/моль)
(1)	ФЕП + H_2O → пируват + P_i	−61,9
(2)	ADP + P_i → ATP + H_2O	+30,5
Итого:	ФЕП + ADP → пируват + ATP	−31,4

Обратите внимание, что хотя итоговая реакция и представлена в виде алгебраической суммы первых двух реакций, она по сути является третьей отдельной реакцией, которая не включает P_i; ФЕП передает *фосфорильную* группу *непосредственно* ADP. На основании величин стандартной свободной энергии гидролиза мы можем описать фосфорилированные соединения как соединения, имеющие высокий или низкий потенциал переноса фосфорильной группы (табл. 13-6). Потенциал переноса фосфорильной группы фосфоенолпирувата очень высокий, АТР — высокий, а глюкозо-6-фосфата — низкий (рис. 13-19).

Многие процессы катаболизма направлены на синтез высокоэнергетических фосфатных соединений, но их образование не является конечной целью как таковой. Эти соединения — лишь средство активирования множества разнообразных веществ с целью их дальнейших химических превращений. Перенос фосфорильной группы эффективно привносит свободную энергию, которая используется в последующих метаболических превращениях. Выше мы описывали, как происходит синтез глюкозо-6-фосфата с переносом фосфорильной группы от АТР. В следующей главе будет показано, как фосфорилирование глюкозы активирует глюкозу, т. е. система «заправляется» таким образом «горячим» для катаболических реакций, которые происходят в любой живой клетке. Благодаря своему промежуточному положению на шкале потенциала переноса групп АТР может передавать энергию от высокоэнергетических фосфатных соединений, которые образуются в процессах катаболизма, к таким соединениям, как глюкоза, превращая их в более реакционноспособные формы. Таким образом, АТР служит универсальным переносчиком энергии во всех живых клетках.

У АТР есть еще одна особенность, которая очень важна для его роли в метаболизме: хотя в водных растворах АТР термодинамически нестабилен и поэтому является хорошим донором фосфорильной группы, *кинетически* он стабилен. Из-за очень больших значений энергии активации (от 200 до 400 кДж/моль), необходимой для неферментативного расщепления фосфоангидридных связей, АТР не может спонтанно отдавать фосфорильные группы воде или сотням других потенциальных акцепторов, находящихся в клетке. Перенос фосфорильных групп от АТР происходит только при наличии специфических ферментов, понижающих энергию активации. Поэтому клетка способна управлять распределением энергии, переносимой молекулами АТР, путем регуляции ферментов, которые на них воздействуют.

АТР отдает фосфорильную, пирофосфорильную и аденильную группы

Реакции, в которых принимает участие АТР, — это, как правило, реакции нуклеофильного замещения S_N2 (см. разд. 13-2), в которых в качестве нуклеофилов могут выступать, например, кислород спирта или карбоксилата либо азот креатина боковой цепи аргинина или гистидина. Каждый из трех атомов фосфора АТР подвержен нуклеофильной атаке (**рис. 13-20**), в результате чего образуются разные продукты реакции.

Нуклеофильная атака спиртом γ-фосфата (рис. 13-20, *а*) вытесняет ADP и приводит к образованию нового фосфоэфира. Опыты с реагентами, меченными ^{18}O, продемонстрировали, что в новом соединении кислород эфирной связи происходит от спирта, а не от АТР, и, следовательно, от АТР переносится фосфорильная группа ($-PO_3^{2-}$), а не фосфатная ($-OPO_3^{2-}$). При переносе фосфорильной группы от АТР к глутамату (рис. 13-18) или к глюкозе (т. 1, с. 308) происходит атака в γ-положение молекулы АТР.

При атаке на β-фосфат в АТР происходит вытеснение AMP и перенос пирофосфорильной (не пирофосфатной) группы к атакующему нуклеофилу (рис. 13-20, *б*). Например, образование 5′-фосфорибозил-1-пирофосфата (с. 861), ключевого промежуточного продукта в синтезе нуклеотидов, происходит при атаке группой −OH рибозы β-фосфата.

При нуклеофильной атаке в α-положение молекулы АТР происходит вытеснение PP_i и

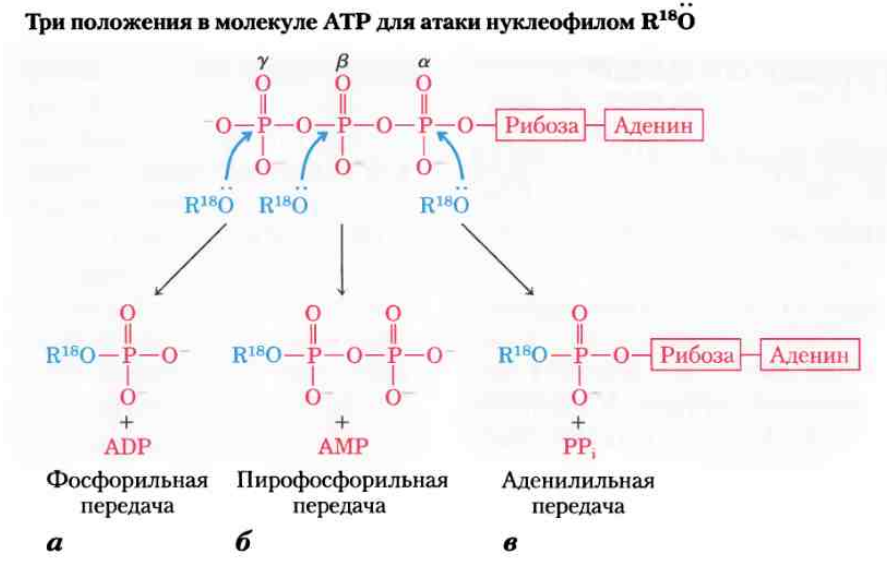


Рис. 13-20. Реакции нуклеофильного замещения ATP. Любой из трех атомов фосфора (α, β или γ) может служить электрофильной мишенью для нуклеофильной атаки — в данном случае меченым нуклеофилом R–^{18}O:. В качестве нуклеофилов могут выступать спирт (ROH), карбоксильная группа ($RCOO^-$) или фосфоангидрид (например, нуклеозидмонофосфат или нуклеозиддифосфат). *а* — когда кислород нуклеофила атакует γ-положение, тогда в эфирной связи продукта реакции оказывается меченый кислород. Это свидетельствует о том, что с ATP переносится именно фосфорильная ($-PO_3^{2-}$), а не фосфатная группа ($-OPO_3^{2-}$). *б* — атака на β-положение вытесняет AMP и ведет к переносу пирофосфорильной (не пирофосфатной) группы на нуклеофил. *в* — при атаке в α-положение замещается PP_i и нуклеофилу передается аденилильная группа.

перенос аденилата (5′-AMP) в виде аденилильной группы (рис. 13-20, *в*). Такая реакция называется реакцией **аденилилирования** (вероятно, самое неуклюжее слово в биохимическом языке). Обратите внимание, что при гидролизе α–β-фосфоангидридной связи освобождается значительно больше энергии (~ 46 кДж/моль), чем при гидролизе β–γ-связи (~ 31 кДж/моль) (табл. 13-6). Более того, побочный продукт аденилилирования неорганический пирофосфат PP_i затем гидролизуется при участии повсеместно распространенного фермента **неорганической пирофосфатазы** с образованием двух молекул неорганического ортофосфата P_i. При этом выделяется 19 кДж/моль энергии, что обеспечивает дальнейший энергетический «толчок» для реакции аденилилирования. В результате суммарной реакции разрываются обе фосфоангидридные связи ATP. Поэтому реакции аденилилирования термодинамически очень выгодны. В том случае, когда энергия ATP используется для проведения особенно невыгодных метаболических реакций, аденилилирование часто используется в качестве механизма сопряжения энергии. Хорошим примером такого способа сопряжения энергии может служить активация жирных кислот.

Первая стадия активации жирной кислоты, необходимой для окисления с выделением энергии или для синтеза более сложных липидов, — это образование тиолового эфира (см. рис. 17-5). Прямая конденсация жирной кислоты с коферментом А — эндергоническая реакция, однако при постадийном удалении двух фосфорильных групп от ATP образование CoA-производного жирной кислоты — экзергонический процесс. Сначала аденилат (AMP) переносится от ATP к карбоксильной группе жирной кислоты с образованием смешанного ангидрида (аденилатного производного жирной кислоты)

Дополнение 13–1 АТР поставляет энергию для светляков

Для биолюминесценции требуются значительные количества энергии. Светляки используют АТР в ряде реакций, преобразующих химическую энергию в световую. В 1950-х гг. Уильям МакЭлрой с коллегами из Университета Джона Хопкинса выделил из нескольких тысяч светляков, собранных детьми в Балтиморе и его окрестностях, главных участников этих энергетических процессов: карбоновую кислоту люциферин и фермент люциферазу. Для генерации вспышки света требуется активация люциферина, при которой происходит пирофосфатное расщепление АТР и образование люцифериладенилата (рис. 1). В присутствии молекулярного кислорода и люциферазы люциферин подвергается многостадийному окислительному декарбоксилированию до (гидр)оксилюциферина, что сопровождается излучением света. Цвет световых вспышек различается в зависимости от вида светляков и, по-видимому, обусловлен различиями в структуре люциферазы. Люциферин регенерируется из гидроксилюциферина в серии последующих реакций.

В лаборатории очищенные люциферин и люцифераза светляков используются для измерения очень малых количеств АТР по интенсивности генерируемой световой вспышки; можно измерить количества АТР порядка нескольких пикомолей (10^{-12} моль). В углубленных исследованиях люциферазы было проведено клонирование соответствующего гена в растениях табака. Когда такие растения поливали раствором, содержащим люциферин, они светились в темноте (см. рис. 9-29).

Светляк, насекомое из сем. Lampyridae.

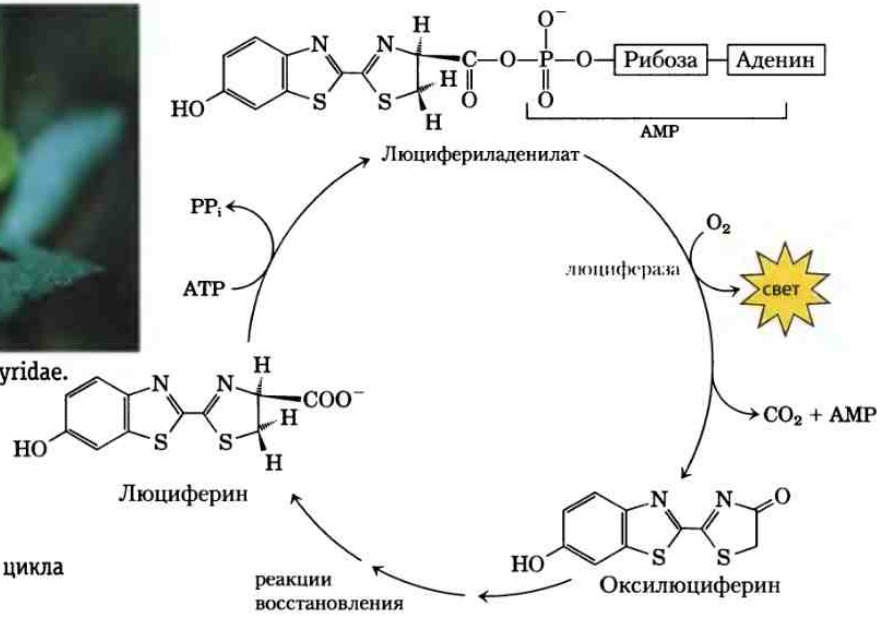


Рис. 1. Важнейшие составляющие цикла биолюминисценции у светляка

и высвобождением PP_i. Затем тиоловая группа кофермента А замещает аденилатную группу и образует тиоэфир с жирной кислотой. Сумма этих двух реакций энергетически эквивалентна экзергоническому гидролизу АТР до AMP и PP_i ($\Delta G'^\circ$ = −45,6 кДж/моль) и эндергоническому образованию CoA-производного жирной кислоты ($\Delta G'^\circ$ = 31,4 кДж/моль). Образование CoA-производного жирной кислоты становится энергетически выгодным благодаря гидролизу PP_i неорганической пирофосфатазой. Таким образом, при активации жирной кислоты разрываются обе фосфоангидридные связи АТР. В итоге, $\Delta G'^\circ$ — это сумма $\Delta G'^\circ$ разрыва этих связей, т. е. −45,6 кДж/моль + (−19,2) кДж/моль:

$$ATP + 2H_2O \rightarrow AMP + 2P_i$$
$$\Delta G'^\circ = -64{,}8 \text{ кДж/моль}$$

Активация аминокислот перед их полимеризацией в белки (см. рис. 27-19) осуществляется аналогичным набором реакций, в которых кофермент А заменяет молекула транспортной РНК. Интересное использование расщепления АТР до AMP и PP_i происходит у светляков, которые используют АТР в качестве источника энергии для генерации световых вспышек (доп. 13-1).

Для сборки информационных макромолекул необходима энергия

При сборке макромолекул ДНК, РНК, белков (т. е. биополимеров) из простых молекул-предшественников, о чем подробно говорится в третьем томе, необходима энергия как для конденсации мономерных единиц, так и для создания *упорядоченных* последовательностей. Предшественниками ДНК и РНК в биосинтезе служат нуклеозидтрифосфаты; при этом реакция полимеризации сопровождается расщеплением фосфоангидридной связи между α- и β-фосфатами и высвобождением PP_i (рис. 13-21). В этих реакциях при синтезе РНК остатками, переносимыми на растущий биополимер, являются аденилат (AMP), гуанилат (GMP), цитидилат (CMP) или уридилат (UMP), а при синтезе ДНК их дезокси-аналоги (с TMP вместо UMP). Как отмечалось выше, при активации аминокислот, необходимой для синтеза белка, происходит перенос аденилатных групп от ATP; кроме того, как мы увидим в гл. 27, эти несколько стадий белкового синтеза сопровождаются еще и гидролизом GTP. Во всех перечисленных случаях экзергонический распад нуклеозидтрифосфата сопряжен с эндергоническим синтезом биополимера с определенной последовательностью.

ATP обеспечивает энергию для активного транспорта и для сокращения мышц

ATP может поставлять энергию для переноса иона (или молекулы) через мембрану в другой водный компартмент, где его (ее) соответствующая концентрация выше (см. рис. 11-38). Процессы, связанные с транспортом веществ, являются главными потребителями энергии. Например, в почках и мозге человека две трети энергии, потребляемой в состоянии покоя, идет на перекачивание Na^+ и K^+ через плазматические мембраны с помощью Na^+/K^+-ATPазы. Транспорт Na^+ и K^+ сопровождается циклическим фосфорилированием–дефосфорилированием транспортного белка, а в качестве донора фосфорильной группы участвует ATP (см. рис. 11-37). Na^+-зависимое фосфорилирование Na^+/K^+-ATPазы вызывает изменение конформации белка, а K^+-зависимое дефосфорилирование возвращает его в первоначальное состояние. Каждый цикл процесса транспорта сопровождается расщеплением ATP до ADP и P_i, при этом изменение свободной энергии гидролиза ATP приводит к циклическим изменениям конформации белка, в результате чего происходит электрогенное перекачивание ионов Na^+ и K^+. Заметим, что в этом случае фосфорильная группа от ATP переносится на молекулу фермента, а не субстрата.

В клетках сократительной системы скелетных мышц миозин и актин специализируются на преобразовании химической энергии ATP в механическую (движение) (см. рис. 5-31). ATP прочно связывается (но не ковалентными связями) с одной из конформаций миозина, удерживая белок в этом состоянии. Когда миозин катализирует гидролиз связанного с ним ATP, от белка отщепляются ADP и P_i, и это вновь приводит к изменению конформации белковой молекулы, в которой она и находится до присоединения другой молекулы ATP. Связывание и последующий гидролиз ATP (посредством миозин-ATPазы) поставляет энергию, которая вызывает циклические изменения конформации головки миозина. Изменение конформации многих отдельных молекул миозина приводит к скольжению миозиновых фибрилл вдоль актиновых филаментов (см. рис. 5-30), что и обеспечивает макроскопическое сокращение мышечного волокна.

Как мы уже отмечали ранее, при расходовании ATP осуществление механического движения — это один из немногих случаев, при которых источником химической энергии в сопряженном процессе скорее является сама реакция гидролиза ATP, а не перенос групп от ATP.

Во всех типах клеток происходит трансфосфорилирование между нуклеотидами

Хотя мы сосредоточили свое внимание на ATP как основном переносчике энергии в клетке и доноре фосфатных групп, все другие нуклеозидтрифосфаты (GTP, UTP, CTP) и все дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dUTP, dCTP) энергетически эквивалентны ATP. Изменение свободной энергии при гидролизе фосфоангидридных связей этих соединений почти совпадает с величинами для ATP, приведенными в табл. 13-6. Для выполнения различных биологических функций эти нуклеотиды создаются и сохраняются в виде нуклеозидтрифосфатных форм (NTP) путем переноса фосфорильной группы на соответствующие нуклеозиддифосфаты (NDP) и монофосфаты (NMP).

АТР — важное высокоэнергетическое фосфатное соединение, которое образуется в процессах катаболизма, таких как гликолиз, окислительное фосфорилирование, а в фотосинтетических клетках — фотофосфорилирование. Затем с помощью некоторых ферментов осуществляется перенос фосфорильных групп от АТР к другим нуклеотидам. **Нуклеозиддифосфаткиназы**, обнаруженные во всех клетках, катализируют следующую реакцию:

$$\text{ATP} + \text{NDP (или dNDP)} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ADP} + \text{NTP (или dNTP)} \qquad \Delta G^{\circ} \approx 0$$

Хотя эта реакция обратима, относительно высокое значение отношения [ATP]/[ADP] в клетках в норме способствует протеканию реакции слева направо с образованием NTP и dNTP. На самом деле фермент катализирует двухстадийный процесс передачи фосфорильной группы — классический механизм двойного замещения (механизм «пинг-понг»; **рис. 13-21**, см. также рис. 6-13, *б*). Сначала, происходит перенос фосфорильной группы от АТР к активному участку гистидинового остатка фермента с образованием промежуточного фосфорилированного фермента; затем фосфорильная группа от этого соединения переносится на акцептор NDP. Поскольку фермент неспецифичен к основанию в NDP и одинаково хорошо работает и с dNDP, и с NDP, в присутствии АТР он способен синтезировать все NTP и dNTP из соответствующих NDP.

Переносы фосфорильных групп от АТР приводят к накоплению ADP. Например, при энергичном мышечном сокращении происходит накопление ADP, что препятствует АТР-зависимому сокращению. В периоды острой потребности АТР в клетках понижается концентрация ADP и в то же время под действием **аденилаткиназы** накапливается АТР.

$$2\,\text{ADP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{ATP} + \text{AMP} \qquad \Delta G^{\circ} \approx 0$$

Эта реакция обратима, поэтому после того как острая необходимость в АТР пропадает, фермент может снова превращать AMP в ADP, а последний затем может фосфорилироваться в митохондриях до АТР. Аналогичный фермент гуанилаткиназа превращает GMP в GDP за счет расходования АТР. Подобным образом энергия, запасенная в процессе катаболического образования АТР, используется для обеспечения клетки необходимым количеством NTP и dNTP.

Готовым источником фосфорильных групп для быстрого синтеза АТР из ADP служит креатинфосфат (рис. 13-15). Концентрация креатинфосфата (PCr) в скелетных мышцах составляет приблизительно 30 мМ, что почти в 10 раз превышает концентрацию АТР. В других тканях, таких как гладкая мускулатура, мозг и почки, концентрация PCr составляет от 5 до 10 мМ. Обратимая реакция переноса фосфорильной группы от креатинфосфата к ADP катализируется **креатинкиназой**

$$\text{ADP} + \text{PCr} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{TP} + \text{Cr} \quad \Delta G^{\circ} = -12{,}5\ \text{кДж/моль}$$

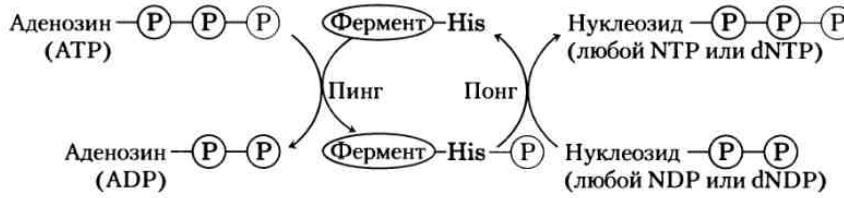
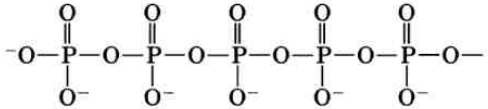


Рис. 13-21. «Пинг-понг»-механизм работы нуклеозиддифосфаткиназы. Сначала фермент связывается с субстратом (АТР в нашем примере) и фосфорильная группа от АТР переносится на боковую цепь остатка гистидина. Происходит высвобождение ADP и его место занимает другой нуклеозиддифосфат (или дезоксинуклеозиддифосфат), который превращается в соответствующий трифосфат в результате переноса фосфорильной группы от фосфогистидинового остатка.

Креатинфосфат служит резервуаром фосфорильных групп в тех случаях, когда из-за неожиданной потребности в энергии истощаются запасы ATP; при этом восстановление ATP происходит значительно быстрее, чем при катаболическом синтезе. Когда же потребность в энергии ослабевает, образуемые в процессах катаболизма молекулы ATP используются для пополнения запасов PCr в обратной креатинкиназной реакции. У низших в филогенетическом отношении организмов в качестве резервуаров фосфорильных групп служат другие PCr-подобные молекулы, которые носят общее название **фосфагенов**.

Неорганические полифосфаты — потенциальные доноры фосфорильных групп

Неорганические полифосфаты polyP (или $(polyP)_n$, где n — число ортофосфатных групп) представляют собой линейные полимеры, состоящие из многих десятков или сотен остатков P_i, связанных друг с другом фосфоангидридными связями. Эти вещества, присутствующие во всех организмах, в некоторых клетках могут накапливаться в больших количествах. Например, у дрожжей концентрация polyP, аккумулирующихся в вакуоли, при равномерном распределении по всей клетке составила бы 20 мМ. (Ср. с концентрациями других доноров фосфорильных групп, см. табл. 13-5.)



Неорганический полифосфат (polyP)

Потенциальная роль polyP заключается в том, что он может служить в качестве фосфагена, т. е. резервуара фосфорильных групп для производства молекул ATP, так же, как креатинфосфат используется в мышцах. PolyP обладает примерно таким же потенциалом (энергией) переноса фосфорильной группы, как и PP_i. Самый короткий полифосфат PP_i ($n = 2$) служит в качестве источника энергии для активного транспорта в вакуолях растений. У растений пирофосфат PP_i служит донором фосфатной группы, по крайней мере для одного фермента — фосфофруктокиназы, т. е. он играет ту же роль, что ATP у животных и микроорганизмов (с. 73). Обнаружение высоких концентраций polyP в вулканических конденсатах и выбросах пара наводит на мысль, что он мог служить источником энергии в добиологической и ранней клеточной эволюции.

У бактерий фермент **полифосфаткиназа-1** (PPK-1) катализирует обратимую реакцию

$$ATP + polyP_n \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} ADP + polyP_{n+1}$$

$$\Delta G'^{\circ} = -20 \text{ кДж/моль}$$

по механизму, в котором в качестве промежуточного продукта принимает участие связанный с ферментом фосфогистидин (вспомните механизм действия нуклеозиддифосфаткиназы, описанный выше). Другой фермент **полифосфаткиназа-2** (PPK-2) катализирует обратимый синтез GTP (или ATP) из полифосфата и GDP (или ADP)

$$GTP + polyP_{n+1} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} ADP + polyP_n$$

Полагают, что PPK-2 действует главным образом в направлении синтеза GTP и ATP, а PPK-1 — в направлении синтеза полифосфатов. Киназы PPK-1 и PPK-2 присутствуют в клетках различных бактерий, включая многие патогенные виды.

Как было показано, у бактерий повышенный уровень polyP стимулирует экспрессию ряда генов, отвечающих за адаптацию организма к условиям голодания и другим угрожающим жизни условиям. Например, у *Escherichia coli* polyP накапливаются, когда клеткам не хватает аминокислот или P_i, и этот запас способствует их выживанию в этих неблагоприятных условиях. Делеции генов полифосфаткиназ снижают способность некоторых патогенных бактерий к поражению тканей животных. Поэтому фермент может оказаться уязвимой мишенью при разработке новых противомикробных лекарственных препаратов.

У дрожжей нет гена, кодирующего PPK-подобный белок, однако есть четыре гена (не имеющие отношения к генам PPK у бактерий), которые необходимы для синтеза полифосфатов. По-видимому, механизм полифосфатного синтеза у эукариот совершенно иной, чем у прокариот.

Краткое содержание раздела 13.3 ПЕРЕНОС ФОСФОРИЛЬНЫХ ГРУПП И АТР

- Аденозинтрифосфат (ATP) связывает процессы катаболизма и анаболизма. Это химическое соединение — энергетическая «валюта» живой клетки. Экзергоническое превращение ATP в ADP и P_i или в AMP и PP_i сопряжено со многими эндергоническими реакциями.

- Гидролиз ATP служит источником энергии для конформационных изменений, приводящих к сокращению мышц. Однако обычно не гидролиз молекулы ATP, а перенос фосфорильной, пирофосфорильной или аденилильной группы от ATP к молекуле субстрата или фермента участвует в энергетическом сопряжении распада ATP и эндергонических превращений субстратов.

- Благодаря этим реакциям переноса групп ATP обеспечивает энергией анаболические реакции, включая синтез информационных молекул, а также транспорт молекул и ионов через мембраны против градиента концентраций и градиента электрического потенциала.

- Для поддержания способности к переносу фосфатных групп концентрация ATP должна быть намного выше равновесной концентрации, что достигается в реакциях катаболизма, сопровождающихся производством энергии.

- В клетках содержатся и другие метаболиты, имеющие большие по абсолютной величине отрицательные свободные энергии гидролиза, в их числе фосфоенолпируват, 1,3-бисфосфоглицерат и креатинфосфат. Эти высокоэнергетические соединения с высоким потенциалом переноса фосфорильной группы, подобные ATP, — хорошие доноры фосфорильных групп. Тиоэфиры также характеризуются высокими свободными энергиями гидролиза.

- Неорганические полифосфаты, присутствующие во всех клетках и имеющие высокий потенциал переноса групп, могут служить в качестве резервуара фосфорильных групп.

13.4. Окислительно-восстановительные реакции в биологических системах

Главное в метаболизме — перенос фосфорильных групп. Однако важен ведь и другой вид переноса — перенос электронов в окислительно-восстановительных реакциях. В этих реакциях происходит потеря электронов одной молекулой, которая при этом окисляется, и получение электронов другой молекулой, которая восстанавливается. За работу, которая совершается живыми организмами, прямо или косвенно отвечают потоки электронов в окислительно-восстановительных реакциях. У нефотосинтезирующих организмов источниками электронов служат восстановленные соединения (пища); у фотосинтезирующих организмов в роли первоначального донора электронов выступает молекула, способная переходить в возбужденное состояние при поглощении света. Пути переноса электронов при метаболизме сложные. В катализируемых ферментами реакциях электроны движутся от различных промежуточных продуктов метаболизма к специализированным переносчикам электронов. Переносчики в свою очередь отдают электроны акцепторам, имеющим более высокое сродство к электронам, и это приводит к выделению энергии. В клетках содержатся разнообразные молекулы — преобразователи энергии, которые превращают энергию электронного потока в полезную работу.

Мы начинаем наше обсуждение с того, как электродвижущая сила (эдс) может совершать работу, затем коснемся теоретических основ и экспериментальных принципов измерений энергии в окислительных реакциях в терминах эдс и обсудим соотношение между этой силой, выражаемой в вольтах, и изменением свободной энергии — в джоулях. В заключение мы опишем химические основы процессов окисления–восстановления, а также строение наиболее распространенных специализированных переносчиков электронов, которые неоднократно встречаются в следующих главах.

Поток электронов может выполнять биологическую работу

Всякий раз, когда мы используем электродвигатель, включаем электрический свет или электронагреватель или же в двигателе нашего автомоби-

ля проскакивает искра, воспламеняющая бензин, на самом деле это совершает работу поток электронов. Источником электронов в электрической цепи может быть батарейка (аккумулятор, электрохимический элемент) с двумя электродами, которые изготовлены из двух разных химических элементов. Электрические провода обеспечивают протекание потока электронов от химического элемента на одном полюсе батарейки через двигатель (внешнюю цепь) к другому химическому элементу на другом полюсе батарейки. Благодаря тому, что материал противоположно заряженных электродов имеет разное сродство к электрону, во внешней цепи самопроизвольно течет электрический ток (поток электроны) под действием силы, пропорциональной разности сродства к электронам материалов электродов, т. е. под действием **электродвижущей силы (эдс)**. Электродвижущая сила (как правило, в несколько вольтов) способна совершать работу, если в цепь включен преобразователь энергии, в данном случае электродвигатель. Для совершения полезной работы двигатель можно соединить с несколькими механизмами.

В живых клетках также есть внутренняя биологическая «электроцепь», в которой электроны поставляет такое соединение, как, например, глюкоза. При ферментативном окислении глюкозы освобожденные электроны спонтанно движутся через целый ряд промежуточных соединений — переносчиков эектронов (*интермедиатов*) к другому химическому соединению, например O_2. Такой транспорт электронов — экзергонический процесс, поскольку O_2 обладает более высоким сродством к электрону по сравнению с интермедиатами, переносящими электроны. Результирующая эдс снабжает энергией множество молекулярных преобразователей энергии (ферменты и другие белки), которые совершают биологическую работу. Например, в митохондриях связанные с мембраной ферменты сопрягают поток электронов с образованием трансмембранной разности pH, выполняющей осмотическую и электрическую работу. Созданный таким образом протонный градиент обладает потенциальной энергией, которая иногда называется протон-движущей силой по аналогии с электродвижущей силой. Другой фермент АТР-синтаза на внутренней мембране митохондрий использует протондвижущую силу для совершения химической работы: синтеза ATP из ADP и P_i (по мере самопроизвольного транспорта протонов через мембрану). Сходным образом у *E. coli* локализованные в мембране ферменты преобразуют эдс в протондвижущую силу, которая затем используется для движения жгутиков. Электрохимические принципы, которые регулируют изменение энергии в макроскопической цепи с электродвигателем и батарейкой (аккумулятором), с одинаковым успехом применимы и к молекулярным процессам, сопровождающимся электронными потоками в живых клетках.

Окислительно-восстановительные процессы можно представить в виде полуреакций

Хотя окисление и восстановление не происходят поодиночке (друг без друга), при описании переноса электронов удобно рассматривать окислительно-восстановительную реакцию как две полуреакции. Например, окисление иона железа Fe^{2+} ионом меди Cu^{2+}

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^{+}$$

можно записать в виде двух полуреакций, где Fe^{2+} — восстановитель, а Cu^{2+} — окислитель:

Окисление: $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + e^{-}$ (1)

Восстановление: $Cu^{2+} + e^{-} \rightleftharpoons Cu^{+}$ (2)

В окислительно-восстановительной реакции вещество, отдающее электроны (донор электронов), называется восстановителем; а акцептор электронов (принимает электроны) называется окислителем. В данном случае двухзарядные катионы железа Fe^{2+} и трехзарядные катионы Fe^{3+} образуют сопряженную окислительно-восстановительную пару (*редокс-пару*). Аналогично, кислота и соответствующее основание — тоже сопряженная пара, но это кислотно-основная пара. Напомним (см. гл. 2, т. 1), что кислотно-основные реакции в общем виде записывают следующим образом:

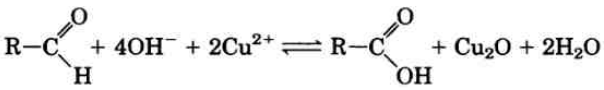
$$\text{донор протонов} \rightleftharpoons H^{+} + \text{акцептор протонов}$$

Для окислительно-восстановительных реакций можно написать похожее общее уравнение:

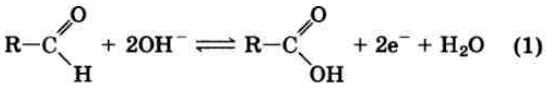
$$\text{донор электронов} \rightleftharpoons e^{-} + \text{акцептор электронов}$$

В полуреакции (1) Fe^{2+} — донор электронов, а Fe^{3+} — акцептором электронов. Ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} — **сопряженная редокс-пара**.

Переносы электронов в окислительно-восстановительных реакциях между органическими и неорганическими соединениями принципиально ничем не отличаются. В гл. 7 мы рассматривали окисление восстанавливающего сахара (альдегида или кетона) ионом меди Cu^{2+} (см. рис. 7-10):



Эту реакцию можно представить в виде двух полуреакций:



(1)

(2)

Поскольку от углерода альдегидной группы отщепляются два электрона, вторую полуреакцию (одноэлектронное восстановление двухвалентного иона меди до одновалентного) надо умножить на коэффициент 2, чтобы привести к балансу заряды в суммарной окислительно-восстановительной реакции.

Биологические процессы окисления часто включают и дегидрирование

В живых клетках углерод существует в нескольких состояниях окисления (**рис. 13-22**). Когда общая электронная пара находится между атомом углерода и другим, отличным от углерода атомом

Рис. 13-22. Состояния окисления углерода в биосфере. Обратите внимание на атомы углерода, которые отмечены красным, и их электроны связи. Если атом углерода связан с менее электроотрицательным атомом H, оба электрона связи (красные) смещены к углероду. Если углерод связан с другим углеродом, электронная пара находится ровно посередине между ними, хотя только один из двух электронов в этой паре поступил от «красного» углерода. Если «красный» углерод связан с более электроотрицательным атомом O, электроны связи смещены к кислороду. Цифры в правой колонке указывают число электронов, смещенных к «красному» углероду, что можно использовать при грубой оценке степени окисления углерода в соединении (функциональной группе): в данном ряду соединений степень окисления углерода увеличивается сверху вниз.

(обычно H, C, S, N или O), эта электронная пара оказывается смещенной к более электроотрицательному атому. Электроотрицательность увеличивается в ряду H < C < S < N < O. Например, в метане CH_4 углерод более электроотрицательный, чем любой из четырех связанных с ним атомов водорода, и поэтому в четырех связях C—H атом C «притягивает» поближе к себе все восемь электронов (рис. 13-22). В этане электроны, образующие связь C—C, находятся на одинаковом расстоянии от каждого углерода и принадлежат им поровну, т. е. можно считать, что у одного атома углерода находятся только семь, а не восемь электронов. В этаноле атом C-1 менее электроотрицательный, чем связанный с ним кислород, и поэтому атом O «перетягивает к себе» оба электрона, образующих связь C—O, а вокруг атома C-1 остается только пять электронов. При каждой формальной потере электрона атом углерода подвергается окислению; это происходит даже без участия кислорода, например, когда алкан ($-CH_2-CH_2-$) превращается в алкен ($-CH=CH-$), происходит окисление — формальная потеря электронов, т. е. отрицательных зарядов, на самом деле происходит потеря атомов водорода. В биологических системах при окислении часто происходит дегидрирование, а многие ферменты, которые катализируют реакции окисления, называются **дегидрогеназами**. Заметим, что более восстановленные соединения на рис. 13-22 (*вверху*) богаче водородом, чем кислородом, в то время как в более окисленных соединениях (*внизу*) число атомов кислорода увеличивается, а число атомов водорода уменьшается.

Не во всех биологических окислительно-восстановительных реакциях участвует углерод. Например, при превращении молекулярного азота в аммиак происходит восстановление атомов азота.

$$6H^+ + 6e^- + N_2 \rightarrow 2NH_3$$

Передача электронов от одной молекулы (донора электронов) к другой (акцептору электронов) осуществляется четырьмя различными способами.

1. Прямой перенос *электронов*. Например, окислительно-восстановительная пара Fe^{2+}/Fe^{3+} может передавать электроны паре Cu^+/Cu^{2+}:

$$Fe^{2+} + Cu^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+} + Cu^+$$

2. Перенос *атомов водорода* ($H^+ + e^-$), ведь формально атом водорода состоит из протона H^+ и одного электрона e^-. В этом случае можно записать общее уравнение

$$AH_2 \rightleftharpoons A + 2e^- + 2H^+$$

где AH_2 — донор водорода (или электронов). (Не путайте с реакцией диссоциации кислоты, в которой участвуют ионы H^+, но не электроны.) AH_2 и A — это сопряженная окислительно-восстановительная пара (A/AH_2), которая может участвовать в реакции с другой редокс-парой B/BH_2):

$$AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$$

3. Перенос электронов от донора к акцептору в форме *гидрид-иона* $(:H)^-$, несущего два электрона, как в случае NAD-зависимых дегидрогеназ, о которых речь пойдет ниже.

4. Прямое *присоединение кислорода*. Здесь кислород взаимодействует с органическим восстановителем и ковалентно встраивается в продукт реакции. Примером такой реакции служит окисление углеводорода до спирта:

$$R-CH_3 + \tfrac{1}{2}O_2 \rightarrow R-CH_2-OH$$

В этой реакции углеводород — донор электронов, а кислород — акцептор электронов.

В клетках встречаются все четыре способа переноса электронов. В окислительно-восстановительных реакциях для обозначения переноса заряда, эквивалентного 1 e^-, используется термин **восстановительный эквивалент**; при этом не имеет значения, переносится ли сам электрон как таковой, атом водорода, гидрид-ион или же происходит реакция с кислородом, в результате которой образуется окисленный продукт. Поскольку молекулы питательных веществ обычно ферментативно дегидрируются с одновременной потерей *двух* восстановительных эквивалентов и поскольку каждый атом кислорода способен получить два восстановительных эквивалента, биохимики условились считать единицей биологического окисления два восстановительных эквивалента, переходящих с субстрата на кислород.

Восстановительный потенциал — мера сродства к электронам

Если в растворе присутствуют две сопряженные редокс-пары, перенос электрона от донора электрона одной пары к акцептору электрона другой может произойти спонтанно. Направление такой реакции зависит от сродства к электрону акцепторов электронов в каждой редокс-паре. Мерой этого сродства служит **стандартный восстановительный потенциал E°** (измеряется в вольтах), его можно измерить экспериментально **(рис. 13-23)**. Электрохимики выбрали в качестве стандарта, по отношению к которому проводится измерение, полуреакцию

$$H^+ + e^- \rightarrow \tfrac{1}{2} H_2$$

Этому водородному электроду (он называется полуячейкой), на котором данная полуреакция происходит, произвольно присвоен нулевой восстановительный потенциал $E'^\circ = 0{,}00$ В. Когда водородный электрод (электрод сравнения) соединен через внешнюю цепь с рабочим электродом (другой полуячейкой), находящимся в растворе со стандартными концентрациями окисленной и восстановленной форм (при стандартных условиях: 25 °С, концентрации растворов 1 М, давление газов 101,3 кПа), поток электронов во внешней цепи направлен от полуячейки с меньшим стандартным восстановительным потенциалом к полуячейке с большим потенциалом. По договоренности, у электрода (полуячейки) с наибольшим «стремлением» получить электроны E° — положительное число (со знаком «плюс»), а у той, что передает электроны водородной ячейке, E° — отрицательное число (со знаком «минус»). Когда два электрода соединены через внешнюю цепь, электрод, который имеет более высокое (более положительное) значение E° (восстановительный потенциал выше), будет восстанавливаться.

Восстановительный потенциал полуячейки зависит не только от природы химического элемента, но и от его активности, которая связана с концентрацией в растворе. Более 100 лет назад Вальтер Нернст вывел уравнение, связывающее стандартный восстановительный потенциал E° с восстановительным потенциалом E для произвольной концентрации окисленных и восстановленных элементов в ячейке.

Рис. 13-23. Измерение стандартного восстановительного потенциала E'° редокс-пары. Направление потока электронов — от рабочего электрода к электроду сравнения. Самый известный электрод сравнения — водородный электрод (pH 0). Электродвижущая сила (эдс) водородного электрода принята равной 0,00 В. При pH 7 рабочего электрода E'° водородного электрода составляет –0,414 В. Направление потока электронов зависит от относительного потенциала обоих электродов (так называемое «давление» электронов). Солевой мостик, содержащий насыщенный раствор KCl, обеспечивает канал движения противоионов между рабочим электродом и электродом сравнения. Из наблюдаемого значения эдс и эдс ячейки сравнения экспериментатор может найти эдс рабочей ячейки, содержащей редокс-пару. По договоренности, у электрода, который «приобретает» электроны, более высокое положительное значение восстановительного потенциала.

Уравнение Нернста

$$E = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{акцептор электронов}]}{[\text{донор электронов}]} \quad (13\text{-}5)$$

где R — *универсальная газовая постоянная*, T — абсолютная температура (в кельвинах), n — число перенесенных электронов на одну молекулу, F — постоянная Фарадея (табл. 13-1). При 298 К (25 °С) и после подстановки численных значений постоянных получим

$$E = E^\circ + \frac{0{,}026\ \text{В}}{n} \ln \frac{[\text{акцептор электронов}]}{[\text{донор электронов}]} \quad (13\text{-}6)$$

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. В случае окислительно-восстановительных реакций биохимики определяют стандартные условия, как для $\Delta G'^{\circ}$: pH 7 и 25 °C; стандартный восстановительный потенциал обозначен E'°. По договоренности, для любой окислительно-восстановительной реакции разность потенциалов E'° равна разности восстановительных потенциалов E'° акцептора и донора электронов. ■

В табл. 13-7 приведены стандартные восстановительные потенциалы E'°, которыми мы и будем пользоваться — они применимы только для систем при нейтральном pH (pH 7). Любое значение E'° в табл. 13-7 получено как разность потенциалов между стандартным водородным электродом (pH 0) и сопряженной редокс-пары с концентрацией 1 М и pH 7. Обратите внимание, что, согласно приведенным в табл. 13-7 данным, в цепи из сопряженной пары $2H^+/H_2$ при pH 7 и стандартного водородного электрода (pH 0) электроны переходят из ячейки с pH 7 в стандартную ячейку (pH 0); таким образом, для пары $2H^+/H_2$ измеряемое значение $E'^{\circ} = -0{,}414$ В.

Таблица 13-7 Стандартные восстановительные потенциалы некоторых биологически важных полуреакций при pH 7,0 и 25 °C (298 K)

Полуреакция	E'°, В
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0,816
$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	0,771
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NO_2^- + H_2O$	0,421
Цитохром f (Fe^{3+}) + e^- → цитохром f (Fe^{2+})	0,365
$Fe(CN)_6^{3-}$ (феррицианид) + $e^- \rightarrow Fe(CN)_6^{4-}$	0,36
Цитохром a_3 (Fe^{3+}) + e^- → цитохром a_3 (Fe^{2+})	0,35
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	0,295
Цитохром a (Fe^{3+}) + e^- → цитохром a (Fe^{2+})	0.29
Цитохром c (Fe^{3+}) + e^- → цитохром c (Fe^{2+})	0,254
Цитохром c_1 (Fe^{3+}) + e^- → цитохром c_1 (Fe^{2+})	0,22
Цитохром b (Fe^{3+}) + e^- → цитохром b (Fe^{2+})	0,077
Убихинон + $2H^+ + 2e^-$ → убихинол + H_2	0,045
Фумарат$^{2-}$ + $2H^+ + 2e^-$ → сукцинат$^{2-}$	0,031
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (при стандартных условиях, pH 0)	**0,000**
Кротонил-CoA + $2H^+ + 2e^-$ → бутирил-CoA	−0,015
Оксалоацетат$^{2-}$ + $2H^+ + 2e^-$ → малат$^{2-}$	−0,166
Пируват$^-$ + $2H^+ + 2e^-$ → лактат$^-$	−0,185
Ацетальдегид + $2H^+ + 2e^-$ → этанол	−0,197
FAD + $2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$	−0,219[a]
Глутатион + $2H^+ + 2e^-$ → → 2 восстановленных глутатиона	−0,23
$S + 2H^+ + 2e^- = H_2S$	−0,243
Липоевая кислота + $2H^+ + 2e^-$ → → дигидролипоевая кислота	−0,29
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$	−0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADPH$	−0,324
Ацетоацетат + $2H^+ + 2e^-$ → β-гидроксибутират	−0,346
α-Кетоглутарат + $CO_2 + 2H^+ + 2e^-$ → изоцитрат	−0,38
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (при pH 7)	−0,414
Ферредоксин (Fe^{3+}) + e^- → ферредоксин (Fe^{2+})	−0,432

Источник: Данные взяты из Loach, R.A. (1976) In *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd edn (Fasman, G.D., ed.), *Physical and Chemical Data*, vol. 1, pp. 122–130, CRC Press, Boca Raton, FL.

[a] Для свободного FAD; FAD, связанный со специфическим флавопротеином (например, сукцинатдегидрогеназой), имеет другое значение E'°, которое зависит от белкового окружения.

Стандартные восстановительные потенциалы можно использовать для расчета изменений свободной энергии

Зачем биохимикам нужны восстановительные потенциалы? Их удобно использовать, ведь если для любых двух ячеек известны E, измеренные относительно стандартного водородного электрода, можно найти их восстановительные потенциалы относительно друг друга. После этого можно предсказать направление потока электронов при соединении двух полуячеек внешней цепью или в том случае, если компоненты обеих ячеек окажутся в одном растворе. Электроны стремятся в полуячейку с более положительным значением E, и сила тока пропорциональна разности восстановительных потенциалов ΔE. Энергия самопроизвольной окислительно-восстановительной реакции характеризуется изменением свободной энергии и пропорциональна ΔE:

$$\Delta G = -nF\Delta E \qquad \text{или} \qquad \Delta G'^{\circ} = -nFE'^{\circ}$$

где n означает число электронов, перенесенных в реакции. Зная E'° (можно взять из таблицы восстановительных потенциалов (табл. 13-7)) и концентрации реагирующих веществ, с помощью этого уравнения можно рассчитать изменение свободной энергии окислительно-восстановительной реакции.

Пример 13-3 РАСЧЕТ $\Delta G'^\circ$ И ΔG ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

Найти изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^\circ$ для реакции, в которой ацетальдегид восстанавливается биологическим переносчиком электронов NADH:

$$\text{Ацетальдегид} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{этанол} + \text{NAD}^+$$

Далее рассчитать *реальное* изменение свободной энергии ΔG, если концентрация ацетальдегида и NADH составляет 1,00 М, а концентрация этанола и NAD^+ 0,100 М.

(1) Ацетальдегид + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ этанол
$E'^\circ = -0{,}197$ В

(2) $NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \rightarrow NADH + H^+$
$E'^\circ = -0{,}320$ В

Вспомните, что по договоренности $\Delta E'^\circ$ — это разность между $\Delta E'^\circ$ акцептора электронов и $\Delta E'^\circ$ донора.

Решение. В данном примере ацетальдегид — акцептор электронов ($n = 2$), которые он отдает NADH.

$$\Delta E'^\circ = -0{,}197 \text{ В} - (-0{,}320 \text{ В}) = 0{,}123 \text{ В}.$$

$$\Delta G'^\circ = -nF\Delta E'^\circ = -2 \cdot 96{,}5 \text{ кДж/(В} \cdot \text{моль)} \cdot 0{,}123 \text{ В} = -23{,}7 \text{ кДж/моль}$$

Это изменение свободной энергии окислительно-восстановительной реакции при pH 7, когда ацетальдегид, этанол, NAD^+ и NADH присутствуют в концентрациях 1,00 М.

Чтобы вычислить ΔG, когда концентрации ацетальдегида и NADH 1,00 М, а этанола и NAD^+ 0,100 М, сначала определим E обоих восстановителей (уравнение 13-5):

$$E_{\text{ацетальдегид}} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{ацетальдегид}]}{[\text{этанол}]} =$$

$$= -0{,}197 \text{ В} + \frac{0{,}026 \text{ В}}{2} \ln \frac{1{,}00}{0{,}100} =$$

$$= -0{,}197 \text{ В} + 0{,}013 \text{ В} \,(2{,}303) = -0{,}167 \text{ В}$$

$$E_{\text{NADH}} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} =$$

$$= -0{,}320 \text{ В} + \frac{0{,}026 \text{ В}}{2} \ln \frac{0{,}100}{1{,}0} =$$

$$= -0{,}320 \text{ В} + 0{,}013 \text{ В} \,(-2{,}303) = -0{,}350 \text{ В}$$

Отсюда мы можем найти ΔE, а затем по уравнению 13-6 рассчитать ΔG:

$$\Delta E = -0{,}167 \text{ В} - (-0{,}350) \text{ В} = 0{,}183 \text{ В}$$

$$\Delta G = -nF\Delta E = -2 \cdot 96{,}5 \text{ кДж/(В·моль)} \cdot 0{,}183 \text{ В} = -35{,}3 \text{ кДж/моль}$$

Таким образом можно рассчитать изменение свободной энергии любой окислительно-восстановительной реакции при любых концентрациях редокс-пар.

Для окисления глюкозы до углекислого газа в клетках необходимы специальные переносчики электронов

Основы энергетики окислительно-восстановительных реакций, о которых речь шла выше, применимы ко многим метаболическим реакциям с участием переносчиков электронов. Например, у многих организмов окисление глюкозы обеспечивает энергией синтез ATP. Для реакции полного окисления глюкозы

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

$\Delta G'^\circ = -2840$ кДж/моль. Эта энергия намного больше той, что необходима для синтеза ATP (от 50 до 60 кДж/моль; см. доп. 13-1). В клетках глюкоза превращается в CO_2 не по одной реакции с большим выделением энергии, а в серии контролируемых реакций, часть из которых окислительные. Свободная энергия, выделяемая при реакциях окисления, того же порядка по величине, что и энергия, необходимая для синтеза ATP из ADP, поэтому часть ее запасается. Электроны, высвобождаемые в реакциях окисления, переносятся на коферменты, такие как NAD^+ и FAD (речь о них пойдет ниже), специализирующиеся на переносе электронов.

Некоторые коферменты и белки служат универсальными переносчиками электронов

Множество ферментов, катализирующих реакции окисления в клетке, направляют электроны с сотен своих различных субстратов на универсальные электронные переносчики всего лишь нескольких видов. Восстановление этих переносчиков в процессах катаболизма приводит к сохранению свободной энергии, которая выделяется при окислении субстрата. NAD^+, $NADP^+$, FMN и FAD —

водорастворимые коферменты, которые подвергаются обратимому окислению и восстановлению во многих метаболических реакциях с переносом электронов. Нуклеотиды NAD^+ и $NADP^+$ без затруднений переходят от одного фермента к другому; флавиннуклеотиды FMN и FAD обычно очень прочно связаны с ферментами флавопротеинами, для которых они служат простетическими группами. Жирорастворимые хиноны, например убихинон и пластохинон, действуют в качестве переносчиков электронов и доноров протонов в безводной среде — в мембранах. Железосерные белки и цитохромы с прочно связанными простетическими группами, которые подвержены обратимому окислению и восстановлению, также служат переносчиками электронов во многих окислительно-восстановительных реакциях. Некоторые из этих белков растворимы в воде, остальные являются периферическими или интегральными мембранными белками (см. рис. 11-6).

В завершение этой главы рассмотрим химические свойства нуклеотидных коферментов, а также некоторых ферментов (дегидрогеназ и флавопротеинов), использующие эти коферменты. Окислительно-восстановительные свойства хинонов, железосерных белков и цитохромов обсуждаются в гл. 19.

NADH и NADPH действуют совместно с дегидрогеназами — растворимыми переносчиками электронов

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD^+ в окисленной форме) и его фосфорилированный аналог никотинамидадениндинуклеотидфосфат ($NADP^+$) состоят из двух нуклеотидов, соединенных фосфоангидридной связью фосфатных

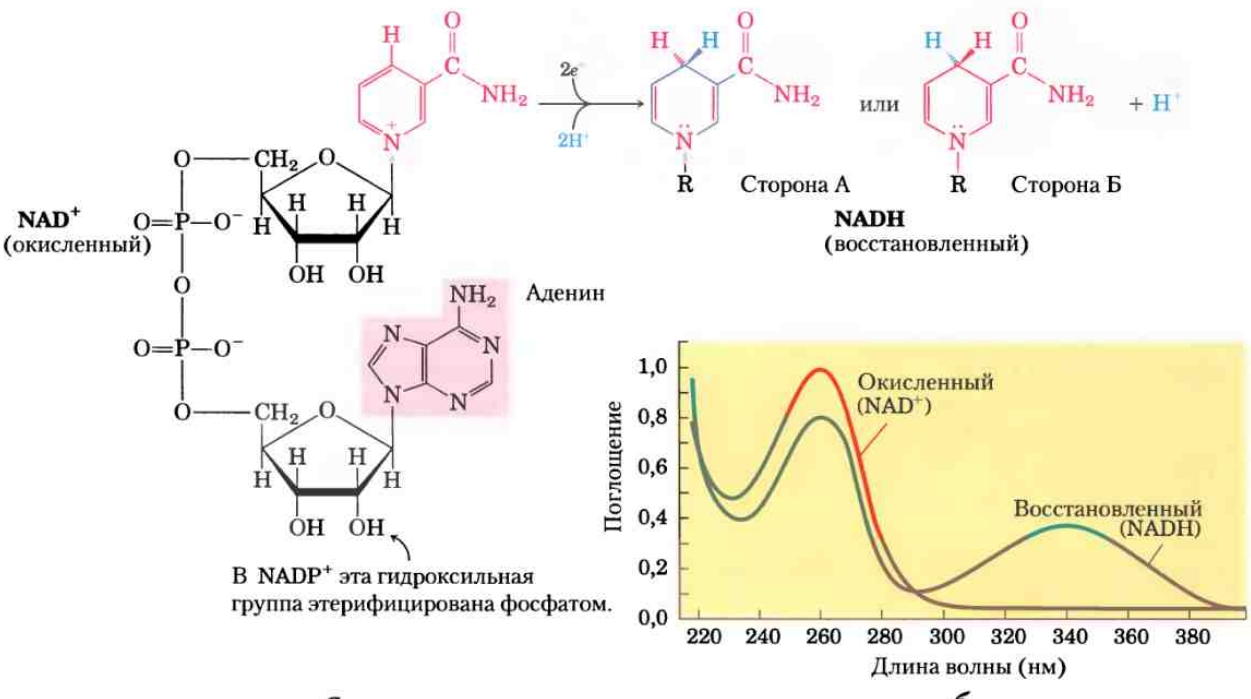


Рис. 13-24. NAD и NADP. *а* — никотинамидадениндинуклеотид NAD^+ и его фосфорилированный аналог $NADP^+$ подвергаются восстановлению до NADH и NADPH, присоединяя гидридный ион (т. е. два электрона и один протон) от окисляемого субстрата. Гидридный ион присоединяется либо спереди (сторона А), либо сзади (сторона Б) плоского никотинамидного кольца (см. табл. 13-8). *б* — УФ-спектр поглощения NAD^+ и NADH. Восстановление никотинамидного кольца приводит к появлению новой широкой полосы поглощения с максимумом при 340 нм. Образование NADH в ферментативной реакции можно легко проследить, наблюдая за появлением поглощения при 340 нм (коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon_{340} = 6200\ M^{-1}см^{-1}$).

групп (**рис. 13-24, *а***). Поскольку никотинамидное кольцо напоминает пиридин, эти соединения иногда называют **пиридиннуклеотидами**. Источником никотинамидной функциональной группы в никотинамиднуклеотидах служит витамин ниацин.

Оба кофермента подвержены обратимому восстановлению никотинамидного кольца (рис. 13-24). Как только молекула субстрата окисляется (дегидрируется) с образованием двух атомов водорода, окисленная форма нуклеотида (NAD^+ или $NADP^+$) присоединяет гидридный ион ($:H^-$, эквивалент протона и двух электронов) и восстанавливается (до NADH или NADPH). Второй выделившийся протон попадает в водную среду. Для каждого кофактора-нуклеотида можно написать полуреакцию:

$$NAD^+ + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NADH + H^+$$

$$NADP^+ + 2e^- + 2H^+ \rightarrow NADPH + H^+$$

Восстановление NAD^+ или $NADP^+$ превращает бензоидное кольцо никотинамидной функциональной группы (с положительным зарядом на азоте кольца) в хиноидную форму (отсутствует заряд на азоте). Обратите внимание, что восстановленные нуклеотиды поглощают свет при 340 нм, а окисленные формы нет (рис. 13-24, *б*). Знак плюс в аббревиатурах NAD^+ и $NADP^+$ *не* означает суммарный заряд на этих молекулах (обе они отрицательно заряжены); он указывает на то, что никотинамидное кольцо находится в окисленной форме с положительным зарядом на атоме азота. В аббревиатурах NADH и NADPH символ H означает добавленный гидридный ион. Для этих нуклеотидов без уточнения их окислительного состояния используются обозначения NAD и NADP.

В большинстве тканей общая концентрация $[NAD^+ + NADH] \approx 10^{-5}$ М, $[NADP^+ + NADPH] \approx 10^{-6}$ М. Во многих клетках и тканях отношение NAD^+(окисл.)/NADH(восст.) — большая величина, что благоприятствует переносу гидрид-иона с субстрата *на* NAD^+ с образованием NADH. Напротив, NADPH(восст.) обычно присутствует в бóльших количествах, чем окисленная форма $NADP^+$, что благоприятствует переносу водорода *с* NADPH *на* субстрат. Все это отражает специфическую роль в метаболизме этих двух коферментов: NAD^+, как правило, действует при окислении, обычно в катаболических реакциях; а NADPH — чаще при восстановлении, практически всегда в анаболических реакциях. Некоторые ферменты могут использовать любой кофермент, однако для большинства наблюдается значительное предпочтение одного кофермента перед остальными. Кроме того, процессы, в которых эти два кофактора принимают участие, изолированы друг от друга в разных органеллах эукариотических клеток: окисление энергоемких веществ, таких как пируват, жирные кислоты и α-кетокислоты, которые образуются из аминокислот, происходят в матриксе митохондрий, тогда как процессы восстановительного биосинтеза, например синтез жирных кислот, — в цитоплазме. Эта функциональная и пространственная специализация позволяет клетке содержать два индивидуальных хранилища переносчиков электронов с своими особыми функциями.

Известно более 200 ферментов, катализирующих реакции, в которых NAD^+ (или $NADP^+$) получает гидридный ион с восстановленного субстрата или NADPH (или NADH), отдают гидридный ион окисленному субстрату. Напишем эти реакции в общем виде:

$$AH_2 + NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$$

$$A + NADPH + H^+ \rightarrow AH_2 + NADP^+$$

где AH_2 восстановленный субстрат, а A — окисленный. Общее название этого класса ферментов — **оксидоредуктазы**, обычно же их называют **дегидрогеназами**. Например, алкогольдегидрогеназа катализирует первичный катаболизм этанола — окисление до уксусного альдегида:

$$\underset{\text{Этанол}}{CH_3CH_2OH} + NAD^+ \rightarrow \underset{\text{Ацетальдегид}}{CH_3CHO} + NADH + H^+$$

Обратите внимание, что один из атомов углерода в этаноле потерял водород; спирт при этом окислился до альдегида (чтобы оценить состояния окисления углерода, вернитесь к рис. 13-22).

В восстановленном NAD^+ или $NADP^+$ гидридный ион, вообще говоря, может быть перенесен на любую сторону никотинамидного кольца: переднюю (А) или заднюю (Б), как показано на рис. 13-24, *а*. Исследования субстратов с изотопными метками показали, что данный фермент катализирует либо перенос типа А, либо типа Б, но не оба одновременно. Например, алкогольдеги-

Таблица 13-8 Стереоспецифичность дегидрогеназ, использующих NAD^+ или $NADP^+$ в качестве коферментов

Фермент	Кофермент	Стереохимическая специфичность к никотинамидному кольцу (А или Б)	Страница(ы) в книге
Изоцитратдегидрогеназа	NAD^+	А	193
α-Кетоглутаратдегидрогеназа	NAD^+	Б	194
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	$NADP^+$	Б	109
Малатдегидрогеназа	NAD^+	А	199
Глутаматдегидрогеназа	NAD^+ или $NADP^+$	Б	269
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	NAD^+	Б	76
Лактатдегидрогеназа	NAD^+	А	91
Алкогольдегидрогеназа	NAD^+	А	93

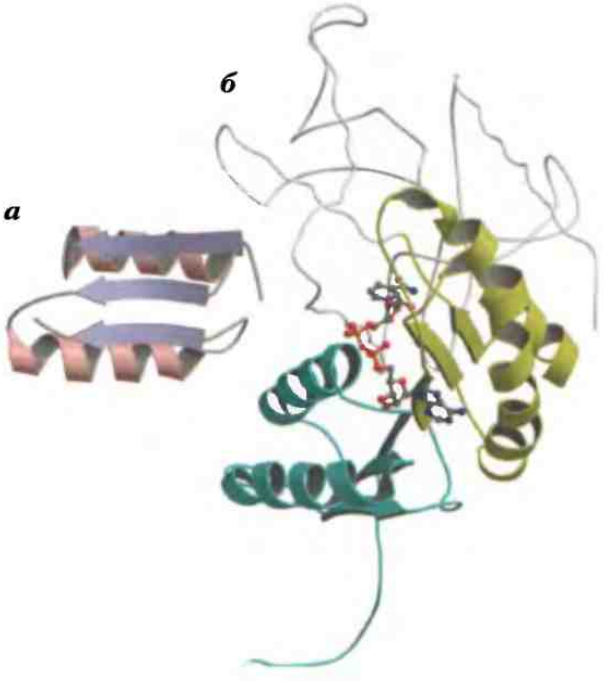


Рис. 13-25. Укладка Россмана. Этот структурный мотив обнаружен в связывающем NAD участке многих дегидрогеназ. *а* — два близких по структуре мотива, у каждого по три параллельные β-складки и по две α-спирали (β-α-β-α-β). *б* — нуклеотидсвязывающий домен фермента лактатдегидрогеназы (PDB ID 3LDH) с NAD в развернутой конформации (шаростержневая модель) и с β-α-β-α-β-мотивом укладки Россмана (зеленый цвет разных оттенков); NAD связан посредством водородных связей и солевых мостиков.

дрогеназа дрожжей и лактатдегидрогеназа сердца позвоночных переносит гидридный ион на сторону А никотинамидного кольца или удаляет гидридный ион с этой стороны кольца; поэтому они выделены в дегидрогеназы типа А, чтобы отличить их от другой группы ферментов, переносящих гидридный ион на (или удаляющих гидридный ион со) сторону(ы) Б никотинамидного кольца (табл. 13-8). Специфичность фермента по той или другой стороне может быть очень значительной; например у лактатдегидрогеназы предпочтение стороны А над стороной Б больше, чем в $5 \cdot 10^7$ раз! Причина такого предпочтения заключается в специфическом расположении функциональных групп в молекуле фермента, участвующих в образовании водородной связи, относительно группы $-CONH_2$ никотинамида.

Большинство дегидрогеназ, которые используют NAD или NADP, связывают кофактор в консервативной области белка, которая называется укладка Россмана (Майкл Россман впервые установил структуру лактатдегидрогеназы и описал этот структурный фрагмент). Укладка Россмана, как правило, это шесть параллельных β-складок, объединенных с четырьмя α-спиралями (**рис. 13-25**).

Связь между дегидрогеназой и NAD или NADP относительно непрочная; кофермент спокойно диффундирует между ферментами, действуя в качестве водорастворимого переносчика электронов от одного метаболита к другому. Например, при образовании спирта в процессе

брожения глюкозы в клетках дрожжей гидридный ион отщепляется от глицеральдегид-3-фосфата одним ферментом (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой типа Б) и переносится на NAD^+. Затем образованный NADH покидает поверхность фермента и диффундирует к другому ферменту (алкогольдегидрогеназе типа А), который переносит гидридный ион на ацетальдегид с образованием этанола:

(1) Глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ → → 3-фосфоглицерат + NADH + H^+

(2) Ацетальдегид + NADH + H^+ → → этанол + NAD^+

Итого: глицеральдегид-3-фосфат + ацетальдегид → → 3-фосфоглицерат + этанол

Обратите внимание, что в суммарной реакции не происходит образования или расходования NAD^+ или NADH; коферменты действуют как катализаторы — они повторно высвобождаются и итоговая концентрация NAD^+ + NADH не изменяется.

Дефицит в пище ниацина, витаминной формы NAD и NADP, вызывает пеллагру

Как мы уже отмечали в гл. 6 и увидим в последующих главах, большинство коферментов — это производные витаминов. Пиридиноподобные кольца NAD и NADP образуются из витамина **ниацина** (никотиновой кислоты; **рис. 13-26**), который образуется из триптофана. У человека ниацин в необходимых количествах обычно не синтезируется; это главным образом относится к тем людям, кто потребляет пищу, содержащую мало триптофана (например, кукурузу — очень низкое содержание триптофана). Нехватка у человека

Рис. 13-26. Структуры ниацина (никотиновой кислоты) и его производного никотинамида. В природных биосистемах предшественником этих соединений является триптофан. В лаборатории никотиновая кислота впервые была получена окислением природного никотина — отсюда и название. Как никотиновая кислота, так и никотинамид лечат пеллагру, однако никотин (из сигарет) не обладает исцеляющей силой.

ниацина сказывается на всех NAD(P)-зависимых дегидрогеназах и приводит к серьезной болезни пеллагре (*итал.* — «грубая кожа»; у собак болезнь называется «черным языком»). Болезнь характеризуется тремя симптомами: дерматит, диарея и дименция, причем во многих случаях приводит к летальному исходу. Столетие назад пеллагра была распространенной болезнью; в южных штатах США, где кукуруза служила основным продуктом питания населения, в период с 1912 по 1916 гг. было порядка 100 000 больных пеллагрой и умерло около 10 000. Джозеф Голдбергер в 1920 г. показал, что пеллагра вызывается недостатками рациона питания, а в 1937 г. Фрэнк Стронг, Д. Уэйн Вули и Конрад Эльвейем обнаружили, что эффективным

Фрэнк Стронг, 1908–1993

Д. Уэйн Вули, 1914–1966

Конрад Эльвейем, 1901–1962

средством от «черного языка» служит ниацин. Добавление в пищу этого недорогого соединения позволило справиться с пеллагрой в развитых странах. Однако важно отметить, что эта победа оказалась неабсолютной — пеллагра все еще встречается среди алкоголиков, у которых всасывание ниацина в кишечнике сильно ослаблено и чьи потребности в калориях зачастую удовлетворяются спиртными напитками, лишенными в сущности витаминов, включая и ниацин. В некоторых местностях, например на Деканском плоскогорье в Индии, пеллагра все еще встречается, особенно среди бедных. ■

Таблица 13-9 Некоторые ферменты (флавопротеины), использующие флавиннуклеотидные коферменты

Фермент	Флавин-нуклеотид	Страница(ы) в книге
Ацил-CoA-дегидрогеназа	FAD	рис. 17-8
Дигидролипоилдегидрогеназа	FAD	186
Сукцинатдегидрогеназа	FAD	198
Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа	FAD	рис. 19-30 и текст
Тиоредоксинредуктаза	FAD	рис. 22-39 и текст
NADH-дегидрогеназа (комплекс I)	FAD	рис. 19-1 и текст
Гликолатоксидаза	FAD	рис. 20-21

Флавиннуклеотиды прочно связываются с флавопротеинами

Флавопротеины (табл. 13-9) — это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции, используя в качестве кофермента флавинмононуклеотид (FMN) или флавинадениндинуклеотид (FAD) (**рис. 13-27**). Коферменты **флавиннуклеотиды** образуются из витамина рибофлавина. Конденсированная многоядерная структура флавиннуклеотидов (изоаллоксазиновое кольцо) подвергается обратимому восстановлению, полу-

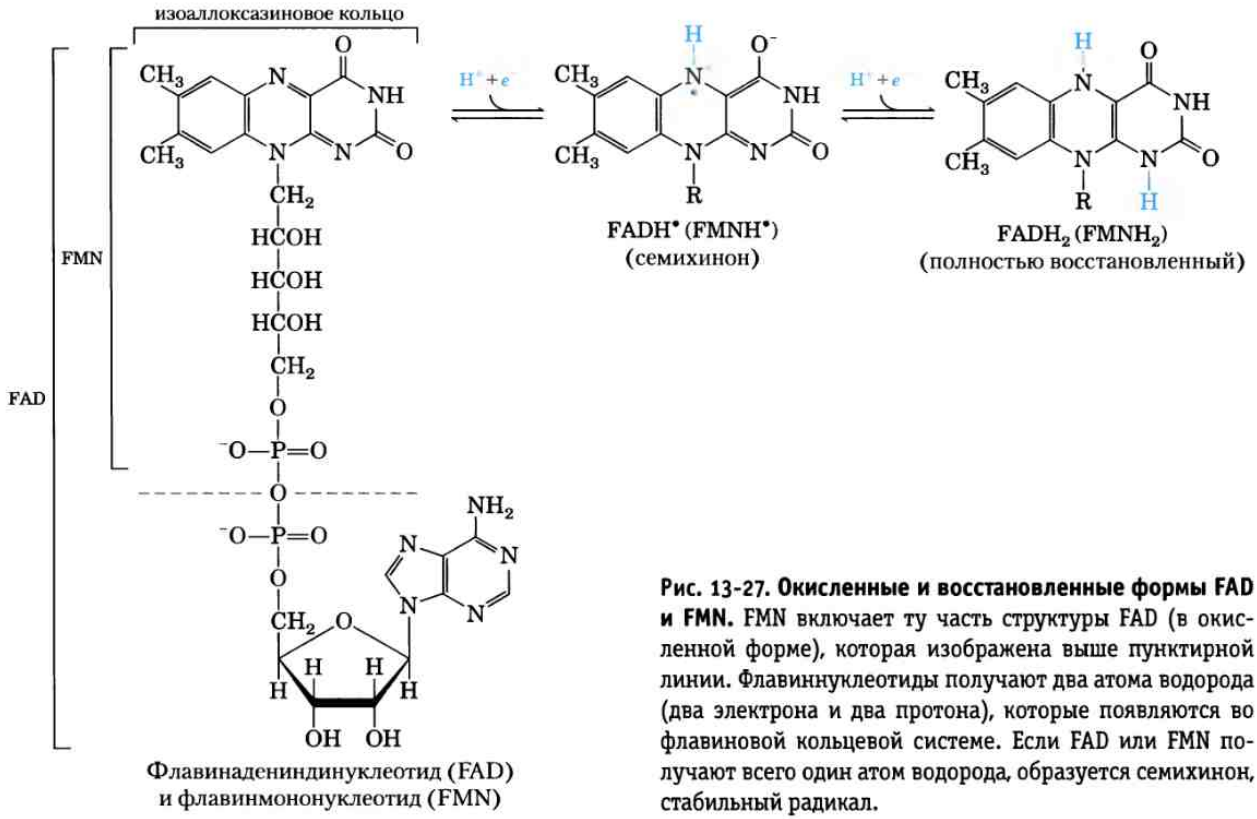


Рис. 13-27. Окисленные и восстановленные формы FAD и FMN. FMN включает ту часть структуры FAD (в окисленной форме), которая изображена выше пунктирной линии. Флавиннуклеотиды получают два атома водорода (два электрона и два протона), которые появляются во флавиновой кольцевой системе. Если FAD или FMN получают всего один атом водорода, образуется семихинон, стабильный радикал.

чая от восстановленного субстрата либо один, либо два электрона в виде одного или двух атомов водорода (у атома водорода один электрон и один протон). Полностью восстановленные формы обозначаются $FADH_2$ и $FMNH_2$. Когда полностью окисленный флавиннуклеотид получает всего один электрон (один атом водорода), образуется семихинонная форма изоаллоксазинового кольца, обозначаемая $FADH^{\bullet}$ и $FMNH^{\bullet}$. Поскольку функция флавиновых нуклеотидов несколько отличается от функции никотинамидных коферментов (участие в переносе одного или двух электронов), флавопротеины задействованы в более широком наборе реакций, чем NAD(P)-связанные дегидрогеназы.

Как и у никотинамидных коферментов (рис. 13-24), у флавиннуклеотидов при восстановлении наблюдается сдвиг основной полосы поглощения. У полностью восстановленных флавопротеинов (получивших два электрона) максимум поглощения, как правило, лежит при 360 нм. У частично восстановленных флавопротеинов (получивших один электрон) появляется еще один максимум поглощения при 450 нм; полностью окисленная флавиновая система дает максимумы при 370 и 440 нм. Максимумы поглощения промежуточной радикальной формы, восстановленной одним электроном, лежат при 380, 480, 580 и 625 нм. Эти спектральные особенности можно использовать при изучении реакций с участием флавопротеинов.

В большинстве флавопротеинов флавиннуклеотид довольно прочно связан с белком, а в некоторых ферментах, например в сукцинатдегидрогеназе, он связан ковалентно. Такие прочно связанные коферменты называются простетическими группами. Они не переносят электроны, диффундируя от одного фермента к другому; напротив, они предоставляют средство, с помощью которого флавопротеин может временно удерживать электроны, пока он катализирует электронный перенос с восстановленного субстрата на акцептор электронов. Характерная особенность флавопротеинов состоит в том, что стандартный восстановительный потенциал (E'°) связанного флавиннуклеотида может изменяться, что имеет очень важное значение. Из-за сильного взаимодействия между ферментом и простетической группой флавиновое кольцо приобретает восстановительный потенциал, характерный для данного конкретного флавопротеина, который иногда значительно отличается от восстановительного потенциала свободного флавиннуклеотида. Например, у FAD, связанного с сукцинатдегидрогеназой, $E'^{\circ} \approx 0{,}0$ В, а для свободного FAD $E'^{\circ} = -0{,}219$ В; для других флавопротеинов E'° лежит в диапазоне от $-0{,}40$ В до $+0{,}06$ В. Флавопротеины — соединения очень сложного строения; некоторые из них наряду с флавиннуклеотидом несут еще прочно связанные неорганические ионы (например, содержат ионы железа или молибдена), способные участвовать в переносе электронов.

Некоторые флавопротеины выполняют совершенно неожиданные функции, действуя в качестве рецепторов света. **Криптохромы** представляют собой семейство флавопротеинов, широко распространенных в эукариотических организмах, которые опосредуют действие синего света на развитие растений и влияние света на циркадные ритмы млекопитающих (физиологические и биохимические колебания с 24-часовым периодом). Криптохромы являются гомологами другого семейства флавопротеинов — фотолиаз. **Фотолиазы**, обнаруженные как у прокариот, так и у эукариот, используют энергию поглощенного света для исправления химических дефектов в ДНК.

Действие флавопротеинов в качестве электронных переносчиков обсуждается в гл. 19 при рассмотрении их роли в окислительном фосфорилировании (в митохондриях) и в фотофосфорилировании (в хлоропластах), а в гл. 25 речь пойдет о фотолиазных реакциях.

Краткое содержание 13.4 ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

- У многих организмов главный запасающий энергию процесс состоит в многостадийном окислении глюкозы до CO_2, при котором часть энергии окисления сохраняется в виде ATP по мере того, как электроны переносятся на O_2.

- Биологические окислительно-восстановительные реакции можно представить в виде двух полуреакций, каждая из которых характеризуется стандартным восстановительным потенциалом E'°.

- При соединении двух электрохимических полуячеек, каждая из которых содержит компоненты полуреакции, электроны стремятся перейти в полуячейку с большим восстановительным потенциалом, что зависит от разности между двумя восстановительными потенциалами (ΔE) и является функцией концентраций окисленных и восстановленных форм.

- Изменение стандартной свободной энергии окислительно-восстановительной реакции прямо пропорционально разности стандартных восстановительных потенциалов двух полуячеек: $\Delta G'^{\circ} = -nFE'^{\circ}$.

- Многие биологические реакции окисления — это реакции дегидрирования, в которых один или два атома водорода ($H^+ + e^-$) переносятся с субстрата на акцептор водорода. Окислительно-восстановительные реакции в живых клетках происходят при участии специальных переносчиков электронов.

- NAD и NADP — свободно диффундирующие коферменты многих дегидрогеназ. Как NAD^+, так и $NADP^+$ получают два электрона и один протон.

- Флавиннуклеотиды FAD и FMN выступают в роли прочно связанных простетических групп флавопротеинов. Они способны получать либо один, либо два электрона и один или два протона. Флавопротеины служат также в качестве рецепторов света в криптохромах и фотолиазах.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

автотрофы 5
аденилаткиназа 41
аденилилирование 38
альдольная конденсация 22
анаболизм 7
восстановительный эквивалент 46
гетеролитический разрыв связи 20
гетеротрофы 6
гомолитический разрыв связи 20
дегидрирование 46
дегидрогеназы 46
карбанион 21
карбокатион 21
катаболизм 7
киназа 26
конденсация Кляйзена 23
креатинкиназа 41
криптохром 55
метаболизм 7
метаболит 7
метаболические пути 7
неорганическая пирофосфатаза 38
нуклеозиддифосфаткиназа 41
нуклеофил 21
оксиредуктаза 51
пиридиннуклеотид 51
полифосфаткиназа-1 42
полифосфаткиназа-2 42
потенциал фосфорилирования (ΔG_p) 30
приведенные стандартные константы 15
промежуточный метаболизм 7
радикал 20
сопряженная редокспара 44
стандартный восстановительный потенциал (E'°) 47
тиоэфир 33
флавиннуклеотиды 54
флавопротеин 54
фосфагены 42
фотолиаза 55
электродвижущая сила (эдс) 43
электрофил 21

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Биоэнергетика и термодинамика

Atkins, P.W. (1984) *The Second Law*, Scientific American Books, Inc., New York

Прекрасно иллюстрированное обсуждение второго закона термодинамики и его приложений начального уровня.

Atkinson, D.E. (1977) *Cellular Energy Metabolism and Its Regulation*, Academic Press, Inc., New York.

Классическое освещение роли ATP, ADP и AMP в контроле скорости катаболизма.

Bergethon, P.R. (1998) *The Physical Basis of Biochemistry*, Springer Verlag, New York.

Главы с 11 по 13 этой книги, а также книги Tinoco и др. и van Holde и др. (см. ниже) содержат превосходный справочный материал по физико-химической биохимии с обсуждениями приложений термодинамики.

Edsall, J.T. & Gutfreund, H. (1983) *Biothermodynamics: The Study of Biochemical Processes at Equilibrium*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Hammes, G. (2000) *Thermodynamics and Kinetics for the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Понятное изложение, хорошие иллюстрации, прекрасные примеры и задания.

Harold, F.M. (1986) *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, W. H. Freeman and Company, New York.

Неперегруженное обсуждение термодинамики биологических процессов.

Harris, D.A. (1995) *Bioenergetics at a Glance*, Blackwell Science, Oxford.

Краткое и понятное изложение закономерностей энергетики клетки, некоторые вводные главы по термодинамике.

Haynie, D.T. (2001) *Biological Thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge.

Очень доступное объяснение термодинамики и кинетики биологических систем.

Loewenstein, W.R. (1999) *The Touchstone of Life: Molecular Information, Cell Communication, and the Foundations of Life*, Oxford University Press, New York.

Превосходно изложены взаимосвязи между энтропией и информацией.

Nicholls, D.G. & Ferguson, S.J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Inc., New York.

Понятное обсуждение в сопровождении хороших иллюстраций теоретических основ биоэнергетики и механизмов передачи энергии.

Tinoco, I., Jr., Sauer, K., Wang, J.C., & Puglisi, J.D. (2002) *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*, 4th edn, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Главы 2–5 посвящены термодинамике.

van Holde, K.E., Johnson, C., & Ho, P.S. (2006) *Principles of Physical Biochemistry*, 2nd edn, Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ.

Особенно полезны гл. 2 и 3.

Химические основы биохимических реакций

Frey, P.A. (2001) Radical mechanisms of enzymatic catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 121–148.

Очень полезный обзор свободнорадикальных реакций.

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Написанный известными учеными современный справочник по реакциям, происходящим в живых системах.

Gutteridge, A. & Thornton, J.M. (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 622–629.

Kraut, D.A., Carroll, K.S., & Herschlag, D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 517–571.

Хороший обзор по основам ферментативного катализа в современном ихложении; выделены проблемы, пока далекие от понимания.

Переносы фосфорильной группы и ATP

Alberty, R.A. (1994) Biochemical thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1–11.

Объясняются различия между биохимическими и химическими уравнениями, даны примеры расчетов приведенных термодинамических параметров для ATP и других фосфорилированных соединений.

Bridger, W.A. & Henderson, J.F. (1983) *Cell ATP*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Химия ATP, его роль в метаболической регуляции, а также в катаболизме и анаболизме.

Brown, M.R.W. & Kornberg, A. (2004) Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16085–16087.

Fraley, C.D., Rashid, M.H., Lee, S.S.K., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P.J., Brown, M.R.W., & Kornberg, A. (2007) A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 3526–3531.

Frey, P.A. & Arabshahi, A. (1995) Standard free-energy change for the hydrolysis of the α-β-phosphoanhydride bridge in ATP. *Biochemistry* **34**, 11307–11310.

Hanson, R.W. (1989) The role of ATP in metabolism. *Biochem. Educ.* **17**, 86–92.

Превосходное краткое изложение химии и биологии ATP.

Kalckar, H.M. (1991) Fifty years of biological research: from oxidative phosphorylation to energy requiring transport regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 1–37.

Изложена история изучения ATP.

Kornberg, A. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 89–125.

Lipmann, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* **11**, 99–162.

Классическая интерпретация роли высокоэнергетических фосфатных соединений в биологии.

Pullman, B. & Pullman, A. (1960) Electronic structure of energy-rich phosphates. *Radiat. Res., Suppl.* **2**, 160–181.

Обсуждение химии ATP и других «богатых энергией» соединений; для углубленного уровня изучения.

Rees, D.C. & Howard, J.B. (1999) Structural bioenergetics and energy transduction mechanisms. *J. Mol. Biol.* **293**, 343–350.

Обсуждение структурных основ эффективного сопряжения двух энергетических процессов с помощью изменения конформации.

Veech, R.L., Lawson, J.W.R., Cornell, N.W., & Krebs, H. A. (1979) Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* **254**, 6538–6547.

Экспериментальное определение концентраций ATP, ADP и P_i в мозге, мышцах и печени, а также обсуждение проблем при определении реального изменения свободной энергии при синтезе ATP в клетках.

Westheimer, F.H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173–1178.

Химические аспекты уникальной «приспособленности» фосфатных эфиров и ангидридов для метаболических превращений.

Окислительно-восстановительные реакции в биологических системах

Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., & Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760–765.

Dolphin, D., Avramovic, O., & Poulson, R. (eds). (1987) *Pyridine Nucleotide Coenzymes: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Двухтомник с превосходным собранием обзоров. Наиболее полезны главы, написанные Kaplan, Westheimer, Veech, а также Ohno и Ushio.

Fraaije, M.W. & Mattevi, A. (2000) Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126–132.

Hosler, J.P., Ferguson-Miller, S., & Mills, D.S. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 165–187.

Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 22459–22462.

Краткий обзор химии флавин-кислородных взаимодействий в флавопротеинах.

Rees, D.C. (2002) Great metalloclusters in enzymology. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 221–246.

Обзор разных типов металлокластеров в ферментах и механизмов их действия; для углубленного уровня изучения.

Roehm, K.-H. (2001) *Electron carriers: proteins and cofactors in oxidative phosphorylation. In Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Inc./Wiley InterScience, www.els.net.

Хороший обзор различных классов переносчиков электронов, участвующих в дыхании.

Williams, R.E. & Bruce, N.C. (2002) New uses for an old enzyme — the old yellow enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* **148**, 1607–1614.

Вопросы и задачи

1. Изменения энтропии при развитии яйца. Рассмотрим систему, состоящую из яйца в инкубаторе. В яичном белке и желтке содержатся белки, углеводы и липиды. При оплодотворении яйца из одной клетки развивается сложный организм. Обсудите этот необратимый процесс и дайте качественную оценку изменений энтропии в системе, ее окружении и во всем пространстве. Прежде всего следует правильно определить систему и ее окружение.

2. Вычисление $\Delta G'^\circ$ из константы равновесия. Найдите изменения стандартной свободной энергии в следующих катализируемых ферментами метаболически важных реакциях при 25 °C и pH 7,0, используя данные по константам равновесия.

а) Глутамат + оксалоацетат $\xrightleftharpoons{\text{аспартатамино-трансфераза}}$ аспартат + α-кетоглутарат

$K'_{eq} = 6{,}8$

б) Дигидроксиацетонфосфат $\xrightleftharpoons{\text{триозофосфат-изомераза}}$ глицеральдегид-3-фосфат

$K'_{eq} = 0{,}0475$

в) Фруктозо-6-фосфат + ATP $\xrightleftharpoons{\text{фосфофруктокиназа}}$ фруктозо-1,6-бисфосфат + ADP

$K'_{eq} = 254$

3. Расчет константы равновесия из $\Delta G'^\circ$. Рассчитайте константы равновесия K'_{eq} реакций при pH 7,0 и 25 °C, используя значения $\Delta G'^\circ$ из табл. 13-4.

а) Глюкозо-6-фосфат + H_2O $\xrightleftharpoons{\text{глюкозо-6-фосфатаза}}$ глюкоза + P_i

б) Лактоза + H_2O $\xrightleftharpoons{\text{β-галактозидаза}}$ глюкоза + галактоза

в) Малат $\xrightleftharpoons{\text{фумараза}}$ фумарат + H_2O

4. Экспериментальное определение K'_{eq} и $\Delta G'^\circ$. Если 0,1 M раствор глюкозо-1-фосфата инкубировать с фосфоглюкомутазой в каталитическом количестве, глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат. Концентрации компонентов указаны для равновесной реакции

Глюкозо-1-фосфат $\rightleftharpoons$ глюкозо-6-фосфат

$4{,}5 \cdot 10^{-3}$M $\qquad$ $9{,}6 \cdot 10^{-2}$M

Рассчитайте K'_{eq} и $\Delta G'^\circ$ для этой реакции при 25 °C.

5. Экспериментальное определение $\Delta G'^\circ$ гидролиза ATP. Требуется осуществить прямое

измерение изменения стандартной свободной энергии при гидролизе ATP, поскольку в равновесной реакции трудно определить количество ATP, гидролизуемое за 1 мин. Однако $\Delta G'^{\circ}$ можно рассчитать косвенно из констант равновесия двух других ферментативных реакций, которые обладают менее благоприятными константами равновесия:

Глюкозо-6-фосфат + H_2O → глюкоза + P_i
$K'_{eq} = 270$

ATP + глюкоза → ADP + глюкозо-6-фосфат
$K'_{eq} = 890$

Найдите стандартную свободную энергию гидролиза ATP при 25 °C.

6. Различие между $\Delta G'^{\circ}$ и ΔG. Рассмотрим следующее превращение, происходящее при гликолизе (гл. 14):

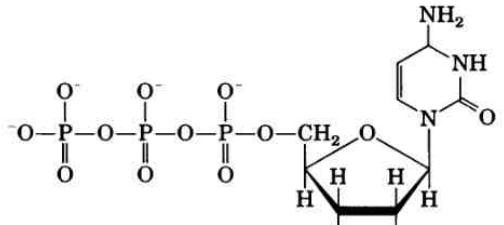
Фруктозо-6-фосфат ⇌ глюкозо-6-фосфат
$K'_{eq} = 1{,}97$

а) Найдите $\Delta G'^{\circ}$ реакции (при 25 °C).

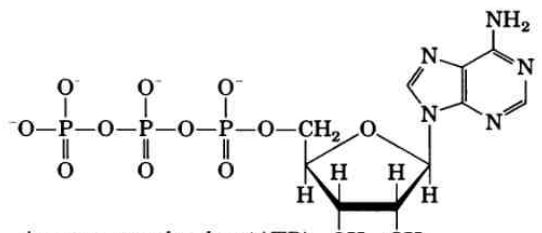
б) Если концентрацию фруктозо-6-фосфата довести до 1,5 M, а глюкозо-6-фосфата до 0,50 M, чему равно ΔG?

в) Почему $\Delta G'^{\circ}$ и ΔG не совпадают по величине?

7. Свободная энергия гидролиза CTP. Сравните структуру нуклеозидтрифосфата CTP со структурой ATP.



Цитидинтрифосфат (CTP)



Аденозинтрифосфат (ATP)

Предскажите значения K'_{eq} и $\Delta G'^{\circ}$ для следующей реакции:

ATP + CDP → ADP + CTP

8. Зависимость ΔG от pH. Свободная энергия, выделяющаяся при гидролизе ATP в стандартных условиях (при pH 7,0), равна –30,5 кДж/моль. Больше или меньше выделится свободной энергии, если гидролиз ATP происходит в стандартных условиях, но при pH 5,0? Объясните. Используйте физиологический график для объяснения этой зависимости.

9. $\Delta G'^{\circ}$ сопряженных реакций. Глюкозо-1-фосфат превращается во фруктозо-6-фосфат в двух последовательных реакциях:

Глюкозо-1-фосфат → глюкозо-6-фосфат

Глюкозо-6-фосфат → фруктозо-6-фосфат

Основываясь на величинах $\Delta G'^{\circ}$ из табл. 13-4, рассчитайте константу равновесия K'_{eq} суммарной реакции при 25 °C:

Глюкозо-1-фосфат → фруктозо-6-фосфат

10. Влияние отношения [ATP]/[ADP] на величину свободной энергии гидролиза ATP. Используя уравнение 13-4, изобразим зависимость ΔG от $\ln Q$ (отношение действующих масс) при 25 °C для указанных в таблице концентраций ATP, ADP и P_i. Для данной реакции $\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$ кДж/моль. Используя полученный график, объясните, почему регуляция метаболизма направлена на поддержание высокого значения отношения [ATP]/[ADP].

	Концентрация (мМ)				
ATP	5	3	1	0,2	5
ADP	0,2	2,2	4,2	5,0	25
P_i	10	12,1	14,1	14,9	10

11. Способ преодоления невыгодности реакций: ATP-зависимое химическое сопряжение. Фосфорилирование глюкозы до глюкозо-6-фосфата является начальным шагом в катаболизме глюкозы. Непосредственное фосфорилирование глюкозы P_i описывается уравнением

Глюкоза + P_i → глюкозо-6-фосфат + H_2O
$\Delta G'^{\circ} = 13{,}8$ кДж/моль

а) Рассчитайте константу равновесия приведенной реакции. В гепатоцитах крысы физиологическая концентрация глюкозы и P_i составляет ~4,8 мМ. Какова равновесная концентрация глюкозо-6-фосфата, полученного непосредственным фосфорилированием глюкозы неорганическим фосфатом? Приемлима ли эта реакция как стадия метаболизма при катаболизме глюкозы? Объясните.

б) В принципе, по крайней мере один из способов увеличения концентрации глюкозо-6-фосфата заключается в смещении равновесия реакции вправо увеличением внутриклеточных концентраций глюкозы и P_i. Предполагая, что концентрация P_i не меняется и равна 4,8 мМ, найдите, какой должна быть внутриклеточная концентрация глюкозы, чтобы равновесная концентрация глюкозо-6-фосфата составила 250 мкМ (это обычная физиологическая концентрация)? Будет ли такой способ физиологически приемлемым, если известно, что максимальная растворимость глюкозы меньше 1 М?

в) Фосфорилирование глюкозы в клетке сопряжено с гидролизом ATP; т. е. часть свободной энергии гидролиза ATP идет на фосфорилирование глюкозы:

(1) Глюкоза + P_i → глюкозо-6-фосфат + H_2O
$\Delta G'^\circ$ = 13,8 кДж/моль

(2) ATP + H_2O → ADP + P_i
$\Delta G'^\circ$ = –30,5 кДж/моль

Итого: глюкоза + ATP → глюкозо-6-фосфат + ADP

Рассчитайте K'_{eq} суммарной реакции. При ATP-зависимом фосфорилировании глюкозы какая ее концентрация необходима для получения 250 мкМ внутриклеточной концентрации глюкозо-6-фосфата, если концентрации ATP и ADP равны 3,38 и 1,32 мМ соответственно? Дает ли такое сопряжение в принципе осуществимый способ фосфорилирования глюкозы в клетке? Объясните.

г) Хотя сопряжение гидролиза ATP с фосфорилированием глюкозы термодинамически разумно, пока остается невыясненным, каким образом это должно происходить. Раз установлено, что для сопряжения необходим общий посредник, возможный способ состоит в использовании гидролиза ATP для повышения внутриклеточной концентрации P_i и, таким образом, стимулировании им невыгодного фосфорилирования глюкозы. Разумен ли такой путь? (Подумайте о результатах растворимости метаболических посредников.)

д) ATP-сопряженное фосфорилирование глюкозы в гепатоцитах катализируется ферментом глюкокиназой. Этот фермент связывается с ATP и глюкозой с образованием глюкозо-ATP-ферментного комплекса, а фосфорильная группа переносится непосредственно с ATP на глюкозу. Объясните преимущества такого пути.

12. Расчет $\Delta G'^\circ$ ATP-сопряженных реакций. Из данных табл. 13-6 найдите $\Delta G'^\circ$ реакций

а) Креатинфосфат + ADP → креатин + ATP

б) ATP + фруктоза → ADP + фруктозо-6-фосфат

13. Сопряжение разрыва ATP с энергетически невыгодными реакциями. Для исследования результатов сопряжения гидролиза ATP в физиологических условиях с термодинамически невыгодной биохимической реакцией рассмотрим гипотетическое превращение X → Y, для которого $\Delta G'^\circ$ = 20 кДж/моль.

а) Чему равно отношение [Y]/[X] в состоянии равновесия?

б) Пусть X и Y участвуют в последовательности реакций, в ходе которых происходит гидролиз ATP до ADP и P_i. Суммарная реакция

$$X + ATP + H_2O \rightarrow Y + ADP + P_i$$

Вычислите [Y]/[X] для этой реакции в состоянии равновесия. Примите, что равновесные концентрации ATP, ADP и P_i равны 1 М.

в) Известно, что в физиологических условиях [ATP], [ADP] и [P_i] *не* равны 1 М. Вычислите [Y]/[X] для ATP-сопряженной реакции со значениями [ATP], [ADP] и [P_i], взятыми для миоцитов крыс.

14. Расчеты ΔG при физиологических концентрациях. Найдите физиологическое ΔG (а не $\Delta G'^\circ$) реакции

Креатинфосфат + ADP → креатин + ATP

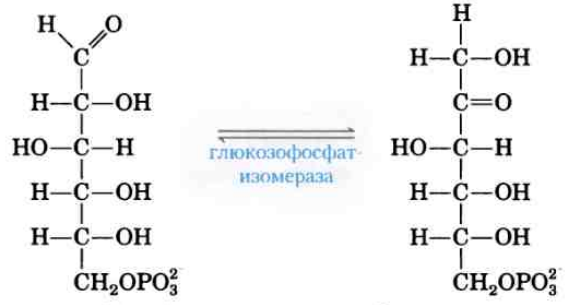
при 25 °С для цитозоля нейронов с концентрацией креатинфосфата 4,7 мМ, креатина 1,0 мМ, ADP 0,73 мМ и ATP 2,6 мМ.

15. Свободная энергия, необходимая для синтеза ATP в физиологических условиях. В цитозоле гепатоцитов крыс коэффициент действующих масс Q равен

$$\frac{[ATP]}{[ADP][Pi]} = 5{,}33 \cdot 10^2\ M^{-1}$$

Найдите свободную энергию, необходимую для синтеза ATP в гепатоцитах крыс.

16. «Химическая» логика. В ходе гликолиза шестиуглеродный сахар фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется с образованием двух трехуглеродных сахаров, которые подвергаются дальнейшим метаболическим превращениям (см. рис. 14-5). При этом за две стадии до реакции расщепления происходит изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат (см. ниже) (промежуточная стадия представляет собой фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата) (с. 73)).



Глюкозо-6-фосфат — Фруктозо-6-фосфат

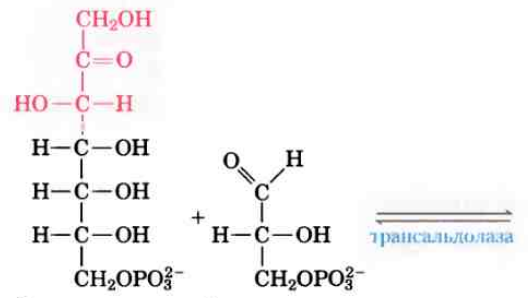
В чем смысл стадии изомеризации в ходе данного процесса? *Подсказка.* Подумайте, что могло бы произойти при расщеплении связи C—C без предварительной изомеризации.

17. Механизм ферментативной реакции I. Лактатдегидрогеназа — один из ферментов, использующих в качестве кофермента NADH. Фермент катализирует превращение пирувата в лактат

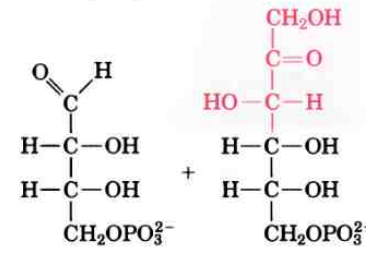
Пируват — L-лактат

Изобразите механизм данной реакции (стрелками покажите направление передачи электронов). *Подсказка.* Механизм этой реакции аналогичен механизму любой другой реакции, катализируемой NADH-зависимой дегидрогеназой, например алкогольдегидрогеназой.

18. Механизм ферментативной реакции II. Биохимические реакции часто кажутся более сложными, чем они есть на самом деле. В пентозофосфатном пути (гл. 14) седогептулозо-7-фосфат реагирует с глицеральдегид-3-фосфатом с образованием эритрозо-4-фосфата и фруктозо-6-фосфата при участии фермента трансальдолазы.



Седогептулозо-7-фосфат — Глицеральдегид-3-фосфат



Эритрозо-4-фосфат — Фруктозо-6-фосфат

Изобразите механизм данной реакции (стрелками покажите направление передачи электронов). *Подсказка.* Взгляните на реакцию альдольной конденсации и учтите название данного фермента.

19. Организм взрослого человека ежедневно использует ATP.

а) Для синтеза ATP из ADP и P_i при условии, что реагенты взяты в концентрациях 1 M (стандартное состояние), требуется всего 30,5 кДж/моль свободной энергии. Поскольку истинные физиологические концентрации ATP, ADP и P_i *не* равны 1 M, свободная энергия, необходимая для синтеза ATP в физиологических условиях, отличается от $\Delta G'^{\circ}$. Найдите свобод-

ную энергию, необходимую для синтеза АТР в гепатоцитах человека, если физиологические концентрации АТР, ADP и P_i составляют 3,5, 1,50 и 5,0 мМ соответственно.

б) Взрослому человеку с массой тела 68 кг (150 фунтов) требуется 2000 ккал (8,360 кДж); эту энергию человек получает с пищей за сутки (24 ч). Пища усваивается, а свободная энергия используется для синтеза АТР. Затем АТР предоставляет организму энергию для выполнения ежедневной химической и механической работы. Предположив, что эффективность превращения энергии пищи в АТР составляет 50%, найдите массу АТР, которая используется организмом взрослого человека за 24 ч. Какой процент от массы тела составляет АТР?

в) Несмотря на то что в организме человека каждый день синтезируются огромные количества АТР, при синтезе АТР масса человека по своему строению и составу не претерпевает значительных изменений. Объясните это кажущееся противоречие.

20. Скорости обновления γ- и β-фосфатов в АТР. Если небольшое количество АТР с радиоактивной меткой на месте последнего атома фосфора [γ-^{32}P]АТР добавить в экстракт дрожжей, то через несколько минут примерно половина ^{32}P окажется в P_i; при этом концентрация АТР остается неизменной. Объясните это. Если выполнить такой же эксперимент, используя [β-^{32}P]АТР, меченный ^{32}P в центральном положении, то в течение такого же короткого промежутка времени ^{32}P в P_i не появляется. Почему?

21. Распад АТР до AMP и PP_i в ходе метаболизма. Синтез активированной формы ацетата (ацетил-CoA) является АТР-зависимым процессом:

$$\text{Ацетат} + \text{CoA} + \text{АТР} \rightarrow \text{ацетил-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

а) $\Delta G'^\circ$ гидролиза ацетил-CoA до ацетата и CoA составляет −32,2 кДж/моль, а гидролиза АТР до AMP и PP_i −30,5 кДж/моль. Найдите $\Delta G'^\circ$ АТР-зависимого синтеза ацетил-CoA.

б) Почти в каждой клетке есть фермент неорганическая пирофосфатаза, катализирующая гидролиз PP_i до P_i. Какой эффект оказывает присутствие данного фермента на синтез ацетил-CoA? Объясните.

22. Энергия переноса H^+. Париетальные клетки желудка содержат мембранные «насосы», которые обеспечивают транспорт ионов водорода из цитозоля этих клеток (pH 7,0) в желудок, обеспечивая кислотность желудочному соку (pH 1,0). Найдите свободную энергию, необходимую для транспорта 1 моль ионов водорода с помощью этого насоса. *Подсказка.* См. гл. 11. Температура 25 °C.

23. Стандартные восстановительные потенциалы. Стандартный восстановительный потенциал E'° любой редокс-пары определяется для реакции полуячейки:

$$\text{Окислитель} + n\ \text{электронов} \rightarrow \text{восстановитель}$$

Для сопряженных редокс-пар NAD^+/NADH и пируват/лактат E'° = −0,32 В и −0,19 В соответственно.

а) Какая сопряженная пара обладает большей склонностью к потере электронов? Поясните.

б) Какой окислитель более сильный? Поясните.

в) Если начальная концентрация каждого реагента и продукта при pH 7 составляет 1 М, в каком направлении пойдет реакция?

$$\text{Пируват} + \text{NADH} + H^+ \rightleftharpoons \text{лактат} + NAD^+$$

г) Каково изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^\circ$ превращения пирувата в лактат при 25 °C?

д) Какова константа равновесия K'_{eq} этой реакции?

24. Энергетический спектр дыхательной цепи. Перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий можно представить суммарным уравнением

$$\text{NADH} + H^+ + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

а) Найдите $\Delta E'^\circ$ для суммарной реакции переноса электронов в митохондриях. Используйте значения E'° из табл. 13-7.

б) Найдите $\Delta G'^\circ$ этой реакции.

в) Сколько молекул АТР может образоваться *теоретически* в этой реакции, если в клетке свободная энергия синтеза АТР 52 кДж/моль?

25. Зависимость электродвижущей силы от концентрации. Найдите электродвижущую силу (в вольтах), регистрируемую электродом, который погружен в раствор, содержащий следующие смеси NAD^+ и NADH при pH 7,0 и 25 °C относительно полуячейки с E'° 0,00 В:

а) 1,0 мМ NAD^+ и 10 мМ NADH;
б) 1,0 мМ NAD^+ и 1,0 мМ NADH;
в) 10 мМ NAD^+ и 1,0 мМ NADH.

26. Электронное сродство соединений. Расположите следующие вещества в порядке увеличения стремления получать электроны: а) α-кетоглутарат + CO_2 (с образованием изоцитрата); б) оксалоацетат; в) O_2; г) $NADP^+$.

27. Направление окислительно-восстановительных реакций. Какая из следующих реакций (по вашему мнению) должна идти в прямом направлении в стандартных условиях, если предположить, что имеются соответствующие ферменты, катализирующие их?

а) Малат + NAD^+ → → оксалоацетат + NADH + H^+

б) Ацетоацетат + NADH + H^+ → → β-гидроксибутират + NAD^+

в) Пируват + NADH + H^+ → лактат + NAD^+

г) Пируват + β-гидроксибутират → → лактат + ацетоацетат

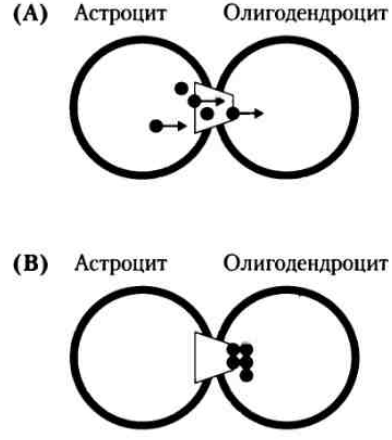
д) Малат + пируват → оксалоацетат + лактат

е) Ацетальдегид + сукцинат → → этанол + фумарат

Анализ экспериментальных данных

28. «Хитрая» термодинамика. Термодинамика — один из самых интересных разделов науки, однако интерпретация ее законов не всегда правильна. В качестве забавного примера рассмотрим фрагмент работы, выполненной Робинсоном, Хэмпсоном, Манро и Вани и опубликованной в журнале *Science* в 1993 г. В работе изучалась миграция небольших молекул между соседними клетками нервной системы через синаптическую щель. Выяснилось, что красители люцифер желтый (небольшая отрицательно заряженная молекула) и биоцитин (небольшой цвиттер-ион) перемещались между клетками глии двух типов (между вспомогательными клетками нервной системы) только в одном направлении. После инъекции красителей в астроциты они быстро проникали в соседние астроциты, олигодендроциты или клетки Мюллера, однако после инъекции красителей в олигодендроциты или клетки Мюллера они лишь слабо и медленно проникали в астроциты. Все эти типы клеток разделены между собой синаптическими щелями.

Хотя это и не было основной целью работы, авторы все же предложили молекулярную модель такого однонаправленного транспорта (см. рис.).



Подпись к этому рисунку гласит: «Модель однонаправленной диффузии красителей между соседними олигодендроцитами и астроцитами, основанная на различии диаметров пор. Подобно рыбе в ловушке, молекулы красителя (черные кружки) могут проходить из астроцитов в олигодендроциты (А), но не в обратном направлении (Б)».

Хотя эта статья и прошла рецензирование перед публикацией в этом авторитетном журнале, в 1994 г. редакция журнала получила несколько писем, в которых указывалось, что утверждения Робинсона с соавторами нарушают второе начало термодинамики.

а) Объясните, почему предложенная модель нарушает второе начало термодинамики. *Подсказка.* Рассмотрите, что было бы с энтропией системы, если бы в астроцитах и олигодендроцитах, разделенных синаптической щелью типа «ловушки для рыбы», в начальный момент времени была бы одинаковая концентрация красителя.

б) Объясните, почему данная модель непригодна для описания поведения малых молекул, хотя хорошо описывает рыбную ловлю.

в) Объясните, почему рыба попадает в ловушку, но не может из нее выбраться.

г) Предложите два возможных механизма для объяснения однонаправленного транспорта молекул красителя между клетками, которые бы не нарушали второго начала термодинамики.

Литература

Letters to the editor. (1994) *Science* **265**, 1017–1019.

Robinson, S.R., Hampson, E.C.G.M., Munro, M.N., & Vaney, D.I. (1993) Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia. *Science* **262**, 1072–1074.

Спиртовое брожение, которое лежит в основе чудесного и, по-видимому, самопроизвольного процесса превращения простого виноградного сока в возбуждающее вино, с древних времен привлекало внимание естествоиспытателей.

Артур Гарден, Alcoholic Fermentation (Спиртовое брожение), *1923*

14

Гликолиз, глюконеогенез и пентозофосфатный путь

14.1. Гликолиз 66

14.2. Метаболические пути, питающие гликолиз 86

14.3. Превращение пирувата в анаэробных условиях: брожение 90

14.4. Глюконеогенез 97

14.5. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы 107

В метаболизме растений, животных и многих микроорганизмов глюкоза занимает центральное место. Молекула глюкозы богата энергией и поэтому используется клетками в качестве «топлива». Полное окисление глюкозы до углекислого газа и воды сопровождается изменением свободной энергии, равным −2840 кДж/моль. В клетках глюкоза запасается в виде высокомолекулярных соединений крахмала или гликогена, что позволяет накапливать большое количество гексозных звеньев и при этом сохранять сравнительно низкую осмолярность цитозоля. При увеличении энергетических затрат клетки глюкоза высвобождается из внутриклеточных запасов и используется для продуцирования ATP аэробным или анаэробным путем.

Глюкоза не только прекрасный источник энергии, но и универсальный предшественник, из которого в реакциях биосинтеза образуется множество интермедиатов. Например, бактерия *Escherichia coli* производит из глюкозы углеродные скелеты всех аминокислот, нуклеотидов, коферментов, жирных кислот и других продуктов, необходимых ей для роста. Для полного понимания метаболических процессов с участием глюкозы необходимо было бы рассмотреть сотни или даже тысячи различных реакций. В клетках животных и в клетках сосудистых растений глюкоза претерпевает превращения трех основных типов: 1) запасается в виде полисахаридов или сахарозы; 2) путем гликолиза окисляется до трикарбоновых соединений (пирувата) с образованием ATP и различных интермедиатов метаболизма; 3) по пентозофосфатному (фосфоглюконатному) пути окисляется до рибозо-5-фосфата, необходимого для синтеза нуклеиновых кислот и NADPH, участвующего в восстановительных реакциях биосинтеза **(рис. 14-1)**.

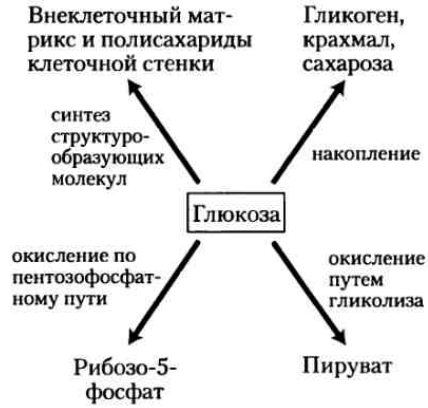


Рис. 14-1. Основные пути использования глюкозы в клетке. Глюкоза претерпевает и другие превращения, однако в большинстве клеток наиболее существенные количества глюкозы расходуются именно по этим трем самым важным направлениям.

Те организмы, которые не могут получить глюкозу из других источников, должны синтезировать ее самостоятельно. Фотосинтезирующие организмы образуют глюкозу из атмосферного CO_2, превращая его триозу и далее в глюкозу. Нефотосинтезирующие клетки производят глюкозу из более простых трех- и четырехуглеродных предшественников в глюконеогенезе (процессе, обратном гликолизу), где эффективно используются многие гликолитические ферменты.

В данной главе мы остановимся на отдельных реакциях гликолиза, глюконеогенеза и пентозофосфатного пути и обсудим функциональное значение каждого из этих путей. Кроме того, мы рассмотрим различные превращения пирувата, образующегося в результате гликолиза; к ним относятся процессы брожения, используемые многими организмами в анаэробных условиях для получения ATP, а человеком для промышленного производства этилового спирта, молочной кислоты и других важных продуктов. Мы также разберем метаболические пути, поставляющие для гликолиза различные сахара из моно-, ди- и полисахаридов. Обсуждение метаболизма глюкозы продолжается в гл. 15, где рассматриваются процессы анаболизма и катаболизма, связывающие глюкозу с гликогеном. Механизмы регуляции метаболизма мы проиллюстрируем на примере реакций синтеза и деградации углеводов. Пути биосинтеза полисахаридов внеклеточного матрикса и клеточных стенок из глюкозы обсуждаются в гл. 20.

14.1. Гликолиз

В процессе **гликолиза** (от греч. *glykys* — сладкий или сахар и *lysis* — разрушение) происходит последовательное ферментативное расщепление молекулы глюкозы с образованием двух молекул трехуглеродного соединения пирувата. Часть высвобождающейся в этом процессе свободной энергии запасается в виде ATP и NADH. Из всех метаболических путей последовательность реакций гликолиза была установлена первой, и он, по-видимому, изучен лучше всего. Начиная с открытия Эдуардом Бухнером в 1897 г. ферментации в дрожжевом экстракте и вплоть до установления полного метаболического пути в дрожжах (работы Отто Варбурга и Ганса Эйлера-Челпина) и в мышцах (работы Густава Эмбдена и Отто Мейергофа) в 1930-х гг. основное направление биохимических исследований было сконцентрировано на реакциях гликолиза в дрожжевом экстракте и мышцах. Изменение научных взглядов под влиянием данного открытия было сформулировано Жаком Лебом в 1906 г.:

> «Благодаря открытию Бухнера биология освободилась еще от одного мифа. Разложение сахара на CO_2 и спирт нельзя считать проявлением «принципа витализма», как и расщепление тростникового сахара инвертазой. История данного вопроса поучительна, поскольку не позволяет считать, что те или иные проблемы находятся вне нашего понимания лишь по той причине, что они пока еще не нашли своего объяснения.»

Ганс Эйлер-Челпин, 1873–1964

Густав Эмбден, 1874–1933

Отто Мейергоф, 1884–1951

Исследование процесса гликолиза стимулировало развитие методов очистки ферментов, помогло осознать роль коферментов, например NAD, а также выявить ключевую метаболическую функцию ATP и других фосфорилированных соединений. Были очищены и детально изучены гликолитические ферменты из многих видов организмов.

Гликолиз — практически универсальный центральный путь катаболизма глюкозы; в большинстве клеток в этом процессе происходит превращение основных количеств углеродсодержащих соединений. В некоторых клетках и тканях млекопитающих (например, эритроцитах, мозговом веществе почки, головном мозге, сперме) гликолитическое расщепление глюкозы — это единственный источник метаболической энергии. Некоторые ткани растений, служащие для накопления крахмала (картофельные клубни), а также ряд водных растений (например, водяной кресс) получают большую часть необходимой им энергии в процессе гликолиза; многие анаэробные организмы полностью зависят от гликолиза.

Брожение — это общий термин, обозначающий анаэробное разложение глюкозы или других органических питательных веществ с целью высвобождения энергии, запасаемой в виде ATP. Поскольку живые организмы возникли в бескислородной атмосфере, анаэробное разложение глюкозы, возможно, самый древний биологический механизм, позволяющий получить энергию из органических молекул. В процессе эволюции данная последовательность химических превращений полностью сохранилась. Гликолитические ферменты позвоночных очень похожи на своих гомологов у дрожжей и шпината как по аминокислотной последовательности, так и по третичной структуре. У организмов разных видов гликолиз различается лишь деталями регуляции и судьбой образующегося пирувата. При этом термодинамические принципы и типы регуляторных механизмов, управляющих гликолизом, такие же, как и для всех метаболических путей в клетке. Итак, гликолиз играет важную роль в химии жизни и как модельный процесс он удобен для изучения общих принципов метаболизма.

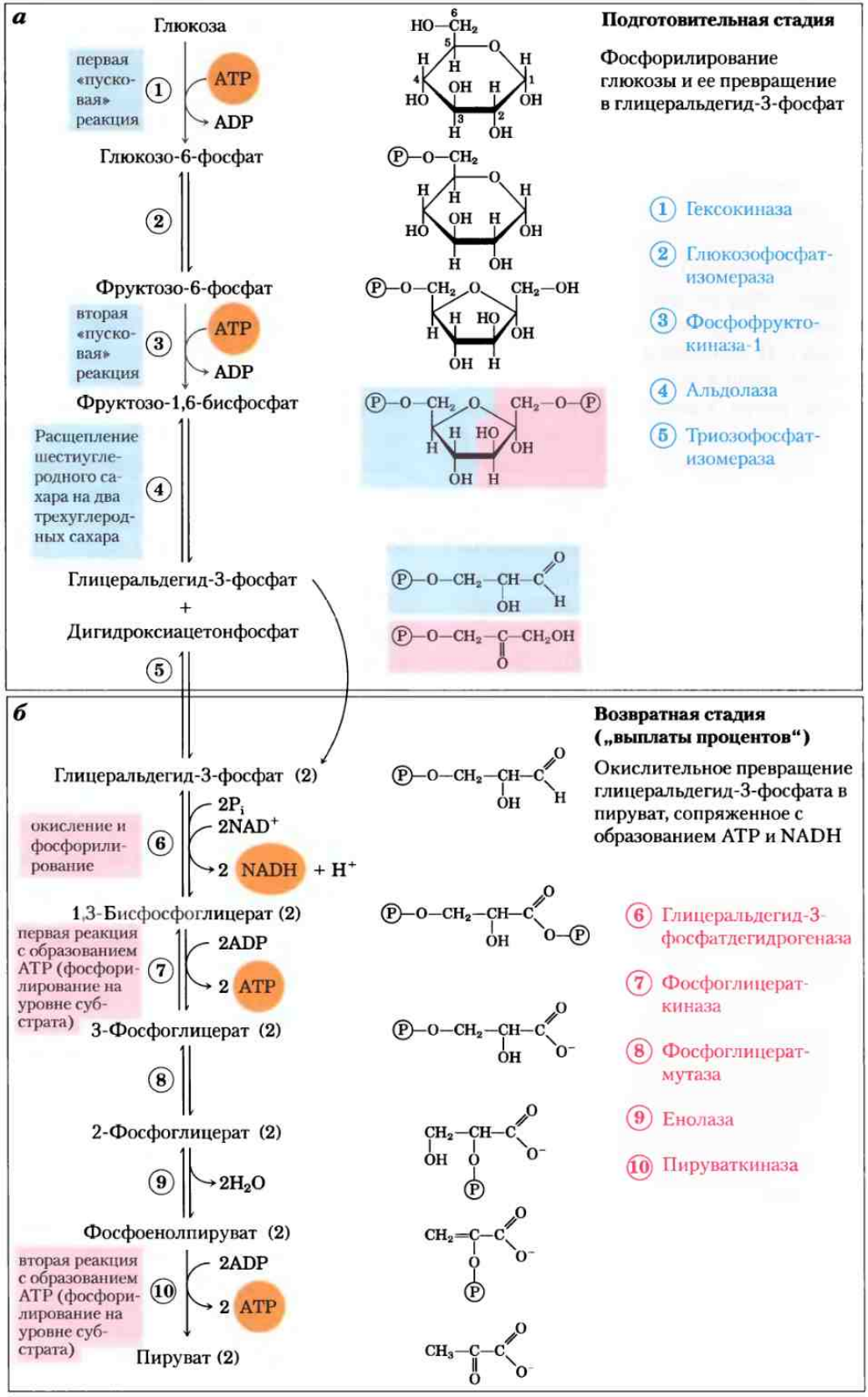
Прежде чем начать изучение отдельных стадий гликолиза, взглянем на этот процесс в целом.

Гликолиз протекает в две стадии

Расщепление шестиуглеродной глюкозы на две молекулы трехуглеродного пирувата представляет собой последовательность из 10 реакций, из которых первые пять называют *подготовительной стадией* (**рис. 14-2, *а***). Сначала глюкоза фосфорилируется по гидроксильной группе у атома C-6 (реакция ①). Образующийся при этом D-глюкозо-6-фосфат превращается в D-фруктозо-6-фосфат (реакция ②), который в свою очередь тоже фосфорилируется — теперь по атому C-1 — с образованием D-фруктозо-1,6-бисфосфата (реакция ③). В обеих реакциях фосфорилирования донором фосфорильной группы служит ATP. Поскольку все производные сахаров, образующиеся в процессе гликолиза, — D-изомеры, мы посчитали возможным здесь опустить в названиях соединений букву D, за исключением тех случаев, когда важно подчеркнуть их стереохимические свойства.

Фруктозо-1,6-бисфосфат распадается с образованием двух трехуглеродных молекул — дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата (реакция ④; именно эта стадия «лизиса» дает название всему процессу). Затем в результате изомеризации дигидроксиацетонфосфата образуется вторая молекула глицеральдегид-3-фосфата (реакция ⑤); на этом заканчивается первая стадия гликолиза. Далее мы с химической точки зрения обсудим подробнее, насколько важную роль играет стадия изомеризации (реакция ②) для фосфорилирования и разрушения связи C—C в реакциях ③ и ④. Обратите внимание, что до стадии расщепления глюкозы на трехуглеродные соединения расходуются две молекулы ATP; несколько позже эти затраты ATP будут не только компенсированы, но и перекрыты. Итак, на подготовительной стадии гликолиза энергия, заключенная в ATP, увеличивает потенциальную энергию интермедиатов; углеродные цепи всех расщепляемых гексоз превращаются в один и тот же продукт — глицеральдегид-3-фосфат.

Вторая (возвратная) стадия гликолиза (стадия *«выплаты процентов»*) сопровождается высвобождением энергии (рис. 14-2, *б*). Каждая молекула глицеральдегид-3-фосфата окисляется и фосфорилируется под действием неорганического фосфата (*не* ATP!) с образованием 1,3-бисфосфоглицерата (реакция ⑥). При превращении двух молекул 1,3-бисфоглицерата в две молекулы пирувата (реакции ⑦–⑩) происходит высвобождение энергии.


а
Глюкоза
первая «пусковая» реакция
1
ATP
ADP
Глюкозо-6-фосфат
2
Фруктозо-6-фосфат
вторая «пусковая» реакция
3
ATP
ADP
Фруктозо-1,6-бисфосфат
Расщепление шестиуглеродного сахара на два трехуглеродных сахара
4
Глицеральдегид-3-фосфат
+
Дигидроксиацетонфосфат
5
Подготовительная стадия
Фосфорилирование глюкозы и ее превращение в глицеральдегид-3-фосфат
1 Гексокиназа
2 Глюкозофосфат-изомераза
3 Фосфофруктокиназа-1
4 Альдолаза
5 Триозофосфат-изомераза
б
Глицеральдегид-3-фосфат (2)
окисление и фосфорилирование
6
2Pi
2NAD+
2 NADH + H+
1,3-Бисфосфоглицерат (2)
первая реакция с образованием АТР (фосфорилирование на уровне субстрата)
7
2ADP
2 ATP
3-Фосфоглицерат (2)
8
2-Фосфоглицерат (2)
9
2H2O
Фосфоенолпируват (2)
вторая реакция с образованием АТР (фосфорилирование на уровне субстрата)
10
2ADP
2 ATP
Пируват (2)
Возвратная стадия („выплаты процентов“)
Окислительное превращение глицеральдегид-3-фосфата в пируват, сопряженное с образованием АТР и NADH
6 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
7 Фосфоглицераткиназа
8 Фосфоглицератмутаза
9 Енолаза
10 Пируваткиназа

В результате сопряженного фосфорилирования четырех молекул ADP большая часть этой энергии накапливается в виде ATP. Общий выход ATP в процессе гликолиза, однако, составляет не четыре, а лишь две молекулы на одну молекулу глюкозы, поскольку две молекулы ATP расходуются на подготовительной стадии. Кроме того, энергия, высвобождающаяся на второй стадии гликолиза, запасается в виде двух молекул NADPH в расчете на одну молекулу глюкозы.

В процессе гликолиза происходят превращения трех разных типов: 1) расщепление углеродного скелета глюкозы с образованием пирувата; 2) фосфорилирование ADP до ATP под действием высокоэнергетических фосфорилированных соединений, образующихся при гликолизе; 3) перенос гидрид-иона на NAD^+ с образованием NADH.

Превращения молекулы пирувата. За исключением нескольких интересных случаев среди бактерий у всех остальных организмов образующийся в результате гликолиза пируват претерпевает дальнейшие превращения по одному из трех основных путей катаболизма. У аэробных организмов и в тканях при аэробных условиях гликолиз — это всего лишь первая стадия полного расщепления глюкозы **(рис. 14-3)**. При окислении пирувата образуется ацетогруппа ацетилкофермента А, а карбоксильная группа пирувата превращается в CO_2. Далее ацетогруппа полностью окисляется до CO_2 в цикле лимонной кислоты (гл. 16). Эти процессы сопровождаются переносом электронов на молекулу O_2 с образованием H_2O в митохондриях. Энергия, высвобождаемая при переносе электронов, является движущей силой образования ATP в митохондриях (гл. 19).

Рис. 14-3. Возможные пути катаболизма пирувата, образующегося в результате гликолиза. Пируват, кроме того, служит предшественником во многих реакциях анаболизма, которые здесь не изображены.

Второй возможный путь превращения пирувата — его восстановление до лактата в процессе **молочнокислого брожения**. При интенсивной работе мышц в условиях недостатка кислорода **(гипоксия)** NADH не может вновь превращаться в NAD^+, однако NAD^+ как акцептор электронов необходим для дальнейшего окисления пирувата. В таких условиях пируват восстанавливается до лактата, принимая электроны от NADH, в результате чего образуется NAD^+, необходимый для продолжения гликолиза. Некоторые типы клеток и тканей (например, клетки сетчатки и эритроциты) превращают глюкозу в лактат даже в аэробных условиях; кроме того, некоторые микроорганизмы также образуют лактат в процессе гликолиза в анаэробных условиях (рис. 14-3).

На третьем основном пути катаболизма пируват превращается в этиловый спирт. Превращение пирувата в этанол и CO_2 в некоторых тканях растений, у определенных видов беспозвоночных, простейших и микроорганизмов (например, у пекарских дрожжей) при недостатке кислорода или в анаэробных условиях называют **спиртовым брожением** (рис. 14-3).

Рис. 14-2. Две стадии гликолиза. На подготовительной стадии (*а*) из каждой молекулы глюкозы образуются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата; обе эти молекулы претерпевают дальнейшие превращения на возвратной стадии. *б* — конечным продуктом второй стадии гликолиза является пируват. На первой стадии гликолиза на одну молекулу глюкозы расходуются две молекулы ATP, а на второй стадии образуются четыре молекулы ATP, что в сумме приводит к образованию двух молекул ATP на каждую молекулу глюкозы, превращенную в пируват. Нумерация реакций на схеме соответствует нумерации в тексте; ферменты, катализирующие соответствующие реакции, перечислены справа. Помните, что каждая фосфорильная группа, обозначенная здесь как Ⓟ, несет два отрицательных заряда ($—PO_3^{2-}$).

Окисление пирувата — важный процесс катаболизма, однако пируват участвует и в реакциях анаболизма. Например, на его основе строится углеродный скелет аминокислоты аланина. Мы рассмотрим эти реакции пирувата в последующих главах.

Образование ATP и NADH в процессе гликолиза. Часть энергии, запасенной в молекуле глюкозы, в результате гликолиза переходит в ATP, а часть сохраняется в пирувате. Полное уравнение гликолиза можно записать следующим образом:

$$\text{Глюкоза} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\ \text{пируват} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (14\text{-}1)$$

При разложении каждой молекулы глюкозы до пирувата происходит образование двух молекул ATP из ADP и P_i и двух молекул NADH при восстановлении NAD^+. Акцептором водорода в данной реакции выступает NAD^+ (см. рис. 13-24), связанный с мотивом укладки Россмана (см. рис. 13-25). Восстановлению NAD^+ предшествует ферментативный перенос гидрид-иона ($:H^-$) от альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата на никотинамидное кольцо NAD^+, что приводит к образованию восстановленной формы кофермента NADH. Другой атом водорода из молекулы субстрата высвобождается в раствор как H^+.

Мы можем записать гликолиз в виде двух отдельных реакций — экзергонической реакции (превращение глюкозы в пируват)

$$\text{Глюкоза} + 2\text{NAD}^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\ \text{пируват} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ \quad (14\text{-}2)$$
$$\Delta G_1'^\circ = -146\ \text{кДж/моль}$$

и эндергонической (образование ATP из ADP и P_i)

$$2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O} \quad (14\text{-}3)$$
$$\Delta G_2'^\circ = 2 \cdot 30{,}5\ \text{кДж/моль} = 61{,}0\ \text{кДж/моль}$$

Суммируя уравнения 14-2 и 14-3, получим изменение свободной энергии в процессе гликолиза ($\Delta G'^\circ_{\text{общ}}$):

$$\Delta G'^\circ_{\text{общ}} = \Delta G_1'^\circ + \Delta G_2'^\circ =$$
$$= -146\ \text{кДж/моль} + 61{,}0\ \text{кДж/моль} =$$
$$= -85\ \text{кДж/моль}$$

В стандартных условиях в клетке гликолиз необратим и проходит полностью (до конца) — большая отрицательная величина изменения свободной энергии.

Энергия, заключенная в пирувате. В результате гликолиза высвобождается лишь небольшая часть энергии, запасенной в молекуле глюкозы. Образующиеся две молекулы пирувата попрежнему содержат значительную долю энергии молекулы глюкозы, и эту энергию можно извлечь в ходе окислительных реакций в цикле лимонной кислоты (гл. 16) и окислительного фосфорилирования (гл. 19).

Роль фосфорилированных интермедиатов. Каждый из девяти интермедиатов на пути превращения глюкозы в пируват фосфорилирован (рис. 14-2). Фосфорильные группы, по-видимому, выполняют три функции.

1. Поскольку в плазматической мембране обычно нет переносчиков фосфорилированных сахаров, фосфорилированные интермедиаты не могут покинуть клетку. После первой же стадии фосфорилирования отпадает необходимость затрачивать энергию на удерживание интермедиатов внутри клетки, несмотря на большую разницу в их внутри- и внеклеточной концентрациях.

2. Фосфорильные группы играют важную роль в сохранении метаболической энергии. Энергия, высвобождающаяся при разрыве фосфоангидридной связи (например, в ATP), частично сохраняется благодаря образованию эфиров фосфорной кислоты (например, глюкозо-6-фосфата). Богатые энергией фосфорилированные соединения, образующиеся в процессе гликолиза (1,3-бисфосфоглицерат и фосфоенолпируват), отдают свою фосфорильную группу молекулам ADP, в результате чего образуется ATP.

3. Энергия связывания фосфатных групп в активных центрах ферментов снижает энергию активации и повышает специфичность ферментативных реакций (гл. 6). Фосфатные группы ADP, ATP и интермедиатов гликолиза образуют комплексы с ионами Mg^{2+}, а центры связывания субстратов многих гликолитических ферментов специфичны к этим комплексам. Большинству гликолитических ферментов для проявления активности требуются ионы Mg^{2+}.

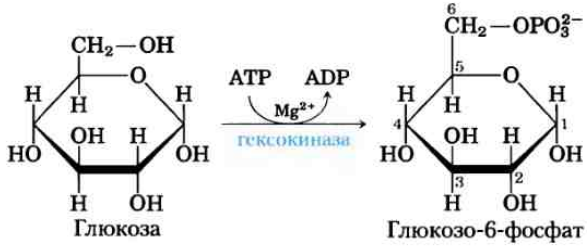
На подготовительной стадии гликолиза расходуется АТР

На подготовительной стадии гликолиза расходуются две молекулы АТР, а фосфорилированный шестиуглеродный сахар расщепляется на два фосфорилированных трехуглеродных сахара. Понимание того, что интермедиатами гликолиза являются именно *фосфорилированные* гексозы, было достигнуто не сразу и в некотором смысле случайно. В 1906 г. Артур Гарден и Уильям Янг проверяли свою гипотезу, в соответствии с которой ингибиторы протеолитических ферментов должны стабилизировать ферменты в дрожжевом экстракте при сбраживании глюкозы. Они добавляли к дрожжевому экстракту сыворотку крови (в которой, как было известно, содержатся ингибиторы протеолитических ферментов) и действительно наблюдали усиление метаболизма глюкозы. Однако контрольный эксперимент, целью которого было продемонстрировать отсутствие стимулирующей активности сыворотки после кипячения, показал, что сыворотка и после кипячения оказывала такое же стимулирующий эффект на гликолиз. Тщательный анализ содержимого прокипяченной сыворотки показал, что стимулирующий эффект связан с наличием неорганического фосфата. Вскоре Гарден и Янг обнаружили, что глюкоза, добавленная к дрожжевому экстракту, превращалась в гексозобисфосфат («эфир Гардена–Янга», идентифицированный впоследствии как фруктозо-1,6-бисфосфат). Это открытие дало начало длительной серии исследований, посвященных изучению функций органических эфиров фосфорной кислоты в биохимии, в результате которых сложились наши современные представления о центральной роли переноса фосфорильных групп.

Артур Гарден, 1865–1940

Уильям Янг, 1878–1942

① **Фосфорилирование глюкозы.** В первой реакции гликолиза происходит активация глюкозы путем ее фосфорилирования по атому С-6, в результате чего образуется **глюкозо-6-фосфат**; донором фосфорильной группы является АТР:



$\Delta G'^{\circ} = -16{,}7$ кДж/моль

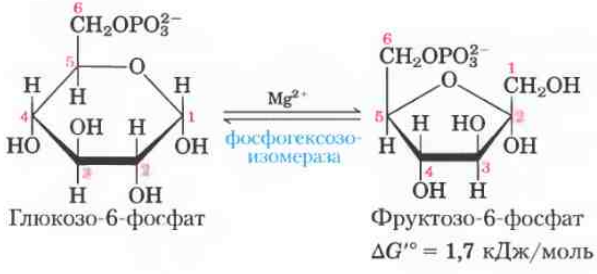
Эта необратимая во внутриклеточных условиях реакция катализируется **гексокиназой**. Вспомните, что киназами называют ферменты, катализирующие перенос концевой фосфорильной группы от АТР на нуклеофильную акцепторную молекулу (см. рис. 13-20). Киназы относятся к классу ферментов трансфераз (см. табл. 6-3). В случае гексокиназы акцептором выступает гексоза (обычно D-глюкоза, хотя в некоторых тканях гексокиназы катализируют также фосфорилирование других распространенных гексоз, таких как D-фруктоза и D-манноза).

Как и многим другим ферментам, гексокиназе для проявления активности необходимы ионы Mg^{2+}, поскольку на самом деле субстратом данного фермента выступает не ATP^{4-}, а комплекс $MgATP^{2-}$ (см. рис. 13-2). Ионы Mg^{2+} экранируют отрицательные заряды фосфорильных групп АТР, в результате чего концевой атом фосфора становится более доступным для нуклеофильной атаки –ОН-группой глюкозы. При связывании глюкозы молекула гексокиназы претерпевает значительные изменения (индуцированное соответствие), а при связывании АТР два домена белка сближаются на ~8 Å (см. рис. 6-22, т. 1). В результате такого смещения связанная молекула АТР приближается к связанной молекуле глюкозы, что предотвращает проникновение окружающей воды. В противном случае вода могла бы попадать в активный центр и атаковать (гидролизовать) фосфоангидридные связи АТР. Подобно девяти другим ферментам гликолиза, гексокиназа представляет собой растворимый белок, находящийся в цитозоле.

Гексокиназа есть почти у всех организмов. В геноме человека закодированы четыре гексокиназы (I–IV), и все они катализируют одну и ту же реакцию. Ферменты, катализирующие одну и

ту же реакцию, но кодируемые разными генами, называют **изоферментами** (см. доп. 15-2). Одна из форм, присутствующая в гепатоцитах, гексокиназа IV (она же глюкокиназа) отличается от всех других форм гексокиназы своими кинетическими и регуляторными свойствами, что имеет важное физиологическое значение (см. разд. 15.3).

② Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Фермент фосфоглюкоизомераза **(глюкозофосфатизомераза)** катализирует обратимую изомеризацию альдозы глюкозо-6-фосфата и кетозы фруктозо-6-фосфата:



Механизм этой реакции включает образование промежуточного эндиола **(рис. 14-4)**. Реакция легко протекает в обоих направлениях, что связано с небольшим изменением свободной энергии. Изомеризация играет принципиальную роль для всего процесса гликолиза, поскольку перегруппировки карбонильной и гидроксильной групп у атомов С-1 и С-2 необходимы для протекания двух следующих реакций. Для реакции фосфорилирования (реакция ③) требуется, чтобы у атома С-1 появилась спиртовая группа, а для расщепления связи между атомами С-3 и С-4 (реакция ④) важно, чтобы у атома С-2 находилась карбонильная группа (с. 22).

③ Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-бисфосфата. Во второй из двух «пусковых» реакций гликолиза фосфофруктокиназа-1 (PFK-1) катализирует перенос фосфорильной группы АТР на

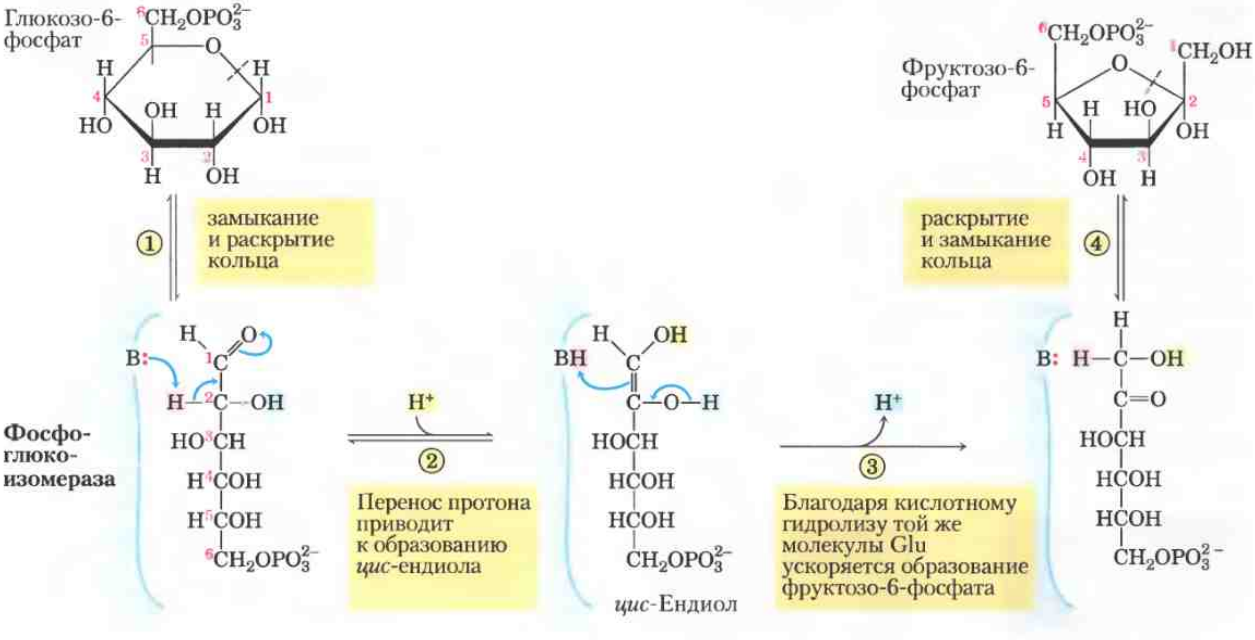
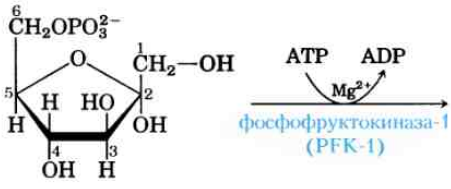
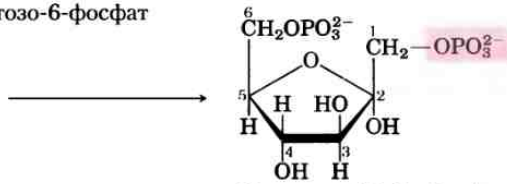


Рис. 14-4. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Реакция, катализируемая фосфоглюкоизомеразой. В раскрытии и замыкании кольца (стадии ① и ④) принимает участие остаток His активного центра (для простоты здесь не показан). Протон (выделен розовым цветом), исходно находящийся у атома С-2, становится более подвижным благодаря смещению электронов к карбонильному кислороду и кислороду соседней гидроксильной группы. После переноса протона от атома С-2 на остаток Glu (слабая кислота) в активном центре он свободно обменивается на протоны из раствора, так что вовсе не обязательно, что на стадии ③ к атому С-1 присоединяется тот же самый протон. ● **Механизм действия фосфоглюкоизомеразы**

фруктозо-6-фосфат, в результате чего образуется фруктозо-1,6-бисфосфат:



Фруктозо-6-фосфат



Фруктозо-1,6-бисфосфат

$\Delta G'^{\circ} = -14{,}2$ кДж/моль

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Соединения, имеющие в своем составе две фосфатные или фосфорильные группы, присоединенные к разным участкам молекулы, называют *бисфосфатами* (или *бисфосфосоединениями*); например, фруктозо-1,6-бисфосфат и 1,3-бисфосфоглицерат. Соединения с двумя соединенными между собой фосфатными группами, как в пирофосфорильной группе, называют *дифосфатами*; например, аденозиндифосфат ADP. Те же правила используются и в номенклатуре соединений с тремя фосфатными группами: различают *трисфосфаты* (например, инозит-1,4,5-трисфосфат) и *трифосфаты* (например, аденозинтрифосфат ATP). ■

Фермент, который превращает фруктозу во фруктозо-1,6-бисфосфат, называется PFK-1, чтобы отличить его от другого фермента PFK-2, который катализирует в другом метаболическом пути образование фруктозо-2,6-бисфосфата из фруктозо-6-фосфата. Во внутриклеточных условиях реакция, катализируемая PFK-1, необратима; это первый «контрольный пункт» гликолиза. Глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат могут претерпевать и другие превращения, однако фруктозо-1,6-бисфосфат задействован лишь в гликолизе.

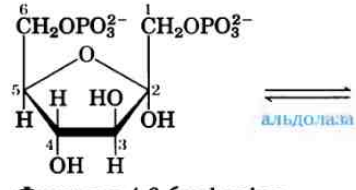
Фосфофруктокиназы некоторых бактерий, простейших, а также, по-видимому, всех растений в качестве донора фосфатной группы для синтеза фруктозо-1,6-бисфосфата используют пирофосфат PP_i, а не ATP:

$$\text{Фруктозо-6-фосфат} + PP_i \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{фруктозо-1,6-бисфосфат} + P_i$$

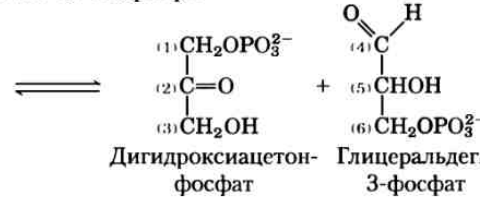
$\Delta G'^{\circ} = -14$ кДж/моль

Фосфофруктокиназа-1 — один из ферментов со сложной аллостерической регуляцией. Его активность возрастает всякий раз, когда в клетке уменьшаются запасы ATP или начинают накапливаться продукты его распада — ADP и особенно AMP. Напротив, фермент ингибируется, когда в клетке оказывается достаточное количество ATP, а также других топливных молекул, например жирных кислот. У некоторых организмов фруктозо-2,6-бисфосфат (не путайте с фруктозо-1,6-бисфосфатом, образующимся при действии PFK-1) является мощным аллостерическим активатором PFK-1. Рибулозо-5-фосфат, промежуточное соединение пентозофосфатного пути, который обсуждается ниже в данной главе, также косвенным путем активирует фосфофруктокиназу. Более подробно разные уровни регуляции этой стадии гликолиза обсуждаются в гл. 15.

④ **Расщепление фруктозо-1,6-бисфосфата.** Фермент **фруктозодифосфатальдолаза**, который часто называют просто **альдолазой**, катализирует обратимую реакцию альдольной конденсации (см. рис. 13-4). Фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется с образованием двух триозофосфатов — альдозы **глицеральдегид-3-фосфата** и кетозы **дигидроксиацетонфосфата**:



Фруктозо-1,6-бисфосфат



Дигидроксиацетонфосфат

Глицеральдегид-3-фосфат

$\Delta G'^{\circ} = 23{,}8$ кДж/моль

Существует два класса альдолаз. Альдолазы I, обнаруженные в клетках растений и животных, действуют в соответствии с механизмом, изображенным на **рис. 14-5**. Ферменты класса II, присутствующие в грибах и бактериях, не образуют основания Шиффа в качестве промежуточного соединения. Ион цинка в активном центре этих ферментов координирован

с карбонильным кислородом у атома С-2; Zn^{2+} поляризует карбонильную группу и стабилизирует енольное производное, образующееся при расщеплении связи С–С.

Хотя реакция расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата характеризуется положительным изменением стандартной свободной энергии, при низких внутриклеточных концентрациях реагирующих веществ реальное изменение свободной энергии невелико, поэтому альдолазная реакция может протекать в обоих направлениях. Далее мы увидим, что в глюконеогенезе альдолаза катализирует обратную реакцию (см. рис. 14-16).

⑤ **Взаимопревращения триозофосфатов.** В последующих стадиях гликолиза непосредственное участие может принимать лишь один из двух триозофосфатов, образованных альдолазой, а именно, глицеральдегид-3-фосфат. Другой про-

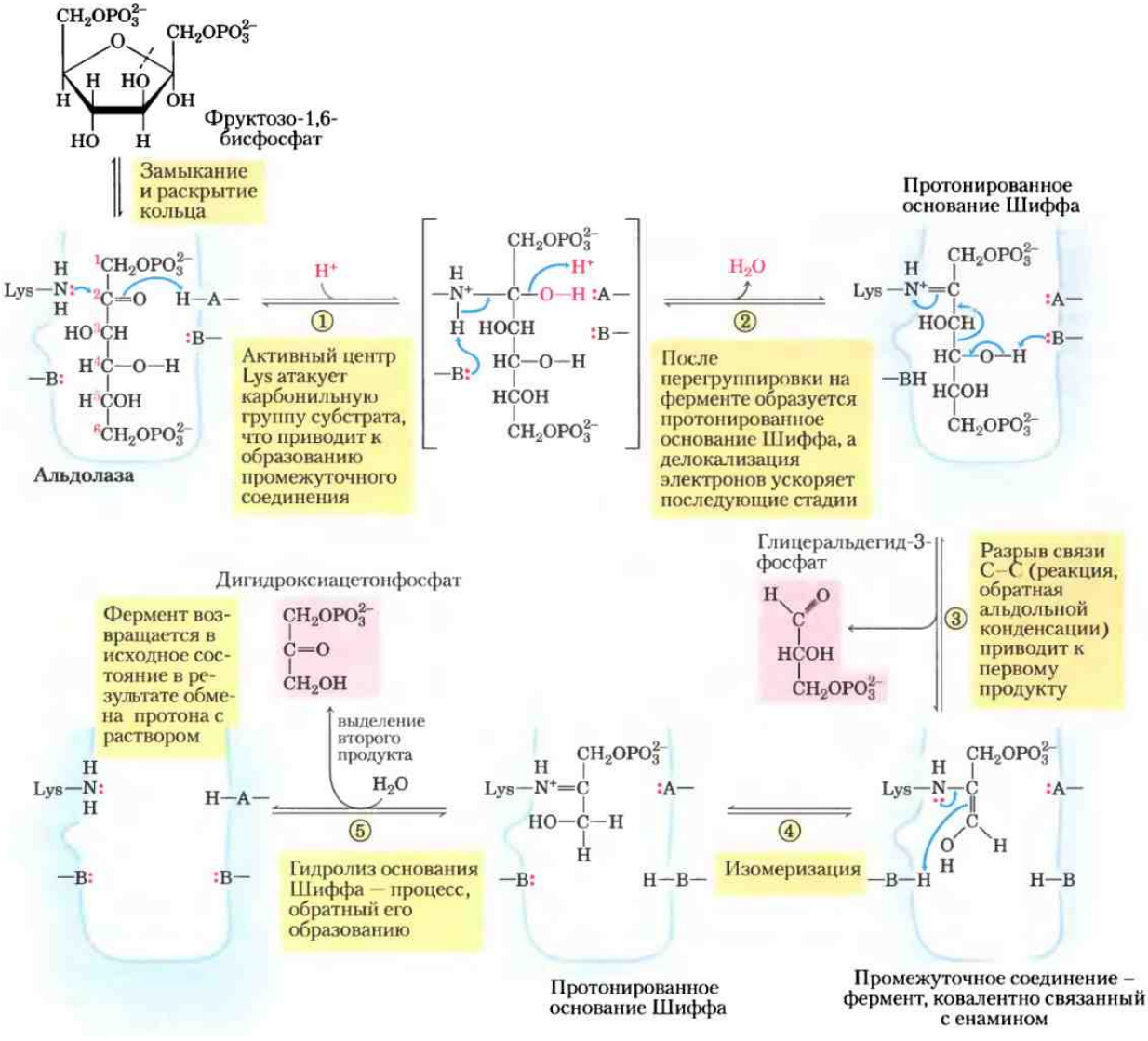


Рис. 14-5. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Реакция, катализируемая альдолазой I. Здесь изображена реакция, обратная альдольной конденсации. Обратите внимание, что расщепление связи между С-3 и С-4 зависит от наличия карбонильной группы у атома С-2. A и B — аминокислотные остатки.

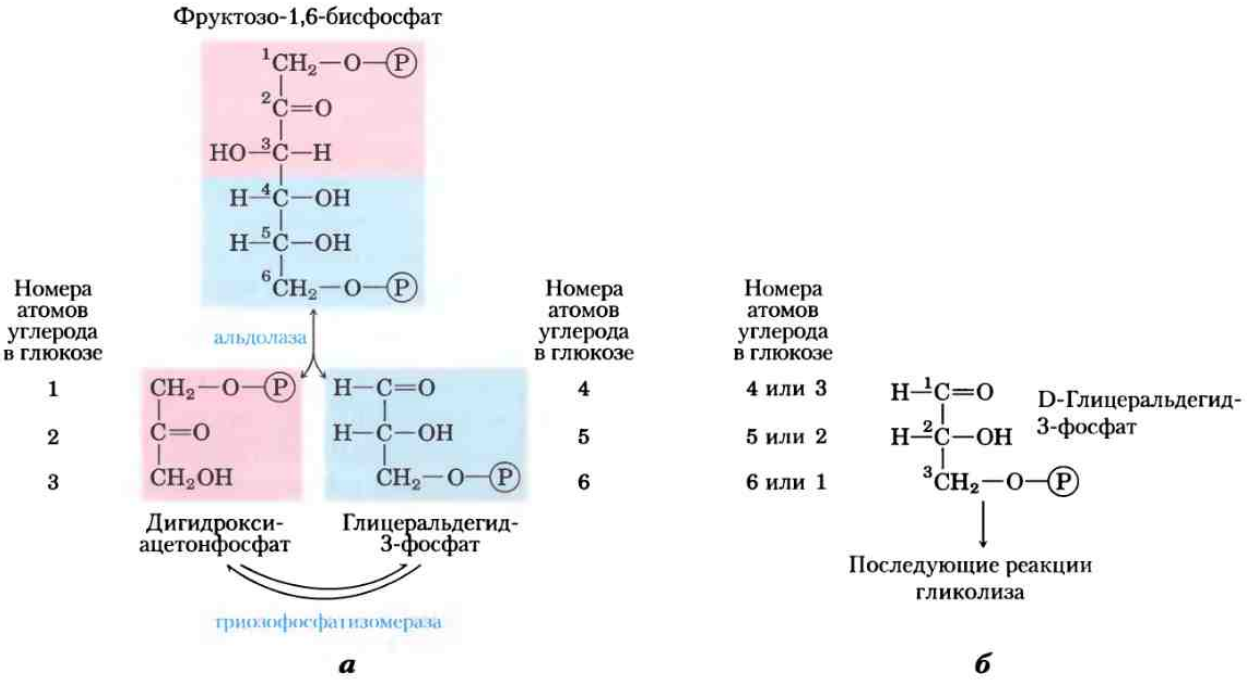


Рис. 14-6. Судьба атомов углерода при превращении глюкозы в глицеральдегид-3-фосфат. *а* — происхождение атомов углерода у двух трехуглеродных продуктов в реакциях, катализируемых альдолазой и триозофосфатизомеразой. Конечный продукт этих двух реакций — глицеральдегид-3-фосфат (2 молекулы). *б* — в молекуле глицеральдегид-3-фосфата атомы углерода происходят из одного из двух определенных атомов углерода молекулы глюкозы. Заметьте, что нумерация атомов глицеральдегид-3-фосфата отличается от нумерации углеродной цепочки в глюкозе, из которой он образован. В молекуле глицеральдегид-3-фосфата углерод наиболее сложной функциональной группы (карбонильной группы) имеет первый номер, С-1. Подобное изменение нумерации важно учитывать при интерпретации результатов экспериментов с глюкозой, несущей один меченный изотопной меткой углерод (см. в конце главы задачи 3 и 5).

дукт дигидроксиацетонфосфат быстро и обратимо превращается в глицеральдегид-3-фосфат под действием пятого фермента гликолиза **триозофосфатизомеразы**:

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5$ кДж/моль

Механизм этой реакции аналогичен механизму катализируемой фосфоглюкоизомеразой реакции ② (рис. 14-4). После действия триозофосфатизомеразы в исходной молекуле глюкозы атомы С-1, С-2 и С-3 химически неразличимы от атомов С-4, С-5 и С-6 соответственно (**рис. 14-6**) — обе «половинки» молекулы глюкозы превращаются в глицеральдегид-3-фосфат.

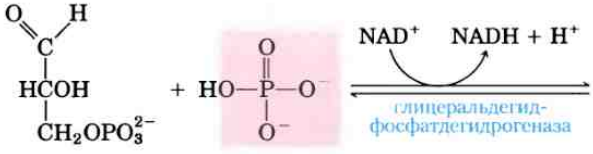
Этой реакцией завершается подготовительная стадия гликолиза: фосфорилирование молекулы гексозы по положениям 1 и 6 и ее расщепление с образованием двух молекул глицеральдегид-3-фосфата.

На второй стадии гликолиза образуются ATP и NADH

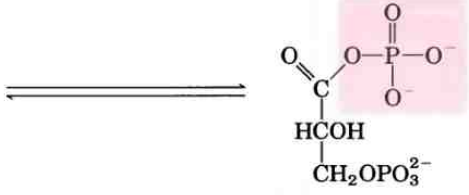
Вторая (возвратная) стадия гликолиза (стадия «выплаты процентов», рис. 14-2, *б*) включает реакции фосфорилирования, в ходе которых часть свободной энергии из исходной молекулы глюкозы запасается в форме ATP. Выше мы показа-

ли, что из одной молекулы глюкозы получаются две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, которые претерпевают дальнейшие превращения на второй стадии гликолиза. Превращение двух молекул глицеральдегид-3-фосфата в две молекулы пирувата сопровождается образованием четырех молекул ATP из ADP. Однако в расчете на одну молекулу глюкозы суммарный выход ATP составляет лишь две молекулы, поскольку две молекулы ATP были израсходованы на подготовительной стадии гликолиза для фосфорилирования двух концевых углеродов молекулы гексозы.

⑥ Окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата. Первая реакция на второй стадии гликолиза — окисление глицеральдегид-3-фосфата до **1,3-бисфосфоглицерата**, катализируемое **глицеральдегидфосфатдегидрогеназой**:



Глицеральдегид-3-фосфат — Неорганический фосфат



1,3-Бисфосфоглицерат

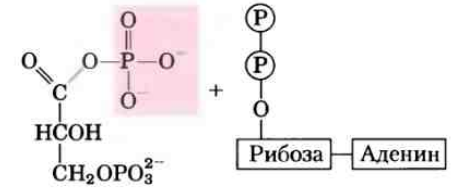
$\Delta G'^{\circ} = 6{,}3$ кДж/моль

Это первая из двух реакций гликолиза, которые ведут к запасанию энергии в виде ATP. В результате данной реакции альдегидная группа глицеральдегид-3-фосфата окисляется, но образуется не свободная карбоксильная группа, а смешанный ангидрид фосфорной и карбоновой кислот. Ангидрид такого типа, называемый **ацилфосфатом**, характеризуется очень высокой стандартной свободной энергией гидролиза ($\Delta G'^{\circ} = -49{,}3$ кДж/моль; см. рис. 13-4, табл. 13-6). В ацилфосфатной группе у атома C-1 в 1,3-бисфосфоглицерате сохраняется большая часть энергии от окисления альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата.

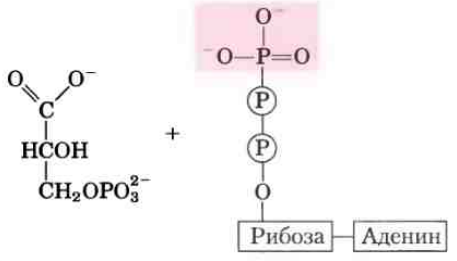
В ходе реакции глицеральдегид-3-фосфат остается ковалентно связанным с ферментом (**рис. 14-7**). Альдегидная группа глицеральдегид-3-фосфата реагирует с –SH-группой остатка Cys в активном центре фермента; эта реакция напоминает образование полуацеталя (см. рис. 7-5), но в данном случае образуется *тио*полуацеталь. Взаимодействие остатка Cys, играющего важную роль в катализе, с ионами тяжелых металлов, такими как Hg^{+}, приводит к необратимому ингибированию фермента.

Количество NAD^{+} в клетке ($\leq 10^{-5}$ M) значительно меньше количества глюкозы, метаболизируемой за несколько минут. Если бы образующийся на этой стадии гликолиза NADH постоянно не окислялся и не использовался вновь, гликолиз очень скоро остановился бы. О рецикле NAD^{+} мы поговорим чуть позже.

⑦ Перенос фосфатной группы с 1,3-бисфосфоглицерата на ADP. Фермент фосфоглицераткиназа катализирует перенос высокоэнергетической фосфатной группы от карбоксильной группы 1,3-бисфосфоглицерата на ADP, в результате чего образуются ATP и 3-фосфоглицерат.



1,3-Бисфосфоглицерат — ADP



3- Фосфоглицерат — ATP

$\Delta G'^{\circ} = -18{,}5$ кДж/моль

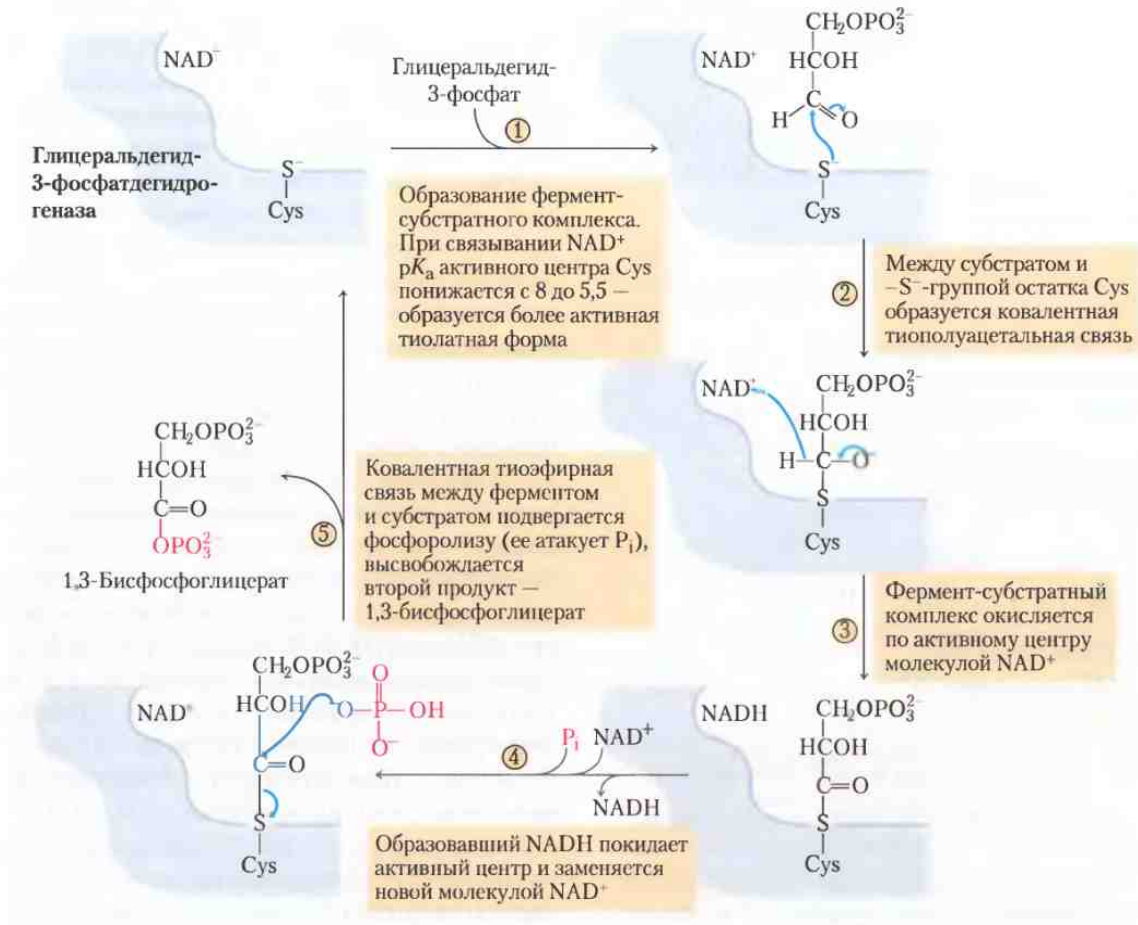


Рис. 14-7. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Реакция, катализируемая глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой.

Обратите внимание, что название фермента фосфоглицераткиназы соответствует обратной реакции, когда фосфорильная группа переносится с АТР на 3-фосфоглицерат. Как и все ферменты, фосфоглицераткиназа катализирует реакцию в обоих направлениях. В соответствии со своим названием данный фермент действует в реакциях глюконеогенеза (см. рис. 14-16) и фотосинтетической ассимиляции CO_2 (см. рис. 20-4). При гликолизе катализируемая этим ферментом реакция протекает в направлении синтеза АТР, как указано выше.

Реакции гликолиза ⑥ и ⑦ сопряжены друг с другом, поскольку имеют общий промежуточный продукт 1,3-бисфосфоглицерат, образующийся в первой (эндергонической) реакции и отдающий свою ацилфосфатную группу АТР во второй (экзергонической) реакции. Суммарное уравнение этих двух реакций выглядит следующим образом:

$$\text{Глицеральдегид-3-фосфат} + \text{ADP} + P_i + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons$$
$$\text{3-фосфоглицерат} + \text{ATP} + \text{NADH} + \text{H}^+$$
$$\Delta G'^\circ = -12{,}5 \text{ кДж/моль}$$

Таким образом, суммарная реакция характеризуется отрицательным изменением стандартной свободной энергии.

Как обсуждалось в гл. 13, реальное изменение свободной энергии ΔG зависит от изменения стандартной свободной энергии $\Delta G'^\circ$ и отношения действующих масс Q — отношение произведения концентраций продуктов к произведению

концентраций реагирующих веществ (см. уравнение 13-4). Для реакции ⑥ можно записать:

$$\Delta G = \Delta G'^{\circ} + RT\ln Q =$$

$$= \Delta G'^{\circ} + RT\ln\frac{[\text{1,3-бисфосфоглицерат}][\text{NADH}]}{[\text{глицеральдегид-3-фосфат}][P_i][\text{NAD}^+]}$$

Обратите внимание, что $[H^+]$ не входит в параметр Q, поскольку при биохимических расчетах $[H^+]$ считают постоянной величиной (10^{-7} М) и включают в $\Delta G'^{\circ}$ (с. 15).

Если $Q < 1$, то $\ln Q < 0$. Потребление продукта реакции ⑥ (1,3-бисфосфоглицерата) в реакции ⑦ приводит к тому, что в стационарном состоянии концентрация 1,3-бисфосоглицерата довольно низкая, следовательно, для всего процесса с сопряжением энергии Q — малая величина. Тогда множитель $\ln Q$ имеет знак минус, а изменение свободной энергии (ΔG) — большая отрицательная величина. Таким образом, мы еще одним способом показали, как происходит сопряжение реакций ⑥ и ⑦, имеющих общее промежуточное соединение.

Конечным результатом этих двух сопряженных реакций, обратимых в условиях клетки, является то, что энергия, высвобождаемая при окислении альдегидной группы до карбоксильной, запасается в ходе сопряженного образования ATP из ADP и P_i. Синтез ATP в результате переноса фосфорильной группы от субстрата 1,3-бисфосфоглицерата называют **фосфорилированием на уровне субстрата** в отличие от механизма **окислительного фосфорилирования**. В фосфорилировании на уровне субстрата принимают участие растворимые ферменты и химические интермедиаты (в нашем случае 1,3-бисфосфоглицерат), тогда как окислительное фосфорилирование связано с переносом протонов через мембрану с участием мембраносвязанных ферментов (гл. 19).

Фосфоглицератмутаза

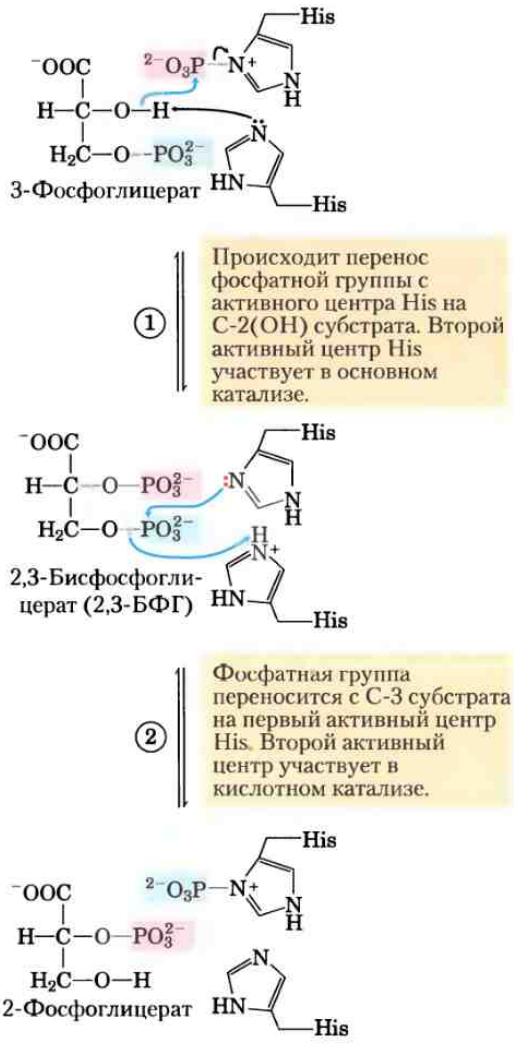
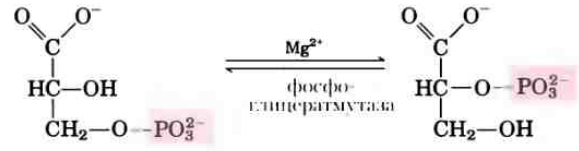


Рис. 14-8. Реакция, катализируемая фосфоглицератмутазой.

⑧ Превращение 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат. Фермент фосфоглицератмутаза катализирует обратимый перенос фосфорильной группы между атомами С-2 и С-3 в молекуле глицерата; важную роль в данной реакции играют ионы Mg^{2+}:

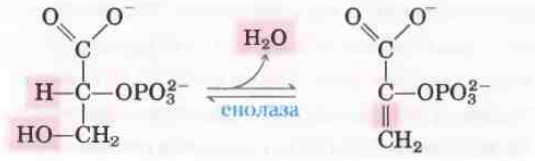


$\Delta G'^{\circ} = 4{,}4$ кДж/моль

Реакция протекает в две стадии (**рис. 14-8**). Сначала фосфорильная группа, связанная с остатком His в молекуле фермента, перено-

сится на гидроксильную группу у атома С-2 3-фосфоглицерата, в результате чего образуется 2,3-бисфосфоглицерат (2,3-БФГ). Затем фосфатная группа у атома С-3 2,3-БФГ переносится на тот же остаток His, образуется 2-фосфоглицерат и высвобождается фосфорилированный фермент. Фосфоглицератмутаза фосфорилирована — фосфатная группа от 2,3-БФГ; для начала каталитического цикла необходимо небольшое количество последнего, поэтому 2,3-БФГ постоянно возобновляется в ходе реакции.

⑨ Дегидратация 2-фосфоглицерата с образованием фосфоенолпирувата. Это вторая реакция гликолиза, в которой образуется соединение, способное активно участвовать в переносе фосфорильной группы (первая — реакция ⑥). Фермент **енолаза** катализирует обратимое удаление молекулы воды от 2-фосоглицерата, что приводит к образованию **фосфоенолпирувата (ФЕП)**:

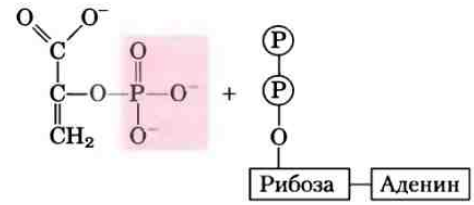


2-Фосфоглицерат Фосфоенолпируват

$\Delta G'^{\circ} = 7{,}5$ кДж/моль

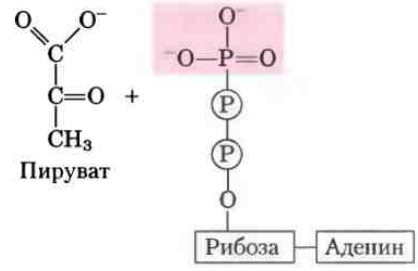
Механизм реакции, катализируемой енолазой, включает образование енольного интермедиата, который стабилизируется ионами Mg^{2+} (рис. 6-23). Несмотря на сравнительно небольшое изменение стандартной свободной энергии в данной реакции, ΔG гидролиза фосфорильных групп исходного вещества и гидролиза продукта существенно различаются: −17,6 кДж/моль для 2-фосфоглицерата (низкоэнергетический эфир фосфорной кислоты) и −61,9 кДж/моль для фосфоенолпирувата (высокоэнергетическое фосфорилированное соединение) (см. рис. 13-3, табл. 13-6).

⑩ Перенос фосфорильной группы от фосфоенолпирувата на ADP. Последняя стадия гликолиза состоит в переносе фосфорильной группы с фосфоенолпирувата на ADP под действием **пируваткиназы**, для активности которой необходимо присутствие K^+, а также Mg^{2+} или Mn^{2+}:



Фосфоенолпируват ADP

Mg^{2+}, K^+ | пируваткиназа



ATP

$\Delta G'^{\circ} = -31{,}4$ кДж/моль

В данной реакции фосфорилирования на уровне субстрата продукт реакции **(пируват)** сначала появляется в енольной форме, а затем подвергается быстрой неферментативной таутомеризации, превращаясь в кетоформу, преобладающую при pH 7:

Пируват (енольная форма) Пируват (кетоформа)

Суммарная реакция характеризуется большим отрицательным значением изменения стандартной свободной энергии, что в значительной степени связано с самопроизвольным превращением енольной формы пирувата в кетоформу (см. рис. 13-3). Для реакции гидролиза фосфоенолпирувата $\Delta G'^{\circ} = -61{,}9$ кДж/моль. Почти половина этой энергии запасается в фосфоангидридной связи молекулы ATP (−30,5 кДж/моль), а другая часть (−31,4 кДж/моль) выступает движущей силой, смещающей равновесие реакции в сторону образования ATP. Во внутриклеточных условиях реакция, катализируемая пируваткиназой, практически необратима и выполняет важную роль в регуляции (см. гл. 15).

Выигрыш в АТР заметен при составлении полного баланса гликолиза

Составим полный материальный баланс гликолиза. При этом надо учесть следующее: 1) превращения углеродного скелета глюкозы; 2) расход P_i и ADP и выход ATP; 3) пути переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях. В левой части уравнения запишем все вещества, расходуемые в процессе гликолиза, а именно ATP, NAD^+, ADP и P_i (см. рис. 14-2), а в правой части — все продукты гликолиза (помните, что из каждой молекулы глюкозы образуется две молекулы пирувата).

$$\text{Глюкоза} + 2\,\text{ATP} + 2\,\text{NAD}^+ + 4\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,\text{пируват} + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{NADH} + 2\,\text{H}^+ + 4\,\text{ATP} + 2\,\text{H}_2\text{O}$$

Вычитая из левой и правой части уравнения одинаковые слагаемые, получаем общее уравнение гликолиза в аэробных условиях:

$$\text{Глюкоза} + 2\,\text{NAD}^+ + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,\text{пируват} + 2\,\text{NADH} + 2\,\text{H}^+ + 2\,\text{ATP} + 2\,\text{H}_2\text{O}$$

Две молекулы NADH, образующиеся в цитозоле в процессе гликолиза, в аэробных условиях вновь окисляются до NAD^+ путем переноса своих электронов по электронтранспортной цепи, что в эукариотических клетках происходит в митохондриях. По электронтранспортной цепи электроны направляются к месту назначения — молекуле O_2:

$$2\,\text{NADH} + 2\,\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow 2\,\text{NAD}^+ + 2\,\text{H}_2\text{O}$$

Перенос электронов от NADH на O_2 в митохондриях обеспечивает энергию, необходимую для синтеза ATP путем окислительного фосфорилирования (гл. 19).

Итак, при гликолизе из одной молекулы глюкозы образуются две молекулы пирувата (путь превращения углерода). Две молекулы ADP и две молекулы P_i превращаются в две молекулы ATP (путь превращения фосфорильных групп). Четыре электрона в виде двух гидрид-ионов переносятся от двух молекул глицеральдегид-3-фосфата на две молекулы NAD^+ (путь переноса электронов).

Гликолиз находится под строгим контролем

При изучении сбраживания глюкозы дрожжами Луи Пастер обнаружил, что скорость потребления глюкозы и общее количество потребляемой глюкозы в анаэробных условиях во много раз выше, чем в аэробных. Позже исследования на мышечной ткани выявили столь же значительное различие в скоростях анаэробного и аэробного гликолиза. Сегодня биохимические причины «эффекта Пастера» понятны. Выход ATP при гликолизе в анаэробных условиях (2 молекулы на молекулу глюкозы) гораздо ниже, чем при полном окислении глюкозы до CO_2 в аэробных условиях (30 или 32 молекулы ATP на молекулу глюкозы; см. табл. 19-5). Таким образом, для образования одного и того же количества ATP в анаэробном процессе должно расщепляться примерно в 15 раз больше глюкозы, чем в аэробном.

Количество глюкозы, распадающейся в процессе гликолиза, регулируется так, чтобы поддерживать примерно постоянный уровень (концентрацию) ATP (и интермедиатов гликолиза, участвующих в биосинтезе). Необходимый контроль скорости гликолиза достигается благодаря сложной взаимосвязи между расходованием ATP, регенерацией NADH, аллостерической регуляцией некоторых гликолитических ферментов (в том числе гексокиназы PFK-1 и пируваткиназы); концентрации ключевых метаболитов испытывают ежесекундные колебания при поддержании внутриклеточного баланса потребления и образования ATP. В несколько более длительном временном диапазоне гликолиз регулируется с помощью гормонов (глюкагона, адреналина и инсулина), а также путем изменения экспрессии генов некоторых гликолитических ферментов. Особый интерес представляет аномальная регуляция гликолиза при злокачественных новообразованиях. Немецкий биохимик Отто Варбург в 1928 г. обратил внимание на то, что почти во всех опухолевых тканях гликолиз происходит с более высокими скоростями, чем в нормальных тканях, даже при достаточном количестве кислорода. Это наблюдение положено в основу некоторых методов диагностирования и лечения онкологических заболеваниях (доп. 14-1).

Отто Варбург, 1883–1970

Дополнение 14–1 МЕДИЦИНА Высокая скорость гликолиза в опухолевых тканях лежит в основе методов химиотерапии при некоторых онкологических заболеваниях и облегчает постановку диагноза

Во многих типах опухолей у человека и животных потребление глюкозы и гликолиз происходят приблизительно в 10 раз быстрее, чем в нормальных тканях. Большинство опухолевых клеток существует в условиях гипоксии (т. е. при недостаточном содержании кислорода), поскольку в начале развития опухоли капиллярная сеть недостаточно развита и не может доставлять необходимое количество кислорода. В опухолевых клетках, расположенных на расстоянии более 100–200 мкм от ближайшего капилляра, образование АТР полностью зависит от гликолиза (без последующего окисления пирувата). Энергетический выход (две молекулы АТР на молекулу глюкозы) значительно ниже того, что можно получить при полном окислении пирувата до CO_2 в митохондриях (~30 молекул АТР на молекулу глюкозы; см. гл. 19). Чтобы получить такое же количество АТР, опухолевые клетки вынуждены потреблять больше глюкозы, чем нормальные клетки, превращая ее в пируват, а затем в лактат с рециклом NADH. Возможно, вначале трансформации нормальных клеток в опухолевые, во-первых производство АТР переходит на зависимость от гликолиза и, во-вторых, во внеклеточной жидкости развивается толерантность к низким pH (что обусловлено образованием молочной кислоты — конечного продукта гликолиза). Обычно чем агрессивнее опухоль, тем выше в ней скорость гликолиза.

Эта активизация гликолиза в какой-то степени достигается благодаря увеличению продукции гликолитических ферментов и мембранных переносчиков GLUT1 и GLUT3 (см. табл. 11-3), переносящих глюкозу внутрь клетки. (Вспомните, что GLUT1 и GLUT3 не зависят от инсулина.) **Индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор-1** (***hypoxia-inducible transcription factor*, HIF-1**) представляет собой белок, который действует на уровне синтеза мРНК, стимулируя производство не менее восьми ферментов гликолиза и переносчиков глюкозы при недостатке кислорода (рис. 1). При повышении скорости гликолиза опухолевые клетки способны выживать в анаэробных условиях до появления новых

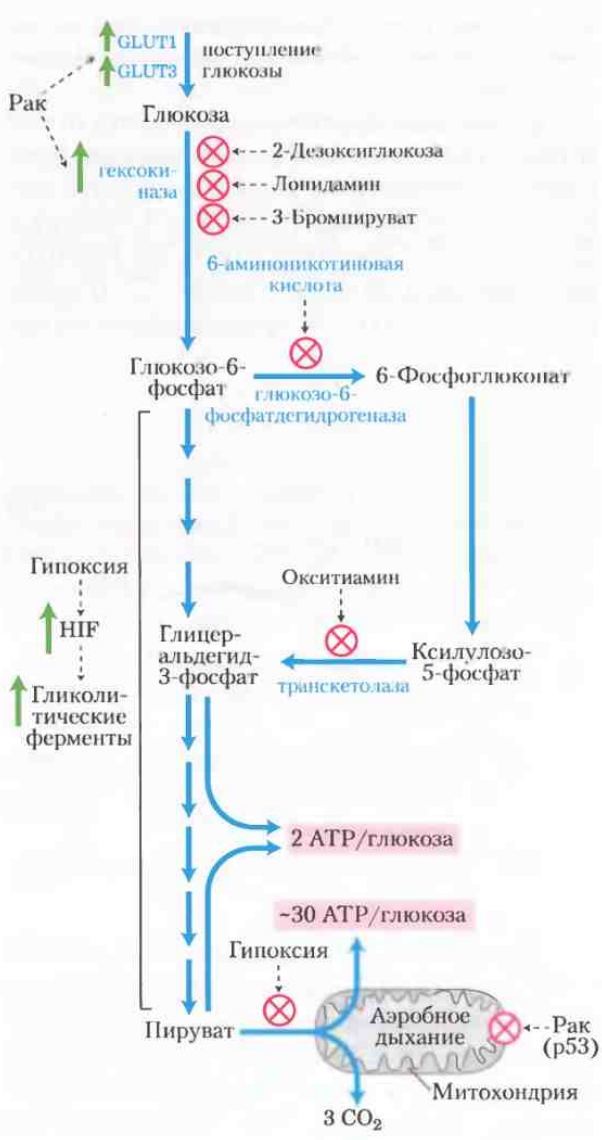


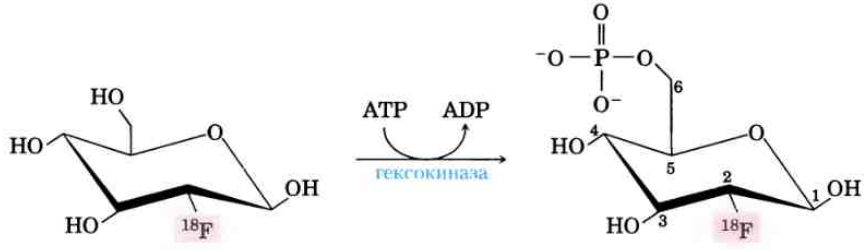
Рис. 1. При анаэробном метаболизме глюкозы в опухолевых клетках образуется значительно меньше АТР (две молекулы АТР на молекулу глюкозы), чем при полном окислении до CO_2, которое происходит в здоровых клетках в аэробных условиях (~30 молекул АТР на молекулу глюкозы). В результате опухолевые клетки вынуждены потреблять существенно больше глюкозы, чтобы получить то же количество АТР. В опухолевых тканях наблюдается значительная активация синтеза переносчиков глюкозы и гликолитических ферментов. Вещества, ингибирующие гексокиназу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу или транскетолазу, блокируют производство АТР в ходе гликолиза и в результате убивают раковые клетки, лишая их необходимой энергии.

Дополнение 14–1 **МЕДИЦИНА** **Высокая скорость гликолиза в опухолевых тканях лежит в основе методов химиотерапии при некоторых онкологических заболеваниях и облегчает постановку диагноза (*продолжение*)**

кровеносных сосудов. Еще один белок, индуцируемый HIF-1, это пептидный гормон фактор роста сосудистого эндотелия VEGF (***vascular endothelial growth factor***), который стимулирует ускоренный рост кровеносных сосудов (ангиогенез) в опухоли.

Кроме того, существуют доказательства того, что опухолевый супрессор p53, который при многих онкологических заболеваниях мутирует (т. 1, с. 670), контролирует синтез и сборку митохондриальных белков, необходимых для передачи электронов на молекулу кислорода. В клетках с мутантной формой p53 митохондриальный транспорт электронов нарушен, в связи с чем для образования ATP в этих клетках преобладает гликолиз (рис. 1).

Высокая зависимость опухолевых клеток от гликолиза по сравнению с нормальными клетками предоставляет возможность для разработки стратегии противоопухолевой химиотерапии: ингибиторы гликолиза могут находить и уничтожать опухолевые клетки путем ограничения в этих клетках запасов ATP. В настоящий момент известны три эффективных ингибитора гексокиназы, которые можно использовать в качестве химиотерапевтических агентов: 2-дезоксиглюкоза, лонидамин и 3-бромпируват. Предотвращая синтез глюкозо-6-фосфата, эти три вещества не только лишают опухолевые клетки образующегося при гликолизе ATP, но также препятствуют образованию пентозофосфатов в пентозофосфатном пути, который также начинается с глюкозо-6-фосфата. Без пентозофосфатов клетки не могут синтезировать важные для синтеза ДНК и РНК нуклеотиды и поэтому не могут расти и делиться. Еще одним противоопухолевым препаратом, уже допущенным к клиническому применению, является иматиниб (гливек; см. доп. 12-5). Он ингибирует специфическую тирозинкиназу, предотвращая активацию синтеза гексокиназы, которую обычно стимулирует эта тирозинкиназа. В настоящее время проходит фазу доклинических испытаний в качестве противоопухолевого препарата аналог тиамина окситиамин, блокирующий действие фермента транскетолазы, которая превращает ксилулозо-5-фосфат в глицеральдегид-3-фосфат (рис. 1).



[18F]2-Фтор-2-дезоксиглюкоза (FdG)

[18F]6-Фосфо-2-фтор-2-дезоксиглюкоза (6-Фосфо-FdG)

Рис. 2. Гексокиназа фосфорилирует ^{18}F-меченую 2-фтор-2-дезоксиглюкозу (ФДГ или FdG), образующаяся меченая 6-фосфо-ФДГ проникает в клетки, где ее можно обнаружить по эмиссии позитронов из ^{18}F.

Варбурга часто считают самым выдающимся биохимиком первой половины XX в. Он внес существенный вклад в развитие многих направлений, в том числе известны его исследования в области дыхания, фотосинтеза, энзимологии и промежуточного метаболизма. Начиная с 1930 г. Варбург с коллегами выделили и получили в кристаллическом виде семь ферментов, участвующих в гликолизе. Этими же учеными создан прибор, который совершил переворот в традиционных методах изучения окислительного метаболизма. С помощью манометра Варбурга можно определить потребление кислорода в тканях, измеряя изменения объема газа во времени, и по этим дан-

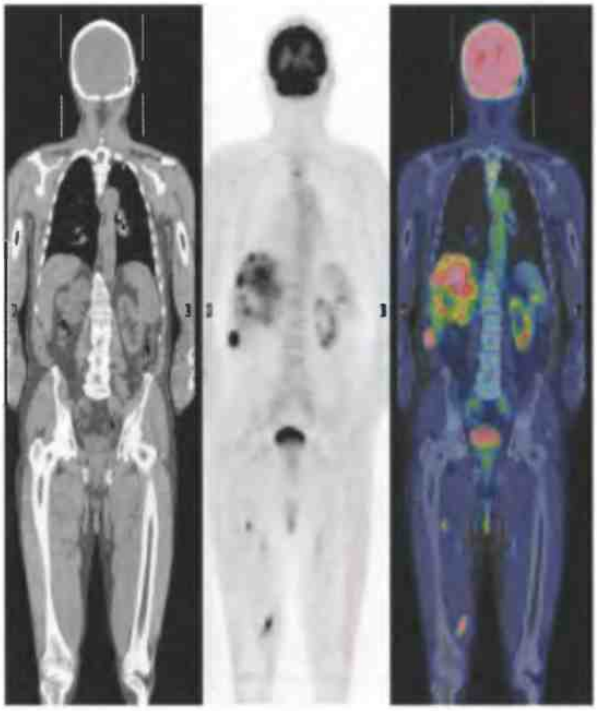


Рис. 3. Обнаружение опухолевой ткани методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Взрослому мужчине хирургическим путем удалили первичную опухоль кожи (злокачественную меланому). *Слева* — изображение, полученное с помощью компьютерной томографии (КТ-сканирование всего тела), видно расположение мягких тканей и костей. *В центре* — результаты ПЭТ после введения пациенту ^{18}F-меченой 2-фтор-2-дезоксиглюкозы (ФДГ). Темные пятна соответствуют областям с активным поглощением глюкозы. Как и ожидалось, высокое содержание метки наблюдается в области головного мозга и мочевого пузыря. Это связано с тем, что головной мозг является основным потребителем глюкозы в организме, а выведение ^{18}F-меченой 6-фосфо-ФДГ осуществляется с мочой. Если интенсивность свечения метки при ПЭТ-сканировании представить в цветовом изображении (с увеличением интенсивности от зеленого цвета через желтый — к красному) и наложить эту картину на изображение, полученное методом КТ-сканирования, можно обнаружить наличие раковых клеток в верхних отделах позвоночника, в печени и некоторых мышцах (*справа*) из-за метастазирования первичной злокачественной опухоли.

Высокая скорость гликолиза в опухолевых клетках имеет также диагностическое значение. Сравнение скоростей захвата глюкозы в различных участках ткани может помочь в локализации опухоли. При позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) пациентам вводят неопасный для здоровья меченый аналог глюкозы, который захватывается, но не метаболизируется тканями. В качестве такого меченого соединения может использоваться 2-фтор-2-дезоксиглюкоза (ФДГ), в которой гидроксильная группа в положении С-2 глюкозы заменена на ^{18}F (рис. 2). Это соединение захватывается транспортной молекулой GLUT и является хорошим субстратом для гексокиназы, но не может превращаться в ендиольное промежуточное соединение в реакции, катализируемой фосфогексозоизомеразой (см. рис. 14-4) и, следовательно, накапливается в виде 6-фосфо-ФДГ. Степень накопления этого вещества зависит от скорости его захвата и фосфорилирования, которая, как отмечалось ранее, обычно в 10 и более раз выше в опухолевых тканях, чем в здоровых тканях. При радиоактивном распаде ^{18}F образуются позитроны (два на атом ^{18}F), которые можно обнаружить с помощью серии чувствительных детекторов, расположенных вокруг тела человека, что позволяет достаточно точно локализовать зоны накопления 6-фосфо-ФДГ (рис. 3).

ным рассчитать концентрацию ферментов с окислительной активностью.

В лаборатории Эмиля Фишера (Нобелевская премия по химии в 1902 г.) Варбург изучал химию углеводов, а сам стал лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1931 г. Ряд учеников и сподвижников Варбурга также были награждены Нобелевской премией, среди них Отто Мейергоф (1922), Ханс Кребс и Фриц Липманн (1953) и Хуго Теорелль (1955). В лаборатории Мейергофа обучался Липманн и некоторые другие лауреаты Нобелевской премии: Северо Очоа (1959), Андре Львов (1965) и Джордж Уолд (1967).

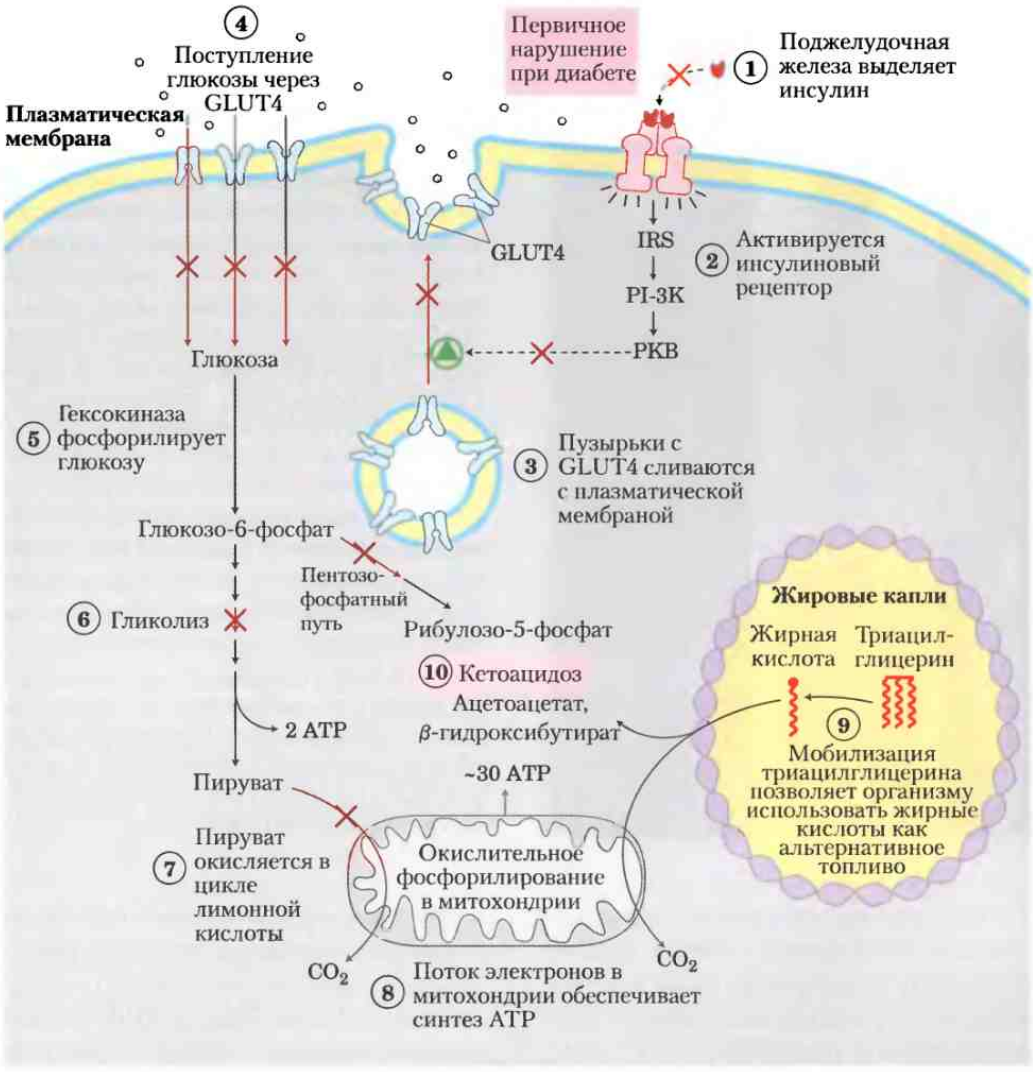


Рис. 14-9. Метаболизм углеводов и жиров в адипоцитах при диабете I типа. В норме инсулин инициирует проникновение переносчиков глюкозы GLUT4 в плазматическую мембрану путем слияния содержащих GLUT4 везикул с мембраной, что позволяет осуществлять потребление глюкозы из кровотока. При снижении уровня инсулина в крови GLUT4 вновь включается в везикулы путем эндоцитоза. При инсулинозависимом диабете (диабете I типа) этот нормальный ход событий нарушается. Отсутствие инсулина предотвращает потребление глюкозы при помощи GLUT4; в результате клеткам не хватает глюкозы, а в крови ее содержание избыточно. Недостаток глюкозы для производства энергии приводит к тому, что адипоциты начинают расщеплять запасенные в виде жировых капелек триацилглицерины и поставлять образующиеся жирные кислоты другим тканям для выработки ATP в митохондриях. В печени образуются два побочных продукта этого процесса (ацетоацетат и β-гидроксибутират, см. с. 252), которые накапливаются и выделяются в кровь. Они служат источником энергии для головного мозга, но при этом происходит снижение pH крови, что вызывает кетоацидоз. Та же последовательность событий наблюдается и в мышечной ткани, за исключением того, что миоциты не запасают триацилглицерины, а вместо этого используют жирные кислоты, высвобождаемые в кровь адипоцитами.

Нарушение потребления глюкозы клетками при сахарном диабете I типа

Метаболизм глюкозы у млекопитающих ограничен скоростью потребления глюкозы клетками и ее фосфорилированием гексокиназой. Транспорт глюкозы из кровотока осуществляется при участии семейства переносчиков глюкозы GLUT (см. табл. 11-3). Переносчики глюкозы в гепатоцитах (GLUT1, GLUT2) и нейронах головного мозга (GLUT3) всегда присутствуют в плазматической мембране клеток. Напротив, основной переносчик глюкозы в клетках скелетных мышц, сердечной мышцы и жировой ткани (GLUT4) хранится в небольших внутриклеточных везикулах и перемещается к плазматической мембране только в ответ на сигнал инсулина (**рис. 14-9**). Механизм передачи сигнала с помощью инсулина мы обсуждали в гл. 12 (см. рис. 12-16). Таким образом, в скелетных мышцах, сердце и жировой ткани захват и метаболизм глюкозы зависят от нормальной выработки инсулина β-клетками пожелудочной железы в ответ на повышение уровня глюкозы крови (см. рис. 23-27).

При сахарном диабете I типа (который также называют инсулинозависимым диабетом) слишком мало β-клеток, и поэтому в организме вырабатывается недостаточное количество инсулина для стимуляции потребления глюкозы клетками скелетных и сердечной мышц и клетками жировой ткани. После приема пищи, содержащей углеводы, уровень глюкозы крови повышается до аномально высоких показателей; такое состояние называют гипергликемией. Неспособные усваивать глюкозу мышечные и жировые ткани начинают использовать жирные кислоты из запасных триацилглицеринов. В печени образующийся из этих жирных кислот ацетил-CoA превращается в кетоновые тела (ацетоацетат и β-гидроксибутират), которые переносятся в другие ткани и служат в качестве источника энергии (гл. 17). Эти вещества играют особенно важную роль в головном мозге, который при недостатке глюкозы использует кетоновые тела как альтернативное топливо. (Жирные кислоты не могут проникать через гематоэнцефалический барьер и поэтому не могут быть источником энергеии для нейронов головного мозга.)

Если больного диабетом I типа не лечить, избыточное образование ацетоацетата и β-гидроксибутирата приводит к их накоплению в крови, что сопровождается снижением pH крови и **кетоацидозом**, несущим угрозу для жизни больного. Инъекции инсулина обращают ход событий: GLUT4 перемещается в плазматическую мембрану гепатоцитов и адипоцитов, глюкоза потребляется клетками и фосфорилируется, уровень глюкозы крови снижается, что приводит к уменьшению выработки кетоновых тел.

При диабете значительно изменяется метаболизм как углеводов, так и жиров. Мы вновь обратимся к этой теме в гл. 23 после обсуждения метаболизма липидов (гл. 17 и 21). ■

Краткое содержание раздела 14.1 ГЛИКОЛИЗ

- Гликолиз — это практически универсальный процесс, в результате которого молекула глюкозы окисляется с образованием двух молекул пирувата, а энергия накапливается в виде ATP и NADH.
- Все 10 ферментов гликолиза находятся в цитозоле, а все 9 интермедиатов представляют собой фосфорилированные соединения, состоящие из шести или трех атомов углерода.
- На подготовительной стадии гликолиза для превращения глюкозы во фруктозо-1,6-бисфосфат расходуются две молекулы ATP. При разрыве связи между атомами C-3 и C-4 образуются две молекулы триозофосфата.
- На второй стадии гликолиза каждая молекула глицеральдегид-3-фосфата, образовавшаяся из глюкозы, окисляется по атому C-1. Энергия, вывобождаемая в этой реакции, запасается в форме одной молекулы NADH и двух молекул ATP в пересчете на один окисленный триозофосфат. Суммарное уравнение гликолиза:

$$\text{Глюкоза} + 2\,NAD^+ + 2\,ADP + 2\,P_i \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,\text{пируват} + 2\,NADH + 2\,H^+ + 2\,ATP + 2\,H_2O$$

- Гликолиз строго регулируется в соответствии с другими процессами, идущими с выигрышем в энергии, что обеспечивает постоянный уровень ATP.
- При диабете I типа нарушение потребления глюкозы мышечной и жировой тканью оказывает большое влияние на метаболизм углеводов и жиров.

14.2. Метаболические пути, питающие гликолиз

В гликолизе принимает участие не только глюкоза, но и многие другие углеводы после их превращения в один из интермедиатов гликолиза. Наиболее важную роль играют запасные полисахариды крахмал и гликоген, дисахариды мальтоза, лактоза, трегалоза и сахароза, а также моносахариды фруктоза, манноза и галактоза (**рис. 14-10**).

Полисахариды и дисахариды пищи разлагаются до моносахаридов

Почти у всех людей основным источником углеводов служит крахмал. Расщепление крахмала начинается уже во рту под действием фермента слюны **α-амилазы** (рис. 14-10), катализирующей гидролиз внутренних гликозидных связей в молекуле крахмала с образованием более коротких полисахаридных фрагментов или олигосахаридов. (Обратите внимание, что в данной реакции *гидролиза* атаку осуществляет не неорганический

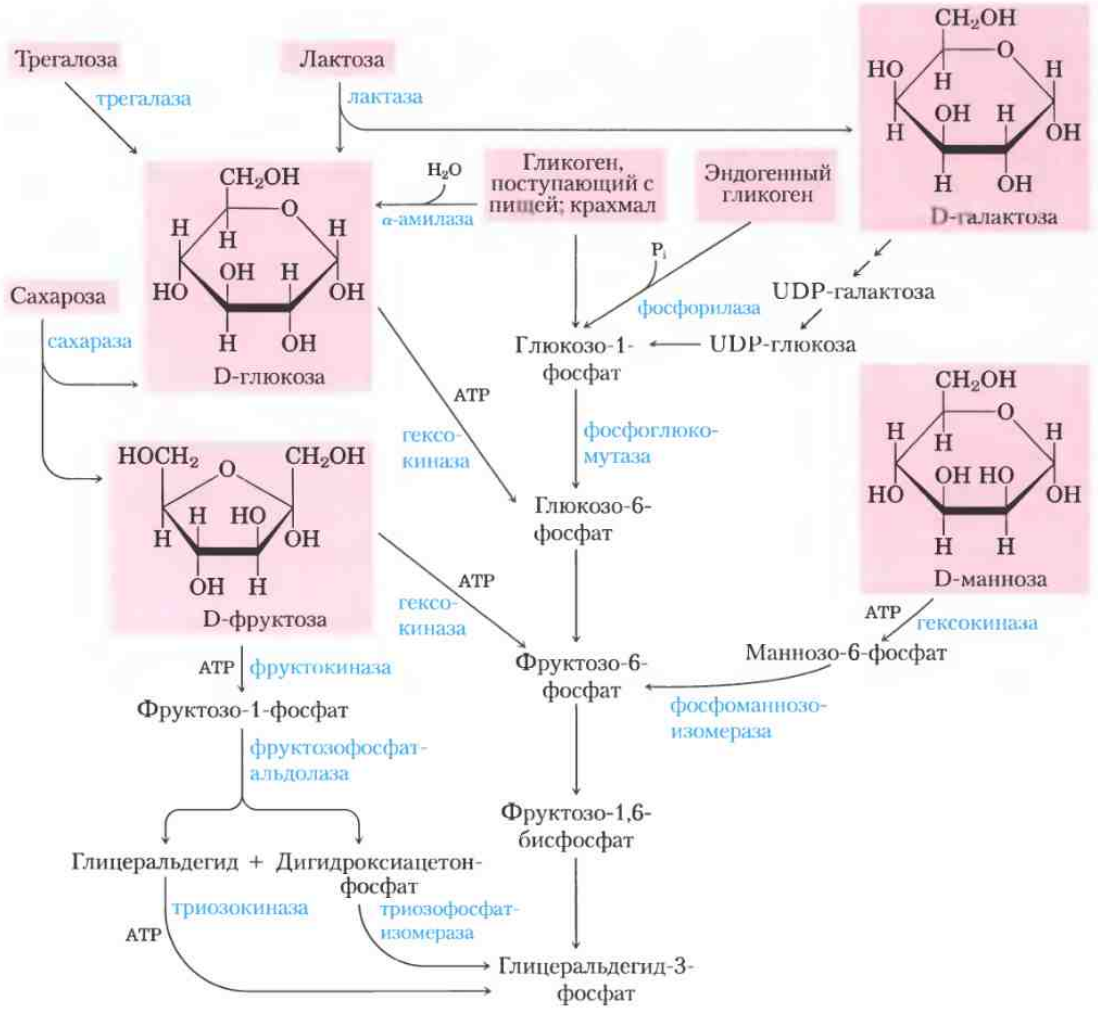


Рис. 14-10. Включение гликогена, крахмала, дисахаридов и гексоз пищи в подготовительную стадию гликолиза.

фосфат, а молекула воды.) В желудке из-за низкого значения pH α-амилаза слюны инактивируется, но далее начинает работать другая α-амилаза, секретируемая поджелудочной железой в тонкий кишечник. В результате действия панкреатической α-амилазы образуются в основном мальтоза и мальтотриоза (ди- и трисахариды глюкозы с α1→4-связями), а также так называемые лимитдекстрины, представляющие собой фрагменты амилопектина со связями α1→6 в точках ветвления. Мальтоза и декстрины далее разлагаются на щеточной кайме кишечника (на микроскопических выростах кишечного эпителия, благодаря которым площадь поверхности кишечника значительно увеличивается). Структура пищевого гликогена во многом похожа на крахмал, и его расщепление идет по тому же пути.

Эндогенные гликоген и крахмал разлагаются в результате фосфоролиза

Гликоген, запасаемый в тканях животных (в основном в печени и скелетных мышцах) и в клетках микроорганизмов, и крахмал в растениях могут использоваться самими клетками после осуществления реакции *фосфоролиза*, катализируемой **гликогенфосфорилазой (у растений – фосфорилазой крахмала)**. Эти ферменты катализируют атаку неорганическим фосфатом гликозидной связи (α1→4), соединяющей два концевых остатка глюкозы на невосстанавливающем конце, в результате чего образуется глюкозо-1-фосфат и укороченный на одну глюкозную единицу полимер (**рис. 14-11**). Часть энергии, высвобождающейся при *фосфоролизе* гликозидной связи, запасается в форме эфира фосфорной кислоты глюкозо-1-фосфата. Гликогенфосфорилаза (или фосфорилаза крахмала) действует многократно до тех пор, пока не достигнет участка ветвления с конфигурацией (α1→6) (см. рис. 7-15), где ее действие прекращается. Для удаления разветвления необходим специальный фермент. Механизм и контроль расщепления гликогена подробнее обсуждаются в гл. 15.

Глюкозо-1-фосфат, образующийся под действием гликогенфосфорилазы, превращается в глюкозо-6-фосфат по обратимой реакции, катализируемой **фосфоглюкомутазой**:

Глюкозо-1-фосфат ⇌ глюкозо-6-фосфат

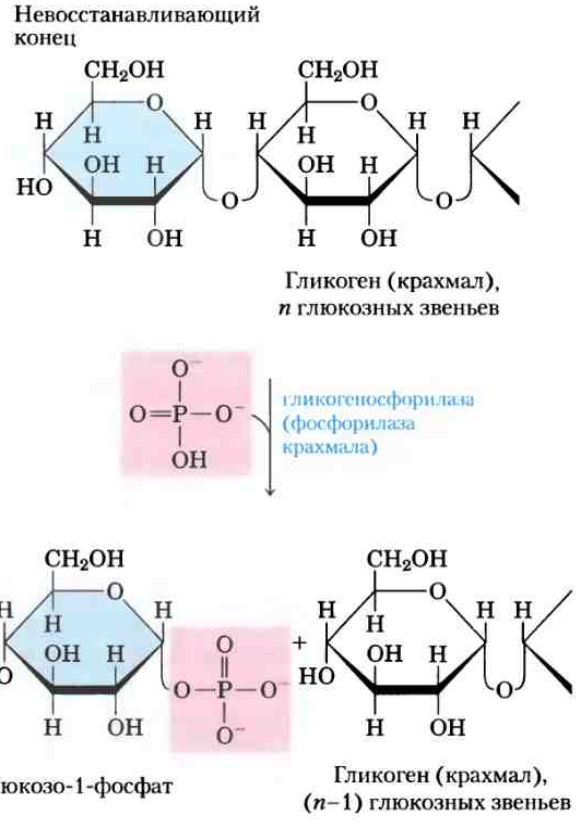


Рис. 14-11. Расщепление внутриклеточного гликогена под действием гликогенфосфорилазы. Этот фермент катализирует взаимодействие неорганического фосфата (выделен розовым цветом) с концевым остатком глюкозы (голубой) на невосстанавливающем конце гликогена, в результате чего образуется глюкозо-1-фосфат и укороченный на одно звено гликоген. Здесь происходит не гидролиз, а *фосфоролиз*.

Фосфоглюкомутаза действует практически по тому же механизму, что и фосфоглицератмутаза (с. 78). Общее название **мутаза** применяют к ферментам, катализирующим перенос функциональных групп из одного положения в другое внутри одной молекулы. Мутазы относятся к более широкому классу **изомераз**, осуществляющих взаимопревращения стереоизомеров, а также структурных или позиционных изомеров (см. табл. 6-3). Образующийся под действием фосфоглюкомутазы глюкозо-6-фосфат может использоваться в гликолизе или другом метаболическом пути, например в пентозофосфатном пути (разд. 14.5).

Пример 14-1 ЗАПАСАНИЕ ЭНЕРГИИ ПРИ РАСЩЕПЛЕНИИ ГЛИКОГЕНА В ПРОЦЕССЕ ФОСФОРОЛИЗА

Рассчитайте выигрыш энергии (в молекулах АТР на мономерное звено глюкозы) при расщеплении гликогена не путем *гидролиза*, а путем *фосфоролиза*.

Решение. В результате фосфоролиза образуется фосфорилированная глюкоза (глюкозо-1-фосфат), которая затем превращается в глюкозо-6-фосфат — без затрат энергии клетки (1 АТР) на образование глюкозо-6-фосфата из свободной глюкозы. Таким образом, на подготовительной стадии расходуется в пересчете на одну мономерную единицу глюкозы лишь одна молекула АТР по сравнению с двумя молекулами в том случае, когда гликолиз начинается со свободной глюкозы. Другими словами, клетка экономит три молекулы АТР в расчете на мономерное звено глюкозы (четыре молекулы АТР образуются на стадии запасания энергии и одна, а не две молекулы АТР расходуется на подготовительной стадии), тем самым сохраняется одна молекула АТР на каждый мономер глюкозы.

Расщепление в желудочно-кишечном тракте полисахаридов пищи, таких как гликоген и крахмал, путем фосфоролиза вместо гидролиза не дало бы выигрыша энергии, поскольку фосфорилированные сахара не проникают в клетки слизистой кишечника, а должны быть сначала дефосфорилированы с образованием свободных сахаров.

Чтобы проникнуть в клетку, дисахариды должны сначала подвергнуться гидролизу до моносахаридов. В кишечнике дисахариды и декстрины гидролизуются под действием ферментов, связанных с поверхностью кишечного эпителия:

$$\text{Декстрин} + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{декстриназа}]{} n\ \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Мальтоза} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{мальтаза}]{} 2\ \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Лактоза} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{лактаза}]{} \text{D-галактоза} + \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Сахароза} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{сахараза}]{} \text{D-фруктоза} + \text{D-глюкоза}$$

$$\text{Трегалоза} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow[\text{трегалаза}]{} 2\ \text{D-глюкоза}$$

Образовавшиеся таким путем моносахариды активно транспортируются в эпителиальные клетки (см. рис. 11-44), а затем попадают в кровь и переносятся к различным тканям, где фосфорилируются и вовлекаются в последовательность гликолитических реакций.

Непереносимость лактозы часто встречается среди взрослого населения Земли, за исключением жителей Северной Европы и некоторых регионов Африки. Это состояние связано с полным или частичным отсутствием лактазной активности в клетках кишечника у взрослых. Из-за этого лактоза не полностью расщепляется и не всасывается в тонком кишечнике, а попадает в толстую кишку, где бактерии превращают ее в токсичный продукт, вызывающий спазмы кишечника и диарею. Проблема еще более усугубляется тем обстоятельством, что нерасщепленная лактоза и ее метаболиты повышают осмолярность содержимого кишечника, что способствует удерживанию воды. В тех странах, где распространена непереносимость лактозы, взрослое население использует в пищу не молоко, а молочные продукты, прошедшие обработку лактазой. При некоторых заболеваниях человека в кишечнике могут вообще отсутствовать все или почти все дисахаридазы. Поэтому при проблемах с пищеварением, вызванных потреблением дисахаридов с пищей, рекомендуется соблюдение определенной диеты. ■

Другие моносахариды включаются в гликолиз на разных участках пути

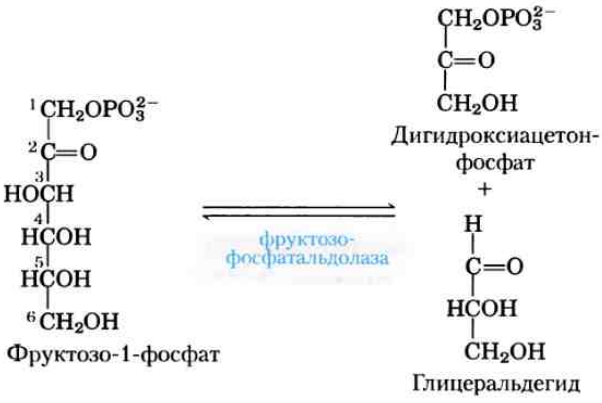
У большинства организмов не только глюкоза, но и другие гексозы могут подвергаться гликолизу после превращения в фосфорилированные производные. D-Фруктоза, встречающаяся в свободном виде во многих фруктах, а также образующаяся в тонком кишечнике позвоночных при гидролизе сахарозы, подвергается фосфорилированию гексокиназой:

$$\text{Фруктоза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{фруктозо-6-фосфат} + \text{ADP}$$

Таким же путем основные количества фруктозы включаются в гликолиз в клетках мышц и почек. В печени реализуется другой путь. Фермент печени **фруктокиназа** катализирует фосфорилирование фруктозы не по С-6, а по С-1:

$$\text{Фруктоза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{фруктозо-1-фосфат} + \text{ADP}$$

Далее фруктозо-1-фосфат расщепляется на глицеральдегид и дигидроксиацетонфосфат под действием фермента **фруктозофосфатальдолазы**:



Дигидроксиацетонфосфат превращается в глицеральдегид-3-фосфат под действием гликолитического фермента триозофосфатизомеразы. Глицеральдегид фосфорилируется за счет ATP при участии **триозокиназы** до глицеральдегид-3-фосфата:

$$\text{Глицеральдегид} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{глицеральдегид-3-фосфат} + \text{ADP}$$

В результате оба продукта гидролиза фруктозо-1-фосфата включаются в гликолиз в виде глицеральдегид-3-фосфата.

D-галактоза, образующаяся в результате гидролиза дисахарида лактозы (молочного сахара), поступает по кровотоку из кишечника в печень, где сначала за счет ATP фосфорилируется по атому C-1 под действием фермента **галактокиназы**:

$$\text{Галактоза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{галактозо-1-фосфат} + \text{ADP}$$

Галактозо-1-фосфат затем переходит в C-4-эпимер — глюкозо-1-фосфат — в результате серии реакций, в которых переносчиком гексозных групп выступает **уридиндифосфат** (UDP; **рис. 14-12**). Эпимеризация включает стадию окисления –OH-группы у атома C-4 до кетогруппы с последующим восстановлением кетогруппы до –OH-группы с обращением конфигурации. Кофактором в реакциях окисления и восстановления служит NAD^+.

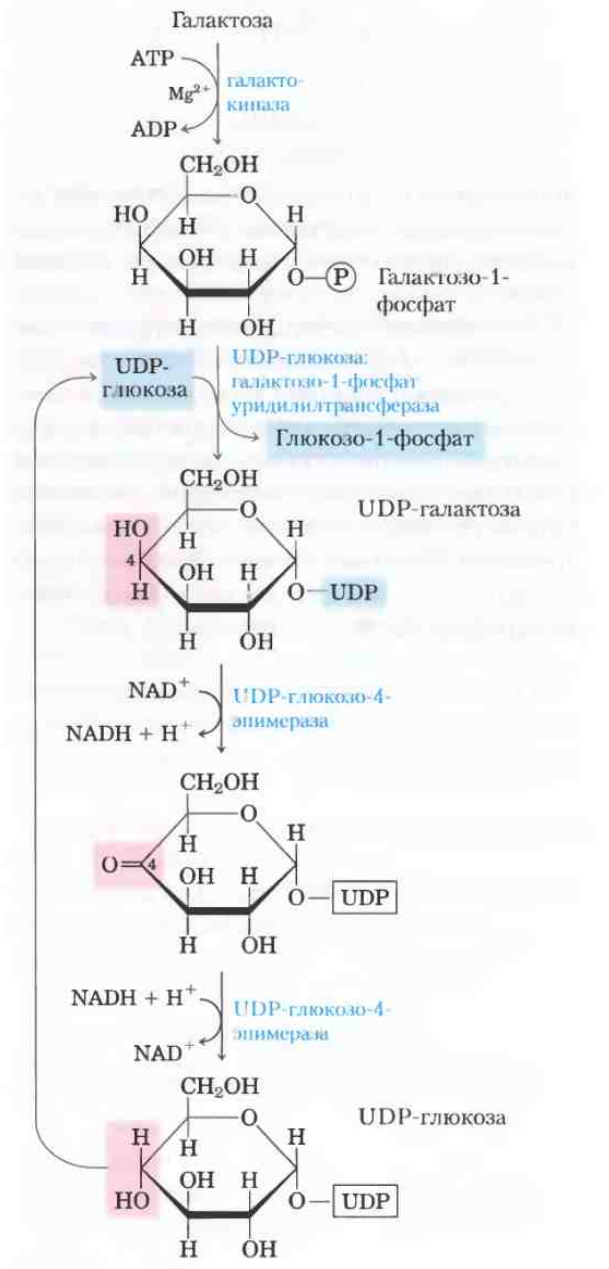
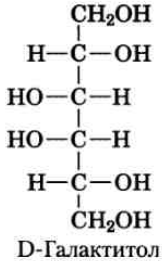


Рис. 14-12. Превращение галактозы в глюкозо-1-фосфат. Процесс протекает с образованием производного сахара и нуклеотида UDP-галактозы при замещении глюкозо-1-фосфата в UDP-глюкозе галактозо-1-фосфатом. Далее UDP-галактоза под действием UDP-глюкозо-4-эпимеразы превращается в UDP-глюкозу; при этом сначала происходит окисление –OH-группы у атома C-4 (выделена розовым цветом) при участии NAD^+, а затем восстановление при участии NADH. Результатом данной реакции является обращение конфигурации у атома C-4. UDP-глюкоза используется в другом цикле той же реакции. Суммарный итог данного цикла — превращение галактозо-1-фосфата в глюкозо-1-фосфат; при подведении материального баланса получается, что ни UDP-галактоза, ни UDP-глюкоза не образуются и не расходуются.

Нарушение функций любого из трех ферментов, действующих в этой серии реакций, вызывает у человека **галактоземию**. При недостаточности галактокиназы в крови и моче обнаруживают высокую концентрацию галактозы. У младенцев может развиться катаракта, что связано с отложением в хрусталиках глаз метаболита галактозы галактитола.



D-Галактитол

Симптомы этого заболевания носят умеренно тяжелый характер; значительно облегчает состояние полное исключение галактозы из рациона питания.

Галактоземия, вызванная недостаточностью трансферазы, — более тяжелое заболевание и характеризуется отставанием в росте, нарушениями речи и умственной недоразвитостью, а также поражением печени, которое может оказаться смертельным даже при исключении галактозы из рациона питания. Недостаточность эпимеразы сопровождается аналогичными симптомами, но при тщательном соблюдении диеты носит менее тяжелый характер. ■

D-Манноза, образующаяся при расщеплении различных полисахаридов и гликопротеинов, фосфорилируется гексокиназой по положению С-6:

$$\text{Манноза} + \text{ATP} \xrightarrow{Mg^{2+}} \text{маннозо-6-фосфат} + \text{ADP}$$

Маннозо-6-фосфат изомеризуется под действием фермента **фосфоманноизомеразы** с образованием фруктозо-6-фосфата — интермедиата гликолиза.

Краткое содержание раздела 14.2 МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ, ПИТАЮЩИЕ ГЛИКОЛИЗ

- Запасные формы глюкозы— полисахариды гликоген и крахмал — вовлекаются в гликолиз в результате двустадийного процесса. Фосфоролитическое отщепление остатка глюкозы от конца молекулы полисахарида, приводящее к высвобождению глюкозо-1-фосфата, катализируется гликогенфосфорилазой или фосфорилазой крахмала. Далее фосфоглюкомутаза превращает глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат, который поступает в путь гликолиза.

- Потребляемые с пищей полисахариды и дисахариды расщепляются до моносахаридов гидролитическими ферментами кишечника; затем моносахариды проникают в клетки кишечника, а из них транспортируются в печень и другие ткани.

- Различные D-гексозы, в том числе фруктоза, галактоза и манноза, также могут подвергаться гликолизу, предварительно превратившись в глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат или фруктозо-1-фосфат.

- В превращении галактозо-1-фосфата в глюкозо-1-фосфат задействованы два нуклеотидных производных: UDP-галактоза и UDP-глюкоза. Генетические дефекты любого из трех ферментов, катализирующих превращение галактозы в глюкозо-1-фосфат, вызывают галактоземию разной степени тяжести.

14.3. Превращение пирувата в анаэробных условиях: брожение

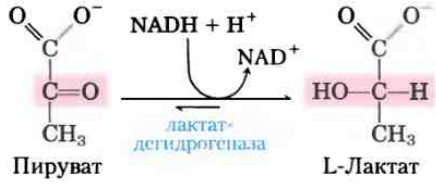
В аэробных условиях пируват, образующийся на финальной стадии гликолиза, окисляется до ацетата (ацетил-CoA), который поступает в цикл лимонной кислоты и окисляется до CO_2 и H_2O, а NADH, образующийся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата, в итоге вновь окисляется до NAD^+ в результате передачи электронов на O_2 в митохондриях. Однако при недостатке кислорода (при гипоксии), например в активно работающих мышцах, в подводных частях растений или у молочнокислых бактерий, образовавшийся в результате гликолиза NADH не может возвращаться в окисленную форму с помощью O_2. Невозможность регенерации NAD^+ оставляла бы клетки без акцептора электронов, необходи-

мых для окисления глицеральдегид-3-фосфата, что привело бы к остановке энергетически выгодных реакций гликолиза. Следовательно, должен существовать какой-то другой путь регенерации NAD^+.

Первые клетки, появившиеся в практически лишенной кислорода атмосфере, умели добывать энергию из топливных молекул в анаэробных условиях. Большинство современных организмов сохранили способность регенерировать NAD^+ в анаэробном процессе гликолиза путем переноса электронов от NADH с образованием таких восстановленных конечных продуктов, как лактат или этанол.

Пируват является последним акцептором электронов при молочнокислом брожении

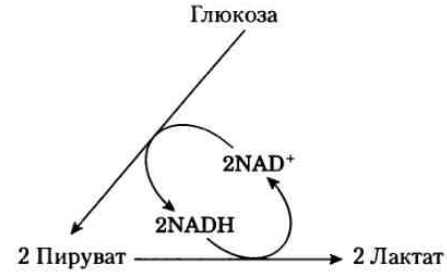
Если ткани животных не получают достаточного количества кислорода, чтобы поддерживать аэробное окисление пирувата и NADH, образовавшихся в результате гликолиза, то регенерация NAD^+ из NADH происходит путем восстановления пирувата до **лактата**. Как уже отмечалось выше, некоторые типы клеток и тканей (например, эритроциты, не имеющие митохондрий и не способные окислять пируват до CO_2) образуют лактат из глюкозы даже в аэробных условиях. Восстановление пирувата катализирует фермент **лактатдегидрогеназа**, под действием которой при pH 7 образуется L-изомер лактата:



$\Delta G'^\circ = -25{,}1$ кДж/моль

Равновесие этой реакции сильно сдвинуто в сторону образования лактата, на что указывает большое отрицательное изменение стандартной свободной энергии.

При гликолизе дегидрирование двух молекул глицеральдегид-3-фосфата, образующихся из каждой молекулы глюкозы, сопровождается превращением двух молекул NAD^+ в две молекулы NADH. Поскольку восстановление двух молекул пирувата до двух молекул лактата приводит к образованию двух молекул NAD^+, то суммарное содержание NAD^+ и NADH не меняется.



Лактат, образующийся при активной работе мышц (или в эритроцитах), может быть повторно использован. При восстановлении сил после активной мышечной деятельности он переносится кровотоком к печени, где превращается в глюкозу. Во время активной физической нагрузки (например, при спринтерском беге) образуется большое количество лактата; снижение pH в крови и мышцах, связанное с диссоциацией молочной кислоты, ограничивает период наиболее напряженной физической активности. Даже тренированные легкоатлеты в самой лучшей спортивной форме способны бежать с максимальной скоростью не более одной минуты (доп. 14-2).

Хотя превращение глюкозы в лактат протекает через две окислительно-восстановительные стадии, углерод не меняет своей степени окисления: в глюкозе ($C_6H_{12}O_6$) и молочной кислоте ($C_3H_6O_3$) соотношение H:C одно и то же. Тем не менее некоторое количество энергии, заключенной в молекуле глюкозы, при превращении в лактат высвобождается, и этой энергии достаточно для образования двух молекул ATP на одну молекулу расщепленной глюкозы. Подобные процессы, идущие с выделением энергии (в форме ATP), но не сопровождающиеся потреблением кислорода или изменением концентрации NAD^+ и NADH, обычно называют **брожением**. Брожение осуществляют очень многие организмы, часто обитающие в анаэробных условиях; конечные продукты брожения довольно разнообразны и нередко находят практическое применение.

Дополнение 14-2 Спортсмены, аллигаторы и целаканты: гликолиз при пониженном содержании кислорода

Большинство позвоночных являются аэробными организмами; они превращают глюкозу в пируват в процессе гликолиза, а затем с помощью молекулярного кислорода полностью окисляют пируват до CO_2 и H_2O. Анаэробный катаболизм глюкозы до лактата происходит в краткие моменты чрезвычайно высокого мышечного напряжения, например при беге на стометровку, когда кислород не успевает поступать в мышцы с достаточной скоростью, чтобы окислять пируват. В это время мышцы в качестве источника энергии для выработки АТР используют внутренние запасы глюкозы (гликоген), сбраживая ее до лактата. При спринтерском беге концентрация лактата в крови достигает очень высоких значений. В процессе глюконеогенеза в печени лактат медленно превращается обратно в глюкозу (это происходит после снятия нагрузки при восстановлении дыхания, когда интенсивность потребления кислорода снижается), постепенно достигая нормы. Избыток кислорода, потребленного при восстановлении дыхания, покрывает его предыдущие затраты. При восстановлении дыхания кислород необходим для синтеза АТР в процессе глюконеогенеза, цель которого — регенерировать гликоген, «заимствованный» из печени и мышц в период максимальной нагрузки. Цикл реакций, включая превращение глюкозы в лактат в мышцах и превращения лактата в глюкозу в печени, называют циклом Кори в честь Карла и Герти Кори, работы которых (1930–1940 гг.) позволили объяснить суть и роль данного метаболического пути (см. доп. 15-1).

Кровеносная система большинства мелких позвоночных достаточно быстро переносит кислород к мышцам, так что не возникает необходимости использовать анаэробный путь разложения мышечного гликогена. Например, перелетные птицы часто без отдыха покрывают большие расстояния с высокой скоростью, не превышая обычных затрат кислорода. В мышцах многих «бегающих» животных среднего размера также поддерживается почти исключительно аэробный метаболизм. А вот кровеносная система более крупных животных, к которым относится и человек, не может полностью обеспечивать аэробный метаболизм в мышцах в длительные периоды интенсивной мышечной активности. Такие животные в обычных условиях передвигаются довольно медленно, а интенсивная мышечная деятельность развивается лишь в случае крайней необходимости, поскольку подобные вспышки активности требуют периода длительного восстановления для погашения перерасхода кислорода.

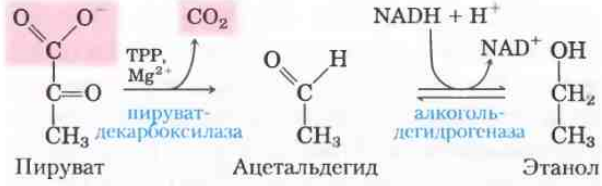
Аллигаторы и крокодилы, например, в обычных условиях довольно пассивны. Лишь при возбуждении они способны на молниеносную атаку и стремительные удары своим мощным хвостом. Время такой взрывной активности очень короткое, а после этого наступает длительный период восстановления. Движения, осуществляемые в случае крайней необходимости, сопровождаются сбраживанием молочной кислоты в мышцах с образованием АТР. При этом запасы мышечного гликогена быстро расходуются, а концентрация лактата в мышцах и внеклеточных жидкостях резко возрастает. После бега на стометровку спортсмен восстанавливает дыхание примерно за полчаса или даже быстрее, а вот аллигатору после вспышки активности может потребоваться много часов покоя и повышенного потребления кислорода для удаления избытка лактата из крови и восстановления уровня мышечного гликогена.

Другие крупные животные, например слоны и носороги, а также ныряющие млекопитающие, такие как киты и тюлени, имеют похожие особенности метаболизма. Возможно, динозавры и другие вымершие крупные животные для своей мышечной активности использовали молочнокислое брожение, требующее длительных периодов восстановления, и в это время они были уязвимы для более мелких хищников, способных лучше использовать кислород и более приспособленных к продолжительной мышечной активности.

Глубоководные исследования позволили обнаружить огромное разнообразие жизни на больших морских глубинах, где концентрация кислорода практически равна нулю. Например, оказалось, что у первобытного целаканта — огромной рыбы, живущей у побережья Южной Африки на глубинах около 4000 м, практически во всех тканях осуществляется анаэробный метаболизм. В организме этого животного углеводы превращаются в лактат и другие продукты, большинство из которых должны удаляться. Некоторые морские позвоночные получают АТР путем сбраживания глюкозы до этанола и CO_2.

Этанол — восстановленный продукт спиртового брожения

Дрожжи и другие микроорганизмы сбраживают глюкозу не до лактата, а до CO_2 и этилового спирта. Сначала в процессе гликолиза глюкоза превращается в пируват, а затем пируват в двустадийном процессе разлагается на этанол и CO_2:



На первой стадии пируват необратимо декарбоксилируется под действием **пируватдекарбоксилазы**. Эта простая реакция декарбоксилирования не приводит к окислению пирувата. Пируватдекарбоксилаза требует присутствия ионов Mg^{2+} и кофермента тиаминпирофосфата (TPP). На второй стадии ацетальдегид восстанавливается до этанола под действием **алкогольдегидрогеназы**; при этом роль восстановителя играет NADH, образовавшийся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата. Данная реакция хорошо изучена и является примером переноса водорода с участием NADH **(рис. 14-13)**. Таким образом, продукты спиртового брожения — этанол и CO_2, что можно записать в виде суммарного уравнения реакции:

$$\text{Глюкоза} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i \rightarrow 2\ \text{этанол} + 2\ CO_2 + 2\ \text{ATP} + 2\ H_2O$$

Как и в случае молочнокислого брожения, при спиртовом брожении не меняется соотношение числа атомов водорода и углерода при превращении глюкозы (H : C = 12 : 6 = 2) в две молекулы этанола и две молекулы CO_2 (в сумме H : C = 12 : 6 = 2). При любом процессе брожения в исходных веществах и продуктах реакции отношение H : C одинаково.

Пируватдекарбоксилаза обнаружена у пивных и пекарских дрожжей (*Saccaromyces cerevisiae*), а также у всех других организмов, сбраживающих глюкозу до этилового спирта, в том числе и у некоторых растений. Характерные пузырьки в шампанском связаны с декарбоксилированием пирувата и образованием CO_2 под действием пивных дрожжей. Древнее искусство пивоварения кроме реакций спиртового брожения включает в себя целый ряд других ферментативных процессов (доп. 14-3). При изготовлении хлеба именно CO_2, выделяющийся при смешивании дрожжей с сахаром, заставляет подниматься тесто. Этот фермент отсутствует в тех тканях позвоночных, а также у тех организмов, которые осуществляют молочнокислое брожение.

Алкогольдегидрогеназа обнаружена у многих организмов, способных метаболизировать этанол, в том числе у человека. В печени этот фермент катализирует окисление этанола как потребленного человеком, так и образованного кишечной микрофлорой; этот процесс сопровождается восстановлением NAD^+ до NADH. В данном случае реакция протекает в направлении, обратном образованию этанола при брожении.

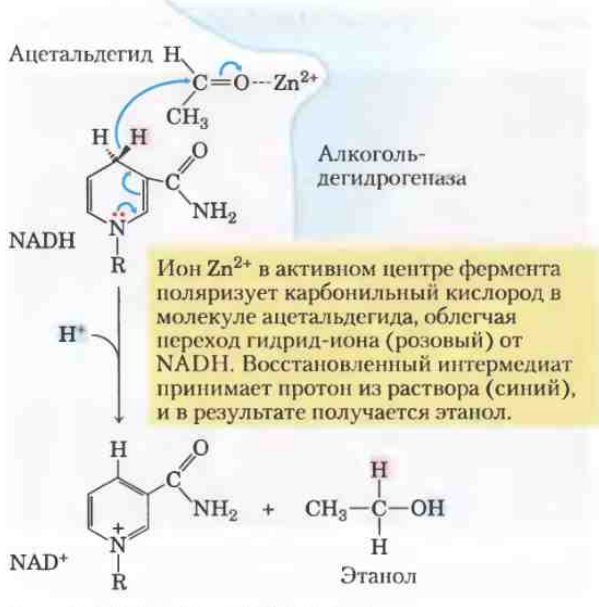


Рис. 14-13. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Действие алкогольдегидрогеназы. ● Механизм действия алкогольдегидрогеназы

Тиаминпирофосфат переносит «активные» ацетальдегидные группы

При рассмотрении реакции, катализируемой пируватдекарбоксилазой, мы впервые сталкиваемся с коферментом **тиаминпирофосфатом (TPP; рис. 14-14)** — производным витамина B_1. Недостаток витамина B_1 в рационе питания человека может привести к развитию болезни бери-бери, характеризующейся накоплением жидкости в организме (отеками), болями, параличом; болезнь может иметь летальный конец. ■

Дополнение 14-3 Спиртовое брожение: пивоварение и производство биотоплива

Пивоварением люди начали заниматься давно, а на определенном этапе перенесли этот процесс в крупномасштабное производство. Пиво является продуктом спиртового брожения углеводов, содержащихся в семенах зерновых культур (например, ячменя), под действием гликолитических ферментов дрожжей. Углеводы, в основном полисахариды, прежде всего должны расщепиться на ди- и моносахариды. Поэтому сначала готовят солод, для чего семена ячменя проращивают до тех пор, пока они не синтезируют необходимые гидролитические ферменты, а затем дальнейшее проращивание прекращают нагреванием. Полученный солод содержит ферменты, катализирующие гидролиз β-связей в целлюлозе и в других полисахаридах из клеточных стенок семенных оболочек ячменя, а также другие ферменты, например α-амилазу и мальтазу.

Следующий производственный процесс пивоварения — приготовление сусла, т. е. питательной среды для роста клеток дрожжей. Солод смешивают с водой, а затем дробят или растирают. При этом ферменты солода воздействуют на полисахариды и расщепляют их до мальтозы, глюкозы и других простых сахаров, растворимых в водной среде. Затем клеточный остаток отделяют, а жидкое сусло варят, добавляя для ароматизации хмель, охлаждают и аэрируют.

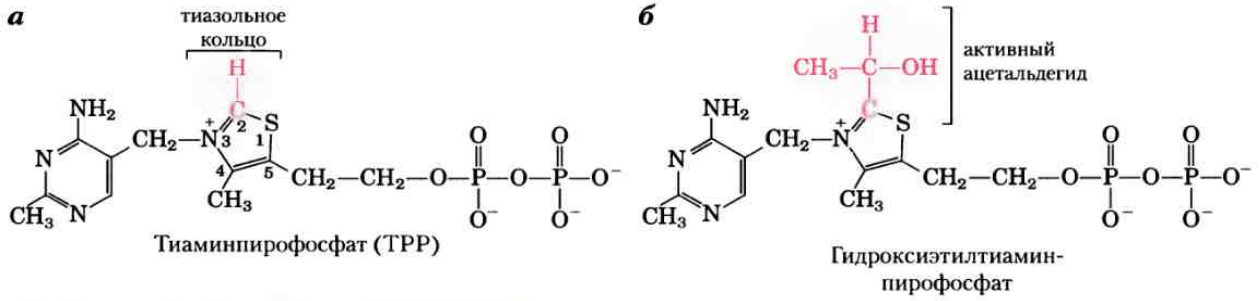
На следующем этапе добавляют клетки дрожжей. В аэробном сусле дрожжи растут и размножаются очень быстро, получая энергию из присутствующих в сусле сахаров, причем этиловый спирт не образуется, поскольку при достаточном содержании кислорода дрожжи окисляют возникающий в результате гликолиза пируват до CO_2 и H_2O через цикл лимонной кислоты. После того как весь растворенный в сусле кислород исчерпан, клетки дрожжей переключаются на анаэробный метаболизм и начинают сбраживать сахара до этилового спирта и CO_2. Процесс брожения контролируется концентрацией образующегося этанола, значением pH и количеством оставшихся сахаров. После остановки брожения дрожжевые клетки удаляют, а молодое пиво готово для финальной стадии дображивания.

На этой заключительной стадии пивоварения контролируют количество пены, возникающей из-за наличия в пиве растворенных белков. Обычно образование пены регулируется протеолитическими ферментами, выделяющимися в процессе приготовления солода. Если эти ферменты воздействуют на белки слишком долго, то пены и пузырьков возникает мало, а если недостаточно долго, то охлажденное пиво не будет прозрачным. Иногда для пенообразования к пиву добавляют протеолитические ферменты из других источников.

Технология крупномасштабного производства алкогольных напитков в настоящее время используется и для решения совершенно иной задачи — для производства этанола в качестве альтернативного топлива. Из-за понимания того факта, что ископаемые ресурсы могут закончиться, а также из-за роста цен на топливо для двигателей внутреннего сгорания, проявляется интерес к этанолу как альтернативе традиционному топливу или добавки к топливу. Основным преимуществом этилового спирта в качестве топлива является возможность его получения из сравнительно *недорогих* и *возобновляемых* источников, богатых сахарозой, крахмалом или целлюлозой (крахмал — из кукурузы или пшеницы, сахароза — из сахарной свеклы или сахарного тростника, а целлюлоза — из соломы, отходов деревообрабатывающей промышленности или твердых городских отходов). Обычно сначала исходный материал химическим путем превращают в моносахариды, а затем эту смесь используют в качестве питательного субстрата для определенных штаммов дрожжей в промышленных ферментерах (рис. 1). В результате ферментации образуется не только этанол, но и побочные продукты, такие как белки, которые можно использовать в качестве кормовых добавок в животноводстве.

Рис. 1. Промышленное брожение для получения биотоплива и других продуктов обычно проводят в ферментерах объемом на тысячи литров среды.

Тиаминпирофосфат (TPP) играет важную роль при расщеплении связей, прилегающих к карбонильной группе, например при декарбоксилировании α-кетокислот, а также в тех химических реакциях, при которых происходит перенос активированной ацетальдегидной группы между двумя атомами углерода (табл. 14-1). Функциональная часть молекулы TPP (тиазольное кольцо) имеет довольно кислый протон при атоме С-2. Диссоциация этого протона приводит к образованию



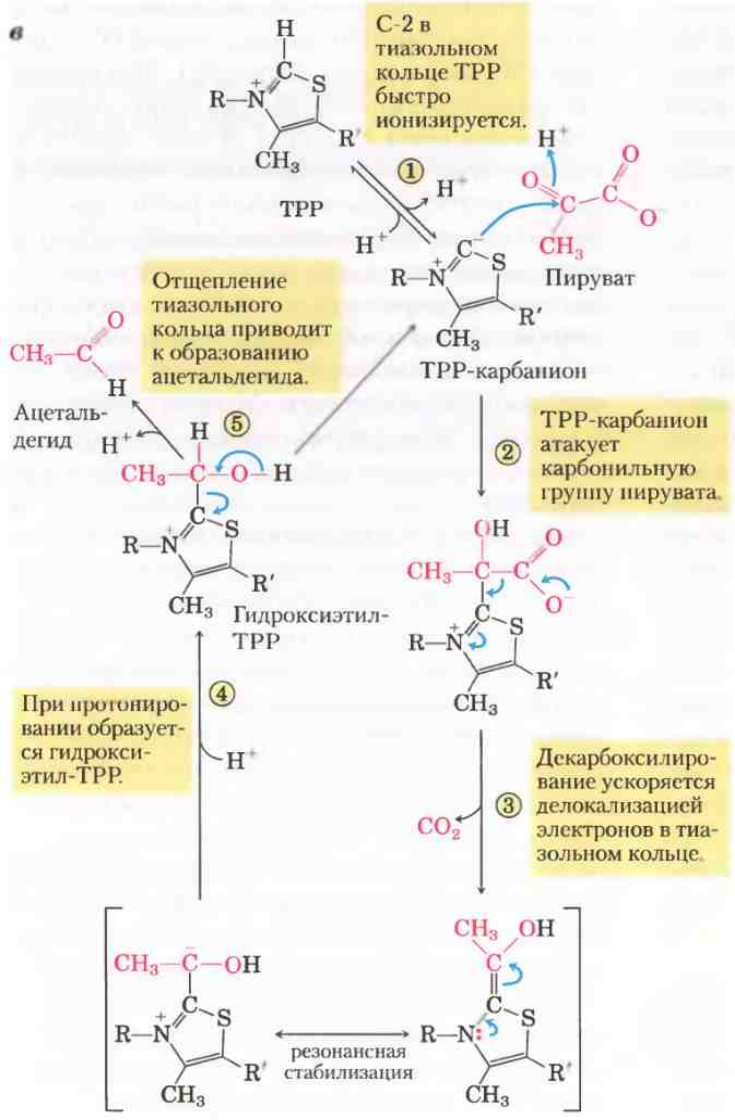
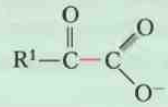
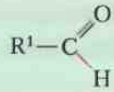
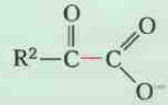
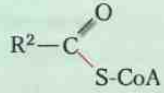
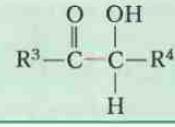
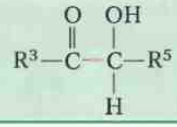


Рис. 14-14. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Тиаминпирофосфат (TPP) и его роль при декарбоксилировании пирувата. *а* — в форме TPP витамин B_1 (тиамин) выступает в роли кофермента. Красным цветом выделен реакционноспособный атом углерода в тиазольном кольце молекулы TPP. В реакции, катализируемой пируватдекарбоксилазой, два из трех атомов углерода пирувата временно переносятся на TPP в форме гидроксиэтильной («активной» ацетальдегидной) группы (*б*), которая впоследствии высвобождается в виде ацетальдегида. *в* — тиазольное кольцо в TPP стабилизирует карбанион, поскольку является электронодефицитной структурой, позволяющей делокализовать электроны карбаниона за счет резонансной стабилизации. Обладающие таким свойством структуры иногда называют «электронными ловушками»; они играют важную роль во многих биохимических реакциях (здесь помогают разорвать связь С–С). ● **Механизм действия тиаминпирофосфата**

Таблица 14-1 Некоторые ТРР-зависимые реакции

Фермент	Путь(и)	Расщепляемая связь	Образующаяся связь
Пируватдекарбоксилаза	Спиртовое брожение		
Пируватдегидрогеназа α-Кетоглутаратдегидрогеназа	Синтез ацетил-CoA Цикл лимонной кислоты		
Транскетолаза	Реакции ассимиляции углерода Пентозофосфатный путь		

карбаниона, который как раз и является активным началом в ТРР-зависимых реакциях (рис. 14-14). Карбанион легко взаимодействует с карбонильными группами, а тиазольное кольцо выступает в качестве «электронной ловушки», сильно облегчающей такие реакции, как декарбоксилирование под действием пируватдекарбоксилазы.

С помощью брожения получают многие продукты питания и химические реагенты

Уже несколько тысяч лет назад наши предки использовали процесс брожения для получения и переработки продуктов питания. Некоторые микроорганизмы, присутствующие в сырых пищевых продуктах, сбраживают углеводы и превращают их в продукты метаболизма, придающие пище ее характерную форму, текстуру и вкус. Йогурт, известный с библейских времен, образуется в результате жизнедеятельности бактерии *Lactobacillus bulgaricus*, сбраживающей углеводы молока до молочной кислоты; происходящее при этом уменьшение pH среды приводит к осаждению молочных белков, что и создает густую консистенцию и кисловатый привкус натурального йогурта. Бактерия *Propionibacterium freudenreichii* сбраживает углеводы молока с образованием пропионовой кислоты и CO_2; пропионовая кислота осаждает молочные белки, а пузырьки газа создают сырные дырки, так характерные для сортов швейцарского сыра. Многие другие продукты питания также получают в результате брожения; это пикули, квашеная капуста, сосиски и колбасы, соевый соус, а также множество излюбленных продуктов национальной кухни, таких как кимчи (Корея), темпояк (Индонезия), кефир (Россия), дахи (Индия) и позол (Мексика). Уменьшение pH среды, сопровождающее брожение, позволяет консервировать продукты питания, поскольку большинство микроорганизмов, вызывающих порчу продуктов, не способны расти при низких значениях pH. В сельском хозяйстве отходы растениеводства, такие как стебли кукурузы, используют на корм скоту в виде силоса; для приготовления силосной массы отходы собирают в больших контейнерах (силосных ямах), где при ограниченном доступе воздуха происходит микробное брожение, что снижает pH силосной массы. Силос может храниться долгое время и не портиться.

В 1910 г. Хаим Вейцман (позже он стал первым президентом Израиля) обнаружил, что бактерия *Clostridium acetobutyricum* превращает крахмал в смесь бутилового спирта и ацетона. Это открытие послужило началом развития промышленной ферментации, при которой некоторые доступные богатые сахарами вещества (например, кукурузный крахмал или мелассу), смешивают с чистой культурой специфических микроорганизмов, способных превратить их в более ценные продукты. Так, используемый для получения газохола (смесь спирта с бензином) метанол, а также муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, янтарная кислоты, глицерин, этанол, изопропанол, бутанол и бутандиол получают в промышленности с помощью ферментации. Промышленную ферментацию обычно проводят в больших закрытых цистернах, в ко-

торых температура и подача воздуха регулируются таким образом, чтобы создать наиболее благоприятные условия для развития полезных микроорганизмов и неблагоприятные — для нежелательных микроорганизмов. Прелесть промышленной ферментации заключается в том, что сложные, многостадийные химические превращения осуществляются с высоким выходом и небольшим количеством побочных продуктов под действием самовоспроизводящихся живых «химических заводов» — микробных клеток. В некоторых технологиях применяются иммобилизованные на инертном носителе клетки, что позволяет осуществлять непрерывный процесс, пропуская исходный субстрат через слой клеток и собирать на выходе конечный продукт. Это ли не мечта инженеров!

Краткое содержание раздела 14.3 ПРЕВРАЩЕНИЕ ПИРУВАТА В АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ: БРОЖЕНИЕ

- Образующийся в процессе гликолиза NADH должен быть вновь переведен в окисленную форму — в NAD^+, который необходим в качестве акцептора электронов в начале второй стадии гликолиза. В аэробных условиях это осуществляется в митохондриях путем передачи электронов от NADH на O_2.

- В анаэробных условиях или при пониженном содержании кислорода многие организмы регенерируют NAD^+, перенося электроны от NADH на молекулу пирувата, в результате чего образуется лактат. Другие организмы, такие как дрожжи, получают NAD^+ при восстановлении пирувата до этилового спирта и CO_2. При таком анаэробном процессе (брожении) не происходит окисления или восстановления углерода в молекулах глюкозы.

- Многие микроорганизмы способны сбраживать сахар, содержащийся в сырой пище, что изменяет кислотность (pH), вкус и текстуру продуктов и, кроме того, защищает их от гниения. Процесс брожения используют в промышленных масштабах для получения различных ценных продуктов из недорогого исходного органического сырья.

14.4. Глюконеогенез

Центральная роль глюкозы в метаболизме проявилась еще в начале эволюционного пути нашей биосферы, а для современных организмов — от микроба до человека — этот сахар остается практически универсальным источником энергии и строительным блоком. Некоторые ткани млекопитающих получают всю необходимую энергию только из глюкозы. Для головного мозга и нервной системы человека, а также эритроцитов, яичек, мозгового вещества почек и эмбриональных тканей глюкоза служит единственным или же главным источником энергии. Только для работы головного мозга ежедневно требуется 120 г глюкозы — это больше половины глюкозы, запасенной в форме гликогена в мышцах и печени. Однако этих запасов глюкозы не всегда хватает; гликоген расходуется между приемами пищи, при длительном голодании и после интенсивной физической нагрузки. В такие периоды организм должен синтезировать глюкозу из предшественников неуглеводной природы. Этот синтез осуществляется с помощью метаболического пути, называемого **глюконеогенезом** («новое» образование сахаров), в котором пируват и другие соединения, состоящие из трех или четырех атомов углерода, превращаются в глюкозу.

Глюконеогенез происходит в клетках животных, растений и микроорганизмов. Механизм этого процесса примерно одинаков во всех клетках и во всех организмах. У животных важными предшественниками глюкозы являются такие трехуглеродные соединения, как лактат, пируват и глицерин, а также некоторые аминокислоты **(рис. 14-15)**. У млекопитающих глюконеогенез протекает преимущественно в печени и в меньшей степени в корковом веществе почек. Синтезированная глюкоза поступает в кровь для снабжения других тканей. Лактат, образующийся в мышцах в результате анаэробного гликолиза при тяжелой физической нагрузке, снова поступает в печень и превращается в глюкозу, которую кровь переносит обратно в мышцы, где из нее образуется гликоген; данный цикл называют циклом Кори (доп. 14-2; см. также рис. 23-20). В семенах растений запасные жиры и белки посредством нескольких метаболических путей, в том числе и глюконеогенеза, превращаются в дисахарид сахарозу, распределяющуюся по всему растению при его росте. Глюкоза и ее производные служат строительным мате-

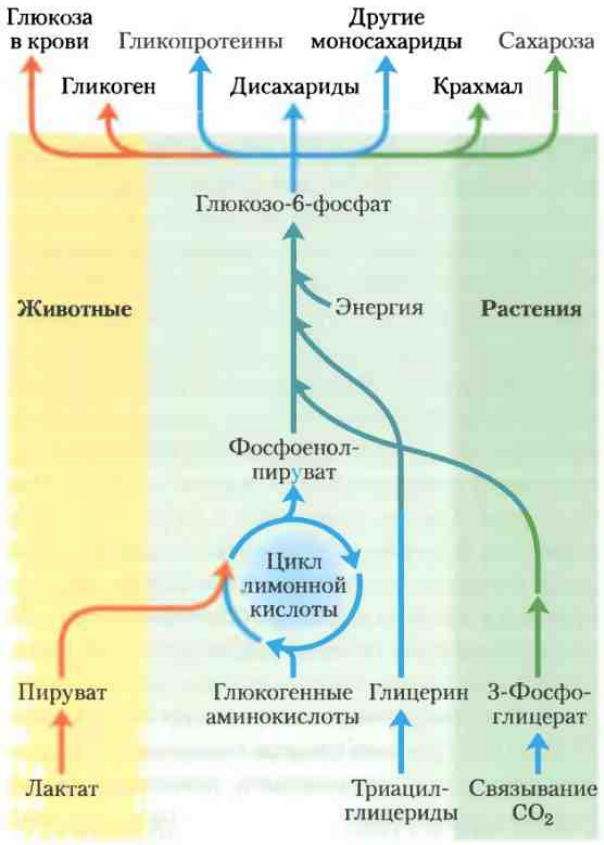


Рис. 14-15. Синтез углеводов из простых предшественников. Путь превращения фосфоенолпирувата в глюкозо-6-фосфат является общим при биосинтетических превращениях многих предшественников углеводов в клетках животных и растений. Однако только растения и фотосинтезирующие бактерии способны использовать CO_2 для синтеза углеводов. В процессе превращения пирувата в фосфоенолпируват образуется оксалоацетат — промежуточное соединение цикла лимонной кислоты, который обсуждается в гл. 16. Таким образом, любое соединение, которое можно превратить в пируват или оксалоацетат, может служить исходным материалом для глюконеогенеза. К таким веществам относятся аланин и аспартат, превращаемые в пируват и оксалоацетат соответственно, а также другие аминокислоты, из которых образуются трех- или четырехчленные углеродные фрагменты (так называемые глюкогенные аминокислоты; см. табл. 14-4 и рис. 18-5). Растения и фотосинтезирующие бактерии обладают уникальной способностью преобразовывать CO_2 в углеводы, используя глиоксилатный цикл (с. 212).

Таблица 14-2 Изменение свободной энергии в реакциях гликолиза в эритроцитах

Реакция гликолиза	$\Delta G'^{\circ}$ (кДж/моль)	ΔG (кДж/моль)
① Глюкоза + ATP ⟶ глюкозо-6-фосфат + ADP	−16,7	−33,4
② Глюкозо-6-фосфат ⟷ фруктозо-6-фосфат	1,7	от 0 до 25
③ Фруктозо-6-фосфат + ATP ⟶ фруктозо-1,6-бисфосфат + ADP	−14,2	−22,2
④ Фруктозо-1,6-бисфосфат ⟷ дигидроксиацетонфосфат + глицеральдегид-3-фосфат	23,8	от 0 до −6
⑤ Дигидроксиацетонфосфат ⟷ глицеральдегид-3-фосфат	7,5	от 0 до 4
⑥ Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + NAD^+ ⟷ 1,3-бисфосфоглицерат + NADH + H^+	6,3	от −2 до 2
⑦ 1,3-Бисфосфоглицерат + ADP ⟷ 3-фосфоглицерат + ATP	−18,8	от 0 до 2
⑧ 3-Фосфоглицерат ⟷ 2-фосфоглицерат	4,4	от 0 до 0,8
⑨ 2-Фосфоглицерат ⟷ фосфоенолпируват + H_2O	7,5	от 0 до 3,3
⑩ Фосфоенолпируват + ADP ⟶ пируват + ATP	−31,4	−16,7

Примечание. Как определено в гл. 13 (с. 14–15), $\Delta G'^{\circ}$ представляет собой изменение стандартной свободной энергии; ΔG — это изменение свободной энергии, рассчитанное на основании реальных концентраций интермедиатов гликолиза, находящихся в эритроцитах в физиологических условиях при pH 7,0. Оранжевым цветом выделены обходные реакции глюконеогенеза. Приведенные выражения не уравнивались по числу атомов водорода и заряду (с. 28).

риалом для создания клеточной стенки растений, нуклеотидов и коферментов, а также множества других важнейших метаболитов. У многих микроорганизмов глюконеогенез начинается с простых органических молекул, состоящих из двух или трех атомов углерода, таких как ацетат, лактат и пропионат, содержащихся в питательной среде.

Хотя реакции глюконеогенеза одинаковы во всех организмах, метаболическое окружение и принципы регуляции этого процесса различаются в разных видах организмов и в разных тканях. В данном разделе мы обсудим, как протекает процесс глюконеогенеза в печени млекопитающих. В гл. 20 мы увидим, как фотосинтезирующие организмы используют этот метаболический путь для превращения первичных продуктов фотосинтеза в глюкозу для запасания ее в виде сахарозы или крахмала.

Метаболические пути гликолиз и глюконеогенез неидентичны, они протекают в противоположных направлениях, хотя на самом деле они имеют несколько общих стадий **(рис. 14-16)**; семь из 10 ферментативных реакций глюконеогенеза — это обратные реакции гликолиза. Три реакции гликолиза *in vivo* необратимы и не могут использоваться в глюконеогенезе: превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат под действием гексокиназы, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата под действием фосфофруктокиназы-1 и превращение фосфоенолпирувата в пируват при участии пируваткиназы (рис. 14-16). В клетках эти реакции характеризуются большим отрицательным изменением стандартной свободной энергии, в то время как другие реакции гликолиза имеют ΔG, близкое к нулю (табл. 14-2). В глюконеогенезе три необратимые стадии осуществляются другим набором ферментов, которые катализируют экзергонические реакции с таким значением ΔG, что они протекают необратимо в сторону образования глюкозы. Таким образом, в клетках как гликолиз, так и глюконеогенез протекают необратимо. У животных оба пути осуществляются в основном в цитозоле, что требует их координированной регуляции. Независимая регуляция двух метаболических путей осуществляется через те ферментативные стадии, которые не являются для них общими.

Мы начнем изучение глюконеогенеза с рассмотрения трех обходных реакций (вспомните, что под «обходными» реакциями подразумевают реакции, обходящие необратимые стадии гликолиза).

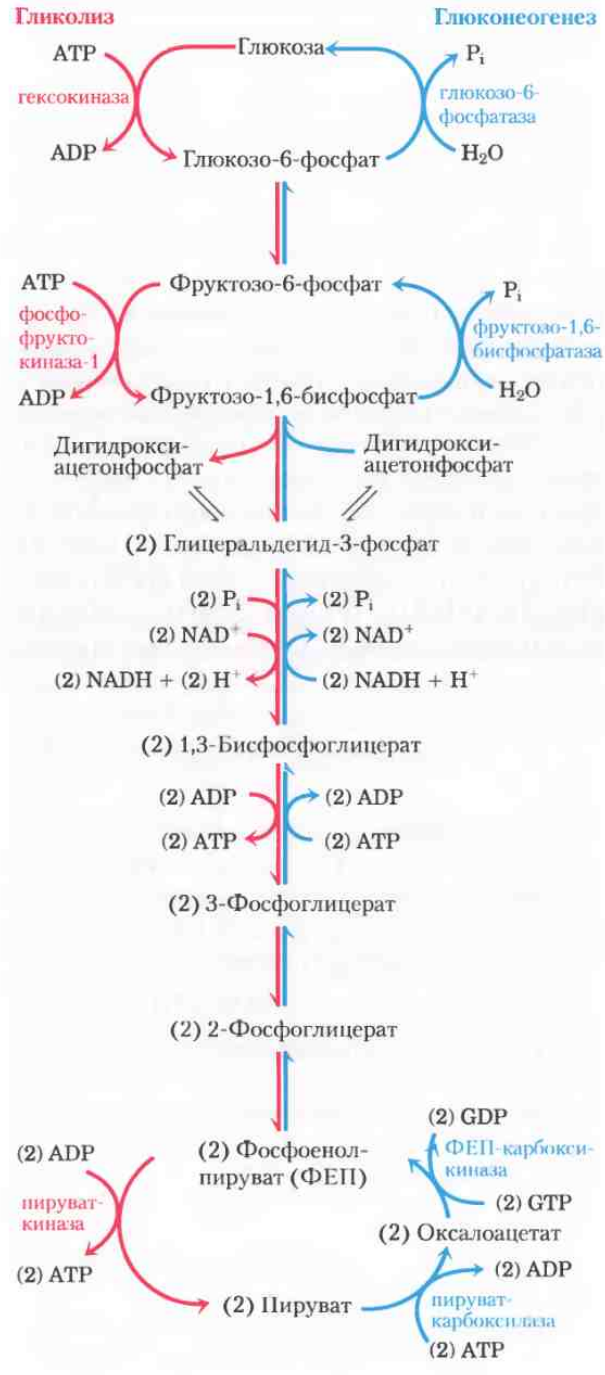


Рис. 14-16. Противоположно направленные пути гликолиза и глюконеогенеза в печени крысы. Реакции гликолиза — *слева*, красным цветом; реакции глюконеогенеза — *справа*, синим цветом. Главные участки регуляции глюконеогенеза, изображенные на схеме, обсуждаются далее в данной главе и подробнее — в гл. 15. На рис. 14-19 представлен альтернативный путь превращений оксалоацетата, реализующийся в митохондриях.

Превращение пирувата в фосфоенолпируват протекает в две экзергонические стадии

Первая обходная реакция глюконеогенеза — это превращение пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП). Данный процесс не может осуществляться простым обращением пируваткиназной реакции гликолиза (с. 79), которая характеризуется большим отрицательным значением изменения стандартной свободной энергии и поэтому в интактной клетке необратима (табл. 14-2, реакция ⑩). Вместо этого фосфорилирование пирувата реализуется по обходному пути, состоящему из последовательности реакций, которые в эукариотических клетках требуют участия как цитозольных, так и митохондриальных ферментов. Как мы увидим далее, изображенный на рис. 14-16 и описанный здесь во всех подробностях путь метаболизма представляет собой один из двух возможных путей превращения пирувата в ФЕП. Этот путь является основным, если предшественником для образования глюкозы служит пируват или аланин. Второй путь, описанный ниже, преобладает в том случае, когда предшественником глюкозы служит лактат.

Прежде всего пируват транспортируется из цитозоля в митохондрии или образуется в митохондриях из аланина в процессе трансаминирования, при котором α-аминогруппа аланина удаляется (в результате чего образуется пируват) и переносится на α-кетокислоту (реакции трансаминирования обсуждаются в гл. 18). Затем митохондриальный фермент **пируваткарбоксилаза** в присутствии кофермента **биотина** превращает пируват в оксалоацетат (**рис. 14-17**):

$$\text{Пируват} + HCO_3^- + \text{ATP} \rightarrow \text{оксалоацетат} + \text{ADP} + P_i \quad (14\text{-}4)$$

Биотин в реакции карбоксилирования играет роль переносчика активированного гидрокарбоната (**рис. 14-18**). Механизм реакции представлен на рис. 16-16. (Отметим, что HCO_3^- возникает при диссоциации угольной кислоты, образующейся из $CO_2 + H_2O$.) В результате фосфорилирования HCO_3^- под действием ATP получается смешанный ангидрид (карбоксифосфат); затем биотин вытесняет фосфат, и образуется карбоксибиотин.

Пируваткарбоксилаза — это первый регуляторный фермент глюконеогенеза, требующий присутствия ацетил-CoA в качестве активатора (ацетил-CoA образуется при окислении жирных кислот (гл. 17), и его накопление свидетельствует о возможности использования жирных кислот в качестве источника энергии). Как мы увидим в гл. 16 (см. рис. 16-15), катализируемая пируваткарбоксилазой реакция способна поставлять интермедиаты для другого важного метаболического пути — цикла лимонной кислоты.

Митохондриальная мембрана не содержит переносчиков оксалоацетата, поэтому до переноса в цитозоль образовавшийся из пирувата оксалоацетат переходит в восстановленную форму

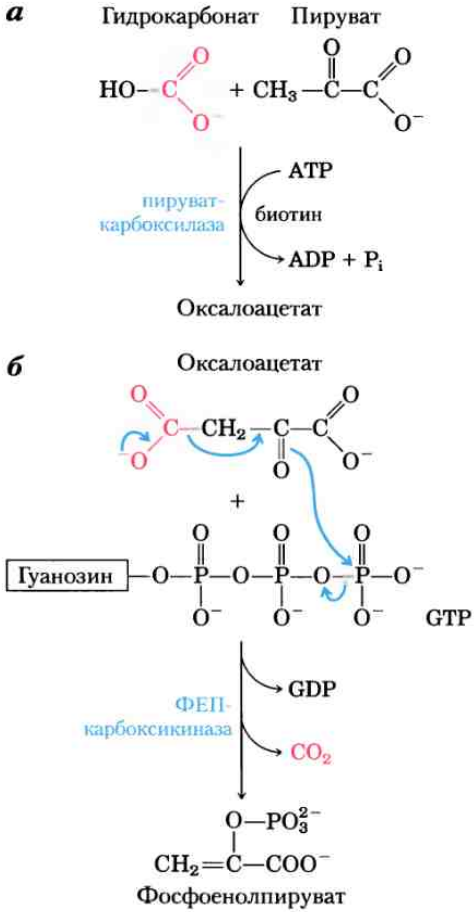


Рис. 14-17. Синтез фосфоенолпирувата из пирувата. *а* — в митохондриях пируват превращается в оксалоацетат в биотинзависимой реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой. *б* — в цитозоле оксалоацетат под действием ФЕП-карбоксикиназы превращается в фосфоенолпируват, а включившийся в состав оксалоацетата CO_2 вновь выделяется. Декарбоксилирование приводит к перераспределению электронов, что облегчает атаку карбонильного кислорода на γ-фосфатную группу GTP.

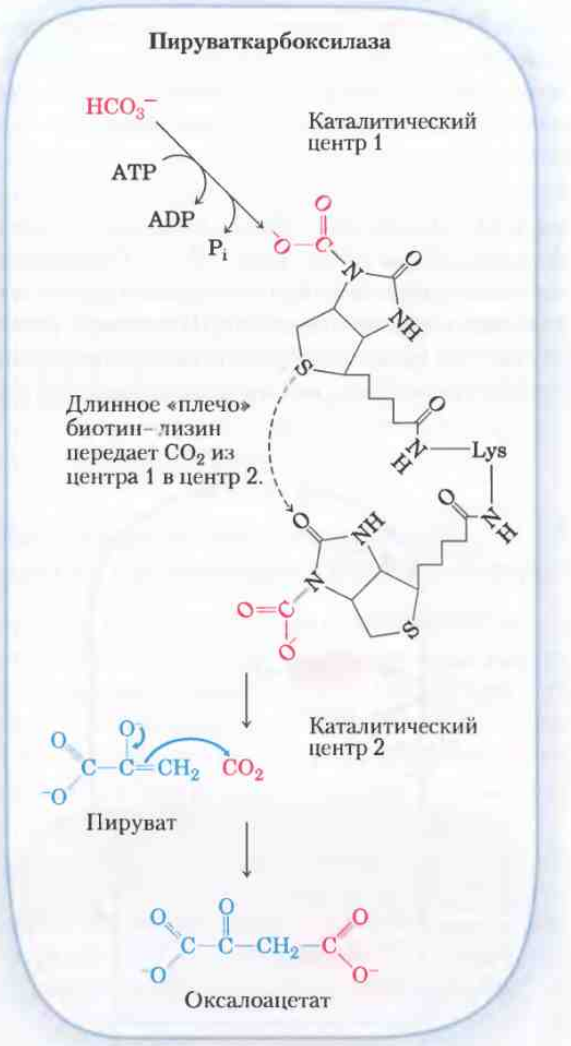


Рис. 14-18. Роль биотина в пируваткарбоксилазной реакции. Кофактор биотин ковалентно связан с ферментом амидной связью, соединяющей его с ε-аминогруппой остатка лизина, в результате чего образуется биотинилированный фермент. Пируваткарбоксилазная реакция протекает в две стадии, которые происходят в двух разных каталитических центрах на молекуле фермента. В каталитическом центре 1 гидрокарбонат превращается в CO_2 с затратой одной молекулы ATP. Затем CO_2 реагирует с биотином, образуя комплекс карбоксибиотина с ферментом. Длинное «плечо», состоящее из биотина и боковой цепи того лизина, к которому он присоединен, переносит CO_2 от комплекса карбоксибиотин–фермент на каталитический центр 2 на поверхности фермента, где CO_2 высвобождается и взаимодействует с пируватом, в результате чего образуется оксалоацетат и регенерируется биотинилированный фермент. Центральная роль подобных «гибких плеч» в переносе интермедиатов между активными центрами фермента проиллюстрирована на рис. 16-17, а детали механизма пируваткарбоксилазной реакции представлены на рис. 16-16. Подобный механизм реализуется и в других реакциях биотинзависимого карбоксилирования, катализируемых, например, пропионил-CoA-карбоксилазой (см. рис. 17-11) и ацетил-CoA-карбоксилазой (см. рис. 21-1).

(малат — соль молочной кислоты) под действием митохондриального фермента **малатдегидрогеназы**, используя NADH:

$$\text{Оксалоацетат} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-малат} + \text{NAD}^+ \quad (14\text{-}5)$$

В этой реакции изменение стандартной свободной энергии довольно значительное, но в физиологических условиях (в том числе при очень низкой концентрации оксалоацетата) $\Delta G \approx 0$, и реакция легко протекает в обратном направлении. Митохондриальная малатдегидрогеназа участвует и в глюконеогенезе, и в цикле лимонной кислоты, однако общие потоки метаболитов в этих двух процессах противоположные по направлению.

Малат покидает митохондрии с помощью специальной транспортной системы, находящейся во внутренней митохондриальной мембране (см. рис. 19-30). В цитозоле малат вновь окисляется до оксалоацетата с образованием NADH:

$$\text{Малат} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{оксалоацетат} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (14\text{-}6)$$

Оксалоацетат затем превращается в ФЕП под действием **фосфоенолпируваткарбоксикиназы** (рис. 14-17). Эта Mg^{2+}-зависимая реакция требует присутствия GTP в качестве донора фосфорильной группы:

$$\text{Оксалоацетат} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{ФЕП} + \text{CO}_2 + \text{GDP} \quad (14\text{-}7)$$

Во внутриклеточных условиях реакция обратима; образование одного богатого энергией фосфата (ФЕП) уравновешивается гидролизом другого фосфата (GTP).

Уравнение этого обходного метаболического пути получаем при суммировании уравнений от (14-4) до (14-7):

$$\text{Пируват} + \text{ATP} + \text{GTP} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{ФЕП} + \text{ADP} + \text{GDP} + \text{P}_i + \text{CO}_2 \quad (14\text{-}8)$$

$$\Delta G'^\circ = 0{,}9 \text{ кДж/моль}$$

Итак, для превращения одной молекулы пирувата в ФЕП должны израсходоваться две высокоэнергетические фосфатные группы (одна от ATP и одна от GTP), каждая из них при внутриклеточных условиях обладает энергией ~50 кДж/моль. Напротив, при превращении ФЕП в пируват в процессе гликолиза лишь одна молекула ATP синтезируется из ADP. Хотя изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}$ двустадийного превращения пирувата в ФЕП составляет 0,9 кДж/моль, истинное изменение свободной энергии с учетом внутриклеточных концентраций интермедиатов имеет довольно большое отрицательное значение (−25 кДж/моль). Это связано с тем, что образующийся ФЕП быстро расходуется в других реакциях, так что его концентрация постоянно находится на достаточно низком уровне. Таким образом, внутри клетки данная реакция практически необратима.

Обратите внимание, что в реакции, катализируемой ФЕП-карбоксикиназой, высвобождается та же самая молекула CO_2, что присоединяется к пирувату на стадии, катализируемой пируваткарбоксилазой (рис. 14-17, *б*). Эта последовательность реакций карбоксилирования–декарбоксилирования служит для «активации» пирувата, поскольку декарбоксилирование оксалоацетата облегчает образование ФЕП. В гл. 21 мы обсудим, как подобная последовательность реакций карбоксилирования–декарбоксилирования используется для активации ацетил-CoA в биосинтезе жирных кислот (см. рис. 21-1).

Поясним, почему эти реакции происходят в митохондриях. Отношение [NADH]/[NAD^+] в цитозоле составляет $8 \cdot 10^{-4}$, что примерно в 10^5 раз ниже, чем в митохондриях. Поскольку NADH из цитозоля расходуется в процессе глюконеогенеза для превращения 1,3-бисфосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат (рис. 14-16), без достаточного количества NADH биосинтез глюкозы происходить не может. Транспортировка малата из митохондрий в цитозоль и его превращение в оксалоацетат способствует переносу восстановительных эквивалентов в цитозоль, где наблюдается их дефицит. Таким образом, превращение пирувата в ФЕП обеспечивает важный баланс в процессе глюконеогенеза между произведенным и израсходованным в цитозоле NADH.

Второй вариант обходной реакции от пирувата к ФЕП преобладает в тех случаях, когда исходным веществом для синтеза глюкозы служит лактат (**рис. 14-19**). Такой метаболический путь использует лактат, образовавшийся при гликолизе, например, в эритроцитах или в анаэробных условиях в мышцах, и он играет особенно важную роль у крупных позвоночных в период после интенсивной физической нагрузки (доп. 14-2). Превращение лактата в пируват в цитозоле гепатоцитов сопровождается образованием NADH, поэтому в данном случае нет нужды в переносе восстановительных эквивалентов (в форме малата) из митохондрий.

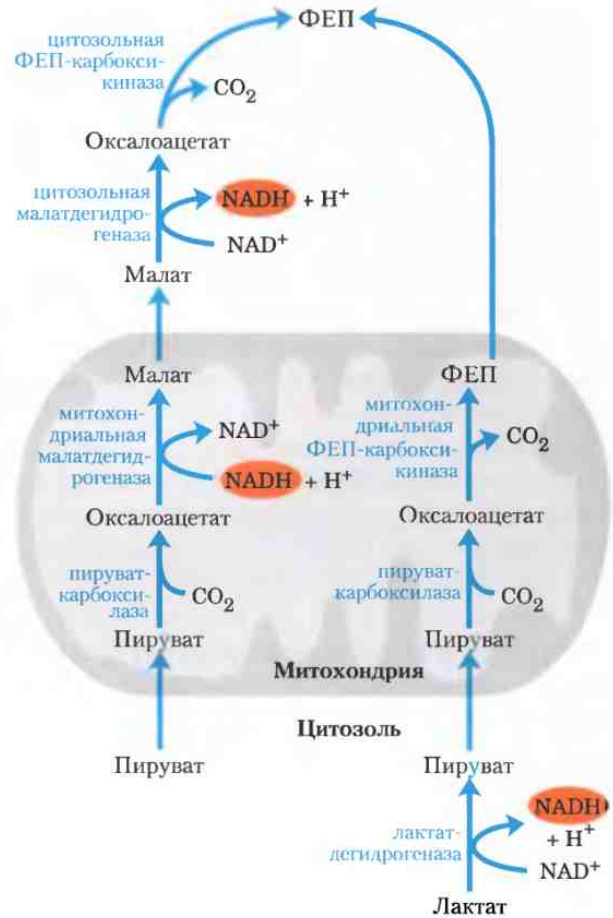


Рис. 14-19. Альтернативные пути образования фосфоенолпирувата (ФЕП) из пирувата. Вклад каждого из двух процессов определяется доступностью лактата или пирувата и потребностью в NADH в цитозоле для глюконеогенеза. *Справа* — путь, преобладающий в том случае, когда исходным соединением является лактат, поскольку в результате лактатдегидрогеназной реакции NADH находится в цитозоле и его не нужно выкачивать из митохондрий (см. текст).

Пируват, образовавшийся в лактатдегидрогеназной реакции, переносится в митохондрии и превращается в оксалоацетат под действием пируваткарбоксилазы, как описано выше. Однако этот оксалоацетат под действием митохондриального изофермента ФЕП-карбоксикиназы превращается сразу в ФЕП, а ФЕП выносится из митохондрий для продолжения глюконеогенеза. Митохондриальный и цитозольный изоферменты ФЕП-карбоксикиназы кодируются разными хромосомными генами, что служит еще одним примером того, как два различных фермента, катализирующих одну и ту же реакцию, локализованы в разных частях клетки или имеют разные метаболические функции (вспомните изоферменты гексокиназы).

Второй обходной путь — превращение фруктозо-1,6-бисфосфата в фруктозо-6-фосфат

Еще одной реакцией гликолиза, которая не может использоваться для глюконеогенеза, является фосфорилирование фруктозо-6-фосфата под действием фосфофруктокиназы-1 (PFK-1; табл. 14-2, реакция ③). Эта реакция характеризуется большим отрицательным значением изменения стандартной свободной энергии и, следовательно, необратима в условиях клетки, поэтому образование фруктозо-6-фосфата из фруктозо-1,6-бисфосфата (рис. 14-16) осуществляется под действием другого фермента — Mg^{2+}-зависимой **фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФаза-1)**. При этом происходит практически необратимый *гидролиз* фосфатной группы у атома С-1 (а не перенос фосфорильной группы на ADP):

$$\text{Фруктозо-1,6-бисфосфат} + H_2O \rightarrow \text{фруктозо-6-фосфат} + P_i$$

$$\Delta G'^\circ = -16{,}3 \text{ кДж/моль}$$

Следует отличать ФБФазу-1 от сходного фермента ФБФазы-2, выполняющего регуляторную функцию (см. гл. 15).

Третий обходной путь — образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата

Этот обходной путь реализуется на заключительной стадии глюконеогенеза и представляет собой дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата с образованием глюкозы (рис. 14-16). Обращение гексокиназной реакции (с. 71) требовало бы переноса фосфатной группы от глюкозо-6-фосфата на ADP с образованием ATP, что энергетически невыгодно (табл. 14-2, реакция ①). Реакция, катализируемая **глюкозо-6-фосфатазой**, не сопровождается синтезом ATP, это просто гидролиз эфира фосфорной кислоты:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + H_2O \rightarrow \text{глюкоза} + P_i$$

$$\Delta G'^\circ = -13{,}8 \text{ кДж/моль}$$

Этот Mg^{2+}-зависимый фермент обнаруживается на люменальной поверхности эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, клеток почек и эпителиальных клеток тонкой кишки (см. рис. 15-28), но не других тканей, которые, следовательно, не могут поставлять глюкозу в кровь. Если бы другие ткани содержали глюкозо-6-фосфат, данная ферментативная активность позволяла бы гидролизовать глюкозо-6-фосфат, необходимый этим тканям для гликолиза. Глюкоза, образующаяся в результате глюконеогенеза в печени или почках, а также потребляемая с пищей, доставляется в мозг и в мышечные ткани кровотоком.

Глюконеогенез необходим, но сопряжен с большими энергетическими затратами

Реакции биосинтеза, ведущие от пирувата к глюкозе (табл. 14-3), можно выразить суммарным уравнением:

$$2 \text{ Пируват} + 4 \text{ ATP} + 2 \text{ GTP} + 2 \text{ NADH} + 2 H^+ + 4 H_2O \rightarrow \text{глюкоза} + 4 \text{ ADP} + 2 \text{ GDP} + 6 P_i + 2 NAD^+ \quad (14\text{-}9)$$

Итак, для образования из пирувата одной молекулы глюкозы требуется израсходовать шесть высокоэнергетических фосфатных групп — четыре из ATP и две из GTP. Кроме того, для восстановления двух молекул 1,3-бисфосфоглицерата необходимы две молекулы NADH. Поэтому понятно, что с помощью уравнения 14-9 записана не просто обратная реакция превращения глюкозы в пируват в процессе гликолиза, таким образом показано, что затрачиваются только две молекулы ATP:

$$\text{Глюкоза} + 2 \text{ ADP} + 2 P_i + 2 NAD^+ \rightarrow 2 \text{ пируват} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + 2 H^+ + 2 H_2O$$

Синтез глюкозы из пирувата — это энергозатратный процесс. Большая часть энергетиче-

Таблица 14-3	Последовательность реакций глюконеогенеза с пируватом в начальной точке пути	
Пируват + HCO_3^- + ATP ⟶ оксалоацетат + ADP + P_i		×2
Оксалоацетат + GTP ⟷ фосфоенолпируват + CO_2 + GDP		×2
Фосфоенолпируват + H_2O ⟷ 2-фосфоглицерат		×2
2-Фосфоглицерат ⟷ 3-фосфоглицерат		×2
3-Фосфоглицерат + ATP ⟷ 1,3-бисфосфоглицерат + ADP		×2
1,3-Бисфосфоглицерат + NADH + H^+ ⟷ глицеральдегид-3-фосфат + NAD^+ + P_i		×2
Глицеральдегид-3-фосфат ⟷ дигидроксиацетонфосфат		
Глицеральдегид-3-фосфат + дигидроксиацетонфосфат ⟷ фруктозо-1,6-бисфосфат		
Фруктозо-1,6-бисфосфат ⟶ фруктозо-6-фосфат + P_i		
Фруктозо-6-фосфат ⟷ глюкозо-6-фосфат		
Глюкозо-6-фосфат + H_2O ⟶ глюкоза + P_i		
Итого: 2 Пируват + 4 ATP + 2 GTP + 2 NADH + 2 H^+ + 4 H_2O ⟶ глюкоза + 4 ADP + 2 GDP + 6 P_i + 2 NAD^+		

Примечание. Обходные реакции выделены оранжевым цветом; все другие реакции — обратные стадии гликолиза. Цифры справа указывают на то, что данная реакция должна быть учтена дважды, поскольку для образования молекулы глюкозы требуется два трехуглеродных предшественника. Здесь не рассматривались реакции, необходимые для восполнения в цитозоле NADH, затраченного в глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции (превращение лактата в пируват в цитозоле или перенос восстановительных эквивалентов из митохондрий в цитозоль в форме малата). Приведенные реакционные схемы не уравнивались по числу атомов водорода и заряду (с. 28).

ских затрат связана с необходимостью обеспечить необратимость процесса глюконеогенеза. Во внутриклеточных условиях общее изменение свободной энергии при гликолизе составляет примерно −63 кДж/моль, а изменение свободной энергии при глюконеогенезе −16 кДж/моль (в тех же условиях). Таким образом, в клетке гликолиз и глюконеогенез протекают необратимо.

Интермедиаты цикла лимонной кислоты и некоторые аминокислоты являются глюкогенными

Изложенный выше путь биосинтеза глюкозы реализуется при ее образовании не только из пирувата, но также из других четырех-, пяти- и шестиуглеродных соединений, возникающих в цикле лимонной кислоты (гл. 16). Цитрат, изоцитрат, α-кетоглутарат, сукцинил-CoA, сукцинат, фумарат и малат — интермедиаты цикла лимонной кислоты; они могут окисляться, превращаясь в оксалоацетат (см. рис. 16-7). Некоторые или даже все атомы углерода из большинства аминокислот,

Таблица 14-4	Глюкогенные аминокислоты (сгруппированы по месту вхождения в цикл лимонной кислоты)
Превращаются в пируват	**Превращаются в сукцинил-CoA**
Аланин	Изолейцин*
Цистеин	Метионин
Глицин	Треонин
Серин	Валин
Треонин	**Превращаются в фумарат**
Триптофан*	Фенилаланин*
Превращаются в α-кетоглутарат	Тирозин*
Аргинин	**Превращаются в оксалоацетат**
Глутамат	Аспарагин
Глутамин	Аспартат
Гистидин	
Пролин	

Примечание. Эти аминокислоты служат предшественниками глюкозы в крови или гликогена в печени, поскольку могут превращаться в пируват или интермедиаты цикла лимонной кислоты. Из 20 аминокислот лишь лейцин и лизин не способны поставлять углерод для синтеза глюкозы.

* Эти аминокислоты являются еще и кетогенными (см. рис. 18-21).

образующихся при катаболизме белков, в итоге включаются в состав пирувата или интермедиатов цикла лимонной кислоты. Иными словами, такие аминокислоты в конце концов превращаются в глюкозу, и поэтому их называют **глюкогенными** (табл. 14-4).

У млекопитающих наиболее важные глюкогенные аминокислоты — аланин и глутамин, переносящие аминогруппы в печень из других тканей (см. рис. 18-9). После удаления аминогрупп в митохондриях клеток печени углеродные скелеты этих аминокислот (пируват и α-кетоглутарат) легко включаются в глюконеогенез.

Млекопитающие не могут превращать жирные кислоты в глюкозу

Полное превращение жирных кислот в глюкозу в организме млекопитающих невозможно. Как мы увидим в гл. 17, катаболизм большинства жирных кислот приводит к образованию лишь ацетил-CoA. Млекопитающие не могут превращать ацетил-CoA в глюкозу, поскольку катализируемая пируватдегидрогеназой реакция необратима, а в клетках нет другого пути для превращения ацетил-CoA в пируват.

Растения, дрожжи и многие бактерии имеют возможность превращать ацетил-CoA в оксалоацетат (глиоксилатный цикл; см. рис. 16-20), поэтому эти организмы могут использовать жирные кислоты в качестве исходного материала для глюконеогенеза. Этот процесс имеет большое значение, например, при прорастании семян, пока листья не разовьются в достаточной степени, чтобы с помощью фотосинтеза производить необходимое количество энергии и углеводов; при прорастании семян запасные жиры используются для производства энергии и синтеза клеточной стенки.

Млекопитающие не могут превращать жирные кислоты в углеводы, но они могут использовать небольшое количество глицерина, образующегося при распаде жиров (триацил*глицеринов*), для глюконеогенеза. Фосфорилирование глицерина под действием глицераткиназы с последующим окислением центрального атома углерода приводит к образованию в печени дигидроацетонфосфата — промежуточного продукта глюконеогенеза.

Как мы увидим в гл. 21, глицерофосфат является важным промежуточным продуктом в синтезе триацилглицеринов в адипоцитах, однако эти клетки не имеют глицераткиназы и поэтому не могут фосфорилировать глицерин. Вместо этого адипоциты осуществляют укороченную версию глюконеогенеза, известную под названием **глицеронеогенеза**; этот процесс заключается в превращении пирувата в дигидроксиацетонфосфат в соответствии с начальными стадиями глюконеогенеза с последующим восстановлением дигидроксиацетонфосфата до глицерофосфата (см. рис. 21-21).

Гликолиз и глюконеогенез взаимно регулируются

Если процессы гликолиза (превращение глюкозы в пируват) и глюконеогенеза (превращение пирувата в глюкозу) идут одновременно с высокими скоростями, результатом являются потребление ATP и выделение тепла. Например, фосфофруктокиназа-1 и фруктозобисфосфатаза-1 катализируют реакции, идущие в противоположных направлениях:

$$\text{ATP} + \text{фруктозо-6-фосфат} \xrightarrow{\text{фосфофруктокиназа-1}} \text{ADP} + \text{фруктозо-1,6-бисфосфат}$$

$$\text{Фруктозо-1,6-бисфосфат} + H_2O \xrightarrow{\text{фруктозобисфосфатаза-1}} \text{фруктозо-6-фосфат} + P_i$$

Суммарное уравнение этих двух реакций:

$$\text{ATP} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_i + \text{тепло}$$

Эти две ферментативные реакции, как и ряд других реакций гликолиза и глюконеогенеза, регулируются аллостерически и путем ковалентной модификации (фосфорилирования).

В гл. 15 мы рассмотрим механизмы регуляции подробнее. Сейчас достаточно сказать, что регуляция происходит таким образом, что при интенсификации превращения глюкозы в пируват превращение пирувата в глюкозу ослабевает, и наоборот.

Дополнение 14-4 МЕДИЦИНА Почему пифагорейцы не ели фалафель: дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Бобы фава — основной компонент арабского блюда фалафель (с античных времен использовались в пищу жителями Средиземноморья и Ближнего Востока). Греческий философ и математик Пифагор запретил своим ученикам употреблять в пищу эти бобы из-за того, что они, возможно, были причиной фавизма — заболевания, приводящего в некоторых случаях к смерти, поскольку при фавизме в течение 24–48 ч после употребления в пищу бобов фава эритроциты начинают лизировать, высвобождая в кровь свободный гемоглобин, развивается анемия, желтуха, увеличивается печень и селезенка. Похожие симптомы наблюдаются при лечении противомалярийным препаратом примахином, сульфамидными антибиотиками, а также от некоторых гербицидов. Симптомы имеют генетическую природу, а именно дефицит фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ), который встречается примерно у 400 млн человек по всему миру. В большинстве случаев дефицит фермента никак не проявляется, а клинические симптомы наблюдаются лишь при сочетании генетического дефекта с воздействием определенных факторов внешней среды.

Первую реакцию пентозофосфатного пути, в результате которого образуется NADPH, катализирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (см. рис. 14-21). Этот важный для многих процессов биосинтеза восстановитель, кроме того, защищает клетки от окислительного повреждения под действием пероксида водорода H_2O_2 и свободных супероксидных радикалов — высокоактивных окислителей, возникающих в качестве побочных продуктов метаболизма, в результате действия некоторых лекарств (примахина), а также дивицина — токсичного компонента бобов фава. В норме H_2O_2 превращается в воду под действием восстановленного глутатиона и глутатионпероксидазы, а окисленный глутатион обратно переходит в восстановленную форму под действием глутатионредуктазы и NADPH (рис. 1). Кроме того, H_2O_2 расщепляется на кислород и воду под действием фермента каталазы, для активности которого также необходим NADPH. При недостаточности Г6ФДГ понижена продукция NADPH, поэтому разложение H_2O_2 ингибируется. В результате в клетке может происходить пероксидирование липидов, приводящее к разрушению мембран эритроцитов, окисление белков, а также возникать дефекты ДНК.

Обращает на себя внимание то, как распределяется дефект Г6ФДГ. Этот дефект встречается у 25% населения в тропической Африке, в некоторых районах Ближнего Востока и Юго-Восточной Азии, т. е. в областях с высоким уровнем распространения малярии. Кроме эпидемиологических наблюдений, результаты

Краткое содержание раздела 14.4 ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

- Глюконеогенез происходит везде; это многостадийный процесс, в результате которого пируват или родственные трехуглеродные соединения (лактат, аланин) превращаются в глюкозу. Семь (обратимых) стадий глюконеогенеза катализируются теми же ферментами, что участвуют в гликолизе.
- Три необратимые стадии глюконеогенеза осуществляются по обходным путям при участии специфических ферментов глюконеогенеза: 1) пируваткарбоксилаза и ФЕП-карбоксикиназа катализируют превращение пирувата в ФЕП через оксалоацетат; 2) фруктозобисфосфатаза-1 катализирует дефосфорилирование фруктозо-1,6-бисфосфата; 3) глюкозо-6-фосфатаза катализирует дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата.
- Образование глюкозы из пирувата — энергозатратный процесс: для образования одной молекулы глюкозы требуется 4 ATP, 2 GTP и 2 NADH.
- У млекопитающих глюконеогенез протекает в печени и почках, снабжая глюкозой головной мозг, мышцы и эритроциты.
- Пируваткарбоксилаза активируется в присутствии ацетил-CoA, что повышает скорость глюконеогенеза, если клетка уже имеет достаточное количество других субстратов (жирных кислот) для получения энергии.
- Животные не могут превращать в глюкозу ацетил-CoA, образованный при катаболизме жирных кислот; растения и микроорганизмы обладают такой способностью.
- Гликолиз и глюконеогенез взаимно регулируются, что позволяет избежать неэкономного ведения обоих процессов одновременно.

исследований *in vitro* показали, что в дефицитных по Г6ФДГ эритроцитах замедляется рост возбудителя малярии *Plasmodium falciparum*. Этот паразит очень чувствителен к окислительному повреждению и уничтожается при таком уровне окислительного стресса, который не оказывает пагубного влияния на организм хозяина. Баланс между устойчивостью против малярии и пониженным сопротивлением к окислительным повреждениям поддерживает существование Г6ФДГ-дефицитного генотипа в популяции людей, живущих в областях распространения малярии. Дефицит Г6ДФГ вызывает серьезные клинические последствия только при чрезмерном окислительном стрессе, вызванном лекарствами, гербицидами или дивицином.

Считается, что действие противомалярийного препарата примахина связано с созданием окислительного стресса для возбудителя. Определенная ирония заключается в том, что противомалярийный препарат по тому же самому биохимическому механизму может вызвать болезнь. Дивицин тоже действует в качестве противомалярийного препарата, а употребление бобов фава может уберечь от малярии. Отказываясь от фалафеля, пифагорейцы с нормальной активностью Г6ФДГ могли подвергать себя повышенному риску заболеть малярией!

Рис. 1. Роль NADPH и глутатиона в защите клеток от активных форм кислорода. Восстановленный глутатион (GSH) защищает клетку, разрушая пероксид водорода и гидроксильный радикал. Для возвращения окисленной формы глутатиона (GSSG) в восстановленную форму требуется NADPH, образующийся под действием глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

14.5. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

В большинстве тканей животных преобладающий путь катаболизма глюкозо-6-фосфата — это гликолитическое разложение до пирувата, основная часть которого затем окисляется в цикле лимонной кислоты, приводя в итоге к образованию АТР. Однако глюкозо-6-фосфат подвергается и другим превращениям до специальных продуктов, в которых нуждается клетка. В некоторых тканях наиболее важный процесс — окисление глюкозо-6-фосфата до пентозофосфата через **пентозофосфатный путь** (цикл или шунт), иначе называемый **фосфоглюконатным** или **гексозомонофосфатным путем (рис. 14-20)**. На этом окислительном пути в качестве акцептора электронов выступает $NADP^+$, превращающийся в NADPH. Быстроделящиеся клетки, такие как клетки костного мозга, кожи и слизистой кишечника, используют пентозы для синтеза РНК, ДНК и таких коферментов, как АТР, NADH, $FADH_2$ и кофермент А.

В других тканях важным продуктом пентозофосфатного пути являются не пентозы, а донор электронов NADPH, необходимый для восстановительного биосинтеза и защиты от повреждающего действия радикалов кислорода. Наибольшую потребность в NADPH испытывают те ткани, в которых происходит активный синтез жирных кислот (печень, жировая ткань, молочные железы) или холестерина и стероидных гормонов (печень, надпочечники, половые железы). Эритроциты, клетки хрусталика и роговицы подвержены непосредственному воздействию кислорода и, следовательно, вредному воздействию свободных радикалов, образуемых кислородом. Поддержание в этих клетках вос-

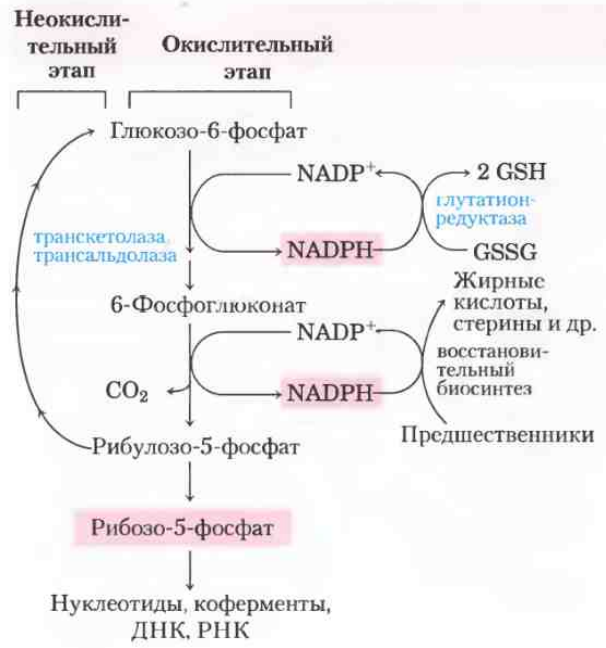


Рис. 14-20. Общая схема пентозофосфатного пути. Образующийся на окислительном этапе NADPH используется для восстановления глутатиона (GSSG) (см. доп. 14-4) и поддержания восстановительного биосинтеза. На этом этапе также образуется рибозо-5-фосфат, необходимый для синтеза нуклеотидов, коферментов и нуклеиновых кислот. В тех клетках, которые не используют рибозо-5-фосфат для биосинтеза, на неокислительном этапе происходит превращение шести молекул пентозы в пять молекул гексозы (глюкозо-6-фосфата), что позволяет продолжать выработку NADPH и превращать глюкозо-6-фосфат в CO_2 (за шесть циклов).

становительных условий (большие значения и глутатион$_{OX}$/глутатион$_{RED}$, и NADPH/NADP$^+$) позволяет предотвратить или ликвидировать окислительное повреждение белков, липидов и других чувствительных молекул. Образующийся в пентозофосфатном цикле NADPH настолько важен для предотвращения окислительных повреждений в эритроцитах, что генетический дефект первого фермента данного метаболического пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы может вызывать серьезные клинические последствия (доп. 14-4). ■

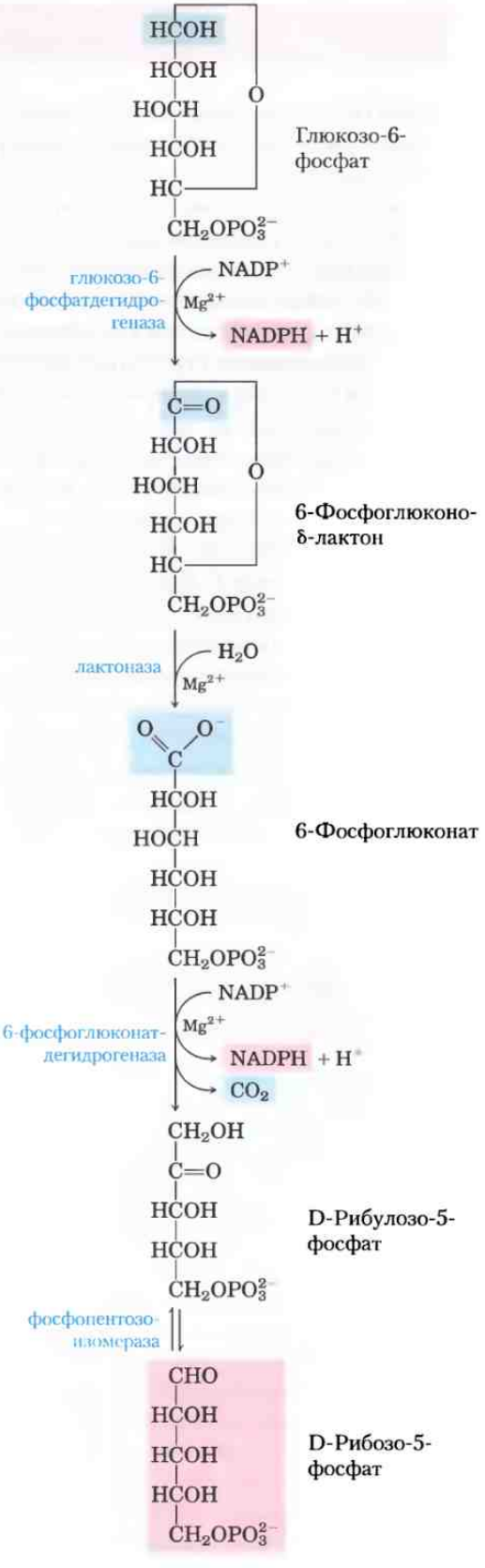


Рис. 14-21. Окислительные реакции пентозофосфатного пути. Конечными продуктами данного метаболического пути являются рибозо-5-фосфат, CO_2 и NADPH.

На окислительном этапе образуются пентозофосфаты и NADPH

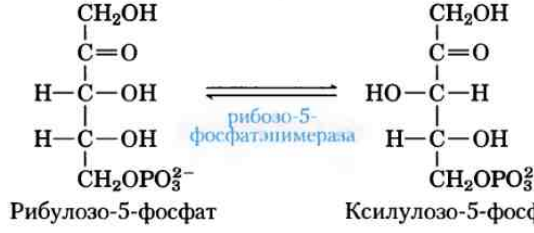
Первой реакцией пентозофосфатного пути (**рис. 14-21**) является окисление глюкозо-6-фосфата до внутримолекулярного сложного эфира 6-фосфоглюконо-δ-лактона под действием фермента **глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ)**. Акцептором электронов выступает $NADP^+$; равновесие реакции сильно смещено в сторону образования NADPH. Лактон гидролизуется под действием специфической **лактоназы** до 6-фосфоглюконата, который затем окисляется и декарбоксилируется под действием **6-фосфоглюконатдегидрогеназы** с образованием кетопентозы рибулозо-5-фосфата. В этой реакции образуется вторая молекула NADPH. (Рибулозо-5-фосфат необходим для регуляции гликолиза и глюконеогенеза, что будет показано в гл. 15.) Далее **фосфопентозоизомераза** превращает рибулозо-5-фосфат в его изомер — рибозо-5-фосфат. В некоторых тканях пентозофосфатный путь на этом завершается; общее уравнение процесса выглядит следующим образом:

$$\text{Глюкозо-6-фосфат} + NADP^+ + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{рибозо-5-фосфат} + CO_2 + 2\,NADPH + 2\,H^+$$

В результате образуется NADPH — восстановитель в реакциях биосинтеза, а также рибозо-5-фосфат — предшественник для синтеза нуклеотидов.

На неокислительном этапе пентозофосфаты превращаются в глюкозо-6-фосфат

В тканях, где особенно требуется NADPH, образующиеся на окислительном этапе пентозофосфатного пути пентозофосфаты вновь превращаются в глюкозо-6-фосфат. В этом неокислительном процессе рибулозо-5-фосфат сначала превращается в свой эпимер ксилулозо-5-фосфат:



Рибулозо-5-фосфат — Ксилулозо-5-фосфат

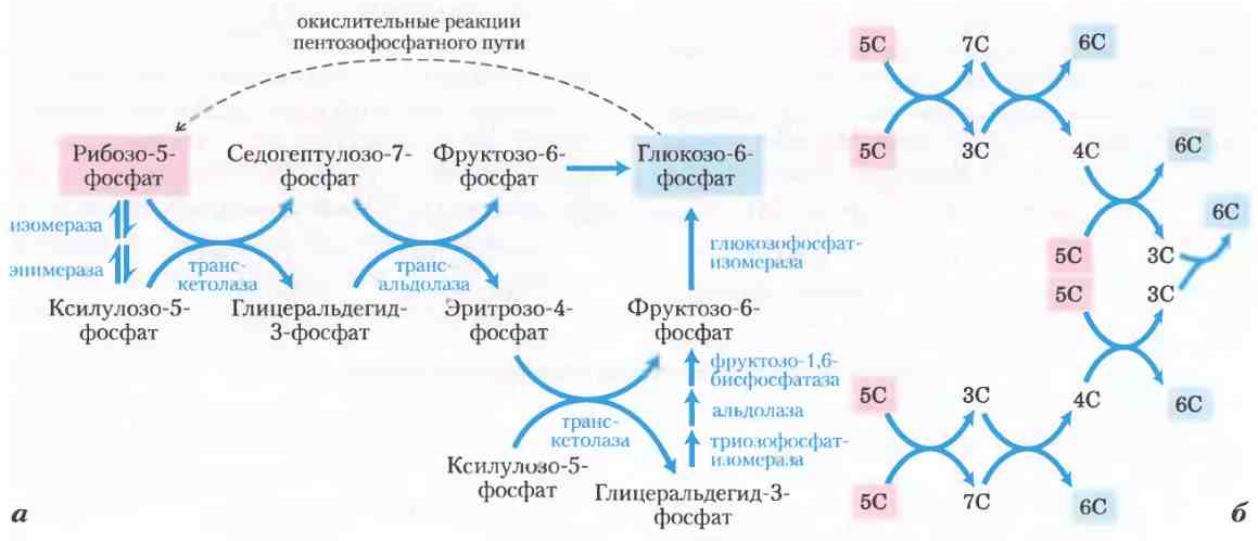


Рис. 14-22. Неокислительные реакции пентозофосфатного пути. *а* — в этих реакциях происходит превращение пентозофосфатов в гексозофосфаты, что позволяет непрерывно осуществлять реакции окислительного этапа пентозофосфатного пути (рис. 14-21). Здесь действуют как специфические ферменты (транскетолаза и трансальдолаза), так и ферменты, задействованные в реакциях гликолиза и глюконеогенеза. *б* — схема превращений шести пентоз (5С) в пять гексоз (6С). Обратите внимание, что реакции состоят из серии двух взаимопревращений (*а*). Каждая приведенная здесь реакция обратима; однонаправленные стрелки указывают направление реакций при непрерывном окислении глюкозо-6-фосфата. В темновых реакциях фотосинтеза эти реакции протекают в противоположном направлении (см. рис. 20-10).

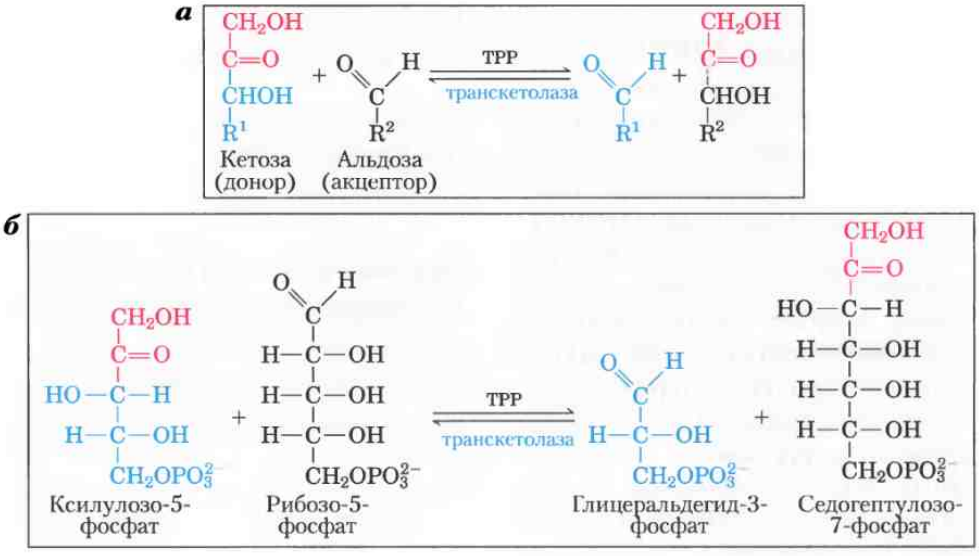


Рис. 14-23. Первая реакция пентозофосфатного пути, катализируемая транскетолазой. *а* — реакция, катализируемая транскетолазой, состоит в переносе двухуглеродного остатка от кетозы (донор) на альдозу (акцептор) с помощью TPP-связанного фермента. *б* — превращение двух пентозофосфатов в триозофосфат и семиуглеродное соединение седогептулозо-7-фосфат.

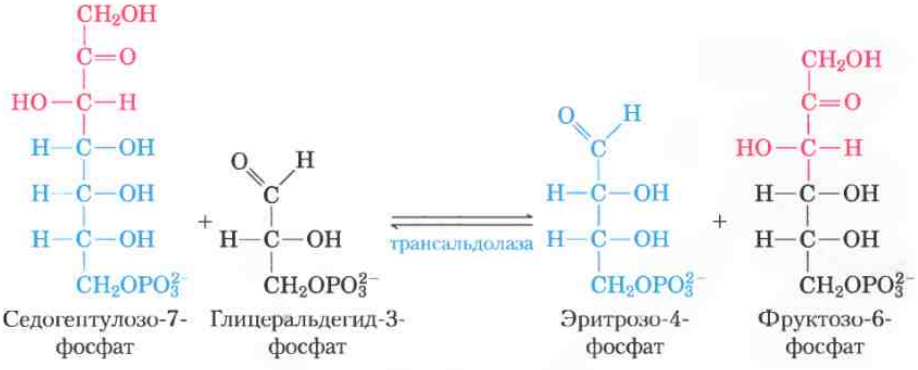


Рис. 14-24. Реакция, катализируемая трансальдолазой.

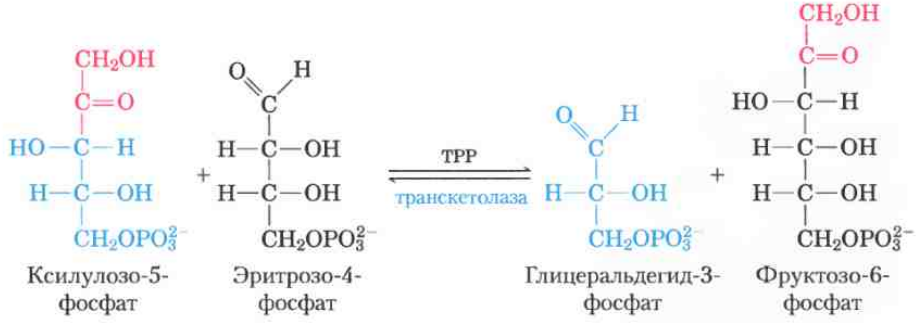


Рис. 14-25. Вторая реакция, катализируемая транскетолазой.

Затем в результате перегруппировки углеродного скелета (**рис. 14-22**) шесть пятиуглеродных фосфатов превращаются в пять шестиуглеродных фосфатов, завершая тем самым цикл и способствуя окислению глюкозо-6-фосфата с образованием NADPH. Реализация данного цикла приводит в итоге к превращению глюкозо-6-фосфата в шесть молекул CO_2. В этом процессе участвуют два фермента, задействованные исключительно в пентозофосфатном пути, а именно, транскетолаза и трансальдолаза. **Транскетолаза** катализирует перенос двухуглеродного фрагмента от кетозы (донор) на альдозу (акцептор) (**рис. 14-23, а**). Первой реакцией пентозофосфатного пути с участием транскетолазы является перенос атомов С-1 и С-2 от ксилулозо-5-фосфата на рибозо-5-фосфат, в результате чего образуется семиуглеродный продукт седогептулозо-7-фосфат (рис. 14-23, *б*). Оставшийся от ксилулозы трехуглеродный фрагмент превращается в глицеральдегид-3-фосфат.

Далее фермент **трансальдолаза** катализирует реакцию, напоминающую альдолазную реакцию гликолиза: происходит перенос трехуглеродного фрагмента от седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат, в результате чего образуются фруктозо-6-фосфат и тетроза эритрозо-4-фосфат (**рис. 14-24**). Теперь опять начинает действовать транскетолаза, которая из эритрозо-4-фосфата и ксилулозо-5-фосфата образует фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат (**рис. 14-25**). Две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, образовавшиеся при повторении этих реакций, превращаются в молекулу фруктозо-1,6-бисфосфата, как в процессе глюконеогенеза (рис. 14-16). И, наконец, фруктозобисфосфатаза-1 и глюкозофосфатизомераза превращают фруктозо-1,6-бисфосфат в глюкозо-6-фосфат. Цикл завершен: шесть пентозофосфатов превращены в пять гексозофосфатов (рис. 14-22, *б*).

Для действия транскетолазы необходим кофактор тиаминпирофосфат (TPP), который стабилизирует образующийся в реакции двухуглеродный карбанион (**рис. 14-26, *а***), точно так же, как это было описано в случае пируватдекарбоксилазы (рис. 14-14). Трансальдолаза (рис. 14-26, *б*) стабилизирует карбанион, возникающий при образовании основания Шиффа между боковой

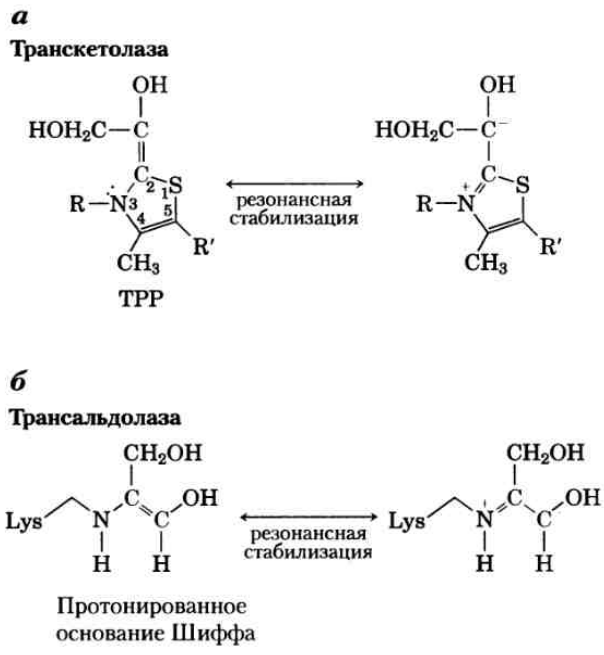


Рис. 14-26. Стабилизация карбанионов путем ковалентных взаимодействий с транскетолазой и трансальдолазой. *а* — кольцо TPP стабилизирует двухуглеродный карбанион, переносимый транскетолазой (механизм действия TPP см. на рис. 14-14). *б* — в реакции, катализируемой трансальдолазой, стабилизация трехуглеродного карбаниона, возникшего в результате альдольного расщепления, происходит путем образования протонированного основания Шиффа между ε-аминогруппой боковой цепи лизина и субстратом.

цепью остатка лизина и карбонильной группой субстрата (кетозы).

Изображенный на рис. 14-21 процесс называют **окислительным пентозофосфатным путем**. Первые две реакции окисления характеризуются большим отрицательным изменением стандартной свободной энергии и необратимы во внутриклеточных условиях. Реакции неокислительного этапа пентозофосфатного пути (рис. 14-22) легко обратимы и, следовательно, предоставляют возможность для превращения гексозофосфатов в пентозофосфаты. Как мы увидим в гл. 20, превращение гексозофосфатов в пентозофосфаты занимает центральное место в фотосинтетической ассимиляции CO_2 у растений. Данный путь ме-

таболизма, называемый **восстановительным пентозофосфатным путем**, фактически представляет собой обращение процесса, изображенного на рис. 14-22, и использует многие из указанных ферментов.

Все ферменты, принимающие участие в пентозофосфатном пути, локализованы в цитозоле, подобно ферментам гликолиза и большинству ферментов глюконеогенеза. Действительно, все три процесса связаны наличием нескольких общих интермедиатов и ферментов. Глицеральдегид-3-фосфат, образующийся при действии транскетолазы, легко превращается в дигидроксиацетонфосфат под действием гликолитического фермента триозофосфатизомеразы, а две названные триозы под действием альдолазы образуют фруктозо-1,6-бисфосфат, как в процессе глюконеогенеза. Триозофосфаты же могут окисляться до пирувата в реакциях гликолиза. Путь превращения триоз определяется потребностью клетки в пентозофосфатах, NADPH и ATP.

Синдром Вернике–Корсакова усугубляется дефектом транскетолазы

Синдром Вернике–Корсакова связан с недостаточностью тиамина, который входит в состав тиаминпирофосфата (TPP). Этот синдром чаще встречается при хроническом злоупотреблении алкоголем, который затрудняет всасывание тиамина в кишечнике. Симптомы заболевания могут усиливаться при мутации гена транскетолазы, что приводит к образованию фермента, сродство которого к TPP может быть в 10 раз ниже, чем у нормального фермента. Этот дефект делает человека гораздо более чувствительным к недостаточности тиамина: даже умеренная недостаточность этого вещества (неощутимая для людей с нормальной формой транскетолазы) может привести к уменьшению содержания TPP ниже того уровня, который необходим для насыщения фермента. В результате замедляются реакции пентозофосфатного пути в целом. У страдающих синдромом Вернике–Корсакова это приводит к усилению симптомов заболеваания, что выражается в потере памяти, спутанности сознания и частичном параличе. ■

Глюкозо-6-фосфат распределяется между гликолизом и пентозофосфатным путем

Участие глюкозо-6-фосфата в гликолизе или пентозофосфатном пути зависит от текущих нужд клетки и концентрации $NADP^+$ в цитозоле. Без этого акцептора электронов первая реакция пентозофосфатного пути (катализируемая Г6ФДГ) протекать не может. Если в клетке в результате восстановительных реакций биосинтеза NADPH быстро превращается в $NADP^+$, уровень $NADP^+$ повышается, происходит аллостерическая регуляция Г6ФДГ, и в итоге увеличивается количество глюкозо-6-фосфата, включающегося в пентозофосфатный путь (**рис. 14-27**). При снижении потребностей в NADPH уменьшается уровень $NADP^+$, пентозофосфатный путь замедляется и глюкозо-6-фосфат в большей степени направляется на гликолиз.

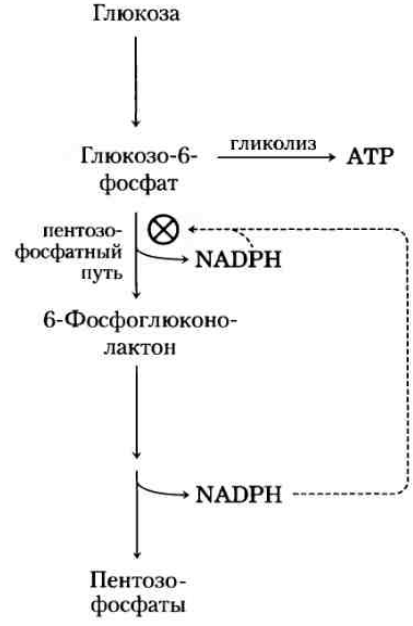


Рис. 14-27. Роль NADPH в регуляции распределения глюкозо-6-фосфата между гликолизом и пентозофосфатным путем. Если NADPH образуется быстрее, чем используется в реакциях биосинтеза и для восстановления глутатиона (см. рис. 14-20), концентрация NADPH увеличивается и происходит ингибирование первого фермента пентозофосфатного пути. В результате больше глюкозо-6-фосфата оказывается доступным для гликолиза.

Краткое содержание раздела 14.5 ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

- *Окислительный* пентозофосфатный путь (иначе называемый фосфоглюконатным или гексозомонофосфатным путем) состоит в окислении и декарбоксилировании глюкозо-6-фосфата у атома С-1 с восстановлением $NADP^+$ до NADPH и образованием пентозофосфатов.

- NADPH служит восстановителем в реакциях биосинтеза, а рибозо-5-фосфат — предшественник нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Быстрорастущие ткани, а также те клетки, что осуществляют активный биосинтез жирных кислот, холестерина или стероидных гормонов, направляют на пентозофосфатный путь больше глюкозо-6-фосфата, чем ткани, менее нуждающиеся в пентозофосфатах или восстановителе.

- Окислительный этап пентозофосфатного пути представляет собой двухступенчатое превращение глюкозо-6-фосфата до рибулозо-5-фосфата, сопровождающееся восстановлением $NADP^+$ до NADPH. Неокислительный этап состоит в превращении пентозофосфатов в глюкозо-6-фосфат, что запускает цикл заново.

- На втором (неокислительном) этапе пентозофосфатного пути транскетолаза (с ТРР в качестве кофактора) и трансальдолаза катализируют взаимопревращения трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродных сахаров, что приводит к обратимому образованию пяти гексозофосфатов из шести пентозофосфатов. В темновых реакциях фотосинтеза эти же ферменты катализируют обратный процесс, называемый *восстановительным* пентозофосфатным путем, а именно, превращение пяти гексозофосфатов в шесть пентозофосфатов.

- Генетический дефект транскетолазы, снижающий сродство фермента к ТРР, усугубляет синдром Вернике–Корсакова.

- Участие глюкозо-6-фосфата в гликолизе или пентозофосфатном пути в большой степени определяется отношением концентраций $NADP^+$ и NADPH.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

ацилфосфат 76
биотин 100
брожение 67
галактоземия 90
гексозомонофосфатный путь 107
гипоксия 69
гликолиз 66
глюконеогенез 97
изомеразы 87
изоферменты 72
молочнокислое брожение 69
мутазы 87
непереносимость лактозы 88
окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи 78
пентозофосфатный путь 107
спиртовое брожение 69
тиаминпирофосфат (ТРР) 93
фосфоглюконатный путь 107
фосфоенолпируват (ФЕП) 79
фосфорилирование на уровне субстрата 78

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общие сведения

Fruton, J.S. (1999) *Proteins, Genes, and Enzymes: The Interplay of Chemistry and Biology*, Yale University Press, New Haven.

Подробно изложена история изучения гликолиза.

Гликолиз

Boiteux, A. & Hess, B. (1981) Design of glycolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 5–22.

Обзор средней сложности, посвященный гликолизу и классическим представлениям о его контроле.

Dandekar, T., Schuster, S., Snel, B., Huynen, M., & Bork, P. (1999) Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes. *Biochem. J.* **343**, 115–124.

Обзор среднего уровня сложности на базе данных по биоинформатики, посвященный эволюции гликолиза.

Dang, C.V. & Semenza, G.L. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 68–72.

Краткий обзор молекулярных основ усиления гликолиза в опухолях.

Erlandsen, H., Abola, E.E., & Stevens, R.C. (2000) Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 719–730.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный структуре гликолитических ферментов.

Gatenby, R.A. & Gillies, R.J. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **4**, 891–899.

Hardie, D.G. (2000) Metabolic control: a new solution to an old problem. *Curr. Biol.* **10**, R757–R759.

Harris, A.L. (2002) Hypoxia — a key regulatory factor in tumor growth. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47.

Heinrich, R., Melendez-Hevia, E., Montero, F., Nuno, J.C., Stephani, A., & Waddell, T.D. (1999) The structural design of glycolysis: an evolutionary approach. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 294–298.

Keith, B. & Simon, M.C. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **129**, 465–472.

Обзор среднего уровня сложности.

Knowles, J. & Albery, W.J. (1977) Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triose phosphate isomerase. *Acc. Chem. Res.* **10**, 105–111.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2005) Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 3.

Краткий обзор классических работ; доступен в интернете.

Kritikou, E. (2006) p53 turns on the energy switch. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 552–553.

Pelicano, H., Martin, D.S., Zu, R-H., & Huang, P. (2006) Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* **25**, 4633–4646.

Обзор среднего уровня сложности.

Phillips, D., Blake, C.C.F., & Watson, H.C. (eds.) (1981) The Enzymes of Glycolysis: Structure, Activity and Evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 1–214.

Сборник превосходных обзорных статей по гликолитическим ферментам; доступен для начинающих изучать биохимию.

Plaxton, W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 185–214.

Очень полезный обзор на тему внутриклеточной локализации гликолитических ферментов и регуляции гликолиза у растений.

Rose, I. (1981) Chemistry of proton abstraction by glycolytic enzymes (aldolase, isomerases, and pyruvate kinase). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **293**, 131–144.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный механизму действия данных ферментов.

Shirmer, T. & Evans, P.R. (1990) Structural basis for the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

Smith, T.A. (2000) Mammalian hexokinases and their abnormal expression in cancer. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**, 170–178.

Обзор посвящен четырем изоферментам гексокиназы у млекопитающих — их свойствам, тканевому распределению и экспрессии при развитии опухолей.

Метаболические пути, питающие гликолиз

Elsas, L.J. & Lai, K. (1998) The molecular biology of galactosemia. *Genet. Med.* **1**, 40–48.

Novelli, G. & Reichardt, J.K. (2000) Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: past, present and future. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 62–65.

Petry, K.G. & Reichardt, J.K. (1998) The fundamental importance of human galactose metabolism: lessons from genetics and biochemistry. *Trends Genet.* **14**, 98–102.

Van Beers, E.H., Buller, H.A., Grand, R.J., Einerhand, A.W.C., & Dekker, J. (1995) Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **30**, 197–262.

Брожение

Demain, A.L., Davies, J.E., Atlas, R.M., Cohen, G., Hershberger, C.L., Hu, W.-S., Sherman, D.H., Willson, R.C., & Wu, J.H.D. (eds). (1999) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Классическое введение в промышленные методы ферментации.

Liese, A., Seelbach, K., & Wandrey, C. (eds). (2006) *Industrial Biotransformations*, John Wiley & Sons, New York.

Использование микроорганизмов в промышленных синтезах продуктов из дешевых исходных материалов.

Глюконеогенез

Gerich, J.E., Meyer, C., Woerle, H.J., & Stumvoll, M. (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care* **24**, 382–391.

Обзор средней сложности, посвященный роли почек в глюконеогенезе.

Gleeson, T. (1996) Post-exercise lactate metabolism: a comparative review of sites, pathways, and regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **58**, 565–581.

Hers, H.G. & Hue, L. (1983) Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 617–653.

Matte, A., Tari, L.W., Goldie, H., & Delbaere, L.T.J. (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

Chayen, J., Howat, D.W., & Bitensky, L. (1986) Cellular biochemistry of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 249–253.

Horecker, B.L. (1976) Unraveling the pentose phosphate pathway. In *Reflections on Biochemistry* (Kornberg, A., Cornudella, L., Horecker, B.L., & Oro, J., eds), pp. 65–72, Pergamon Press, Inc., Oxford.

Kletzien, R.F., Harris, P.K., & Foellmi, L.A. (1994) Glucose 6-phosphate dehydrogenase: a «housekeeping» enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* **8**, 174–181.

Обзор средней степени сложности.

Kresge, N., Simoni, R.D., & Hill, R.L. (2005) Bernard L. Horecker's contributions to elucidating the pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 26.

Краткий обзор классических работ; доступен в интернете.

Luzzatto, L., Mehta, A., & Vulliamy, T. (2001) Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B., eds), pp. 4517–4553, McGraw-Hill Inc., New York.

Четырехтомник, в который вошла и эта статья, содержит очень интересную информацию относительно клинических и биохимических особенностей сотен наследственных метаболических заболеваний.

Martini, G. & Ursini, M.V. (1996) A new lease on life for an old enzyme. *BioEssays* **18**, 631–637.

Обзор средней сложности, посвященный глюкозо-6-фосфатдегидрогеназе, влиянию мутаций данного фермента на здоровье человека, а также изучению нокаутных по этому гену мышей.

Notaro, R., Afolayan, A., & Luzzatto, L. (2000) Human mutations in glucose 6-phosphate dehydrogenase reflect evolutionary history. *FASEB J.* **14**, 485–494.

Wood, T. (1985) *The Pentose Phosphate Pathway*, Academic Press, Inc., Orlando, FL.

Wood, T. (1986) Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochem. Funct.* **4**, 241–247.

Вопросы и задачи

1. Уравнение для подготовительной стадии гликолиза. Напишите уравнения химического баланса для всех реакций разложения глюкозы до двух молекул глицеральдегид-3-фосфата (подготовительная стадия гликолиза) и укажите для каждой реакции изменение стандартной свободной энергии. Затем напишите суммарное уравнение всей подготовительной стадии гликолиза и приведите суммарное изменение стандартной свободной энергии.

2. Вторая стадия гликолиза в скелетных мышцах (стадия «выплаты процентов»). В работающей мышце при анаэробных условиях глицеральдегид-3-фосфат превращается в пируват (вторая стадия гликолиза), а пируват далее восстанавливается до лактата. Напишите уравнения всех химических реакций с указанием изменения стандартной свободной энергии в каждом случае. Затем напишите суммарное уравнение второй стадии гликолиза (с лактатом в качестве конечного продукта) и приведите суммарное изменение стандартной свободной энергии.

3. Переносчики глюкозы. Сравните локализацию GLUT4 с локализацией GLUT2 и GLUT3 и объясните, какую роль она играет в реакции на сигнал инсулина в мышцах, жировой ткани, головном мозге и печени.

4. Образование этилового спирта в дрожжах. При выращивании на глюкозе в анаэробных условиях дрожжи *S. cerevisiae* превращают пируват в ацетальдегид, а затем восстанавливают ацетальдегид до этанола, заимствуя электроны у NADH. Напишите уравнение второй реакции и рассчитайте константу равновесия этой реакции при 25 °C, используя значение стандартного восстановительного потенциала, указанное в табл. 13-7.

5. Изменение энергии при альдолазной реакции. Альдолаза катализирует гликолитическую реакцию:

Фруктозо-1,6-бисфосфат → → глицеральдегид-3-фосфат + + дигидроксиацетонфосфат

Изменение стандартной свободной энергии в этой реакции (в указанном направлении) составляет +23,8 кДж/моль. Концентрации трех промежуточных продуктов в гепатоцитах млекопитающих следующие:

фруктозо-1,6-бисфосфат	$1{,}4 \cdot 10^{-5}$ M;
глицеральдегид-3-фосфат	$3{,}0 \cdot 10^{-6}$ M;
дигидроксиацетонфосфат	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$ M.

Каково изменение свободной энергии в реальной системе при темпетаруре тела (37 °C)?

6. Судьба атомов углерода в процессе брожения. Опыты с радиоактивной меткой (углерод ^{14}C) проводят на дрожжевом экстракте в строго анаэробных условиях, обеспечивающих спиртовое брожение. Небольшое количество меченного радиоактивным углеродом субстрата инкубируют с дрожжевым экстрактом в течение времени, необходимого, чтобы каждый промежуточный продукт брожения успел включить метку. Затем метку «прогоняют» по всему пути, добавляя избыток немеченой глюкозы. Эта процедура предотвращает участие меченой глюкозы в других метаболических путях.

а) Объясните, в каком положении в молекуле этанола окажется метка, если в качестве субстрата использовать глюкозу, меченную ^{14}C по положению C-1.

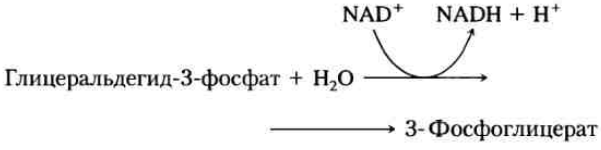
б) В каком положении в меченой глюкозе должна находиться метка, чтобы весь радиоактивный углерод обнаруживался в виде $^{14}CO_2$, образующегося при спиртовом брожении? Объясните ответ.

7. Тепловой эффект ферментации. В крупномасштабных промышленных процессах ферментации обычно требуется постоянное и активное охлаждение ферментера. Объясните этот факт.

8. Соевый соус. Соевый соус готовят путем сбраживания подсоленной смеси соевых бобов и пшеницы под действием нескольких микроорганизмов, в том числе дрожжей, в течение 8–12 месяцев. Оставшийся после удаления твердых частиц соус содержит много лактата и этилового спирта. Как образуются эти продукты? Почему для предотвращения сильного привкуса уксуса брожение следует осуществлять при полном отсутствии кислорода? (Уксус — это разбавленная уксусная кислота.)

9. Эквивалентность триозофосфатов. К дрожжевому экстракту добавили ^{14}C-меченный глицеральдегид-3-фосфат. Через короткий промежуток времени был выделен фруктозо-1,6-бисфосфат, содержащий метку в положениях C-3 и C-4. Где находилась метка в исходном глицеральдегид-3-фосфате? Откуда взялся второй меченый атом углерода в фруктозо-1,6-бисфосфате? Объясните ответ.

10. «Укороченный» гликолиз. Представьте себе, что обнаружен мутант дрожжей с более коротким путем гликолиза, который катализирует новый фермент:



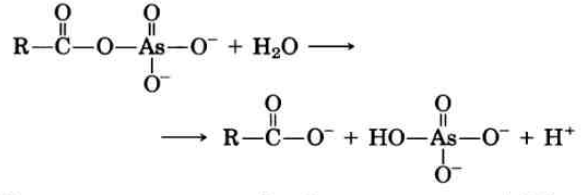
Принесет ли такое укорочение гликолитического пути пользу клетке? Объясните.

11. Роль лактатдегидрогеназы. При напряженной работе мышц сильно возрастает потребность мышечной ткани в АТР. В мышцах лап кролика или крыльев индейки АТР образуется почти исключительно путем молочнокислого брожения. Образование АТР происходит на второй стадии гликолиза в двух реакциях, катализируемых фосфоглицераткиназой и пируваткиназой. Представим себе, что в скелетных мышцах отсутствует лактатдегидрогеназа. Смогли бы в таком случае мышцы выполнять напряженную физическую работу, т. е. смогли бы они с большой скоростью вырабатывать АТР путем гликолиза? Поясните ответ.

12. Эффективность образования АТР в мышцах. В миоцитах превращение глюкозы в лактат сопровождается высвобождением лишь 7% свободной энергии по сравнению с той энергией, которая высвобождается при полном окислении глюкозы до CO_2 и воды. Означает ли это, что при анаэробном гликолизе в мышцах глюкоза расходуется неэкономно? Объясните свой ответ.

13. Изменение свободной энергии при окислении триозофосфата. Окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата, катализируемое глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, происходит с неблагоприятной константой равновесия ($K'_{eq} = 0{,}08$; $\Delta G'^{\circ} = 6{,}3$ кДж/моль). Каким образом клетка преодолевает неблагоприятное равновесие?

14. Отравление арсенатом. Арсенат по строению и химическим свойствам напоминает неорганический фосфат P_i, и многие ферменты, использующие фосфат, также могут использовать и арсенат. Однако органические арсенаты менее устойчивы, чем аналогичные соединения фосфора. Например, *ациларсенаты* быстро гидролизуются:



В отличие от них *ацилфосфаты*, например 1,3-бисфосфоглицерат, более устойчивы и подвергаются в клетке только ферментативным превращениям.

а) Как повлияет замена фосфата арсенатом на суммарную реакцию, катализируемую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой?

б) Какие последствия для организма может вызвать замена фосфата на арсенат? Для большинства организмов арсенат очень токсичен. Объясните, с чем это связано.

15. Потребность в фосфате для спиртового брожения. В 1906 г. Гарден и Янг провели серию классических исследований сбраживания глюкозы до этанола и CO_2 под действием экстракта пивных дрожжей и сделали следующие выводы. 1) Для сбраживания необходим неорганический фосфат; при исчерпании фосфата брожение прекращается даже при наличии глюкозы. 2) При брожении в данных условиях накапливаются этанол, CO_2 и гексозобисфосфат. 3) При замене фосфата арсенатом гексозобисфосфат не накапливается, а процесс сбраживания проходит до полного превращения глюкозы в этанол и CO_2.

а) Почему процесс останавливался при исчерпании фосфата?

б) Почему накапливались этанол и CO_2? Определите, какой гексозобисфосфат накапливался в смеси. Почему он накапливался?

в) Почему при замене фосфата на арсенат не наблюдалось накопления гексозобисфосфата, та, даже если процесс брожения проходил до конца до этанола и CO_2? (См. задачу 10.)

16. Роль ниацина. Взрослый человек, занятый активным физическим трудом, при нормальном питании должен потреблять в сутки около 160 г углеводов, но лишь 20 мг ниацина. Объясните это с учетом роли ниацина в гликолизе.

17. Синтез глицерофосфата. Необходимый для синтеза глицерофосфолипидов 3-фосфоглицерат может быть образован из промежуточных продуктов гликолиза. Предложите последовательность реакций для данного превращения.

18. Клинические проявления ферментативной недостаточности. Клинические проявления двух форм галактоземии (дефицит галактокиназы или галактозо-1-фосфат-уридилилтрансферазы) совершенно различны по тяжести. В обоих случаях после употребления молока наблюдаются кишечные расстройства, однако при недостаточности трансферазы, кроме того, страдают печень, почки, селезенка, нарушается деятельность мозга и может наступить смерть. Какие продукты накапливаются в крови и тканях в каждом из этих случаев ферментативной недостаточности? Сравните токсичность этих продуктов на основании приведенных выше данных.

19. Истощение мышц при голодании. Одним из последствий голодания является уменьшение мышечной массы. Что происходит с белками мышечной ткани?

20. Путь превращения атомов углерода в глюконеогенезе. Печеночный экстракт, способный катализировать все метаболические реакции, происходящие в печени в норме, непродолжительное время инкубировали в двух отдельных опытах со следующими ^{14}C-мечеными предшественниками:

а [^{14}C]Гидрокарбонат, $HO-{}^{14}C(=O)O^-$

б [1-^{14}C]Пируват, $CH_3-C(=O)-{}^{14}COO^-$

Проследите путь обоих предшественников в глюконеогенезе. Укажите положение метки во всех интермедиатах и в конечном продукте — глюкозе.

21. Энергетическая ценность цикла гликолиза и глюконеогенеза. Какова энергетическая ценность (в эквивалентах ATP) превращения глюкозы в пируват в процессе гликолиза и обратно в глюкозу в процессе глюконеогенеза?

22. Связь между глюконеогенезом и гликолизом. Почему так важно, что глюконеогенез не является точной копией процесса, обратного гликолизу?

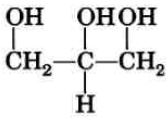
23. Изменение энергии в ходе пируваткиназной реакции. Объясните в терминах биоэнергетики, каким образом превращение пирувата в фосфоенолпируват в ходе глюконеогенеза преодолевает большое отрицательное значение стандартного изменения свободной энергии пируваткиназной реакции в ходе гликолиза.

24. Глюкогенные субстраты. Для определения эффективности различных веществ в качестве предшественников глюкозы экспериментальных животных обычно заставляют голодать до тех пор, пока не будут исчерпаны запасы гликогена в печени, а затем дают им в пищу исследуемое вещество. Субстрат, приводящий к суммарному повышению уровня гликогена в печени, называют глюкогенным, поскольку сначала он превращается в глюкозо-6-фосфат. С помощью известных вам

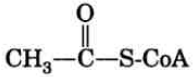
ферментативных реакций покажите, какие из указанных ниже веществ являются глюкогенными.

а Сукцинат, $^{-}OOC-CH_2-CH_2-COO^{-}$

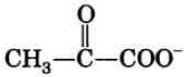
б Глицерин,



в Ацетил-CoA,



г Пируват,



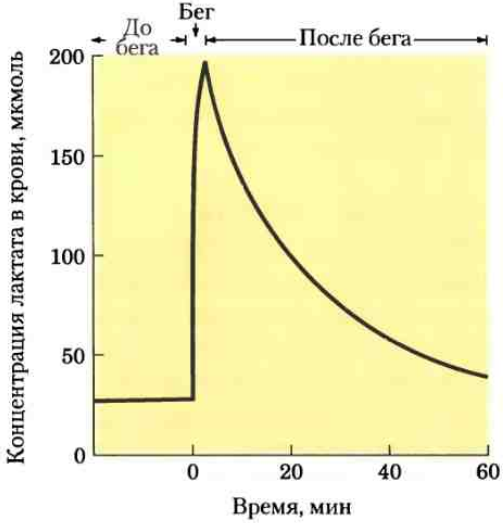
д Бутират, $CH_3-CH_2-CH_2-COO^{-}$

25. Этиловый спирт влияет на уровень глюкозы в крови. Употребление алкоголя (этилового спирта), особенно после активных физических упражнений или на голодный желудок, приводит к снижению уровня глюкозы крови (гипогликемии). Первой стадией метаболизма этанола в печени является его окисление до ацетальдегида, катализируемое алкогольдегидрогеназой печени:

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightarrow CH_3CHO + NADH + H^+$$

Объясните, каким образом данная реакция ингибирует превращение лактата в пируват. Почему это приводит к гипогликемии?

26. Изменение уровня лактата в крови при физической нагрузке. На графике показана концентрация лактата в плазме крови до, во время и после бега на 400 метров.



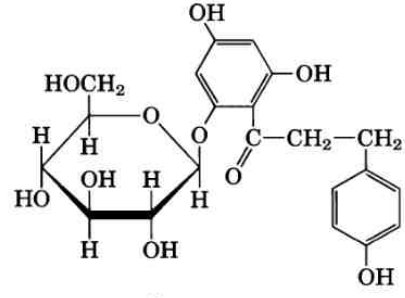
а) Почему происходит резкое увеличение концентрации лактата?

б) С чем связано уменьшение концентрации лактата после завершения бега? Почему уменьшение концентрации происходит медленнее, чем увеличение?

в) Почему в состоянии покоя уровень лактата не равен нулю?

27. Связь между фруктозо-1,6-бисфосфатом и уровнем лактата в крови. Врожденный дефект печеночного фермента фруктозо-1,6-бисфосфатазы приводит к аномально высокому уровню лактата в плазме крови. Объясните причину.

28. Влияние флоридзина на метаболизм углеводов. Флоридзин — токсичный гликозид из коры грушевого дерева — блокирует всасывание глюкозы из почечных канальцев, в результате чего глюкоза из крови практически полностью выводится с мочой. В эксперименте крысы, питавшиеся флоридзином и сукцинатом натрия, выделяли около 0,5 моль глюкозы (образовавшейся в результате глюконеогенеза) на каждый моль потребленного сукцината натрия. Каким образом сукцинат превращался в глюкозу? Объясните стехиометрию процесса.



Флоридзин

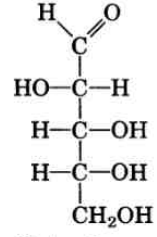
29. Избыточное потребление O_2 в процессе глюконеогенеза. Поглощаемый печенью лактат превращается в глюкозу, при этом на образование каждой молекулы глюкозы затрачивается 6 молекул ATP. За интенсивностью данного процесса в печени крысы можно следить, вводя меченный радиоактивной меткой лактат и измеряя количество образовавшейся ^{14}C-глюкозы. Поскольку стехиометрия потребления O_2 с образованием ATP известна (около 5 молекул ATP на молекулу O_2), можно предсказать, сколько кис-

лорода расходуется дополнительно при введении данного количества лактата. Однако фактически измеренное количество дополнительного кислорода, затраченного на синтез глюкозы из лактата, всегда оказывается выше предсказанного на основании стехиометрии. Предложите возможное объяснение этого явления.

30. Роль пентозофосфатного пути. Если в пентозофосфатном пути окисление глюкозо-6-фосфата использовалось бы главным образом для образования NADPH, происходило бы накопление другого продукта — рибозо-5-фосфата. Какие проблемы могли бы при этом возникать?

Анализ экспериментальных данных

31. Проектирование ферментативного процесса. Ферментативная переработка растительного сырья для производства этанола в качестве альтернативного топлива является одним из путей сокращения использования ископаемых ресурсов; реализация подобного процесса позволила бы снизить выброс CO_2 в атмосферу и препятствовала глобальному потеплению. Существует множество микроорганизмов, способных расщеплять целлюлозу, а затем превращать глюкозу в этанол. Однако многие потенциальные источники целлюлозы, включая отходы сельского хозяйства и некоторые сельскохозяйственные культуры, такие как просо, содержат значительное количество арабинозы, которая плохо ферментируется.



D-Арабиноза

Бактерия *Escherichia coli* способна превращать арабинозу в этанол, но природные штаммы плохо переносят высокое содержание спирта, что ограничивает возможность их применения для промышленного производства этанола. Другая бактерия, *Zymomonas mobilis*, может существовать в среде с высоким содержанием этанола, но не обладает способностью ферментировать арабинозу. Динда, Жанг, Эдди и Пикатаджио (1996) описали свои попытки комбинировать полезные свойства этих двух организмов путем введения генов *E. coli*, ответственных за расщепление арабинозы, в клетки *Z. mobilis*.

а) Почему этот путь реализовать проще, чем создать клетки *E. coli*, толерантные к более высокой концентрации этанола?

Динда с коллегами встроили в геном *Z. mobilis* пять генов *E. coli*: *araA*, кодирующий L-арабинозоизомеразу, которая осуществляет взаимные превращения L-арабинозы и L-рибулозы; *araB*, кодирующий L-рибулокиназу, использующую ATP для фосфорилирования L-рибулозы по положению C-5; *araD*, кодирующий L-рибулозо-5-фосфатэпимеразу, осуществляющую взаимные превращения L-рибулозо-5-фосфата и L-ксилулозо-5-фосфата; *talB*, кодирующий трансальдолазу, а также *tktA*, кодирующий транскетолазу.

б) Кратко опишите три реакции, катализируемые продуктами генов *ara*, и, если сможете, назовите упоминавшиеся в настоящей главе ферменты, которые катализируют аналогичные реакции.

Встраивание пяти генов *E. coli* в геном *Z. mobilis* позволило ввести арабинозу в неокислительную фазу пентозофосфатного пути (рис. 14-22), где она превращалась в глюкозо-6-фосфат с дальнейшей ферментацией до этанола.

в) В какой сахар в итоге превращали арабинозу продукты трех генов *ara*?

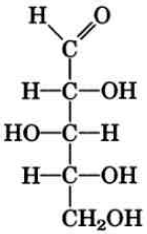
г) Этот сахар (см. вопрос (в)) поступает в процесс, изображенный на рис. 14-22. Опишите общий процесс ферментации шести молекул арабинозы до этанола, учитывая вклад пяти перечисленных выше ферментов *E. coli* и ферментов данного пути.

д) Какова стехиометрия превращения шести молекул арабинозы в этанол и CO_2? Сколько молекул ATP могло бы образоваться в данном процессе?

е) *Z. mobilis* использует несколько иной путь ферментации, чем тот, что был описан в данной главе. В результате превращение каждой молекулы арабинозы сопровождается выделением лишь одной молекулы ATP. Это менее выгодно для

бактерии, зато более выгодно для производства этанола. Как вы думаете, почему?

В растительном сырье часто встречается другой сахар — ксилоза.



D-Ксилоза

ж) Какие дополнительные ферменты необходимо ввести в описанные выше модифицированные клетки *Z. mobilis*, чтобы они приобрели способность превращать в этанол не только арабинозу, но и ксилозу? От вас не требуется дать название каждого фермента (возможно, они даже не существуют в природе); просто приведите необходимые реакции.

Литература

Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., & Picataggio, S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4465–4470.

Таким образом, образование в печени гликогена из молочной кислоты, по-видимому, обеспечивает важную связь между метаболизмом в мышцах и в печени. При участии печени гликоген из мышц превращается в доступный сахар крови, а этот сахар в свою очередь превращается в мышечный гликоген. Следовательно, в организме существует замкнутый цикл превращений молекул глюкозы... Было показано, что адреналин ускоряет эти реакции в направлении от гликогена мышц к гликогену печени... В то же время инсулин ускоряет реакции в направлении от глюкозы крови к мышечному гликогену.

К. Ф. Кори и Г. Т. Кори, из статьи в журнале Biological Chemistry, *1929*

15

Принципы регуляции метаболизма

15.1. Регуляция метаболических путей 123

15.2. Теория контроля метаболизма 132

15.3. Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза 139

15.4. Метаболизм гликогена в клетках животных 154

15.5. Согласованная регуляция синтеза и распада гликогена 165

Регуляция реакций метаболизма составляет основное содержание исследований в биохимии, и это одна из наиболее замечательных способностей живой клетки. Среди тысяч ферментативных реакций, происходящих в клетке, возможно, нет ни одной, которая в том или ином виде не подвергалась бы регуляции. Хотя в учебниках принято (да это и полезно) подразделять метаболический процесс на отдельные «пути», выполняющие определенные функции в жизнеобеспечении клетки, в самой клетке подобного разделения не существует. Более того, каждый путь, обсуждаемый в этой книге, неразрывно связан со всеми другими клеточными процессами, что показано с помощью многомерной сети реакций (**рис. 15-1**). Например, в гл. 14 мы обсуждали три возможных пути превращения **глюкозо-6-фосфата** в клетках печени: участие в гликолизе для накопления ATP, участие в пентозофосфатном пути для получения NADPH и пентозофосфатов, а также гидролиз до глюкозы и фосфата для пополнения запасов глюкозы в крови. Но на самом деле существует ряд других возможных путей превращения глюкозо-6-фосфата; он может, например, использоваться для синтеза других сахаров, таких как глюкозамин, галактоза, галактозамин, фукоза и нейраминовая кислота, участвовать в гликозилировании белков или частично разлагаться, поставляя ацетил-CoA для синтеза жирных кислот и стеринов. Например, бактерия *Escherichia coli* использует глюкозу для синтеза углеродных скелетов *абсолютно всех* своих молекул. Когда клетка направляет глюкозо-6-фосфат по одному из путей, это оказывает влияние на все остальные пути, в которых это вещество является предшественником или интермедиатом. Любое изменение в распределении глюкозо-6-фосфата в одном метаболическом пути прямо или косвенно влияет на его участие во всех других путях.

Подобные изменения в распределении метаболитов часто случаются в жизни клетки. Луи Пастер первым описал значительное увеличение потребления глюкозы (более чем в 10 раз) культурой дрожжей при переходе от аэробных условий к анаэробным. Это явление, называемое эффектом Пастера, не сопровождается какими-либо заметными колебаниями концентрации ATP или какого-то другого вещества из сотен интермедиатов и продуктов метаболизма глюкозы. Похожие изменения наблюдаются в клетках скелетных мышц бегуна на спринтерской дистанции. Клетки обладают потря-

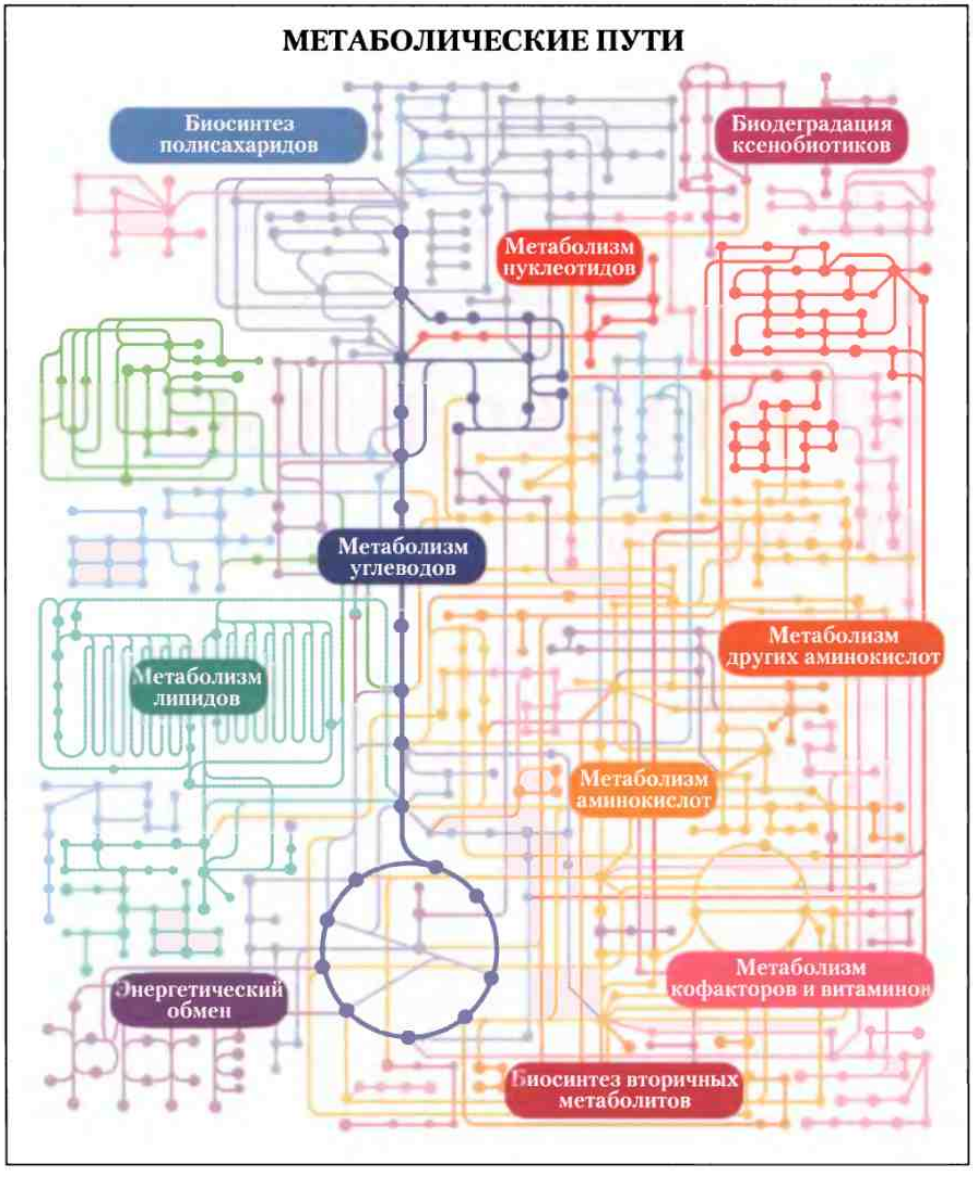


Рис. 15-1. Трехмерная сеть реакций метаболизма. Типичная эукариотическая клетка способна к синтезу около 30 000 различных белков, катализирующих тысячи реакций, в которых образуются сотни метаболитов — многие задействованы в нескольких метаболических путях. Иллюстрация взята из базы данных KEGG PATHWAY (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map01100.html). Каждую область можно рассмотреть более подробно, вплоть до уровня отдельных ферментов и интермедиатов.

сающей способностью одновременно и экономно осуществлять все эти взаимосвязанные метаболические превращения и получать каждый продукт в строго определенном количестве и в строго определенный момент времени при изменяющихся условиях внешней среды.

В этой главе мы проиллюстрируем основные принципы регуляции метаболизма на примере метаболизма глюкозы. Мы начнем с рассмотрения общей роли регуляции в достижении метаболического гомеостаза и познакомимся с теорией контроля метаболизма, на основе которой можно

проводить количественный анализ сложных метаболических процессов. Далее мы остановимся на особенностях регуляции отдельных ферментов метаболизма глюкозы и рассмотрим каталитическую активность ферментов, участвующих в гликолизе и глюконеогенезе, описанных в гл. 14. Обсудим также каталитические и регуляторные свойства ферментов, участвующих в синтезе и разрушении гликогена, одного из наиболее изученных примеров регуляции метаболизма. Выбрав для иллюстрации принципов метаболической регуляции метаболизм углеводов, мы искусственно отделили его от метаболизма жирных кислот. На самом деле эти два процесса в клетке очень тесно связаны, как мы увидим в гл. 23.

15.1. Регуляция метаболических путей

Реакции катаболизма в метаболизме гликогена обеспечивают энергию, необходимую для преодоления «сил» энтропии, а реакции анаболизма приводят к образованию исходных молекул для биосинтеза и запасанию метаболической энергии. Эти процессы настолько важны для жизнедеятельности клеток, что в ходе эволюции возникли очень сложные регуляторные механизмы, обеспечивающие передвижение метаболитов по правильным путям, в нужном направлении и с необходимой скоростью с тем, чтобы полностью удовлетворять текущие нужды клетки или организма; при изменении внешних условий корректируется скорость превращений метаболитов в соответствующих метаболических путях.

Внешние же условия действительно меняются, иногда довольно сильно. При большой физической нагрузке потребность мышц в ATP может вырасти за считанные секунды в сотни раз. Доступность кислорода может снизиться из-за гипоксии (ухудшения доставки кислорода к тканям) или ишемии (уменьшения кровотока к тканям). Соотношение углеводов, жиров и белков в пище различается, и богатые энергией питательные вещества поступают в организм нерегулярно, в результате чего между приемами пищи и при голодании возникает необходимость коррекции происходящих метаболических процессов. Огромные количества энергии и молекул требуются для биосинтеза, например, при заживлении ран.

Клетки и организмы существуют в динамическом стационарном состоянии

Богатые энергией молекулы, такие как глюкоза, поглощаются клеткой, а отходы метаболизма, например CO_2, покидают ее, но при этом масса и состав клетки, отдельного органа или взрослого животного практически не меняются во времени; клетки и организмы существуют в динамическом стационарном состоянии, но никак не в равновесии с окружающей средой. Субстрат для каждой реакции метаболического пути поступает от предыдущей реакции с такой же скоростью, с какой он далее превращается в продукт. Другими словами, хотя скорость (v) потока вещества (или просто — **поток**) на данной стадии метаболизма может быть высокой и сильно изменяться, концентрация субстрата [S] остается постоянной. Для двухстадийной реакции

$$A \xrightarrow{v_1} S \xrightarrow{v_2} P$$

при $v_1 = v_2$ концентрация [S] постоянна. Например, изменение скорости v_1 поступления глюкозы из различных источников в кровь компенсируется изменением v_2 всасывания глюкозы из крови в ткани, таким образом, концентрация глюкозы [S] в крови поддерживается около 5 мМ. Это **гомеостаз** на молекулярном уровне. У человека нарушение механизмов гомеостаза часто бывает причиной заболеваний. Например, при сахарном диабете регуляция концентрации глюкозы в крови нарушена из-за недостатка инсулина или нечувствительности к нему, что и влечет за собой пагубные последствия для здоровья.

Когда внешние воздействия не ограничиваются просто временным влиянием или когда клетка одного типа превращается в клетку другого типа, регулирование состава клетки и метаболизма может оказаться более значительным и потребовать заметных и продолжительных изменений в распределении энергии и исходных веществ для синтеза, чтобы аккуратно осуществить этот переход. Представьте себе, например, процесс дифференцировки стволовой клетки костного мозга в эритроцит. Исходная клетка содержит ядро, митохондрии и мало или вовсе не содержит гемоглобина, в то время как в полностью дифференцированном эритроците гемоглобина огромное количество, но ни ядра, ни митохондрий нет. Состав этой клетки посто-

янно изменялся в ответ на приходящие извне сигналы, и соответственно менялся и метаболизм. **Дифференцировка клеток** требует точной регуляции концентраций клеточных белков.

В ходе эволюции возник замечательный набор регуляторных механизмов, позволяющих поддерживать гомеостаз на уровне молекул, клеток и целых организмов. Значение регуляции метаболизма для организма отражается в относительном количестве генов, кодирующих элементы регуляторного аппарата: у человека около 4000 генов (около 12% всех генов) кодируют регуляторные белки, в том числе разнообразные рецепторы, регуляторы экспрессии генов и около 500 различных протеинкиназ! Регуляторные механизмы действуют в разном временном диапазоне (от секунд до суток) и отличаются по чувствительности к изменениям внешней среды. Во многих случаях эти механизмы перекрываются: один и тот же фермент может быть объектом регуляции в нескольких регуляторных механизмах.

Регулируется не только количество ферментов, но и их каталитическая активность

Интенсивность ферментативного процесса может регулироваться как путем изменения *количества* ферментов, так и путем модуляции *каталитической активности* присутствующих молекул фермента. Подобные превращения происходят во временном диапазоне от нескольких миллисекунд до нескольких часов и служат ответом на внутриклеточный или внешний сигнал. Очень быстрые аллостерические изменения ферментативной активности обычно инициируются на месте путем изменения локальной концентрации небольших молекул субстрата данного метаболического пути (в реакциях гликолиза — глюкозы), продукта пути (ATP при гликолизе) или ключевого метаболита или кофактора (такого, как NADH), что связано с метаболической способностью клетки. Вторичные мессенджеры (такие, как циклический AMP и Ca^{2+}), образующиеся внутри клеток в ответ на внеклеточные сигналы (гормоны, цитокины и т. п.), также опосредуют аллостерическую регуляцию, но несколько медленнее влияя на механизмы передачи сигнала (см. гл. 12).

Внеклеточные сигналы (**рис. 15-2**, ①) могут быть гормональными (инсулин или адреналин), нейрональными (ацетилхолин) или передаваться с помощью факторов роста или цитокинов. Количество данного фермента в клетке определяется соотношением между скоростями его синтеза и деградации. Скорость синтеза регулируется путем активации (в ответ на какой-то внешний сигнал) фактора транскрипции (рис. 15-2, ②; подробности см. в гл. 28). **Факторы транскрипции** — это ядерные белки, которые после активации связываются со специфическими участками ДНК (**респонсивными элементами**) вблизи области промотора гена (точки начала транскрипции) и активируют или подавляют транскрипцию данного гена, что приводит к увеличению или уменьшению продукции соответствующего белка. Активация фактора транскрипции часто происходит в результате его связывания со специфическим лигандом, а иногда бывает вызвана его фосфорилированием или дефосфорилированием. Каждый ген контролируется одним или несколькими респонсивными элементами, которые распознаются специфическими факторами транскрипции. Некоторые гены содержат несколько респонсивных элементов и, следовательно, контролируются несколькими различными факторами транскрипции, реагирующими на несколько различных сигналов. Группы генов, кодирующих белки, действие которых взаимосвязано, как в случае ферментов гликолиза или глюконеогенеза, часто содержат респонсивные элементы с одинаковой последовательностью, так что один и тот же сигнал, действующий через определенный фактор транскрипции, включает или выключает всю группу генов одновременно. В разд. 15.3 обсуждается регуляция метаболизма углеводов под действием специфических факторов транскрипции.

Устойчивость молекул мРНК к рибонуклеазам (рис. 15-2, ③) может быть различной, так что количество мРНК данного вида в клетке — функция скоростей ее синтеза и деградации (гл. 26). Наконец, скорость трансляции мРНК на рибосомах (рис. 15-2, ④) также регулируется и зависит от нескольких факторов, описанных подробно в гл. 27.

Обратите внимание, что увеличение продукции мРНК в n раз не всегда означает n-кратное увеличение синтеза соответствующего белка.

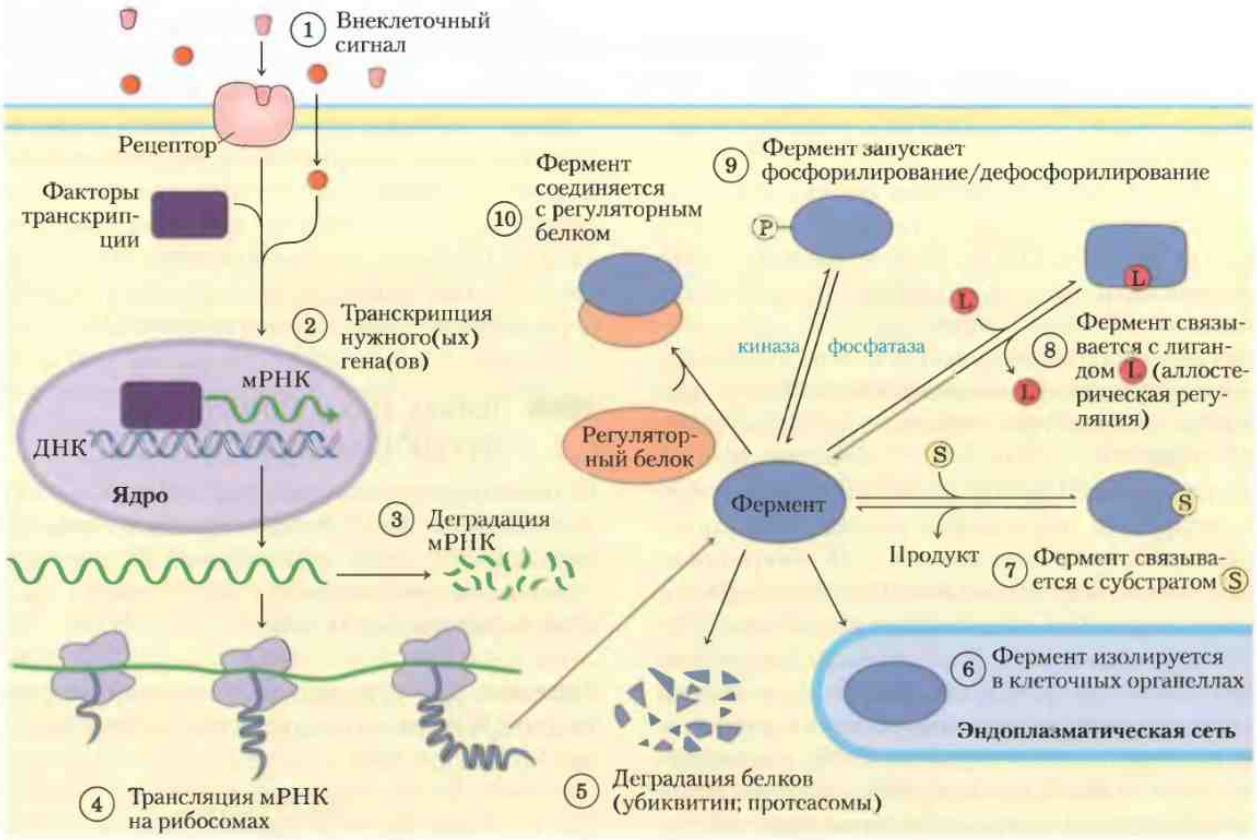


Рис. 15-2. Факторы, влияющие на активность ферментов. Общая активность фермента может меняться из-за изменения *числа* молекул данного (количества) фермента в клетке, его *эффективной* активности в определенном клеточном отделе (①–⑥) или модуляции *активности* существующих молекул фермента (⑦–⑩), как подробно описано в тексте. Активность конкретного фермента определяется сочетанием этих факторов.

Образовавшаяся молекула белка существует ограниченное время, а именно, от нескольких минут до многих дней (табл. 15-1). Скорость деградации ферментов (рис. 15-2, ⑤) также различна и определяется внутриклеточными условиями. Некоторые белки подвергаются деградации в протеасомах (см. гл. 28) в результате ковалентного связывания с убиквитином (вспомните белок циклин; см. рис. 12-46). Быстрый **оборот** (синтез с последующей деградацией) сопряжен с большими энергетическими затратами, однако белки с меньшим периодом полужизни (время, за которое остается половина первоначального количества вещества) могут достичь нового стационарного состояния по своему содержанию быстрее белков, время полужизни которых велико, и выигрыш от такой быстрой реакции должен уравновешивать или быть больше энергетических затрат клетки.

Еще один фактор, влияющий на *эффективную* активность фермента, — это доступность его субстрата (рис. 15-2, ⑥). Гексокиназа из мышц не может действовать на глюкозу, пока этот сахар не поступит из крови в клетки мышц, а скорость проникновения глюкозы в клетки зависит от молекул-переносчиков (см. табл. 11-3) в плазматической мембране. Внутри клетки не-

Таблица 15-1 Примерное время полужизни белков в органах млекопитающих

Органы	Время полужизни, сут
Печень	0,9
Почки	1,7
Сердце	4,1
Мозг	4,6
Мышцы	10,7

которые ферменты и ферментные системы содержатся в различных ограниченных мембраной компартментах; доставка субстратов в эти отделы может быть лимитирующим фактором для фермента.

Благодаря наличию этих нескольких механизмов регуляции ферментативной активности клетки способны существенно изменять набор ферментов в ответ на изменение условий метаболизма. У позвоночных наиболее приспосабливаемым органом является печень; например, замена богатой углеводами пищи на пищу с высоким содержанием липидов влияет на транскрипцию сотен генов и, следовательно, синтез сотен белков. Подобные глобальные изменения в экспрессии генов можно оценить на количественном уровне с помощью ДНК-микрочипов (см. рис. 9-22), позволяющих анализировать весь набор мРНК данного типа клеток или органов (**транскриптом**), или с помощью двумерного гель-электрофореза (см. рис. 3-21) — метода изучения всех белков данного типа клеток или конкретного органа (**протеом**). Оба этих метода очень полезны при исследованиях регуляции метаболизма. Изменения протеома часто влекут за собой изменения всего ансамбля низкомолекулярных метаболитов — **метаболома**.

После того как в результате действия регуляторных механизмов, контролирующих синтез и деградацию белка, в клетке образовалось определенное количество каждого фермента, активность этих ферментов и далее подвержена регуляции: путем изменения концентрации субстратов; путем воздействия аллостерических эффекторов; путем ковалентной модификации; или путем связывания регуляторных белков. Все эти процессы могут изменять активность отдельных молекул фермента (рис. 15–2, ⑦–⑩).

Все ферменты чувствительны к концентрации своих субстратов (рис. 15-2, ⑦). Вспомните, что в простейшем случае (в условиях кинетики Михаэлиса–Ментен) начальная скорость реакции равна половине максимальной скорости при концентрации субстрата, равной значению K_M (т. е. при полунасыщении фермента субстратом). При уменьшении концентрации субстрата [S] скорость реакции также уменьшается, а при $[S] \ll K_M$ скорость реакции линейным образом зависит от [S]. Это важно помнить, поскольку внутриклеточная концентрация субстрата часто близка к K_M или ниже этого значения. Например, активность гексокиназы зависит от концентрации глюкозы, а внутриклеточная концентрация глюкозы изменяется с концентрацией глюкозы в крови. Как мы увидим далее, различным формам (изоформам) гексокиназы соответствуют разные K_M, и, следовательно, присутствие различных изоформ гексокиназы зависит от внутриклеточной концентрации глюкозы, что имеет определенное физиологическое значение.

Пример 15-1 АКТИВНОСТЬ ПЕРЕНОСЧИКА ГЛЮКОЗЫ

Если для переносчика глюкозы в печени (GLUT2) K_t (эквивалент K_M) = 40 мМ, определите изменение скорости поступления (потока) глюкозы в гепатоциты при повышении концентрации глюкозы в крови от 3 до 10 мМ.

Решение. Для определения начальной скорости поступления глюкозы используем уравнение 11-1 (т. 1, с. 555).

$$V_0 = \frac{V_{max}\,[S]_{снаружи}}{K_t + [S]_{снаружи}}$$

При 3 мМ глюкозы

$$V_0 = V_{max}\,(3\text{ мМ})/(40\text{ мМ} + 3\text{ мМ}) =$$
$$= V_{max}\,(3\text{ мМ}/43\text{ мМ}) = 0{,}07\,V_{max}$$

При 10 мМ глюкозы

$$V_0 = V_{max}\,(10\text{ мМ})/(40\text{ мМ} + 10\text{ мМ}) =$$
$$= V_{max}\,(10\text{ мМ}/50\text{ мМ}) = 0{,}20\,V_{max}$$

Таким образом, если концентрация глюкозы в крови увеличилась от 3 до 10 мМ, то это значит, что скорость потока глюкозы в гепатоциты повысилась почти в 3 раза (0,20/0,07).

Ферментативная активность может увеличиваться или уменьшаться под действием аллостерических эффекторов (рис. 15-2, ⑧; см. также рис. 6-34). Под влиянием аллостерических эффекторов кинетика реакции обычно вместо гиперболической становится S-образной, или наоборот (например, см. рис. 15-14, *б*). В наиболее крутой части S-образной кривой небольшие изменения концентрации субстрата или аллостерического эффектора могут значительно влиять на скорость реакции. Как мы обсуждали в гл. 5

(с. 239, т. 1), для описания поведения аллостерических ферментов пользуются коэффициентом кооперативности Хилла, причем большое значение этого коэффициента означает более высокую кооперативность. Для аллостерического фермента с коэффициентом Хилла, равным 4, трехкратное увеличение концентрации субстрата приводит к увеличению скорости реакции от $0{,}1V_{max}$ до $0{,}9V_{max}$, тогда как для фермента, не обладающего свойством кооперативности (коэффициент Хилла 1; см. табл. 15-2), для такого же изменения ферментативной активности требуется повышение концентрации субстрата в 81 раз!

Ковалентные модификации уже существующего фермента или другого белка (рис. 15-2, ⑨) происходят за секунды–минуты с момента поступления сигнала, как правило, внеклеточного. Самая распространенная модификация — это фосфорилирование–дефосфорилирование (**рис. 15-3**); до половины всех белков в эукариотической клетке при определенных условиях подвергаются фосфорилированию. Фосфорилирование может изменить электростатические свойства активного центра фермента, сместить ингибирующий участок белка подальше от активного центра, повлиять на взаимодействие данного белка с другими молекулами или вызвать конформационные изменения, приводящие к изменениям V_{max} и K_M. Для осуществления регуляции необходимо, чтобы после ковалентной модификации клетка могла вернуть белок к его исходному состоянию. Семейство фосфопротеинфосфатаз, некоторые члены которого сами находятся под контролем, катализируют дефосфорилирование белков, которые были фосфорилированы протеинкиназами.

Таблица 15-2 Соотношение между коэффициентом Хилла и влиянием концентрации субстрата на скорость реакции для аллостерических ферментов

Коэффициент Хилла (n_H)	Увеличение (кратность) [S], необходимое для увеличения V_0 от $0{,}1V_{max}$ до $0{,}9V_{max}$
0,5	×6 600
1,0	×81
2,0	×9
3,0	×4,3
4,0	×3

Рис. 15-3. Фосфорилирование–дефосфорилирование белка. Протеинкиназы переносят фосфорильную группу от ATP на остатки Ser, Thr или Tyr в белке. Протеинфосфатазы удаляют фосфорильную группу в виде P_i.

Наконец, регуляция многих ферментов достигается путем связывания с регуляторными белками (рис. 15-2, ⑩). Например, cAMP-зависимая протеинкиназа (PKA; см. рис. 12-6) остается неактивной до тех пор, пока в результате связывания cAMP каталитические и регуляторные субъединицы фермента разделены.

Рассмотренные механизмы влияния на скорость определенной реакции метаболического пути не исключают друг друга. Достаточно часто один и тот же фермент подвергается регуляции на уровне транскрипции, а также путем аллостерических механизмов и ковалентного связывания. Сочетание этих механизмов обеспечивает быструю и эффективную регуляцию в ответ на самые разнообразные изменения в клетке и поступающие сигналы.

Для последующего обсуждения полезно рассмотреть изменения ферментативной активности при выполнении двух различных, но, тем не менее, взаимодополняющих функций. Термином **метаболическая регуляция** будем обозначать процесс, направленный на поддержание гомеостаза на молекулярном уровне, т. е. поддержание определенных клеточных параметров (таких как концентрации метаболитов) даже при изменении потока метаболитов в данном метаболическом пути. Термином **метаболический контроль** будем называть процессы, ведущие к изменению результата метаболического пути во времени в ответ на некоторые внешние сигналы или изменение условий. Следует сказать, однако, что четкую границу между этими двумя понятиями провести не всегда легко.

Обычно в клетке регулируются реакции, далекие от состояния равновесия

На некоторых стадиях метаболического пути реакции приближаются к состоянию равновесия (**рис. 15-4**). Общий поток метаболитов в таких реакциях определяется небольшой разницей между скоростями прямой и обратной реакций, которые при приближении к состоянию равновесия имеют близкие значения. Небольшие изменения концентрации субстрата или продукта реакции могут сильно изменить общую скорость процесса и даже его направление. Идентифицировать эти почти равновесные реакции в клетке мы можем, если будем сравнивать величины **отношения действующих масс** Q с константой равновесия реакции K'_{eq}. Вспомните, что для реакции A + B → C + D $Q = [C][D]/[A][B]$. Считается, что когда Q и K'_{eq} различаются лишь на 1–2 порядка, реакция близка к равновесию. Например, это наблюдается для шести из 10 реакций гликолиза (табл. 15-3).

Многие реакции в клетке, однако, далеки от равновесия. Например, для реакции гликолиза, катализируемой фосфофруктокиназой-1 (PFK-1),

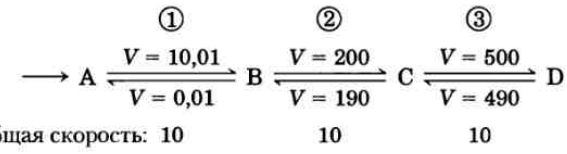


Рис. 15-4. Равновесные и неравновесные стадии метаболизма. В клетке стадии ② и ③ данного пути почти равновесны; скорости их прямых реакций лишь немного превышают скорости обратных реакций, так что общая скорость (10) довольно низкая, а изменение свободной энергии $\Delta G'$ для каждой из этих стадий близко к нулю. Повышение внутриклеточной концентрации метаболитов C или D может изменить направление этих стадий. Стадия ① в клетке далека от равновесия — скорость прямой реакции намного превосходит скорость обратной реакции. Общая скорость стадии ① (10) много больше скорости обратной реакции (0,01) и в стационарном состоянии равна скоростям стадий ② и ③. Стадия ① характеризуется большим отрицательным значением $\Delta G'$.

$K'_{eq} \approx 1000$, а для типичной клетки в стационарном состоянии Q = [фруктозо-1,6-бисфосфат][ADP]/[фруктозо-6-фосфат][ATP]) ≈ 0,1 (табл. 15-3). Именно благодаря тому, что эта реакция так далека от равновесия, во внутриклеточных услови-

Таблица 15-3 Константы равновесия, отношения действующих масс и изменения свободной энергии ферментативных реакций при метаболизме углеводов

Фермент	K'_{eq}	Отношение действующих масс, Q		Реакция *in vivo* близка к равновесию?*	$\Delta G'^{\circ}$ (кДж/моль)	$\Delta G'$ в сердце (кДж/моль)
		Печень	Сердце			
Гексокиназа	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-2}$	$8 \cdot 10^{-2}$	Нет	−17	−27
PFK-1	$1{,}0 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	Нет	−14	−23
Альдолаза	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$	Да	+24	−6,0
Триозофосфатизомераза	$4 \cdot 10^{-2}$	–	$2{,}4 \cdot 10^{-1}$	Да	+7,5	+3,8
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа + + фосфоглицераткиназа	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^2$	9,0	Да	−13	+3,5
Фосфоглицератмутаза	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^1$	$1{,}2 \cdot 10^{-1}$	Да	+4,4	+0,6
Енолаза	3	2,9	1,4	Да	−3,2	−0,5
Пируваткиназа	$2 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^{-1}$	40	Нет	−31	−17
Фосфоглюкоизомераза	$4 \cdot 10^{-1}$	$3{,}1 \cdot 10^{-1}$	$2{,}4 \cdot 10^{-1}$	Да	+2,2	−1,4
Пируваткарбоксилаза + + ФЕП-карбооксикиназа	7	$1 \cdot 10^{-3}$	–	Нет	−5,0	−23
Глюкозо-6-фосфатаза	$8{,}5 \cdot 10^2$	$1{,}2 \cdot 10^2$	–	Да	−17	−5,0

Источник. K'_{eq} и Q взяты из книги [Newsholme E. A. & Start C. (1973) *Regulation in Metabolism*, Wiley Press, New York, pp. 97, 263]; $\Delta G'^{\circ}$ и $\Delta G'$ рассчитаны на основании этих данных.

* Для простоты считают, что все реакции, для которых $\Delta G' < 6$, близки к равновесию.

ях данный процесс экзергонический и протекает в прямом направлении. Эта реакция далека от равновесия, поскольку при обычных внутриклеточных концентрациях субстрата, продукта и эффектора скорость превращения фруктозо-6-фосфата в фруктозо-1,6-бисфосфат ограничена активностью PFK-1, что регулируется числом молекул PFK-1 и действием эффекторов. Таким образом, скорость прямого процесса совпадает со скоростью общего потока интермедиатов гликолиза в других реакциях данного пути, а скорость обратного потока в реакции с участием PFK-1 практически равна нулю.

Клетка *не может допустить*, чтобы реакции с большими значениями констант равновесия приближались к равновесию. Если при обычных клеточных концентрациях фруктозо-6-фосфата, ATP и ADP (несколько миллимолей) катализируемая PFK-1 реакция могла бы достигать равновесия, то концентрация фруктозо-1,6-бисфосфата оказалась бы в молярном диапазоне, что привело бы к гибели клетки из-за высокого осмотического давления.

Рассмотрим другой пример. Если в клетке реакция ATP → ADP + P_i могла бы приблизиться к равновесию, для этой реакции изменение свободной энергии $\Delta G' \rightarrow 0$ (ΔG_p; см. пример 13-2, с. 31); в результате ATP утратил бы свой высокий потенциал переносчика фосфатных групп, который так необходим клетке. Поэтому очень важно, чтобы ферменты, катализирующие разложение ATP и другие экзергонические реакции в клетке, были подвержены регуляции, т. е. при изменении метаболических процессов в результате внешних воздействий реакции с участием этих ферментов корректировались таким образом, чтобы концентрация ATP оставалась гораздо выше равновесного уровня. При подобных изменениях метаболизма происходит корректировка активностей ферментов во всех взаимосвязанных метаболических путях, что не позволяет критическим стадиям достичь равновесия. Поэтому неудивительно, что многие ферменты (такие как PFK-1), катализирующие реакции с большим отрицательным изменением свободной энергии, тонко регулируются множеством различных способов. Эта регуляция происходит настолько сложным путем, что при изучении свойств только одного фермента метаболического пути нельзя определить, насколько большое влияние оказывает этот фермент на ход процесса в целом; для этого надо привлечь теорию контроля метаболизма, к которой мы обратимся в разд. 15.2.

Адениновые нуклеотиды играют особую роль в регуляции метаболизма

Возможно, вторая по важности задача клетки (после защиты от повреждений ДНК) — это поддержание постоянных запасов ATP. Многие ATP-зависимые ферменты имеют K_M между 0,1 и 1 мМ, а нормальная концентрация ATP в клетке составляет 5 мМ. Если концентрация ATP была бы значительно ниже, эти ферменты не могли бы достичь насыщения своим субстратом (ATP), в результате чего снизилась бы скорость сотен реакций, происходящих с участием ATP (**рис. 15-5**). Клетка, вероятно, не смогла бы пережить такого *кинетического* воздействия на столь большое число реакций.

Кроме того, уменьшение концентрации ATP имеет важные *термодинамические* последствия. Поскольку при выполнении работы в клетке ATP превращается в ADP или AMP, соотношение [ATP]/[ADP] оказывает глубокое влияние на течение всех реакций, в которых задействованы эти кофакторы. Это же относится и к другим кофакторам— NADH/NAD^+ и NADPH/$NADP^+$.

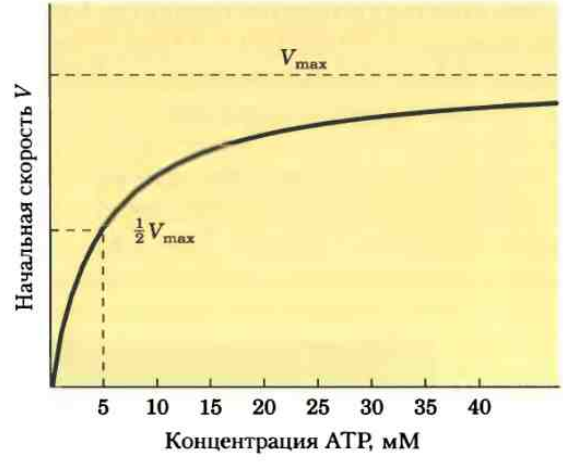


Рис. 15-5. Влияние концентрации ATP на начальную скорость реакции, катализируемой типичным ATP-зависимым ферментом. На основании этих экспериментальных данных для ATP $K_M \approx 5$ мМ. В тканях животных концентрация [ATP] ≈ 5 мМ.

Например, рассмотрим реакцию, катализируемую гексокиназой:

$$\text{ATP} + \text{глюкоза} \rightarrow \text{ADP} + \text{глюкозо-6-фосфат}$$

$$K'_{eq} = \frac{[\text{ADP}]_{eq}\,[\text{глюкозо-6-фосфат}]_{eq}}{[\text{ATP}]_{eq}\,[\text{глюкоза}]_{eq}} = 2 \cdot 10^3$$

Заметьте, что это выражение верно *только* в том случае, когда исходные вещества и продукты реакции находятся в *равновесных* концентрациях, при которых $\Delta G' = 0$. При любых других концентрациях $\Delta G' \neq 0$. Вспомните (гл. 13), что отношение концентраций продуктов реакции к концентрациям субстратов (отношение действующих масс Q) определяет величину и знак $\Delta G'$ и, следовательно, движущую силу ($\Delta G'$) реакции:

$$\Delta G' = \Delta G'^{\circ} + RT \ln \frac{[\text{ADP}]\,[\text{глюкозо-6-фосфат}]}{[\text{ATP}]\,[\text{глюкоза}]}$$

Поскольку изменение этой движущей силы влияет на все реакции с участием ATP, в процессе эволюции организмы выработали регуляторные механизмы, ответственные за поддержание соотношения [ATP]/[ADP].

Концентрация AMP гораздо чувствительнее к энергетическому состоянию клетки, чем концентрация ATP. Обычно в клетках концентрация ATP (5–10 мМ) гораздо выше, чем концентрация AMP (<0,1 мМ). При расходовании ATP, например при мышечном сокращении, AMP образуется в результате двустадийного процесса. Сначала при гидролизе ATP образуется ADP, а затем в результате действия **аденилаткиназы** — AMP:

$$2\text{ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$$

При уменьшении концентрации ATP на 10% *относительное* увеличение концентрации AMP более значительно, чем для ADP (табл. 15-4). Поэтому неудивительно, что многие регуляторные процессы связаны именно с концентрацией AMP. Важную роль как медиатор регуляции играет **AMP-зависимая протеинкиназа**, которая при повышении концентрации AMP начинает фосфорилировать ключевые белки, регулируя тем самым их активность. Увеличение [AMP] может быть связано с недостаточным поступлением питательных веществ или с большой физической нагрузкой. Действие AMP-зависимой протеинкиназы (не путайте с *cAMP*-зависимой протеинкиназой, см. разд. 15.5) усиливает транспорт глюкозы, активирует гликолиз и окисление жирных кислот, но в то же время подавляет такие энергозатратные процессы, как синтез жирных кислот, холестерина и белков (рис. 15-6). В гл. 23 мы подробнее обсудим этот фермент и механизм его действия в указанных процессах.

Наряду с ATP в клетке в необходимых концентрациях должны присутствовать сотни интермедиатов метаболизма. Например, интермедиаты гликолиза дигидроксиацетонфосфат и 3-фосфоглицерат служат предшественниками триацилглицеринов и серина соответственно. При необходимости скорость гликолиза должна корректироваться таким образом, чтобы обеспечить необходимое количество этих веществ без снижения уровня образования ATP. Эта же закономерность справедлива для других важных кофакторов, таких как NADH и NADPH: изменение отношения их действующих масс (т. е. отношение концентрации восстановленной формы кофактора к концентрации его окисленной формы) оказывает очень сильное влияние на метаболизм.

Конечно, на эволюционное развитие регуляторных механизмов влияли также приоритеты, возникающие в жизнедеятельности *целого организма*. В головном мозге млекопитающих запасы энергии практически отсутствуют, поэтому деятельность мозга полностью зависит

Таблица 15-4 Относительные изменения концентраций ATP и AMP при расходовании ATP или функциональных групп

Аденин-нуклеотид	Концентрация до начала расходования ATP (мМ)	Концентрация после расходования ATP (мМ)	Относительное изменение концентрации
ATP	5,0	4,5	10%
ADP	1,0	1,0	0
AMP	0,1	0,6	600%

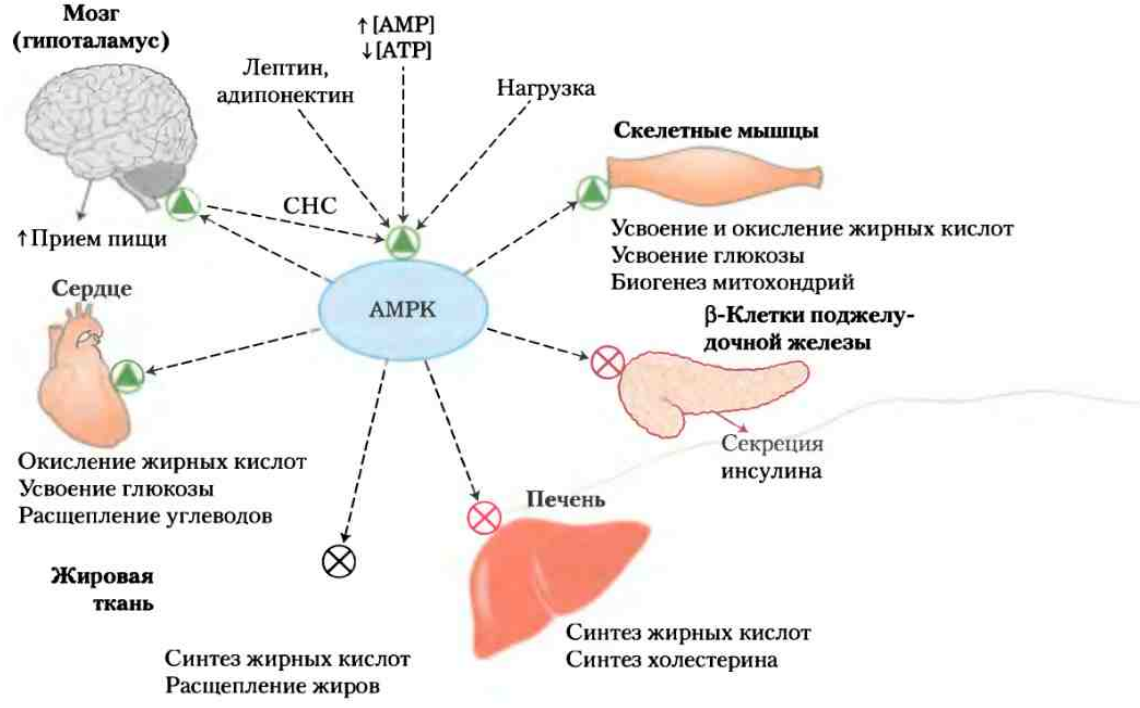


Рис. 15-6. Роль AMP-зависимой протеинкиназы (AMPK) в метаболизме жиров и углеводов. Во время физических нагрузок AMPK активируется в ответ на увеличение концентрации AMP или уменьшение концентрации ATP сигналами от симпатической нервной системы (СНС) или гормонов жировой ткани (лептина и адипонектина, подробнее см. гл. 23). Активированная AMPK фосфорилирует ключевые белки и тем самым регулирует метаболизм во многих тканях, подавляя такие энергозатратные процессы, как синтез гликогена, жирных кислот и холестерина; направляет обмен веществ вне печени на использование жирных кислот в качестве топливных молекул; а в печени запускает глюконеогенез для обеспечения мозга глюкозой. В гипоталамусе AMPK стимулирует пищевое поведение так, чтобы организм получил больше питательных веществ.

от поступления глюкозы по кровотоку. Когда уровень глюкозы крови уменьшается в 2 раза по сравнению с нормой (4–5 мМ), происходит нарушение мозговой деятельности, а 5-кратное снижение уровня глюкозы крови приводит к состоянию комы и к смерти. Поддерживать уровень глюкозы крови в норме помогают гормоны инсулин и глюкагон, выделяющиеся при повышенном и пониженном содержании глюкозы соответственно; эти гормоны запускают серию метаболических реакций, направленных на нормализацию уровня глюкозы.

Кроме того, в ходе эволюции должно было осуществляться и другое селективное воздействие, приведшее к отбору регуляторных механизмов, направленных на решение вполне определенных задач.

1. Обеспечение максимальной эффективности использования энергии путем предотвращения одновременного протекания реакций противоположно направленных метаболических путей (например, гликолиза и глюконеогенеза).
2. Распределение метаболитов между альтернативными метаболическими путями (такими как гликолиз и пентозофосфатный путь).
3. Выбор наиболее подходящего источника энергии для решения текущих задач организма (глюкоза, жирные кислоты, гликоген или аминокислоты).
4. Остановка путей биосинтеза при накоплении его продуктов.

В последующих главах представлено множество примеров регуляторных механизмов каждого типа.

Краткое содержание раздела 15.1 РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

- В клетке с активным метаболизмом, находящейся в стационарном состоянии, интермедиаты метаболизма образуются и расходуются с одинаковой скоростью. Если в результате каких-либо воздействий скорость образования или расходования метаболита изменяется, в клетке происходит компенсаторное изменение активностей ферментов, приводящее к восстановлению стационарного состояния.

- Клетки регулируют свой метаболизм с помощью различных механизмов во временном диапазоне от миллисекунд до нескольких суток, изменяя активность уже существующих ферментов или количество синтезируемых молекул специфического фермента.

- Различные сигналы могут активировать или инактивировать факторы транскрипции, которые регулируют экспрессию генов в ядре клетки. Изменения в транскриптоме приводят к изменениям в протеоме и, в итоге, в метаболоме клетки или ткани.

- В многостадийных процессах, таких как гликолиз, некоторые реакции в стационарном состоянии близки к равновесию; скорости этих реакций контролируются концентрацией субстрата и уменьшаются и увеличиваются при ее изменении. Другие реакции далеки от равновесия; обычно они контролируют потоки веществ целиком в данном метаболическом пути.

- Регуляторные механизмы направлены на поддержание в клетках практически постоянного уровня ключевых метаболитов, таких как ATP и NADH, или глюкозы крови; при изменении потребностей организма используются запасы гликогена.

- Содержание ATP и AMP отражает энергетический статус клетки; при снижении отношения [ATP]/[AMP] AMP-зависимая протеинкиназа запускает различные клеточные процессы, призванные повысить концентрацию ATP и снизить концентрацию AMP.

15.2. Теория контроля метаболизма

Детальное изучение механизмов регуляции реакций метаболизма стало возможным лишь после установления основных химических реакций метаболизма и изучения ответственных за эти реакции ферментов. Приблизительно в 1900 г. Эдуард Бухнер доказал, что глюкоза может превращаться в этиловый спирт и CO_2 под действием дрожжевого экстракта. Этот момент был переломным, и и после этого открытия биохимики стали заниматься главным образом изучением стадий метаболических путей и выделением ферментов, осуществляющихк каждую стадию. К середине XX в. все 10 ферментов гликолитического пути были выделены и охарактеризованы. В последующие 50 лет многочисленные исследования были посвящены изучению регуляции этих ферментов при помощи внутриклеточных и внешних сигналов через различные аллостерические и ковалентные взаимодействия, описанные в настоящей главе. Здравый смысл подсказывал, что в линейных метаболических путях, каким является гликолиз, одна из каталитических стадий должна быть медленнее других, т. е. эта стадия должна определять скорость общего потока метаболитов через весь путь (лимитирующая стадия). В гликолизе таким ферментом считалась PFK-1, поскольку было известно, что ее действие строго регулируется фруктозо-2,6-бисфосфатом и другими аллостерическими регуляторами.

С развитием методов генной инженерии стало возможным проверить эту гипотезу «одной лимитирующей стадии» путем повышения концентрации фермента, катализирующего лимитирующую стадию, и определения того, изменяется ли пропорциональным образом поток метаболитов в данном метаболическом пути.

Эдуард Бухнер, 1860–1917

Оказалось, что это не так: простое решение (наличие одной лимитирующей стадии) было неверным. На сегодняшний день уже ясно, что в большинстве метаболических путей контроль потока метаболитов осуществляется на нескольких ферментативных стадиях, а степень влияния каждого фермента зависит от различных обстоятельств — наличия исходных веществ (например, глюкозы), уровня кислорода, потребностей в других продуктах, которые образуются из интермедиатов данного метаболического пути (скажем, глюкозо-6-фосфата для пентозофосфатного пути в клетках, синтезирующих большое количество нуклеотидов), влияния метаболитов с регуляторными функциями, гормонального статуса организма (уровня инсулина и глюкагона), а также ряда других факторов.

Зачем вообще нужно знать, что ограничивает (лимитирует) поток метаболитов в том или ином метаболическом пути? Это необходимо, чтобы понять действие гормонов и лекарств, а также патологические процессы, возникающие при нарушении метаболической регуляции. При разработке лекарственного препарата, стимулирующего или ингибирующего метаболический путь, вполне понятно, что их мишенью должен быть тот фермент, который оказывает наиболее сильное влияние на интенсивность всего пути. Для создания генно-инженерного штамма микроорганизма, способного производить большие количества ценного коммерческого продукта (см. т. 1, с. 444), требуются знания о факторах, ограничивающих поток других метаболитов в сторону образования данного продукта.

Вклад каждого фермента в поток метаболитов можно измерить экспериментально

Известно несколько методов экспериментального определения, как изменение ферментативной активности влияет на потоки метаболитов в метаболическом пути. Рассмотрим результаты эксперимента, представленные на **рис. 15-7**. Образец печени крысы гомогенизировали, так что все ферменты перешли в раствор, а затем измеряли скорость гликолитического превращения глюкозы в фруктозо-6-фосфат под действием полученного экстракта. Для простоты в данном эксперименте рассматривается лишь первая стадия процесса гликолиза. При добавлении дополнительного

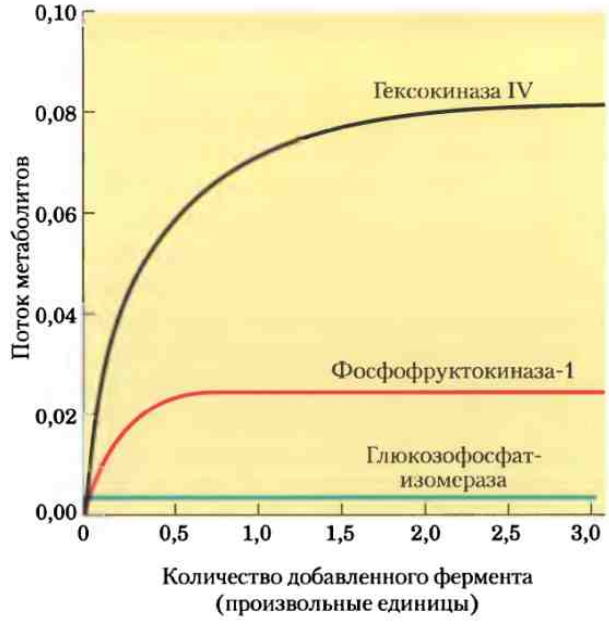


Рис. 15-7. Зависимость интенсивности гликолиза в гомогенате печени крысы от количества добавленных ферментов. К экстракту печени крысы, в котором происходил гликолиз *in vitro*, добавляли чистые ферменты (ось *x*). По оси *y* указан поток метаболитов в данном метаболическом пути.

количества очищенной гексокиназы IV скорость процесса возрастала. Добавление очищенной PFK-1 увеличивало скорость гликолиза, однако не так сильно, как добавление гексокиназы. Внесение в систему очищенной глюкозофосфатизомеразы не оказывало никакого эффекта. Данные результаты говорят о том, что и гексокиназа, и PFK-1 вносят определенный вклад в потоки веществ в этом метаболическом пути, причем гексокиназа оказывает более сильное влияние, а глюкозофосфатизомераза не оказывает никакого действия.

Аналогичные эксперименты можно провести на целых клетках или организмах, если использовать специфические ингибиторы или активаторы, изменяющие активность одного фермента, и анализировать их влияние на скорость всего метаболического пути. Кроме того, количество фермента можно изменять генетическими методами. Можно создать клетку, несущую дополнительные копии исследуемого белка, или, напротив, обладающую белком с пониженной ферментативной

Дополнение 15–1 ПРАКТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ Теория контроля метаболизма: количественные аспекты

Эксперимент позволяет провести количественное определение тех факторов, которые влияют на потоки интермедиатов в метаболическом пути, и выразить их в такой форме, которая удобна для предсказания изменений потока при изменении тех или иных факторов. Рассмотрим простую последовательность реакций, изображенную на рис. 1, в которой субстрат А (скажем, глюкоза) в несколько стадий превращается в продукт В (возможно, пируват, образующийся в результате гликолиза). Один из ферментов данного пути — дегидрогеназа, действующая на субстрат Б (назовем ее *бдг*). Поскольку активность дегидрогеназы определить легко (см. рис. 13-24), мы можем использовать поток на этой стадии $J_{бдг}$ в качестве меры потока через весь путь. Изменяя уровень активности одного из предшествующих ферментов данного пути (например, фермента аазы, действующей на субстрат А), будем следить за изменениями потока $J_{бдг}$.

В интактной клетке зависимость потока от А до В от концентрации каждого фермента, действующего на данном пути, должна иметь гиперболический вид, причем при бесконечно малой концентрации фермента поток должен стремиться к 0, а при очень высокой активности фермента достигать максимума. На графике зависимости $J_{бдг}$ от концентрации первого фермента ($E_{ааза}$) изменение потока при небольшом изменении концентрации фермента ($\delta J_{бдг}/\delta E_{ааза}$) — прямая с тангенсом угла наклона, равным концентрации $E_{ааза}$, а при насыщающей концентрации фермента этот параметр стремится к 0. При низкой концентрации фермента угол наклона растет, т. е. поток увеличивается при увеличении концентрации (активности) фермента. При высокой концентрации фермента угол наклона заметно уменьшается, а система становится менее чувствительной к увеличению концентрации фермента, поскольку он и так присутствует в избытке по отношению к другим ферментам данного пути.

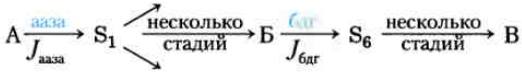


Рис. 1. Поток в гипотетической полиферментной системе.

Для количественного определения зависимости потока от концентрации фермента можно рассматривать отношение $\delta J_{бдг}/\delta E_{ааза}$. Однако этот параметр используется редко, так как потоки и ферментативную активность обычно выражают в разных системах размерности. Используя *относительные* изменения потока и ферментативной активности ($J_{бдг}/J_{бдг}$ и $\delta E_{ааза}/E_{ааза}$), получим выражение для **безразмерного коэффициента управления** ***C***, в данном случае $C^{J_{бдг}}_{ааза}$:

$$C^{J_{бдг}}_{ааза} \approx \frac{\delta J_{бдг}}{J_{бдг}} \Big/ \frac{\delta E_{ааза}}{E_{ааза}} \qquad (1)$$

$$C^{J_{бдг}}_{ааза} \approx \frac{\delta J_{бдг}}{\delta E_{ааза}} \cdot \frac{E_{ааза}}{J_{бдг}}$$

$$C^{J_{бдг}}_{ааза} \approx \frac{\delta \ln J_{бдг}}{\delta \ln E_{ааза}}$$

Используя последнюю формулу, можно определить коэффициент управления с помощью графика: $C^{J_{бдг}}_{ааза}$ равен тангенсу угла наклона зависимости $\ln J_{бдг}$ от $\ln E_{ааза}$, построенной по экспериментальным данным (см. рис. 2, *а* и 2, *б*). Заметьте, что $C^{J_{бдг}}_{ааза}$ не константа; этот параметр зависит от исходного значения $E_{ааза}$, после которого концентрация фермента начинает изменяться. Обратимся к рис. 2, *б:* при минимальной концентрации фермента $C^{J_{бдг}}_{ааза} \approx 1{,}0$, а при высокой концентрации $C^{J_{бдг}} \approx 0{,}2$. Если $C^{J_{бдг}} \to 1$, то концентрация данного фермента полностью определяет поток через метаболический путь; при $C^{J_{бдг}} \to 0$ концентрация фермента не влияет на поток. Изменения активности фермента оказывают серьезное влияние на поток только в том случае, когда $C > 0{,}5$.

Коэффициент эластичности ε позволяет оценить изменение каталитической активности фермента при изменении концентрации метаболита — субстрата, активностью. Повышение концентрации фермента таким генно-инженерным способом иногда оказывает значительное влияние на скорость процесса, а иногда не оказывает никакого действия.

В **теории контроля метаболизма** имеются три основных параметра, описывающих отклик метаболического пути на изменения условий метаболизма. Обратимся к количественному описанию этих параметров и покажем, как они влияют на процессы в живой клетке. Более строгие количественные выкладки представлены в доп. 15-1.

продукта или эффектора. Этот параметр определяют из зависимости скорости реакции, катализируемой данным ферментом, от концентрации метаболита (при таких концентрациях метаболита, которые характерны для внутриклеточных условий). Аналогично тому, как это было сделано для коэффициента управления, можно показать, что ε соответствует тангенсу угла наклона зависимости логарифма скорости реакции V от логарифма концентрации субстрата, продукта или эффектора:

$$\varepsilon_S^{\text{ааза}} = \frac{\delta V_{\text{ааза}}}{\delta S} \cdot \frac{S}{V_{\text{ааза}}} = \frac{\delta \ln |V_{\text{ааза}}|}{\delta \ln S}$$

Для фермента, демонстрирующего типичную кинетику Михаэлиса–Ментен, значение ε варьирует в пределах от 1,0 при концентрации субстрата $\ll K_M$ до 0,0 вблизи V_{max}. Аллостерические ферменты имеют коэффициенты эластичности >1, но не более чем коэффициент Хилла (см. т. 1, с. 239).

Наконец, влияние внешних факторов контроля (т. е. других веществ, не являющихся метаболитами) описывают с помощью **параметра отклика *R***. Изменение потока через путь определяют при разных концентрациях контролирующего фактора P, в таком случае R описывается уравнением, аналогичным уравнению 1:

$$R_P^{J_{\text{бдг}}} = \frac{\delta J_{\text{бдг}}}{\delta P} \cdot \frac{P}{J_{\text{бдг}}}$$

В координатах $\ln J$ от $\ln P$ тангенс угла наклона прямой дает отклик R.

Три коэффициента C, ε и R связаны между собой простым соотношением:

$$R_P^{J_{\text{бдг}}} = C_{\text{ааза}}^{J_{\text{бдг}}} \cdot \varepsilon_P^{\text{ааза}}$$

Таким образом, отклик каждого фермента метаболического пути на изменение внешнего фактора контроля — простая функция двух параметров: коэффициента управления C, отражающего влияние фермента на поток при заданных условиях, и коэффициента эластичности ε, характеристического для фермента, так как он отражает чувствительность фермента к изменениям концентрации субстрата или эффектора.

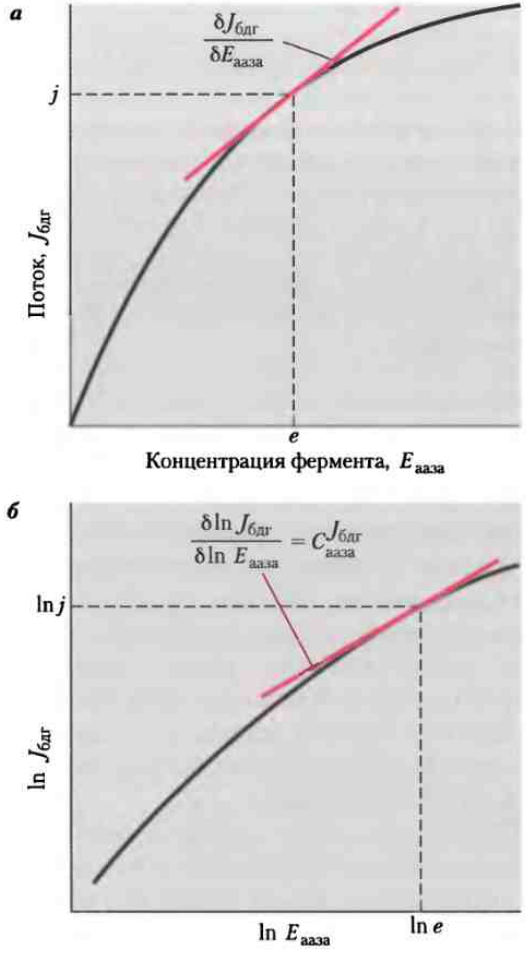


Рис. 2. Определение коэффициента управления C. *а* — типичные изменения потока ($J_{\text{бдг}}$), измеренные на стадии, катализируемой ферментом бдг, как функция концентрации фермента аазы ($E_{\text{ааза}}$), катализирующего более раннюю стадию превращения субстрата А. Коэффициент управления C в точке с координатами (e, j) равен произведению тангенса угла наклона кривой $\delta J_{\text{бдг}}/\delta E_{\text{ааза}}$ и множителя e/j; *б* — те же данные в виде логарифмической зависимости; коэффициент управления C можно определить как тангенс угла наклона кривой.

Коэффициент управления *C* определяет влияние ферментативной активности на поток метаболитов через метаболический путь

Данные, представленные на рис. 15-7, можно использовать для расчета **коэффициента управления *C*** для каждого фермента в метаболическом пути. Этот коэффициент выражает относительный вклад каждого фермента в скорость превращения метаболитов в метаболическом пути, т. е. **поток *J***. Коэффициент C может принимать любые значения от 0 (для фермента, не влияющего на поток) до 1 (для фермента,

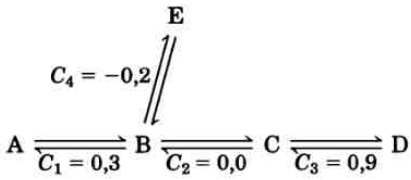


Рис. 15-8. Коэффициенты управления *C* в разветвленном метаболическом пути. В данном процессе интермедиат B может претерпевать два типа превращений. Поскольку реакция B → E выводит вещество B из метаболического пути A → D, фермент, катализирующий стадию B → E, имеет отрицательный коэффициент управления. Обратите внимание, что сумма всех четырех коэффициентов управления равна 1.

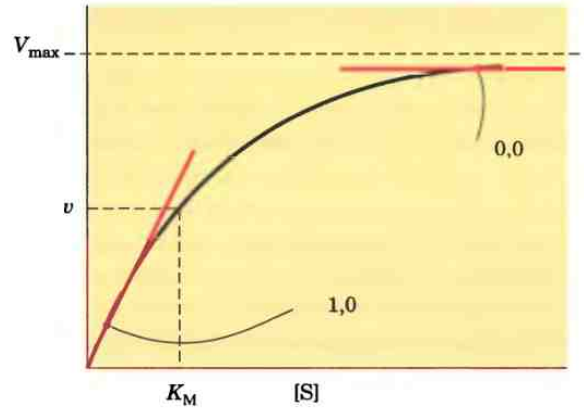


Рис. 15-9. Коэффициент эластичности ε для фермента, действие которого соответствует кинетике Михаэлиса–Ментен. При [S] ≪ K_M увеличение [S] приводит к более значительному росту скорости реакции *v*; в этой области кривой ε → 1. При [S] ≫ K_M увеличение [S] слабо сказывается на изменении *v*; в этой области ε → 0.

полностью контролирующего поток). Коэффициент управления может иметь и *отрицательное значение*, поскольку фермент, задействованный в разветвленных метаболических путях, может выводить метаболиты из одного пути и тем самым вносить отрицательный вклад в поток по этому пути (**рис. 15-8**). Коэффициент управления не константа и не характеристический параметр данного фермента; он зависит от ферментной системы в целом и от концентраций субстратов и эффекторов.

Применение теории контроля метаболизма для интерпретации эксперимента по гликолизу в экстракте печени крысы (рис. 15-7) показало, что для гексокиназы коэффициент управления 0,79, для PFK-1 0,21 и для глюкозофосфатизомеразы 0,0 (ферменты находятся в экстракте). Видно, что сумма этих коэффициентов равна 1, и это не простое совпадение. Можно показать, что для любого полного метаболического пути сумма коэффициентов управления должна быть равна 1.

Коэффициент эластичности ε связан с откликом фермента на изменения концентраций метаболитов или регуляторов

Коэффициент эластичности ε количественно выражает отклик фермента на изменения концентрации метаболита или регулятора и зависит от кинетики ферментативной реакции. Например, если ферментативная реакция описывается кинетикой Михаэлиса–Ментен, продуктивность этой реакции (т. е. активность фермента) связаны с концентрацией субстрата гиперболической зависимостью (**рис. 15-9**). При низкой концентрации субстрата, равной, скажем, 0,1 K_M, увеличение концентрации субстрата приводит к пропорциональному увеличению ферментативной активности; ε ≈ 1,0. При сравнительно высокой концентрации субстрата, например 10 K_M, дальнейшее ее увеличение оказывает лишь небольшое влияние на скорость реакции, поскольку фермент уже насыщен субстратом; ε → 0. В случае аллостерических ферментов с положительной кооперативностью может быть, что ε > 1, но ε никогда не может быть больше, чем коэффициент Хилла. Вспомните, что коэффициент Хилла — это мера кооперативности; его величина обычно лежит в диапазоне от 1,0 до 4,0.

Коэффициент отклика *R* отражает действие внешнего регулятора на поток через метаболический путь

Количественно можно выразить также относительное влияние на поток любого внешнего фактора (например, гормона или фактора роста), не метаболита и не фермента этого метаболического пути. Чтобы экспериментально определить **коэффициент отклика *R***, следует измерить поток через метаболический путь (в данном случае гликолиз) при различных значениях параметра *P*

(например, концентрации инсулина) — коэффициент отклика отражает изменения потока при изменениях P (концентрации инсулина).

Три коэффициента C, ε и R связаны между собой простым соотношением: отклик R метаболического пути на внешний фактор, влияющий на определенный фермент, есть функция 1) чувствительности пути к изменениям активности данного фермента (т. е. коэффициента управления C) и 2) чувствительности данного фермента к изменениям внешнего фактора (т. е. эластичности ε):

$$R = C \cdot \varepsilon$$

Подобным образом можно проанализировать каждый фермент, задействованный в метаболическом пути, а также определить влияние на поток некоторых внешних факторов. Итак, теоретически возможно предсказать характер изменений потока субстрата в серии ферментативных стадий при изменении одного или нескольких внешних регулирующих факторов. В доп. 15-1 изложен математический аспект данной теории.

Приложение теории контроля метаболизма к метаболизму углеводов дало неожиданные результаты

Теория контроля метаболизма позволяет количественно описывать механизмы регуляции, интерпретировать регуляторную роль каждого фермента метаболического пути, идентифицировать стадии, оказывающие наиболее сильное влияние на поток, а также проводить различие между *регуляторными* механизмами, направленными на поддержание концентраций метаболитов, и механизмами *контроля*, которые реально изменяют потоки в метаболическом пути. Например, анализ гликолиза у дрожжей выявил неожиданно низкое значение коэффициента управления C для PFK-1, которая, как было известно, подвержена аллостерической регуляции и поэтому считалась основным участком контроля потока (лимитирующей стадией) при гликолизе. Пятикратное увеличение уровня PFK-1 увеличивало поток лишь на 10%, что говорит о роли PFK-1 не как регулятора потока в гликолитическом пути, а, скорее, как посредника в поддержании гомеостаза, предотвращающего значительные изменения концентрации метаболитов при усилении потока через этот путь в ответ на повышение уровня глюкозы в крови или сигнал инсулина. Вспомните, что при изучении гликолиза в экстракте печени (рис. 15-7) также было получено значение коэффициента управления C, противоречащее теории. Оказалось, что не PFK-1, а гексокиназа оказывает наиболее сильное влияние на поток в гликолизе. Следует отметить, что экстракт печени вовсе не гепатоцит, и наилучшим способом изучения контроля потока было бы варьирование активности каждого отдельного фермента в живой клетке. В некоторых случаях такие исследования можно выполнить.

В качестве неинвазивного метода определения концентрации гликогена и метаболитов в пятистадийном процессе превращения глюкозы крови в гликоген в миоцитах человека и крысы применяли ядерный магнитный резонанс (ЯМР; **рис. 15-10**). Выяснилось, что для гликогенсинтазы коэффициент управления C меньше, чем для переносчика глюкозы и гексокиназы. (Мы обсудим гликогенсинтазу и другие ферменты

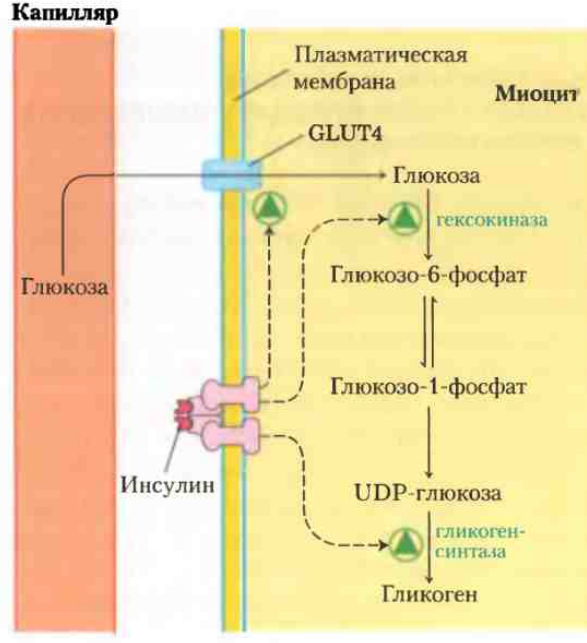


Рис. 15-10. Контроль синтеза гликогена из глюкозы крови в миоцитах. Инсулин влияет на три из пяти стадий данного пути метаболизма, причем поток метаболитов в сторону синтеза гликогена зависит от действия инсулина на транспорт глюкозы и активность гексокиназы, но не на активность гликогенсинтазы.

метаболизма гликогена в разд. 15.4 и 15.5.) Это открытие также противоречило идее о том, что гликогенсинтаза — ключевой пункт контроля потока метаболитов, и показывало, что фосфорилирование и дефосфорилирование гликогенсинтазы связано с поддержанием гомеостаза, т. е. с *регуляцией*, а не с *контролем* метаболизма. Два метаболита данного пути глюкоза и глюкозо-6-фосфат — ключевые интермедиаты других метаболических путей, включая гликолиз, пентозофосфатный путь и синтез глюкозамина. Из теории контроля метаболизма следует, что при повышении уровня глюкозы крови начинается действие инсулина, направленное на 1) усиление транспорта глюкозы внутрь клеток путем приближения GLUT4 к плазматической мембране, 2) индукцию синтеза гексокиназы и 3) активацию с помощью ковалентной модификации гликогенсинтазы (см. рис. 15-39). Первые два действия инсулина усиливают поток глюкозы в данном пути (контроль), а третье служит для адаптации активности гликогенсинтазы с целью не допустить серьезных изменений уровня метаболитов (например, глюкозо-6-фосфата) при усилении потока (регуляция).

Теория контроля метаболизма предлагает общий метод для усиления потока в метаболическом пути

Как создать клетку, в которой усилен поток в одном метаболическом пути, но не изменяются концентрации других метаболитов или другие потоки? Более 20 лет назад Хенрик Кексер, используя теорию контроля метаболизма, предсказал, что это можно осуществить путем увеличения концентрации каждого фермента данного метаболического пути. Его предсказание было подтверждено в нескольких экспериментальных работах и соответствует реальному способу контроля потока в клетке. Например, если в рацион питания крыс включать большое количество белка, они начинают превращать избыточные аминогруппы в мочевину в цикле мочевины (гл. 18). В результате такой смены питания выход мочевины увеличивается в 4 раза, а количество всех восьми ферментов, задействованных в цикле мочевины, возрастает в 2–3 раза. Аналогичным образом, при активации окисления жирных кислот в результате стимуляции рецептора активатора пролиферации пероксисом γ (RPARγ; см. рис. 21-22) происходит усиление синтеза всего набора окислительных ферментов. Использование ДНК-микрочипов для изменения экспрессии целых групп генов в ответ на различные стимулы, возможно, скоро позволит определить, отражает ли подобная картина общий механизм, с помощью которого клетки изменяют потоки через специфические пути метаболизма.

Краткое содержание раздела 15.2 ТЕОРИЯ КОНТРОЛЯ МЕТАБОЛИЗМА

- Из теории контроля метаболизма следует, что контроль скорости потока метаболитов в метаболическом пути осуществляется несколькими ферментами данного пути.

- Коэффициент управления C можно определить экспериментально; он служит мерой влияния концентрации фермента на поток в данном пути с участием многоферментной системы. Этот параметр не относится к каждому ферменту, а характеризует всю систему в целом.

- Коэффициент эластичности ε фермента также можно определить экспериментально; он служит мерой отклика фермента на изменения концентрации метаболита или регулятора.

- Коэффициент отклика R (или просто отклик) отражает экспериментально определяемое изменение потока, связанное с влиянием регуляторного гормона или вторичного мессенджера. Отклик представляет собой функцию C и ε: $R = C \cdot \varepsilon$.

- Некоторые регулируемые ферменты контролируют поток в метаболическом пути, в то время как другие отвечают за поддержание уровня метаболитов при изменениях потока. Ферменты первого рода осуществляют *контроль* процесса, а вторые — его *регуляцию*.

- Из теории контроля метаболизма следует, что наиболее эффективный способ усиления потока в сторону образования желаемого продукта — повышение концентрации всех ферментов, задействованных в метаболическом пути.

15.3. Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза

У млекопитающих **глюконеогенез** происходит главным образом в печени и обеспечивает глюкозой остальные ткани при исчерпании запасов гликогена. Как мы отмечали в гл. 14, в глюконеогенезе участвуют многие ферменты гликолиза. Семь реакций гликолиза легко протекают в обратном направлении, а катализирующие их ферменты действуют и в глюконеогенезе (**рис. 15-11**). Три реакции гликолиза сопровождаются таким значительным уменьшением свободной энергии (табл. 15-3, данные для сердечной мышцы), что протекает необратимо: это реакции, катализируемые гексокиназой, PFK-1 и пируваткиназой. В глюконеогенезе во всех трех случаях используются обходные пути; например, превращение фруктозо-1,6-бисфосфата в фруктозо-6-фосфат катализирует фруктозо-1,6-бисфосфатаза (FBPаза-1). Заметьте, что каждая из обходных реакций также характеризуется большой отрицательной величиной $\Delta G'$.

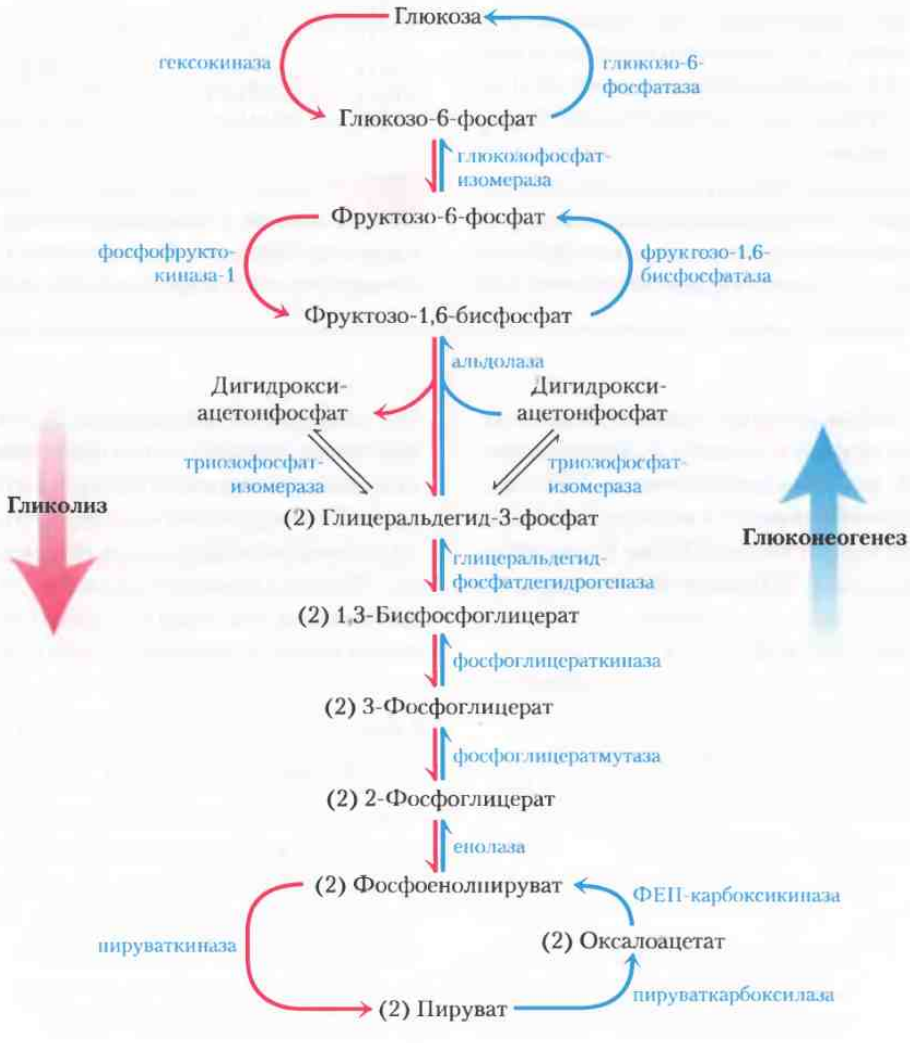


Рис. 15-11. Гликолиз и глюконеогенез. Гликолиз (показан розовым цветом) и глюконеогенез (синий цвет) в печени крысы. Эти процессы протекают в противоположных направлениях. Три стадии гликолиза и глюконеогенеза осуществляются под действием разных ферментов (обходные стадии глюконеогенеза); семь стадий катализируются в обоих направлениях одними и теми же ферментами. Чтобы не усложнять схему, кофакторы не указаны.

Дополнение 15-2 Изоферменты: разные белки, катализирующие одну и ту же реакцию

Четыре формы фермента гексокиназы, обнаруженные в тканях млекопитающих, представляют собой лишь один пример довольно распространенного биологического явления, когда одна и та же реакция катализируется двумя или несколькими различными молекулярными формами фермента. Эти формы, называемые изоферментами (изозимами), могут существовать у одного и того же вида, в одной и той же ткани или даже в одной клетке. Изоферменты обычно различаются по кинетическим свойствам и особенностям регуляции, по используемым кофакторам (например, NADH или NADPH в случае изоформ дегидрогеназ), а также по внутриклеточной локализации (растворимые или мембраносвязанные). У изоферментов может быть близкая, но не идентичная последовательность аминокислот; во многих случаях эти белки имеют общего эволюционного предка.

Один из первых ферментов, у которого были обнаружены изоформы, – лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (с. 91). В тканях позвоночных она существует по меньшей мере в виде пяти изоформ с различной электрофоретической подвижностью. Все формы ЛДГ состоят из четырех полипептидных цепей (каждая с M_r = 33500 Да), но имеют разное сочетание двух типов полипептидов. Полипептидные цепи М (мышечная форма) и Н (сердечная) кодируются двумя разными генами.

Изофермент, преобладающий в скелетных мышцах, состоит из четырех М-цепей, а изофермент, преобладающий в тканях сердца, содержит четыре Н-цепи. В других тканях встречаются изоферменты с различной комбинацией М- и Н-цепей.

Тип	Состав	Локализация
$ЛДГ_1$	НННН	Сердце и эритроциты
$ЛДГ_2$	НННМ	Сердце и эритроциты
$ЛДГ_3$	ННММ	Головной мозг и почки
$ЛДГ_4$	НМММ	Скелетные мышцы и печень
$ЛДГ_5$	ММММ	Скелетные мышцы и печень

Эти различия в содержании изоферментов можно использовать для оценки времени и обширности инфаркта миокарда. Повреждение сердечной ткани приводит к попаданию сердечной ЛДГ в кровь. Через

Если бы любая из этих трех необратимых стадий протекала одновременно в направлении как гликолиза, так и глюконеогенеза, АТР расходовался бы без совершения какой-либо работы в клетке. Например, PFK-1 и FBPаза-1 катализируют противоположно направленные реакции:

$$\text{АТР} + \text{фруктозо-6-фосфат} \xrightarrow{\text{PFK-1}} \text{ADP} + \text{фруктозо-1,6-бисфосфат}$$

$$\text{Фруктозо-1,6-бисфосфат} + H_2O \xrightarrow{\text{FBPаза-1}} \text{фруктозо-6-фосфат} + P_i$$

Суммируя эти две реакции, получаем

$$\text{АТР} + H_2O \rightarrow \text{ADP} + P_i + \text{тепло}$$

т. е. весь процесс состоит в гидролизе АТР, а никаких метаболических превращений не происходит. Понятно, что одновременное протекание в клетке этих двух процессов с высокими скоростями приводило бы к рассеиванию большого количества химической энергии в виде тепла. Такой тип процесса называют **холостым циклом**. Однако, как мы увидим позже, подобные циклы могут быть полезны для контроля метаболических путей, поэтому более правильно называть их **субстратными циклами**. Похожие субстратные циклы имеют место и в двух других участках глюконеогенеза/гликолиза, где используются обходные реакции (рис. 15-11).

Теперь мы более подробно остановимся на механизмах регуляции гликолиза и глюконеогенеза в тех трех участках, где эти пути расходятся.

Глюкозо-6-фосфат по-разному влияет на гексокиназы печени и мышц

Гексокиназа, катализирующая вовлечение свободной глюкозы в путь гликолиза, является регуляторным ферментом. Существуют четыре изофермента гексокиназы (от I до IV), которые кодируются четырьмя разными генами. Вспомните, что разные белки, катализирующие одну и ту же реакцию, называют изоферментами (доп. 15-2). Изофермент гексокиназы, преобладающий в миоцитах (**гексокиназа II**), имеет высокое сродство к глюкозе — полунасыщение достигается при концентрации глюкозы около 0,1 мМ. Поскольку при поступлении глюкозы

короткое время после сердечного приступа общее содержание ЛДГ в крови повышается, причем содержание $ЛДГ_2$ выше, чем $ЛДГ_1$. Спустя 12 ч количества $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$ почти равны, а через 24 ч наблюдается преобладание $ЛДГ_1$. Такое изменение соотношения $ЛДГ_1/ЛДГ_2$ в сочетании с повышением концентрации в крови еще одного сердечного фермента — креатинкиназы — строгое доказательство недавнего инфаркта миокарда. ■

Изоферменты ЛДГ сильно различаются значениями V_{max} и K_M, особенно по отношению к пирувату. $ЛДГ_4$ осуществляет быстрое превращение пирувата при очень низких концентраций в лактат в скелетных мышцах, тогда как $ЛДГ_1$ вызывает быстрое окисление лактата в пируват в сердце.

В общем случае распределение различных изоформ любого фермента отражает по крайней мере следующие четыре особенности метаболизма.

1. *Различие путей метаболизма в разных органах.* Например, механизмы регуляции изоферментов гликогенфосфорилазы в мышцах и печени неодинаковы, что свидетельствует о разном назначении расщепления гликогена в этих двух тканях.
2. *Локализация и метаболическая функция изоферментов в одной и той же клетке различаются.* Пример — изоферменты изоцитратдегидрогеназы в цитозоле и митохондриях (гл. 16).
3. *Развитие тканей плода или эмбриона и тканей взрослого организма протекает по-разному.* Например, печень плода характеризуется определенным изоферментным составом ЛДГ, который изменяется по мере превращения органа в печень взрослого. Некоторые ферменты катаболизма глюкозы в опухолевых клетках присутствуют в виде форм, характерных для плода, а не для взрослого организма.
4. *Различная реакция изоферментов на действие аллостерических модуляторов.* Это различие весьма полезно при тонкой регуляции скоростей метаболизма. Гексокиназа IV печени (глюкокиназа) и изоформы гексокиназы в других тканях различаются по чувствительности к ингибирующему действию глюкозо-6-фосфата.

из крови (где ее концентрация составляет 4–5 мМ) в миоциты создается довольно высокая внутриклеточная концентрация глюкозы, достаточная для насыщения гексокиназы II, этот фермент обычно действует практически с максимальной скоростью. **Гексокиназы I** и II из мышц подвержены аллостерическому ингибированию продуктом катализируемых ими реакций глюкозо-6-фосфатом. Как только концентрация глюкозо-6-фосфата превышает нормальный уровень, эти изоферменты подвергаются временному обратимому ингибированию, в результате чего скорость образования глюкозо-6-фосфата уравновешивается скоростью его утилизации, и восстанавливается стационарное состояние.

Различие между гексокиназами печени и мышц отражает разные функции этих органов в метаболизме углеводов: мышцы потребляют глюкозу, используя ее для получения энергии, в то время как печень поддерживает гомеостаз глюкозы в крови путем удаления или синтеза глюкозы в зависимости от ее текущей концентрации. В печени преобладает **гексокиназа IV** (глюкокиназа), которая отличается от мышечных гексокиназ I–III по трем основным параметрам. Во-первых, полунасыщение гексокиназы IV происходит при более высокой концентрации глюкозы (~10 мМ), чем обычно содержится в крови. Поскольку эффективный переносчик глюкозы в гепатоцитах **GLUT2** (на рис. 11-30 показана кинетика переносчика GLUT2 в эритроцитах) способствует быстрому установлению равновесия между концентрацией глюкозы в цитозоле и в крови, высокое значение K_M для гексокиназы IV позволяет осуществлять ее регуляцию непосредственно через концентрацию глюкозы в крови (рис. 15-12). При высокой концентрации глюкозы в крови после употребления богатой углеводами пищи избыточная глюкоза переносится в гепатоциты, где гексокиназа IV превращает ее в глюкозо-6-фосфат. Поскольку при содержании глюкозы 10 мМ гексокиназа IV не насыщается, ее активность повышается по мере увеличения концентрации глюкозы до 10 мМ и более. При низкой концентрации глюкозы в крови концентрация глюкозы в гепатоцитах ниже K_M для гексокиназы IV, так что образующаяся в ходе глюконеогенеза глюкоза выходит из клетки до того, как подвергается фосфорилированию.

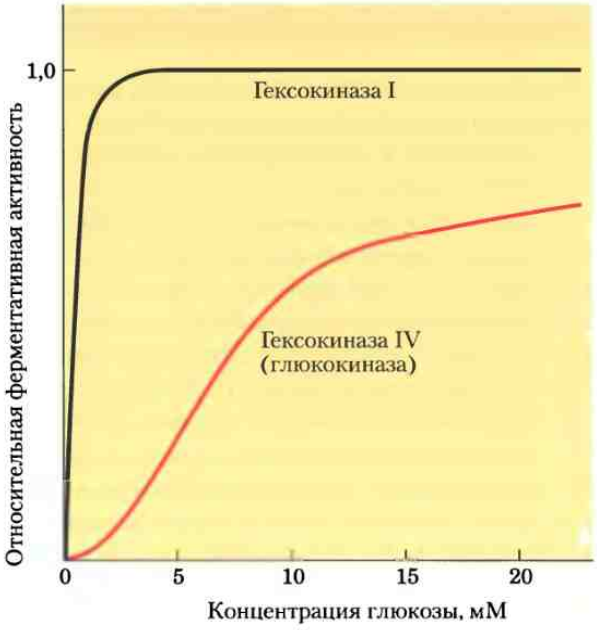


Рис. 15-12. Сравнение кинетических свойств гексокиназы IV (глюкокиназы) и гексокиназы I. Обратите внимание на S-образную зависимость в случае гексокиназы IV и значительно более низкую величину $K_м$ в случае гексокиназы I. Когда концентрация глюкозы в крови превышает 5 мМ, активность гексокиназы IV повышается, однако гексокиназа I уже действует со скоростью, близкой к V_{max}, и не может реагировать на повышение концентрации глюкозы. Гексокиназы I, II и III имеют сходные кинетические свойства.

Во-вторых, гексокиназа IV не ингибируется глюкозо-6-фосфатом и продолжает работать, даже когда накопление глюкозо-6-фосфата полностью ингибирует гексокиназы I–III. Наконец, гексокиназа IV подвержена ингибированию специфическим белком печени путем обратимого связывания (**рис. 15-13**). Более прочное связывание происходит в присутствии аллостерического модулятора фруктозо-6-фосфата. Глюкоза конкурирует за связывание с фруктозо-6-фосфатом и вызывает диссоциацию регуляторного белка из комплекса с гексокиназой IV, снимая ингибирование. Вскоре после употребления богатой углеводами пищи, когда концентрация глюкозы в крови высокая, глюкоза проникает в гепатоциты при помощи GLUT2 и активирует гексокиназу IV по описанному механизму. При голодании, когда концентрация глюкозы понижается до 5 мМ и менее, фруктозо-6-фосфат вызывает ингибирование гексокиназы IV с помощью регуляторного белка, так что печень не конкурирует за глюкозу с другими органами. Интересен механизм ингибирования под действием регуляторного белка: этот белок, локализованный в ядре, связывает гексокиназу IV, благодаря чему она оказывается отделенной от других ферментов гликолиза, находящихся в цитозоле (рис. 15-13). При повышении концентрации глюкозы в клетке этот фермент начинает проникать из цитозоля в ядро до тех пор, пока не устанавливается равновесие. Глюкоза вызывает диссоциацию регуляторного белка из комплекса, гексокиназа IV вновь переходит в цитозоль и начинает фосфорилировать глюкозу.

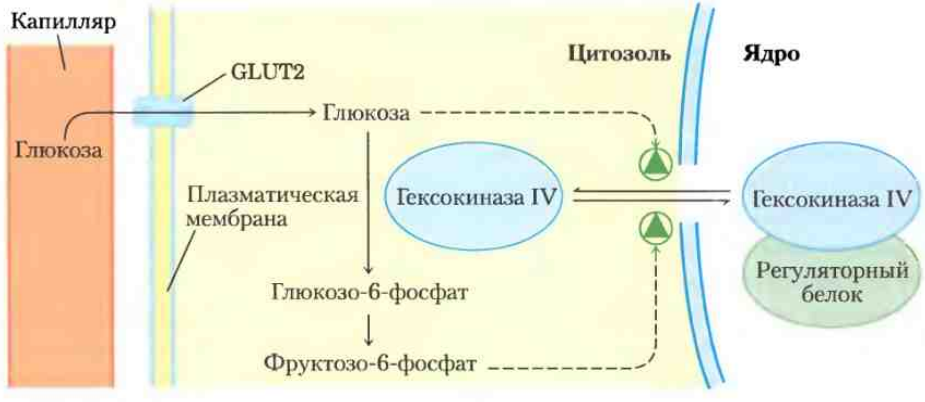


Рис. 15-13. Регуляция гексокиназы IV (глюкокиназы) путем обособления в ядре. Белковый ингибитор гексокиназы IV локализован в ядре; он впускает гексокиназу IV в ядро при высокой концентрации фруктозо-6-фосфата в печени и высвобождает обратно в цитозоль при высокой концентрации глюкозы.

Регуляция гексокиназы IV (глюкокиназы) и глюкозо-6-фосфатазы осуществляется на уровне транскрипции

Регуляция гексокиназы IV осуществляется также на уровне синтеза белка. В тех условиях, когда требуется дополнительная энергия (низкая концентрация ATP, высокая концентрация AMP, активная мышечная деятельность) или происходит активное потребление глюкозы (например, при высокой концентрации глюкозы в крови), активизируется транскрипция гена гексокиназы IV. Регуляция фермента глюконеогенеза глюкозо-6-фосфатазы с обходом гексокиназной стадии гликолиза осуществляется на уровне транскрипции под действием факторов, стимулирующих образование глюкозы (низкий уровень глюкозы в крови, сигнал глюкагона). Регуляция этих двух ферментов (а также других ферментов гликолиза и глюконеогенеза) на уровне транскрипции обсуждается ниже.

Фосфофруктокиназа-1 и фруктозо-1,6-бисфосфотаза взаимно регулируются

Как мы уже говорили, глюкозо-6-фосфат может вступать на путь гликолиза или участвовать в других метаболических превращениях, в том числе в синтезе гликогена и пентозофосфатном пути. Необратимая в условиях клетки реакция, катализируемая PFK-1, — это первая стадия превращения глюкозы на пути гликолиза. Кроме участка связывания субстрата данный сложный фермент имеет несколько регуляторных участков, в которых связываются аллостерические активаторы или ингибиторы.

ATP — это не только субстрат для PFK-1, но и конечный продукт гликолиза. Высокая концентрация ATP в клетке означает, что скорость его образования превышает скорость расходования; в подобной ситуации ATP начинает ингибировать PFK-1, связываясь в регуляторном участке и снижая тем самым сродство фермента к фруктозо-6-фосфату (**рис. 15-14**). Аллостерическое действие

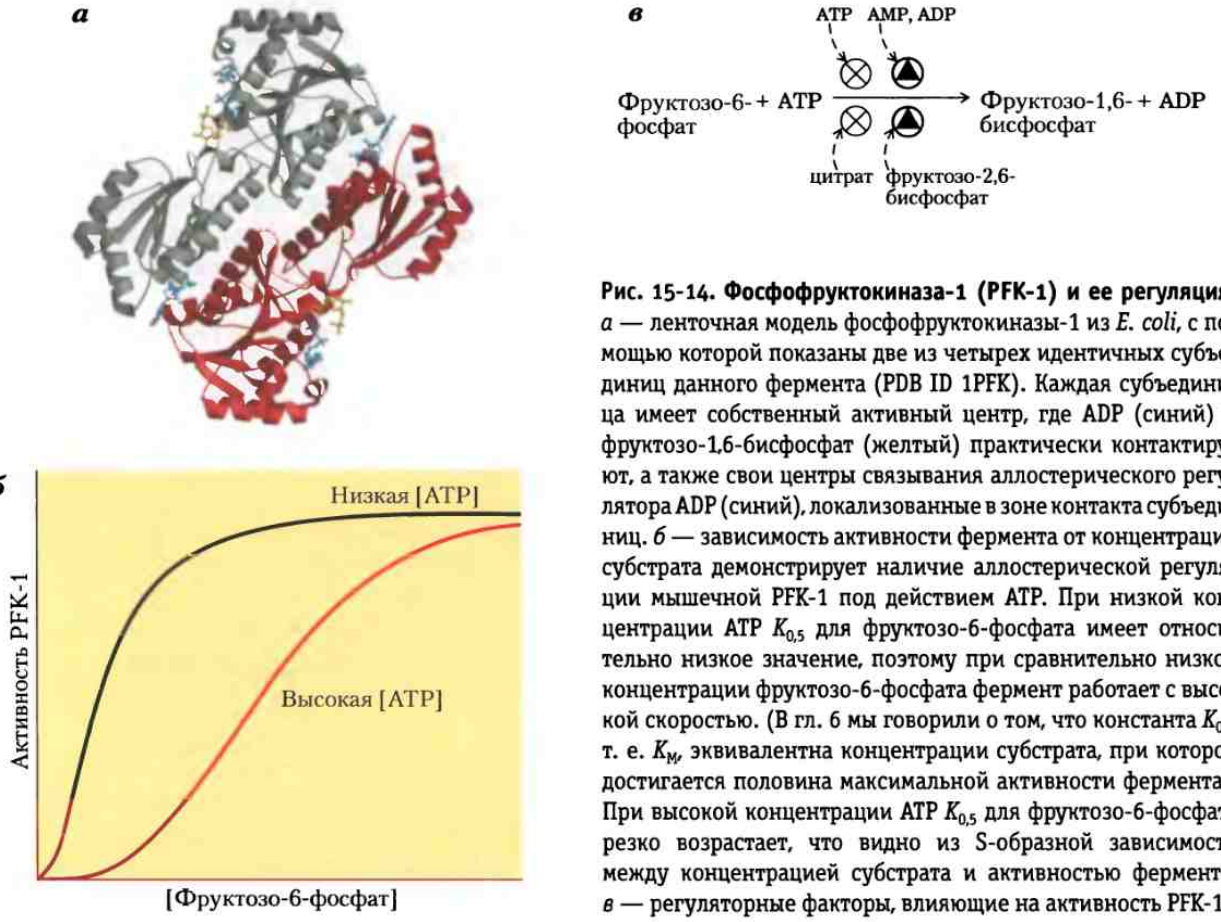


Рис. 15-14. Фосфофруктокиназа-1 (PFK-1) и ее регуляция. *а* — ленточная модель фосфофруктокиназы-1 из *E. coli*, с помощью которой показаны две из четырех идентичных субъединиц данного фермента (PDB ID 1PFK). Каждая субъединица имеет собственный активный центр, где ADP (синий) и фруктозо-1,6-бисфосфат (желтый) практически контактируют, а также свои центры связывания аллостерического регулятора ADP (синий), локализованные в зоне контакта субъединиц. *б* — зависимость активности фермента от концентрации субстрата демонстрирует наличие аллостерической регуляции мышечной PFK-1 под действием ATP. При низкой концентрации ATP $K_{0,5}$ для фруктозо-6-фосфата имеет относительно низкое значение, поэтому при сравнительно низкой концентрации фруктозо-6-фосфата фермент работает с высокой скоростью. (В гл. 6 мы говорили о том, что константа $K_{0,5}$, т. е. K_M, эквивалентна концентрации субстрата, при которой достигается половина максимальной активности фермента.) При высокой концентрации ATP $K_{0,5}$ для фруктозо-6-фосфата резко возрастает, что видно из S-образной зависимости между концентрацией субстрата и активностью фермента. *в* — регуляторные факторы, влияющие на активность PFK-1.

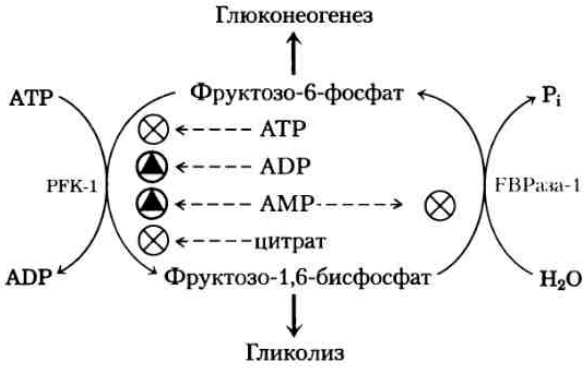


Рис. 15-15. Регуляция фруктозо-1,6-бисфосфатазы-1 (FBPазы-1) и фосфофруктокиназы-1 (PFK-1). Важная роль фруктозо-2,6-бисфосфата в регуляции этого субстратного цикла более подробно отражена далее на рисунках.

ADP и AMP, концентрации которых возрастают в тех случаях, когда расход ATP опережает его синтез, снимает ингибирование фермента под действием ATP. Сочетание этих эффектов позволяет достигать наибольшей активности фермента при накоплении ADP и AMP и снижать активность при накоплении ATP.

Цитрат (ионизованная форма лимонной кислоты) — ключевой интермедиат анаэробного окисления пирувата, жирных кислот и аминокислот; кроме того, он служит аллостерическим регулятором PFK-1. Высокая концентрация цитрата усиливает ингибирующее действие ATP, еще больше снижая интенсивность гликолиза. В данном случае, как и в некоторых других, которые мы обсудим позднее, цитрат служит внутриклеточным сигналом того, что клетка получает необходимое количество энергии путем окисления жиров и белков.

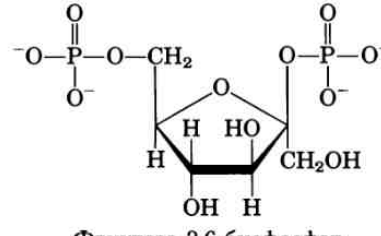
В процессе глюконеогенеза соответствующая стадия — превращение фруктозо-1,6-бисфосфата в фруктозо-6-фосфат **(рис. 15-15)**. Катализирующий эту реакцию фермент FBPаза-1 подвергается сильному ингибирующему действию со стороны AMP (аллостерическое ингибирование); при низком содержании ATP в клетке (что соответствует высокой концентрации AMP) замедляется синтез глюкозы, сопряженный с затратами ATP.

Таким образом, действующие в противоположном направлении ферменты гликолиза и глюконеогенеза (PFK-1 и FBPаза-1) взаимно регулируются. Обычно при наличии достаточной концентрации ацетил-CoA или цитрата (образующегося при конденсации ацетил-CoA с оксалоацетатом) или тогда, когда значительная доля клеточного аденилата присутствует в форме ATP, преимущество получает процесс глюконеогенеза. При повышении уровня AMP происходит стимуляция PFK-1 и активация гликолиза (кроме того, как мы увидим в разд. 15.5, происходит стимуляция расщепления гликогена благодаря активации гликогенфосфорилазы).

Фруктозо-2,6-бисфосфат — мощный регулятор гликолиза и глюконеогенеза

Особая роль печени в поддержании постоянного уровня глюкозы крови требует наличия дополнительных регуляторных механизмов, управляющих синтезом и потреблением глюкозы. При снижении уровня глюкозы крови гормон **глюкагон** дает печени сигнал увеличить синтез и выделение глюкозы и прекратить использование ее для собственных нужд. Одним источником глюкозы служит запасенный в печени гликоген, другим — глюконеогенез, использующий в качестве исходного материала пируват, лактат, глицерин или некоторые аминокислоты. Когда концентрация глюкозы крови высокая, инсулин дает сигнал печени использовать глюкозу как топливо и как реагент для синтеза и запасания гликогена и триацилглицеринов.

Гормональная регуляция гликолиза и глюконеогенеза осуществляется при участии **фруктозо-2,6-бисфосфата**, который выступает в роли аллостерического эффектора ферментов PFK-1 и FBPазы-1:



Фруктозо-2,6-бисфосфат

При связывании фруктозо-2,6-бисфосфата с участком аллостерической регуляции на молекуле PFK-1 происходит повышение сродства фермента к субстрату фруктозо-6-фосфату и сни-

жение сродства к аллостерическим ингибиторам ATP и цитрату (**рис. 15-16**). При физиологических концентрациях субстратов (ATP и фруктозо-6-фосфата), а также других активаторов и ингибиторов (ATP, AMP, цитрата) в отсутствие фруктозо-2,6-бисфосфата фермент PFK-1 практически не проявляет активности. Фруктозо-2,6-бисфосфат активирует PFK-1 и стимулирует гликолиз в печени, а также ингибирует FBPазу-1, т. е. уменьшает ее аффинность к субстрату (рис. 15-16, *в*), ослабляя тем самым глюконеогенез.

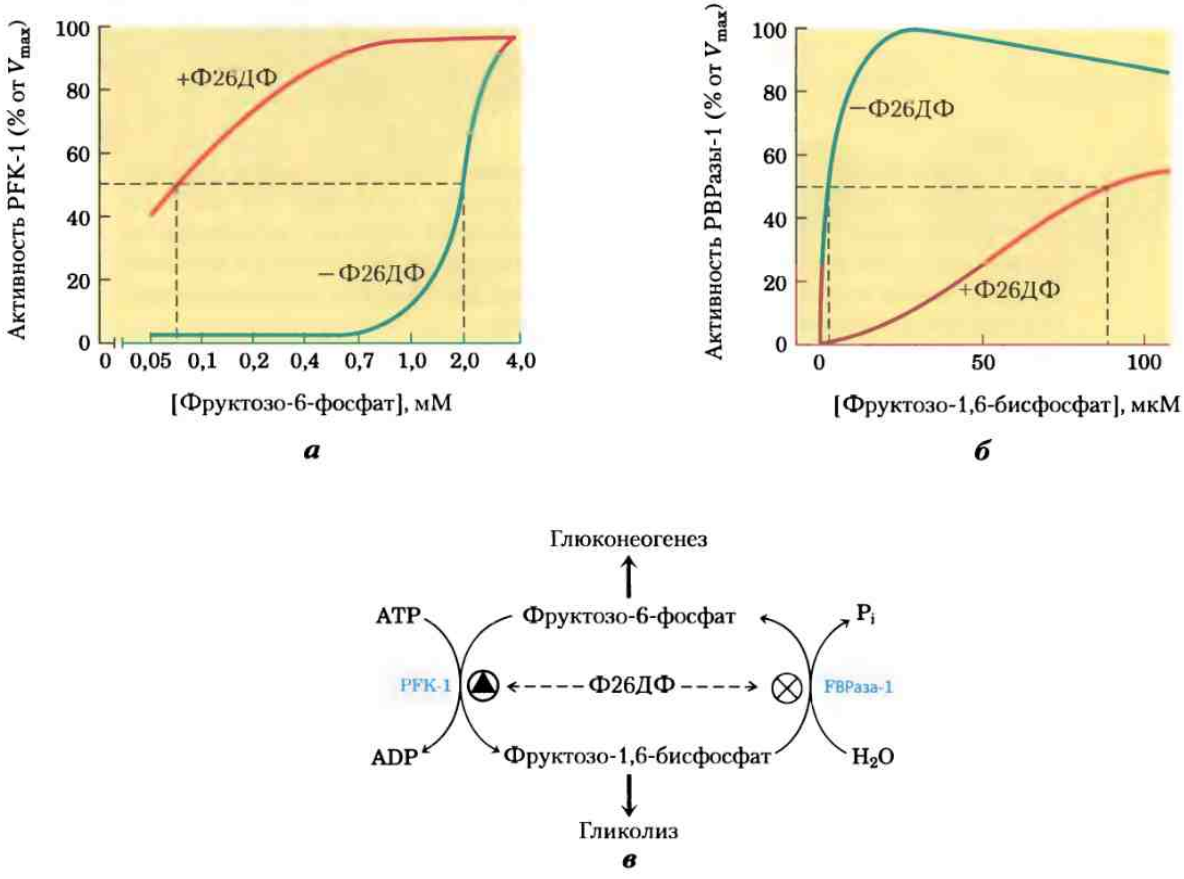


Рис. 15-16. Роль фруктозо-2,6-бисфосфата в регуляции гликолиза и глюконеогенеза. Фруктозо-2,6-бисфосфат (Ф26БФ) оказывает противоположное действие на активность гликолитического фермента фосфофруктокиназы-1 (PFK-1) и фермента глюконеогенеза фруктозо-1,6-дифосфатазы (FBPазы-1). *а* — без Ф26БФ (синяя кривая) активность PFK-1 достигает половины максимальной активности при концентрации фруктозо-6-фосфата 2 мМ (т. е. $K_{0,5}$ = 2 мМ). В присутствии 0,13 мкМ Ф26БФ (красная кривая) $K_{0,5}$ для фруктозо-6-фосфата составляет лишь 0,08 мМ. Таким образом, Ф26БФ активирует PFK-1 путем повышения ее сродства к субстрату (рис. 15-18). *б* — активность FBPазы-1 ингибируется уже в присутствии 1 мкМ Ф26ДФ, а значительное ингибирование наблюдается при концентрации 25 мкМ. В отсутствие ингибитора (синяя кривая) для фруктозо-1,6-бисфосфата $K_{0,5}$ составляет 5 мМ, но в присутствии 25 мкМ Ф26ДФ (красная кривая) $K_{0,5}$ > 70 мМ. Фруктозо-2,6-бисфосфат, кроме того, повышает чувствительность FBPазы-1 к действию другого аллостерического ингибитора — AMP. *в* — суммарное влияние фруктозо-2,6-бисфосфата.

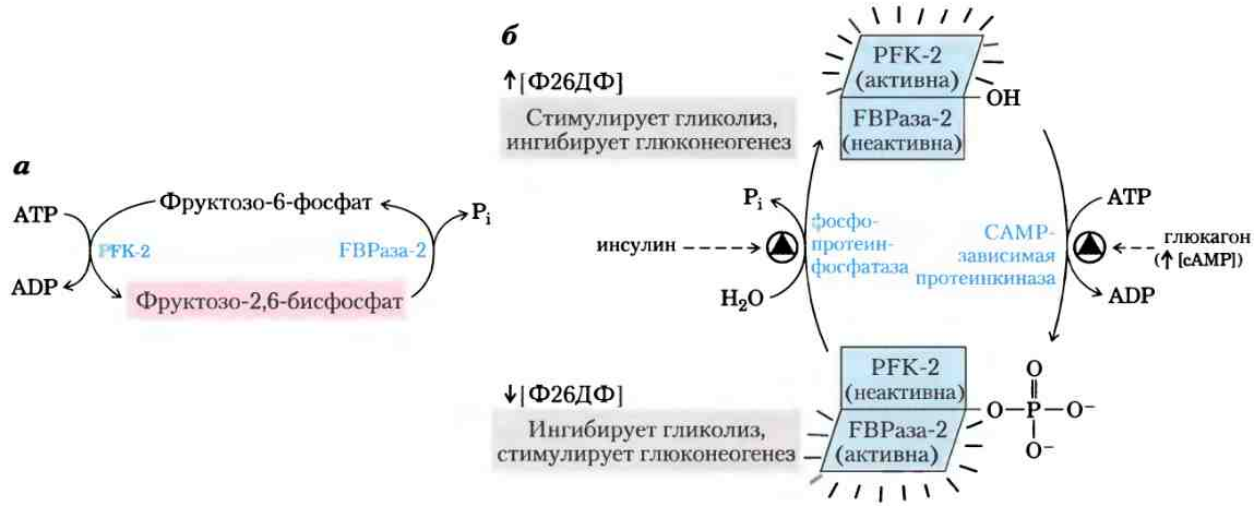


Рис. 15-17. Регуляция уровня фруктозо-2,6-бисфосфата. *а* — концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата (Ф26БФ) в клетке определяется скоростью его синтеза под действием фосфофруктокиназы-2 (PFK-2) и распада под действием фруктозо-2,6-бисфосфатазы (FBPазы-2). *б* — обе ферментативные активности принадлежат одному белку и подвержены согласованной регуляции инсулином и глюкагоном. Здесь и далее стрелками обозначено повышение (↑) и понижение (↓) уровня метаболита.

Концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке определяется отношением скоростей его синтеза и распада (**рис. 15-17, *а***); синтез происходит путем фосфорилирования фруктозо-6-фосфата, катализируемого **фосфофруктокиназой-2 (PFK-2)**, а распад — под действием **фруктозо-2,6-бисфосфатазы (FBPазы-2)**. Обратите внимание, что эти ферменты отличны от PFK-1 и FBPазы-1, которые катализируют синтез и распад фруктозо-1,6-бисфосфата. Активностью PFK-2 и FBPазы-2 обладает один и тот же бифункциональный белок. Соотношение между этими двумя активностями в печени, определяющее уровень фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке, регулируется глюкагоном и инсулином (см. рис. 15-23, *б*).

Как мы уже говорили в гл. 12, глюкагон стимулирует аденилатциклазу печени к синтезу 3′,5′-циклического AMP (cAMP) из ATP. Затем cAMP активирует cAMP-зависимую протеинкиназу, которая переносит фосфорильную группу от ATP на бифункциональный белок PFK-2/FBPазу-2. Фосфорилирование этого белка усиливает активность FBPазы-2 и ингибирует активность PFK-2. Таким образом, глюкагон снижает уровень фруктозо-2,6-бисфосфата в клетке, ингибирует гликолиз и стимулирует глюконеогенез. Увеличение синтеза глюкозы помогает поднять уровень глюкозы в крови в ответ на сигнал глюкагона. Инсулин оказывает противоположное действие, стимулируя активность фосфопротеинфосфатазы, которая катализирует удаление фосфорильной группы от бифункционального белка с активностью PFK-2/FBPазы-2, что повышает активность PFK-2, поднимает уровень фруктозо-2,6-бисфосфата, стимулирует гликолиз и ингибирует глюконеогенез.

Ксилулозо-5-фосфат — ключевой регулятор метаболизма углеводов и жиров

Еще один механизм регуляции также основан на контроле уровня фруктозо-2,6-бисфосфата. В печени млекопитающих продукт гексозомонофосфатного пути ксилулозо-5-фосфат (с. 109) способствует усилению гликолиза после приема богатой углеводами пищи. Концентрация ксилулозо-5-фосфата возрастает при превращении глюкозы, поступающей в печень, в глюкозо-6-фосфат и его вступлении на гликолитический или гексозомонофосфатный путь. Ксилулозо-5-фосфат активирует фосфопротеинфосфатазу PP2A (**рис. 15-18**), которая дефосфорилирует бифункциональный фермент с активностью PFK-2/FBPазы-2 (рис. 15-17).

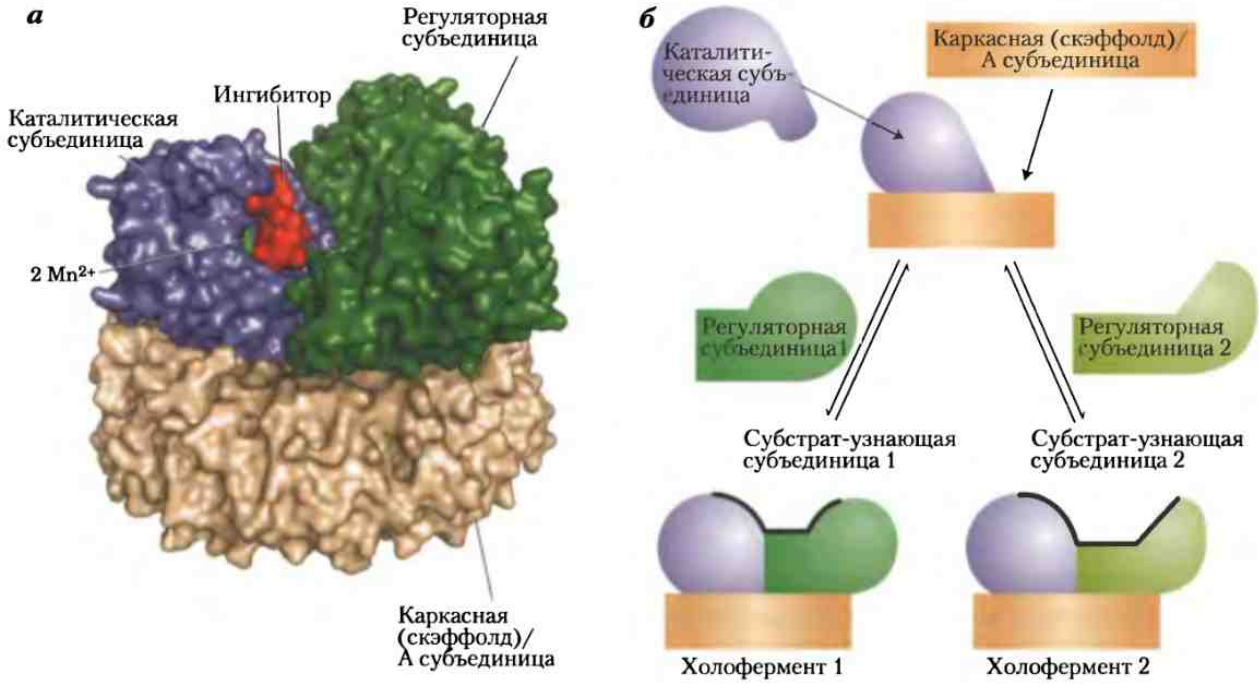


Рис. 15-18. Структура и механизм действия фосфопротеинфосфатазы 2А (PP2A). *а* — в активном центре каталитической субъединицы белка содержатся два иона Mn^{2+}; активный центр расположен вблизи участка узнавания субстрата, находящегося на границе каталитической и регуляторной субъединиц (PDB ID 2NPP). Микроцистин-LR (изображен красным цветом) — специфический ингибитор фермента. Каталитическая и регуляторная субъединицы соединены с каркасной (скэффолд-) субъединицей, которая позволяет им располагаться необходимым образом относительно друг друга и формировать участок узнавания субстрата. *б* — способность распознавать различные белки определяется вариабельной регуляторной субъединицей PP2A. Каждая регуляторная субъединица совместима с каркасной (скэффолд-) субъединицей и связанной на ней каталитической субъединицей, при этом каждая регуляторная субъединица создает свой уникальный субстратсвязывающий участок.

Дефосфорилирование активирует PFK-2 и ингибирует FBPазу-2; увеличение в результате этого концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата стимулирует гликолиз и ингибирует глюконеогенез. Усиление гликолиза способствует образованию ацетил-CoA, а увеличение потока гексозы по гексозомонофосфатному пути приводит к выработке NADPH. Ацетил-CoA и NADPH — исходные вещества для синтеза жирных кислот, концентрация которых, как известно, сильно повышается после употребления пищи с высоким содержанием углеводов. Ксилулозо-5-фосфат, кроме того, способствует синтезу *всех* ферментов, необходимых для образования жирных кислот; к этому механизму мы вернемся при обсуждении связи метаболизма углеводов и липидов (гл. 23).

Гликолитический фермент пируваткиназа подвержен аллостерическому ингибированию со стороны ATP

У позвоночных существуют как минимум три изоформы пируваткиназы, различающиеся тканевой локализацией и реакцией на действие модуляторов. Высокие концентрации ATP, ацетил-CoA и длинноцепочечных жирных кислот (что свидетельствует о достаточных энергетических запасах) ингибируют все изоферменты пируваткиназы (**рис. 15-19**). Изофермент из печени (L-форма), в отличие от M-формы из мышц, кроме того, регулируется фосфорилированием. Когда низкая концентрация глюкозы в крови приводит к появлению глюкагона, cAMP-зависимая протеин-

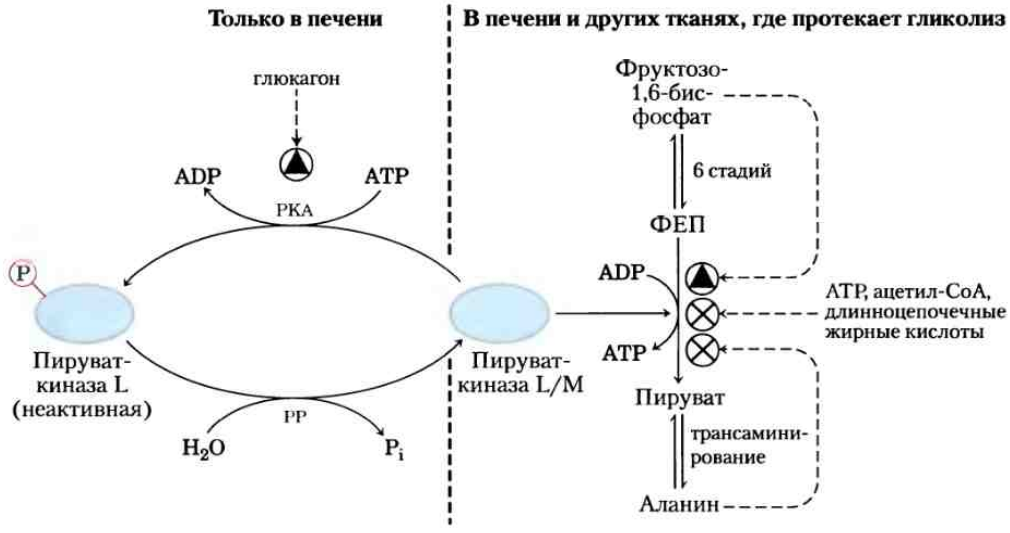


Рис. 15-19. Регуляция пируваткиназы. Аллостерическими ингибиторами фермента являются ATP, ацетил-CoA и длинноцепочечные жирные кислоты (их наличие указывает на избыток энергии в клетке), а накопление фруктозо-1,6-бисфосфата способствует активации фермента. Аланин, который может синтезироваться из пирувата в одну стадию, выступает аллостерическим ингибитором пируваткиназы и замедляет образование пирувата в процессе гликолиза. Изофермент из печени (L-форма), кроме того, подвергается гормональной регуляции; глюкагон активирует cAMP-зависимую протеинкиназу (PKA; см. рис. 15-35), которая фосфорилирует L-форму пируваткиназы, инактивируя ее. При снижении уровня глюкагона протеинфосфатаза (PP) дефосфорилирует пируваткиназу, активируя ее. Этот механизм противодействует расходованию глюкозы в печени в процессе гликолиза при низкой концентрации глюкозы в крови; вместо этого глюкоза из печени попадает в кровь. Мышечная форма фермента (M-форма) не подвержена регуляции фосфорилированием.

киназа фосфорилирует L-форму пируваткиназы, тем самым инактивируя ее. Это тормозит расходование глюкозы в качестве топливной молекулы в печени, сохраняя ее для головного мозга и других органов. Повышение концентрации cAMP в мышцах оказывает совсем другое действие. В ответ на сигнал адреналина cAMP активирует распад гликогена и гликолиз, обеспечивая энергию, необходимую для реакции «борьбы или бегства».

Превращение пирувата в фосфоенолпируват в процессе гликолиза регулируется несколькими способами

На пути превращения пирувата в глюкозу первый «контрольный пункт» определяет судьбу пирувата в митохондриях. Пируват может превратиться либо в ацетил-CoA (с помощью пируватдегидрогеназного комплекса; гл. 16) для использования в качестве источника энергии в цикле лимонной кислоты, либо в оксалоацетат (с помощью пируваткарбоксилазы) для запуска глюконеогенеза (**рис. 15-20**). В тех случаях, когда жирные кислоты легко доступны и могут использоваться в качестве источника энергии, их распад в митохондриях клеток печени приводит к образованию ацетил-CoA, что говорит об отсутствии необходимости окисления глюкозы с целью получения энергии. Ацетил-CoA служит аллостерическим активатором пируваткарбоксилазы и ингибитором пируватдегидрогеназы, поскольку стимулирует протеинкиназу, ингибирующую активность дегидрогеназы. В тех случаях, когда у клетки возникает необходимость в дополнительной энергии, окислительное фосфорилирование замедляется, концентрация NADH начинает превышать концентрацию NAD^+, что ингибирует цикл лимонной кислоты, и накапливается ацетил-CoA. Увеличение концентрации ацетил-CoA ингибирует пируватдегидрогеназный комплекс, снижая скорость

превращения пирувата в ацетил-CoA, и стимулирует глюконеогенез путем активации пируваткарбоксилазы, способствуя превращению избытка пирувата в оксалоацетат (а в итоге — в глюкозу).

Образующийся оксалоацетат превращается в фосфоенолпируват (ФЕП) в реакции, катализируемой ФЕП-карбоксикиназой (рис. 15-11). У млекопитающих регуляция этого важного фермента осуществляется главным образом на уровне его синтеза и распада в ответ на пищевые и гормональные сигналы. Голодание или высокая концентрация глюкагона, действуя через cAMP, повышают скорость транскрипции и стабилизируют мРНК фермента. Инсулин или высокий уровень глюкозы в крови оказывают противоположное действие. Ниже мы более подробно рассмотрим данный механизм. Эти изменения обычно запускаются внешними сигналами (пища, гормоны) и происходят во временном интервале от нескольких минут до нескольких часов.

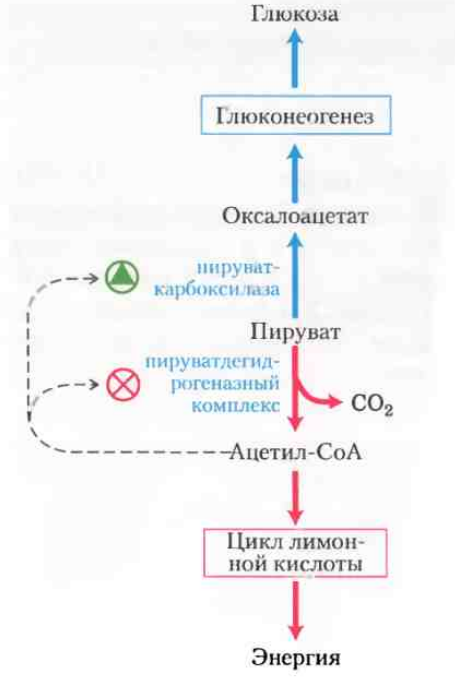


Рис. 15-20. Два возможных пути превращения пирувата. Пируват может превратиться в глюкозу и гликоген в процессе глюконеогенеза или окислиться до ацетил-CoA для получения энергии. Первый фермент на каждом из этих путей подвержен аллостерической регуляции; ацетил-CoA, образующийся в результате окисления жирных кислот или под действием пируватдегидрогеназного комплекса, стимулирует пируваткарбоксилазу и ингибирует пируватдегидрогеназу.

Регуляция гликолиза и глюконеогенеза на уровне транскрипции изменяет количество фермента (число его молекул)

Большинство процессов регуляции, которые обсуждались до сих пор, осуществляются с помощью быстрых и легко обратимых механизмов: аллостерическое действие, ковалентная модификация фермента (фосфорилирование) или связывание регуляторного белка. Еще одна группа процессов регуляции основана на изменении количества фермента в клетке путем сдвига равновесия между синтезом и распадом его молекул. Далее мы рассмотрим регуляцию транскрипции при участии активируемых сигналом транскрипционных факторов.

В гл. 12 мы говорили о ядерных рецепторах и факторах транскрипции в связи с передачей сигнала инсулина. Инсулин действует через свой рецептор в плазматической мембране, включая как минимум два разных сигнальных пути, каждый сопряжен с активацией протеинкиназы. Например, митоген-активированная киназа ERK фосфорилирует факторы транскрипции SRF и Elk1 (см. рис. 12-15), которые затем стимулируют синтез ферментов, необходимых для роста и деления клеток. Протеинкиназа B (также известная как Akt) фосфорилирует другой набор транскрипционных факторов (например, PDX1), что стимулирует синтез ферментов, ответственных за метаболизм углеводов и жиров, которые образуются и запасаются в организме при избыточном потреблении углеводов. В β-клетках поджелудочной железы PDX1 также стимулирует синтез инсулина.

На уровне транскрипции инсулин осуществляет регуляцию более 150 генов; у человека существует не менее семи основных типов инсулинреспонсивных элементов, каждый узнается группой факторов транскрипции, активируемых инсулином в различных условиях. Инсулин стимулирует транскрипцию генов, кодирующих гексокиназы II и IV, PFK-1, пируваткиназу и PFK-2/FBPазу-2 (все эти ферменты участвуют в гликолизе и его регуляции), некоторые ферменты синтеза жирных кислот, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, а также ферменты пентозофосфатного пути, генерирующего NADPH для синтеза жирных кислот. Кроме того, инсулин замедляет экспрессию генов двух фер-

Таблица 15-5 Некоторые гены, которые регулируются инсулином

Изменение генной экспрессии	Метаболический путь
Увеличение экспрессии	
Гексокиназа II	Гликолиз
Гексокиназа IV	Гликолиз
Фосфофруктокиназа-1 (PFK-1)	Гликолиз
Пируваткиназа	Гликолиз
PFK-2/FBPаза-2	Регуляция гликолиза / глюконеогенез
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	Пентозофосфатный путь (NADPH)
6-Фосфоглюконатдегидрогеназа	Пентозофосфатный путь (NADPH)
Пируватдегидрогеназа	Синтез жирных кислот
Ацетил-CoA-карбоксилаза	Синтез жирных кислот
Малат-фермент	Синтез жирных кислот (NADPH)
ATP-цитратлиаза	Синтез жирных кислот (предоставляет ацетил-CoA)
Комплекс синтазы жирных кислот	Синтез жирных кислот
Стеароил-CoA-дегидрогеназа	Десатурация жирных кислот
Ацил-CoA-глицеринтрансфераза	Синтез триацилглицеринов
Уменьшение экспрессии	
ФЕП-карбоксикиназа	Глюконеогенез
Глюкозо-6-фосфатаза (каталитическая субъединица)	Высвобождение глюкозы в кровь

ментов глюконеогенеза — ФЕП-карбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы (табл. 15-5).

Важную роль в метаболизме углеводов играет фактор транскрипции **ChREBP** (*carbohydrate response element binding protein*; **рис. 15-21**), экспрессирующийся в основном в печени, жировой ткани и почках. Он служит для координации синтеза ферментов, необходимых для образования углеводов и жиров. В неактивном состоянии

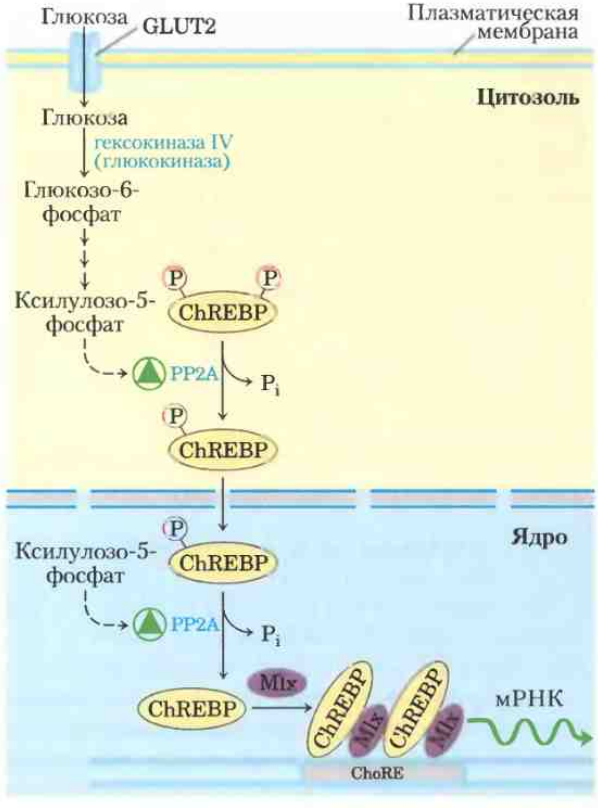


Рис. 15-21. Механизм регуляции генов под действием фактора транскрипции ChREBP. Находящийся в цитозоле гепатоцитов белок ChREBP фосфорилирован по остаткам Ser и Thr и не может проникать в ядро. Удаление фосфорильной группы остатка серина под действием фосфопротеинфосфатазы-2A позволяет белку войти в ядро, где происходит удаление фосфорильной группы остатка треонина. Активированный таким образом ChREBP связывается с белком-партнером Mlx. Далее комплекс ChREBP-Mlx связывается с углеводчувствительным элементом ChoRE в промоторе и стимулирует транскрипцию. Аллостерическую активацию PP2A осуществляет ксилулозо-5-фосфат, образующийся в качестве интермедиата пентозофосфатного пути.

белок ChREBP фосфорилирован и локализован в цитозоле. После того как фосфопротеинфосфатаза 2A (PP2A; рис. 15-18) отщепляет от него фосфорильную группу, фактор транскрипции становится способным проникать в ядро. Здесь ядерная PP2A удаляет следующую фосфорильную группу, и ChREBP связывается с белком Mlx. Этот комплекс запускает синтез нескольких ферментов: пируваткиназы, синтазы жирных кислот, а также ацетил-CoA-карбоксилазы — первого фермента на пути синтеза жирных кислот (рис. 15-21).

Контроль активности PP2A (и, следовательно, регуляцию синтеза группы метаболических ферментов) осуществляет ксилулозо-5-фосфат — интермедиат не гликолиза или глюконеогенеза, а пентозофосфатного пути. При высокой концентрации в крови глюкоза поступает в печень и фосфорилируется под действием гексокиназы IV. Образующийся при этом глюкозо-6-фосфат может использоваться в гликолизе или в пентозофосфатном пути. В последнем случае в результате двух окислительных реакций сначала образуется ксилулозо-5-фосфат, появление которого свидетельствует о том, что использующие глюкозу пути в достаточной степени обеспечены субстратом. Передача сигнала осуществляется путем аллостерической активации PP2A, которая затем дефосфорилирует ChREBP, позволяя ему включить экспрессию генов ферментов гликолиза и синтеза жиров (рис. 15-21). В результате гликолиза получается пируват, а образующийся из пирувата ацетил-CoA служит исходным материалом для синтеза жирных кислот; ацетил-CoA-карбоксилаза превращает ацетил-CoA в малонил-CoA — первый специфический интермедиат на пути синтеза жирных кислот. Синтаза жирных кислот образует жирные кислоты для жировой ткани и для запасания в виде триацилглицеринов (гл. 21). Таким образом, избыток углеводов из пищи запасается в виде жира.

Другой фактор транскрипции в печени **SREBP-1c** (***s**terol **r**esponse **e**lement **b**inding **p**roteins*; см. рис. 21-43) включает синтез пируваткиназы, гексокиназы IV, липопротеинлипазы, ацетил-CoA-карбоксилазы, а также комплекса синтазы жирных кислот, превращающего ацетил-CoA (образуется из пирувата) в жирные кислоты для запасания в адипоцитах. Инсулин стимулирует синтез SREBP-1c, а глюкагон его подавляет. Кроме того, SREBP-1c подавляет экспрессию некоторых ферментов глюконеогенеза: глюкозо-6-фосфатазы, ФЕП-карбоксикиназы и FBPазы-1.

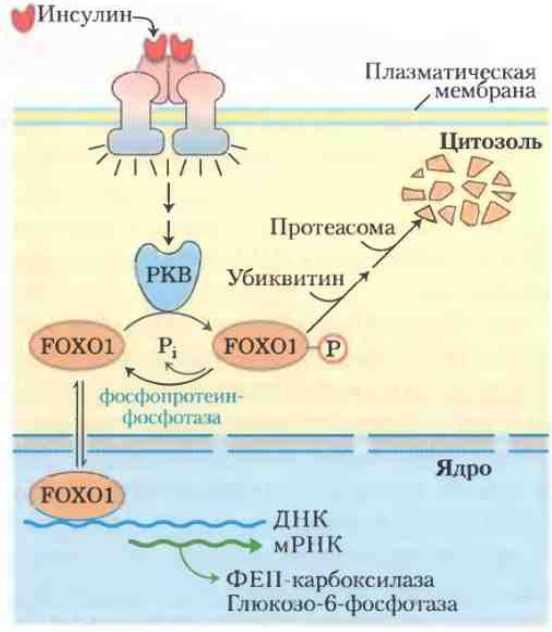
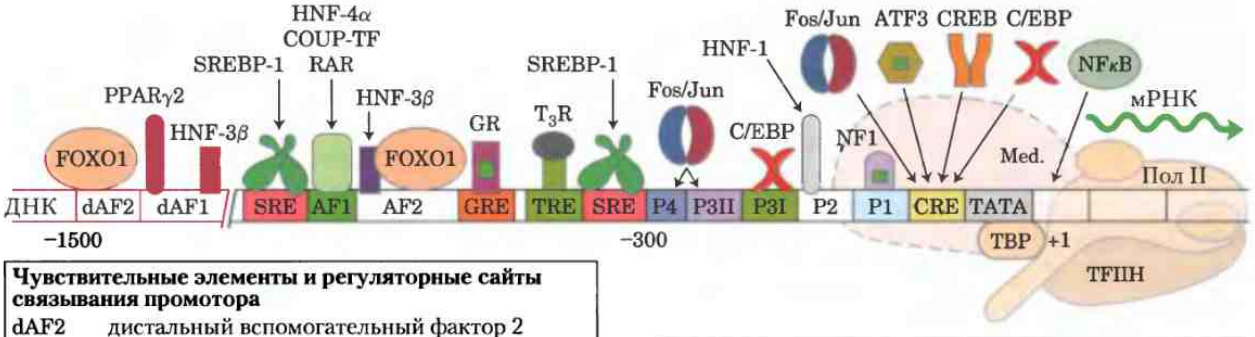


Рис. 15-22. Механизм регуляции экспрессии генов при участии фактора транскрипции FOXO1. Инсулин запускает изображенный на рис. 12-16 сигнальный каскад, активируя при этом протеинкиназу B. Находящийся в цитозоле фактор транскрипции FOXO1 фосфорилируется протеинкиназой B и связывается с убиквитином для последующего распада в протеасоме. Оставшийся нефосфорилированным или дефосфорилированный фактор FOXO1 может проникать в ядро, связываться с респонсивным элементом и запускать транскрипцию соответствующих генов. Таким образом, инсулин обладает способностью выключать экспрессию генов ферментов, таких как ФЕП-карбоксикиназа и глюкозо-6-фосфатаза.

Фактор транскрипции **CREB** (***c**yclic AMP **r**esponse **e**lement **b**inding **p**rotein*) включает синтез глюкозо-6-фосфатазы и ФЕП-карбоксикиназы в ответ на повышение концентрации cAMP, вызванное глюкагоном. Напротив, стимулированная инсулином инактивация других факторов транскрипции выключает синтез нескольких ферментов глюконеогенеза в печени: ФЕП-карбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, переносчика глюкозо-6-фосфата в эндоплазматическом ретикулуме, а также глюкозо-6-фосфатазы. Например, **FOXO1** (***f**orkhead **b**ox **o**ther*) стимулирует синтез ферментов глюконеогенеза и подавляет синтез ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути и синтеза триацилглицеринов (**рис. 15-22**).

В нефосфорилированной форме FOXO1 действует как ядерный фактор транскрипции. В ответ на сигнал инсулина FOXO1 выходит из ядра в цитозоль, где фосфорилируется под действием протеинкиназы B и связывается с убиквитином, а затем расщепляется в протеасоме. Глюкагон предотвращает фосфорилирование под действием протеинкиназы B, в результате чего FOXO1 остается в активной форме в ядре.

Как мы видим, процесс регуляции генов ферментов, ответственных за метаболизм углеводов и жиров, достаточно сложный, причем в реальности он еще сложнее и гораздо тоньше, чем мы тут показали. Многие факторы транскрипции могут действовать на один и тот же промотор, многие протеинкиназы и фосфатазы могут активировать или инактивировать эти факторы транскрипции, кроме того, действие факторов транскрипции модулируется различными вспомогательными белками. Рассмотрим в качестве примера ген ФЕП-карбоксикиназы, регуляция которого на уровне транскрипции достаточно хорошо изучена. В области промотора этого гена **(рис. 15-23)** обнаружено не менее 15 респонсивных элементов, распознаваемых 12 известных факторов транскрипции, причем вполне вероятно, что со временем обнаружатся и другие факторы транскрипции. Факторы транскрипции действуют на эту промоторную область и на сотни других промоторов, осуществляя тонкую регуляцию экспрессии сотен метаболических ферментов и координируя их активность в метаболизме углеводов и жиров. Важнейшая роль факторов транскрипции в регуляции метаболизма отчетливо видна при наличии мутаций соответствующих генов. Например, у молодых людей не менее пяти различных вариантов сахарного диабета взрослого типа (MODY) связано с мутациями специфических факторов транскрипции (доп. 15-3).



Чувствительные элементы и регуляторные сайты связывания промотора	
dAF2	дистальный вспомогательный фактор 2
dAF1	дистальный вспомогательный фактор 1
SRE	регуляторный элемент стеринов
AF1	вспомогательный фактор 1
AF2	вспомогательный фактор 2
GRE	регуляторный элемент глюкокортикоидов
TRE	регуляторный элемент тиреоидного гормона
CRE	регуляторный элемент cAMP

Рис. 15-23. Сложный механизм регуляции экспрессии генов на примере регуляции ФЕП-карбоксикиназы. Изображены факторы транскрипции (в виде пиктограмм, размер которых связан с последовательностью ДНК), регулирующие транскрипцию гена ФЕП-карбоксикиназы. Степень экспрессии гена зависит от совместного влияния всех факторов: доступность питательных веществ, уровень глюкозы в крови и другие параметры, определяющие потребность клетки в этом ферменте в данный момент времени. P1, P2, P3I, P3II и P4 — участки связывания белка, идентифицированные методом футпринтинга с использованием ДНКазы I (см. доп. 26-1). Мотив TATA является местом сборки комплекса транскрипции РНК-полимеразы II (Pol II).

Факторы транскрипции	
FOXO1	*forkhead box other 1*
PPARγ2	рецептор γ2, активирующий пролиферацию пероксисом
HNF-3β	ядерный фактор печени 3β
SREBP-1	белок-1, связывающий регуляторный элемент стеринов
HNF-4α	ядерный фактор печени 4α
COUP-TF	ближний (upstream) промотор овальбумина цыпленка – фактор транскрипции
RAR	рецептор ретиноевой кислоты
GR	рецептор глюкокортикоидов
T_3R	рецептор тиреоидных гормонов
C/EBP	CAAT/усиливающий связывающий белок
HNF-1	ядерный фактор печени 1
NF1	ядерный фактор 1
ATF3	фактор активации транскрипции 3
CREB	белок, связывающий cAMP-регуляторный элемент
NFκB	ядерный фактор κB
TBP	белок, связывающий TATA-бокс
Med.	медиатор
TFIIH	фактор транскрипции II H

Дополнение 15-3 МЕДИЦИНА Мутации, приводящие к возникновению редких форм сахарного диабета

Термин «диабет» охватывает целый ряд клинических состояний, общий признак которых — избыточное образование мочи. В доп. 11-2 мы рассмотрели такую форму заболевания, как несахарный диабет, при котором нарушение всасывания воды в почках вызывается мутацией гена аквапорина. Термин «сахарный диабет» относится к той форме заболевания, при которой нарушается метаболизм глюкозы — либо из-за неспособности поджелудочной железы продуцировать инсулин, либо по причине нечувствительности тканей к сигналу инсулина.

Выделяют две основные формы сахарного диабета. Причиной диабета I типа, также называемого инсулинозависимым сахарным диабетом (ИЗСД), является иммунная реакция организма, направленная против собственных β-клеток поджелудочной железы, производящих инсулин. Для компенсации недостаточной активности β-клеток больные с такой формой диабета должны получать инсулин в виде инъекций или ингаляций. Сахарный диабет I типа проявляется в раннем детстве и в подростковом возрасте, поэтому раньше эту форму заболевания называли юношеским диабетом. Диабет II типа, иначе называемый инсулинонезависимым сахарным диабетом (ИНЗСД), обычно возникает у людей старше 40 лет. Эта форма диабета встречается чаще, чем диабет I типа, и вероятность ее выше у людей с избыточной массой тела. В мире очень много людей с ожирением различной степени, что обусловило широкое распространение ИНЗСД и объясняет острую необходимость изучения связи между ожирением и этой формой заболевания на генетическом и биохимическом уровне. В последующих главах мы более подробно рассмотрим вопросы, связанные с метаболизмом жиров и белков, и в гл. 23 вернемся к обсуждению проблемы диабета, при котором происходят серьезные изменения метаболизма углеводов, жиров и белков.

Здесь мы рассмотрим другой вариант диабета, при котором нарушается метаболизм углеводов и жиров, — диабет взрослого типа у молодых (MODY), при котором происходит мутация гена фактора транскрипции, играющего важную роль в проведении сигнала инсулина в ядро, или фермента, участвующего в формировании ответа на сигнал инсулина. Например, при диабете MODY2 мутирован ген гексокиназы IV (глюкокиназы) в печени и поджелудочной железе, где преобладает именно эта изоформа фермента. Глюкокиназа β-клеток поджелудочной железы действует в качестве сенсора на глюкозу. В норме при повышении концентрации глюкозы в крови повышается также уровень глюкозы в β-клетках, а поскольку глюкокиназа имеет сравнительно высокую величину K_M для глюкозы, ее активность возрастает с увеличением концентрации глюкозы. Метаболизм образующегося в этой реакции глюкозо-6-фосфата приводит к повышению уровня ATP в β-клетках, а это в свою очередь инициирует высвобождение инсулина по механизму, изображенному на рис. 23–28. У здорового человека выброс инсулина происходит при концентрации глюкозы в крови около 5 мМ. Однако у человека с инактивирующей мутацией в обеих копиях гена глюкокиназы пороговое значение концентрации глюкозы, при котором происходит выброс инсулина, очень высокое, и поэтому с самого рождения у них наблюдается тяжелая форма гипергликемии — так называемый перманентный неонатальный диабет. У человека с одной мутированной и одной нормальной копией гена глюкокиназы выброс инсулина происходит при концентрации глюкозы около 7 мМ. Если у больного уровень глюкозы в крови лишь немного превышает норму, наблюдается умеренная гипергликемия без симптомов заболевания. Такое состояние обычно выявляют случайно по результатам анализа крови.

Кроме того, известно не менее пяти других форм диабета MODY, каждая связана с инактивирующей мутацией того или иного фактора транскрипции, необходимого для нормального развития и функционирования β-клеток поджелудочной железы. У человека с такими мутациями в разной степени снижена продукция инсулина и нарушен гомеостаз глюкозы в крови. В вариантах MODY1 и MODY3 нарушения достаточно серьезные, чтобы вызвать осложнения, сопровождающие ИЗСД и ИНЗСД: проблемы в сердечно-сосудистой системе, почечную недостаточность и слепоту. Формы диабета MODY4, 5 и 6 менее тяжелые. Формы диабета MODY — лишь небольшая часть всех патологических состояний при ИНЗСД. Кроме того, очень редко встречаются люди с мутацией самого гена инсулина; у них наблюдается нарушение проведения инсулинового сигнала разной степени тяжести.

Краткое содержание раздела 15.3 СОГЛАСОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ГЛИКОЛИЗА И ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА

- Глюконеогенез и гликолиз имеют семь общих ферментов, катализирующих легко обратимые реакции этих двух метаболических путей. На трех других стадиях прямые и обратные реакции катализируются разными ферментами, и именно на этих стадиях осуществляется регуляция двух путей.

- Кинетические свойства гексокиназы IV (глюкокиназы) связаны с ее особой ролью в печени: она высвобождает глюкозу в кровь при низком уровне глюкозы крови и связывает и метаболизирует глюкозу, когда ее в крови много.

- Аллостерические ингибиторы PFK-1 — ATP и цитрат. В большинстве тканей млекопитающих, в том числе и в печени, аллостерическим активатором PFK-1 выступает фруктозо-2,6-бисфосфат.

- Аллостерический ингибитор пируваткиназы — ATP, а изофермент из печени ингибируется в результате cAMP-зависимого фосфорилирования.

- Регуляция глюконеогенеза осуществляется на уровне пируваткарбоксилазы (активируемой ацетил-CoA) и FBPазы-1 (ингибируемой фруктозо-2,6-бисфосфатом и AMP).

- Для ограничения интенсивности субстратного цикла между гликолизом и глюконеогенезом эти два метаболических пути находятся под согласованным аллостерическим контролем, который главным образом осуществляется путем противоположного действия, оказываемого фруктозо-2,6-бисфосфатом на PFK-1 и FBPазу-1.

- Глюкагон и адреналин снижают концентрацию фруктозо-2,6-бисфосфата. Это действие гормонов достигается посредством повышения концентрации cAMP и фосфорилирования бифункционального фермента, осуществляющего синтез и расщепления фруктозо-2,6-бисфосфата. Фосфорилирование инактивирует PFK-2 и активирует FBPазу-2, что приводит к распаду фруктозо-2,6-фосфата. Инсулин повышает концентрацию фруктозо-2,6-бисфосфата путем активации фосфопротеинфосфатазы, которая дефосфорилирует (и при этом активирует) PFK-2.

- Ксилулозо-5-фосфат — интермедиат пентозофосфатного пути; он активирует фосфопротеинфосфатазу 2A, которая дефосфорилирует несколько белков, включая PFK-2/FBPазу-2, сдвигая равновесие в сторону захвата глюкозы, синтеза гликогена и синтеза липидов в печени.

- Факторы транскрипции, в том числе ChREBP, CREB, SREBP и FOXO1, регулируют экспрессию в ядре специфических генов, кодирующих ферменты гликолиза и глюконеогенеза. Инсулин и глюкагон действуют как антагонисты, активируя эти факторы транскрипции и тем самым включая и выключая экспрессию многих генов.

15.4. Метаболизм гликогена в клетках животных

Далее при обсуждении регуляции метаболизма углеводов мы уделим основное внимание синтезу и распаду гликогена. В этом разделе мы рассмотрим реакции данного метаболического пути, а в разд. 15.5 обратимся к механизмам его регуляции.

У позвоночных и у многих микроорганизмов избыток глюкозы запасается в виде высокомолекулярного гликогена, а у растений - в виде крахмала. У позвоночных гликоген откладывается главным образом в печени и в мышцах и может составлять до 10 % массы печени и 1-2% массы мышечных тканей. Если в цитозоле была бы растворена глюкоза в количестве, эквивалентном этому количеству гликогена,ее концентрация достигла бы 0,4 M, что нарушало бы осмотическое равновесие в клетке. Однако концентрация полимерных молекул гликогена при той массе глюгозы в нем составляет лишь 0,01 мкM. Гликоген запасается в виде больших гранул. Одна гранула гликогена (β-частица) имеет диаметр около 21 нм, состоит из 55 000 остатков глюкозы и содер-

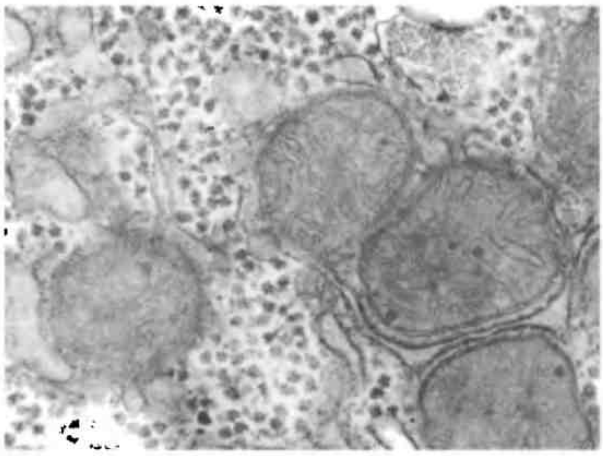


Рис. 15-24. Гранулы гликогена в гепатоците. Гликоген — основная форма запасания углеводов в клетках, особенно в гепатоцитах. Гликоген образует электроноплотные структуры, часто в виде агрегатов или розеток. В гепатоцитах гликоген прочно связан канальцами гладкого эндоплазматического ретикулума. На фотографии также видно множество митохондрий. В гепатоцитах гликоген откладывается в зонах гладкого эндоплазматического ретикулума, богатых пузырьками и канальцами.

жит примерно 2000 невосстанавливающих концов. От 20 до 40 подобных частиц собираются вместе, образуя α-розетки, которые легко различимы в микроскоп в образцах тканей нормально питающихся животных (**рис. 15-24**), но исчезают после 24 ч голодания.

Гликоген мышц используется в качестве доступного источника энергии как для аэробного, так и анаэробного метаболизма. При активной физической нагрузке его запасы могут быть исчерпаны менее чем за час. Гликоген из печени служит источником глюкозы для других тканей в тех случаях, когда глюкоза не поступает с пищей (между приемами пищи или в период голодания); это особенно важно для нейронов головного мозга, которые не могут использовать в качестве источника энергии жирные кислоты. Запасы гликогена в печени могут быть исчерпаны за 12–24 ч. У человека общее количество энергии, запасенной в форме гликогена, гораздо меньше того, что хранится в виде жиров (триацилглицерины; см. табл. 23-5), однако млекопитающие не способны превращать жиры в глюкозу и расщеплять их в анаэробных условиях.

Гранулы гликогена представляют собой сложные агрегаты, состоящие из гликогена, расщепляющих и синтезирующих его ферментов, а также специального аппарата для регуляции этих ферментов. В мышцах и печени механизмы накопления и использования гликогена общие, но у тканеспецифичных ферментов несколько различаются, что связано с разной ролью гликогена в этих двух тканях. Гликоген, кроме того, поступает в организм с пищей и расщепляется в кишечнике; в этом процессе участвует другой набор гидролитических ферментов, превращающих гликоген (и крахмал) в глюкозу. Подобным образом разлагается потребляемый в пищу крахмал. Мы начнем с рассмотрения разложения гликогена до глюкозо-1-фосфата (**гликогенолиз**), а затем обратимся к путям синтеза гликогена (**гликогенез**).

Расщепление гликогена катализирует гликогенфосфорилаза

В мышцах и печени глюкозные звенья из внешних ветвей гликогена вовлекаются в гликолиз в результате действия трех ферментов: гликогенфосфорилазы, фермента, расщепляющего цепи в участках ветвления, и фосфоглюкомутазы. Гликогенфосфорилаза катализирует атаку неорганического фосфата P_i на (α1→4)-гликозидную связь между двумя остатками глюкозы на невосстанавливающем конце гликогена, в результате чего концевой остаток глюкозы отщепляется в виде **α-D-глюкозо-1-фосфата (рис. 15-25)**. Данная реакция *фосфоролиза* отличается от гидролиза гликозидной связи под действием амилазы при переваривании гликогена и крахмала из пищи. При фосфоролизе часть энергии гликозидной связи сохраняется в виде эфира фосфорной кислоты глюкозо-1-фосфата (см. разд. 14-2).

Для реакции с участием гликогенфосфорилазы важно наличие кофактора пиридоксальфосфата, чья фосфатная группа действует как обычная кислота, катализируя атаку P_i на гликозидную связь. Надо сказать, что эта роль необычна для данного кофактора; гораздо чаще он выступает кофактором в метаболизме аминокислот (см. рис. 18-6).

Гликогенфосфорилаза действует на невосстанавливающий конец молекулы гликогена многократно, пока не достигнет участка ветвления с конфигурацией α1→6 (см. рис. 7-14); действие фермента прекращается за четыре остатка глюкозы до этой точки. Дальнейшее разложение

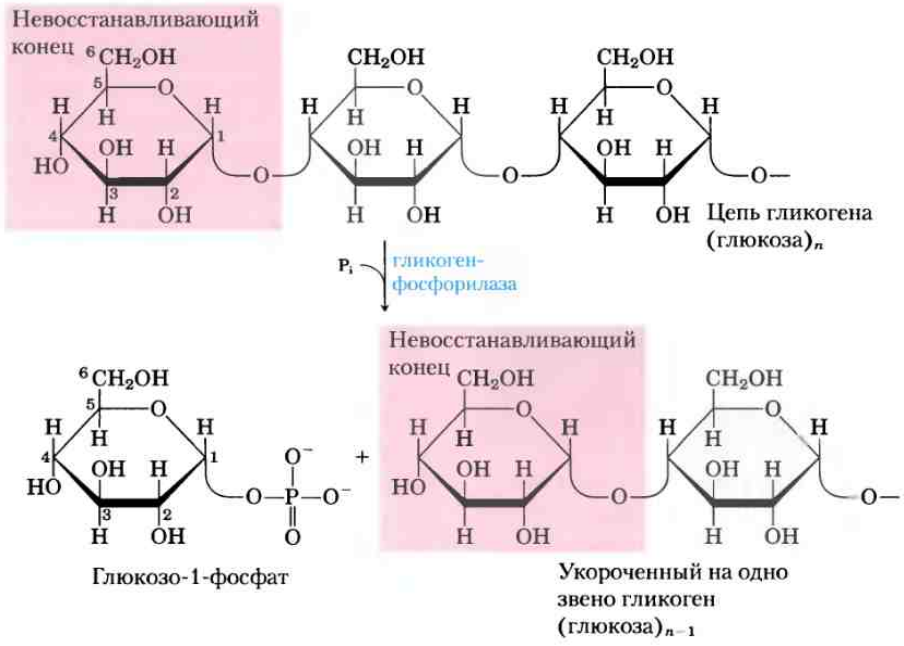


Рис. 15-25. Удаление концевого остатка глюкозы от невосстанавливающего конца цепи гликогена под действием гликогенфосфорилазы. Этот процесс постоянно повторяется; фермент последовательно удаляет остатки глюкозы, пока не остановится за четыре остатка до точки ветвления (см. рис. 15-26).

гликогена гликогенфосфорилаза сможет продолжать после вмешательства фермента, расщепляющего участок ветвления. Этот фермент, обладающий активностью 4-α-D-глюканотрансферазы и амило-1,6-глюкозидазы, последовательно катализирует перенос участка боковой цепи (трех остатков) и отщепление последнего остатка глюкозы (**рис. 15-26**); после этого гликогенфосфорилаза может продолжать свою работу.

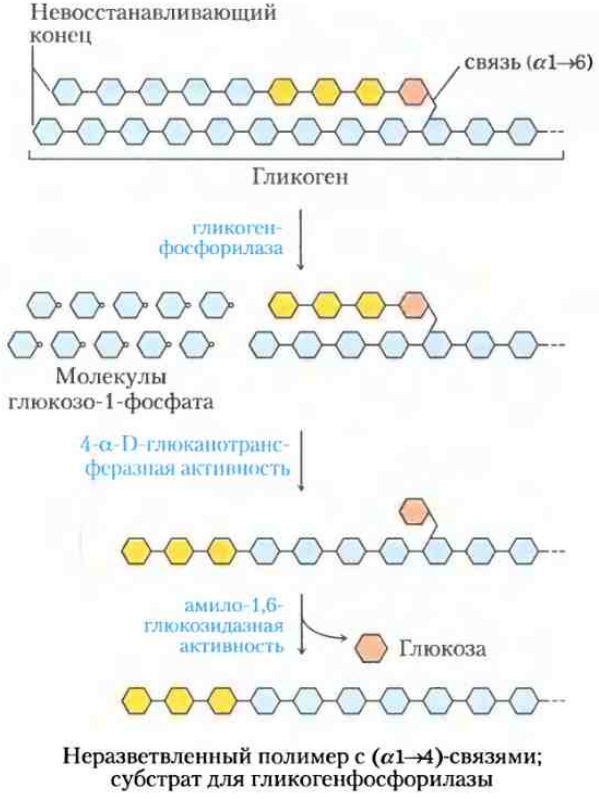


Рис. 15-26. Разложение гликогена вблизи точки ветвления с гликозидной связью (α1→6). После удаления концевых остатков глюкозы гликогенфосфорилазой (см. рис. 15-25) остатки в участке ветвления отщепляет специальный фермент, обладающий двумя типами активности. Под действием трансферазной активности данного фермента участок из трех остатков глюкозы из боковой цепи перемещается на ближайший невосстанавливающий конец с образованием (α1→4)-связи. Затем оставшийся единственный остаток глюкозы, присоединенный связью (α1→6), отщепляется в виде свободной молекулы глюкозы под действием 1,6-глюкозидазной активности фермента. Здесь остатки глюкозы изображены в виде пиранозных колец без обозначения —H, —OH и —CH_2OH-групп.

Глюкозо-1-фосфат может подвергаться гликолизу или, претерпевая превращения в печени, пополнять запасы глюкозы в крови

Конечный продукт реакции с участием гликоген-фосфорилазы глюкозо-1-фосфат под действием **фосфоглюкомутазы** превращается в глюкозо-6-фосфат:

$$\text{Глюкозо-1-фосфат} \rightleftharpoons \text{глюкозо-6-фосфат}$$

Фермент, изначально фосфорилированный по остатку Ser, передает фосфорильную группу на атом С-6 в молекуле субстрата и забирает фосфорильную группу от атома С-1 **(рис. 15-27)**.

Образующийся из гликогена в мышцах глюкозо-6-фосфат может вовлекаться в гликолиз и служить источником энергии для обеспечения мышечного сокращения. В печени разложение гликогена преследует другую цель: поддерживать уровень глюкозы крови, например, между приемами пищи. В этом процессе задействована глюкозо-6-фосфатаза, обнаруженная только в тканях печени и почек. Данный фермент представляет собой интегральный белок мембраны эндоплазматического ретикулума (ЭР), который, как считают, имеет девять трансмембранных спиралей; активный центр фермента обращен в просвет ЭР. Образовавшийся в цитозоле глюкозо-6-фосфат направляется в просвет ЭР при помощи специализированной транспортной молекулы Т1 **(рис. 15-28)** и на поверхности ЭР подвергается гидролизу под действием глюкозо-6-фосфатазы. По всей видимости, образующиеся P_i и глюкоза переносятся обратно в цитозоль с помощью двух других молекул (Т2 и Т3), а затем глюкоза покидает гепатоцит с помощью еще одной молекулы-переносчика GLUT2, расположенной в плазматической мембране. Обратите внимание, что, поскольку активный центр глюкозо-6-фосфатазы обращен в просвет ЭР, клетке удается отделить данную реакцию от процесса гликолиза, который происходит в цитозоле и может быть прерван при вмешательстве глюкозо-6-фосфатазы. Генетиче-

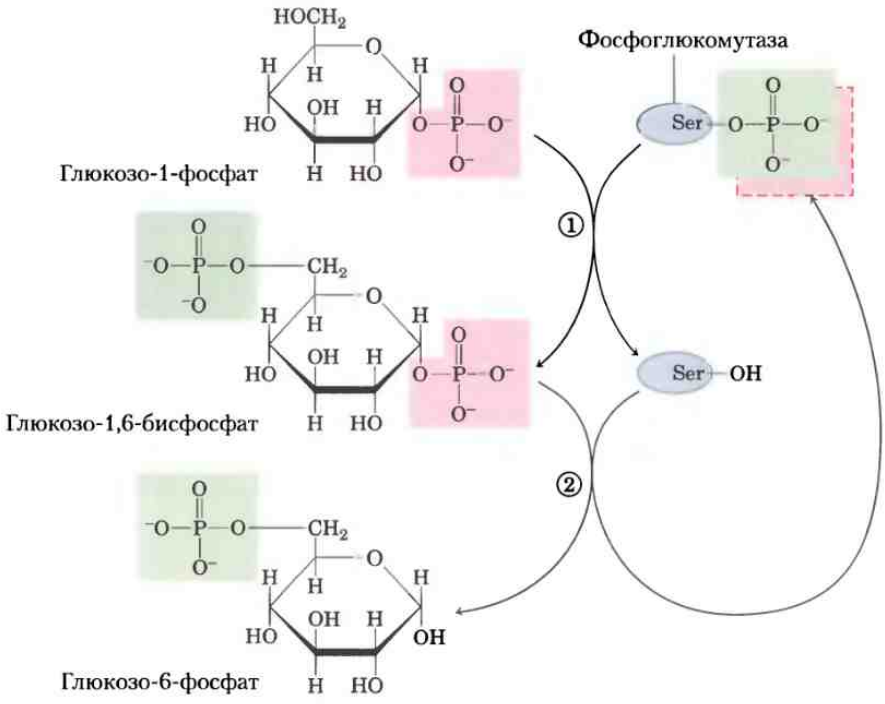


Рис. 15-27. Реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой. В начале реакции фермент фосфорилирован по остатку Ser. На стадии ① фермент передает свою фосфорильную группу (выделена зеленым цветом) глюкозо-1-фосфату, в результате чего образуется глюкозо-1,6-бисфосфат. На стадии ② фосфорильная группа из положения С-1 глюкозо-1,6-бисфосфата (выделена красным цветом) переносится обратно на фермент, что приводит к регенерации фосфорилированного фермента и образованию глюкозо-6-фосфата.

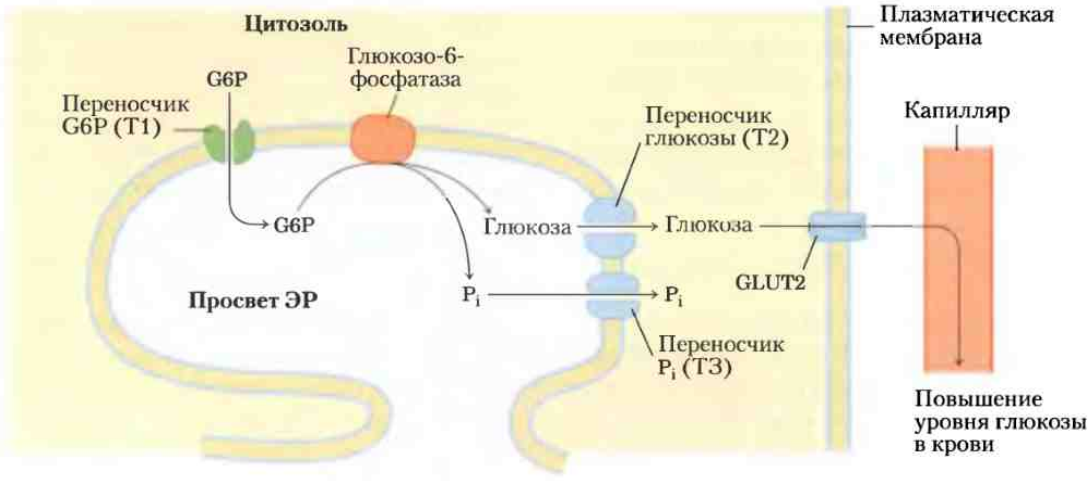


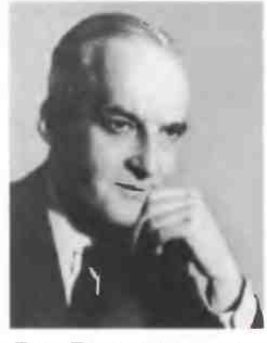
Рис. 15-28. Гидролиз глюкозо-6-фосфата (G6P) под действием глюкозо-6-фосфатазы в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Каталитический центр глюкозо-6-фосфатазы обращен в просвет ЭР. Переносчик глюкозо-6-фосфата T1 транспортирует его из цитозоля в просвет ЭР, а переносчики T2 и T3 транспортируют образующиеся при гидролизе глюкозу и P_i обратно в цитозоль. Глюкоза выходит из клетки при помощи специализированного переносчика GLUT2, находящегося в плазматической мембране.

ский дефект как глюкозо-6-фосфатазы, так и T1 приводит к серьезным нарушениям метаболизма, что выражается в гликогенозе типа Ia (доп. 15-4).

Поскольку в мышцах и в жировой ткани глюкозо-6-фосфатаза отсутствует, эти ткани не могут превращать глюкозо-6-фосфат, образовавшийся при распаде гликогена, в глюкозу; таким образом, эти ткани не вносят никакого вклада в поддержание уровня глюкозы крови.

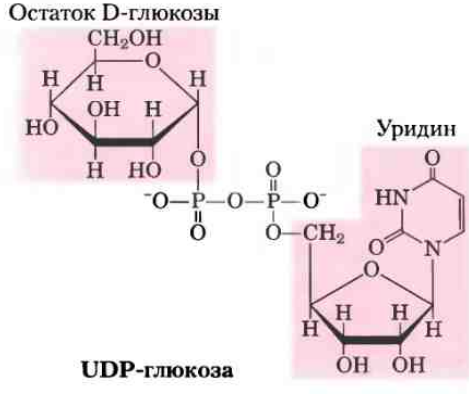
Сахаронуклеотид UDP-глюкоза участвует в синтезе гликогена

Во многих реакциях, в которых происходят превращения или полимеризация гексоз, принимают участие **сахаронуклеотиды** — соединения, в которых аномерный углерод сахара активирован присоединенным сложноэфирной связью нуклеотидом. Подобные нуклеотидные производные сахаров служат субстратами при полимеризации моносахаридов в дисахариды, гликоген, крахмал, целлюлозу и более сложные внеклеточные полисахариды. Они, кроме того, важные интермедиаты при образовании аминогексоз и дезоксигексоз, обнаруженных в некоторых из этих полисахаридов, а также при синтезе витамина C (L-аскорбиновой кислоты). На участие нуклеотидных производных



Луис Лелуар, 1906–1987

сахаров в биосинтезе гликогена и многих других производных углеводов первым обратил внимание аргентинский биохимик Луис Лелуар в 1953 г.



Дополнение 15-4 Карл и Герти Кори — пионеры исследований метаболизма гликогена и связанных с ним заболеваний

Многое из того, что написано в современных учебниках биохимии о метаболизме гликогена, было открыто в период с 1925 по 1950 гг. замечательными исследователями — супругами Карлом Ф. Кори и Герти Т. Кори. Оба они получили медицинское образование в Европе в конце Первой мировой войны (Герти Кори закончила подготовительное отделение и медицинский факультет за один год!). Супруги покинули Европу в 1922 г. и основали исследовательские лаборатории в США: первые девять лет они работали в Буффало, шт. Нью-Йорк, теперь это Мемориальный институт Росвелл парк, а затем с 1931 г. до конца своих дней — в Университете Джорджа Вашингтона в Сент-Луисе.

В своих ранних работах по физиологии, посвященных происхождению и превращениям гликогена в тканях животных, Кори показали, что в мышцах гликоген превращается в лактат, который затем с кровью попадает в печень, где вновь превращается в гликоген; этот цикл позднее стал называться циклом Кори (см. рис. 23-20). В дальнейших биохимических исследованиях они показали, что превращения гликогена начинаются в реакции фосфорилирования под действием открытого

Таблица 1 Заболевания человека (гликогенозы), связанные с отложением гликогена

Тип гликогеноза (название болезни)	Дефектный фермент	Поражаемый орган	Симптомы
Тип 0	Гликогенсинтаза	Печень	Низкий уровень глюкозы крови, много кетоновых тел, ранняя смерть
Тип Ia (болезнь Гирке)	Глюкозо-6-фосфатаза	Печень	Печень увеличена, почечная недостаточность
Тип Ib	Микросомальная глюкозо-6-фосфаттранслоказа	Печень	Как в Ia; предрасположенность к бактериальным инфекциям
Тип Ic	Микросомальный переносчик P_i	Печень	Как в Ia
Тип II (болезнь Помпа)	Лизосомальная глюкозидаза	Скелетные и сердечные мышцы	Инфантильная форма: смерть до достижения возраста 2 года; ювенильная форма: миопатия; взрослая форма: как при мышечной дистрофии
Тип IIIa (болезнь Форбса или болезнь Кори)	4-α-D-глюканотрансфераза и(или) амило-1,6-глюкозидаза	Печень, скелетные и сердечная мышцы	У детей увеличена печень; миопатия
Тип IIIb	4-α-D-глюканотрансфераза и(или) амило-1,6-глюкозидаза печени (мышечный фермент нормальный)	Печень	У детей увеличена печень
Тип IV (болезнь Андерсена)	Фосфорилаза печени	Печень, скелетные мышцы	Увеличены печень и селезенка, миоглобин в моче
Тип V (болезнь Мак-Ардля)	Мышечная фосфорилаза	Скелетные мышцы	Судороги и боль при физической нагрузке; миоглобин в моче
Тип VI (болезнь Герса)	Фосфорилаза печени	Печень	Печень увеличена
Тип VII (болезнь Таруи)	Мышечная PFK-1	Мышцы, эритроциты	Как в V; гемолитическая анемия
Тип VIb, VIII или IX	Киназа фосфорилазы	Печень, лейкоциты, мышцы	Печень увеличена
Тип XI (синдром Фанкони–Бикель)	Переносчик глюкозы (GLUT2)	Печень	Нарушение роста, рахит, увеличение печени, дисфункция почек

Дополнение 15-4 Карл и Герти Кори — пионеры исследований метаболизма гликогена и связанных с ним заболеваний (*продолжение*)

ими же фермента, названного гликогенфосфорилазой. Они показали, что продукт реакции глюкозо-1-фосфат («эфир Кори») может быть вновь использован для ресинтеза гликогена по обратной реакции. Это открытие не доказывало, что в клетке гликоген синтезируется именно таким путем, но тем не менее это было первой демонстрацией синтеза макромолекул из мономерных субъединиц *in vitro*, что заставило других ученых начать поиски ферментов с полимеразной активностью. Артур Корнберг, работавший в лаборатории Кори и открывший первую ДНК-полимеразу, говорил: «К открытию ДНК-полимеразы меня привела гликогенфосфорилаза, а не спаривание оснований».

Герти Кори заинтересовалась генетическими заболеваниями человека, при которых в печени накапливается избыток гликогена. В некоторых случаях ей удалось идентифицировать биохимическую природу нарушения и показать, что диагностику болезни можно осуществлять, анализируя ферменты метаболизма гликогена в небольших образцах тканей, взятых при биопсии. В табл. 1 обобщены современные знания о 13 болезнях такого рода. ■

Карл и Гетри Кори разделили врученную им в 1947 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине с Бернардо Усаем из Аргентины, который был награжден за исследования в области гормональной регуляции метаболизма углеводов. В 1940–1950-х гг. лаборатория Кори в Сент-Луисе была международным центром биохимических исследований. Шестеро учеников, работавших с Кори, стали лауреатами Нобелевской премии: Артур Корнберг (1959) за открытие механизма синтеза ДНК, Северо Очоа (1959) за открытие механизма синтеза РНК, Луис Лелуар (1970) за определение роли нуклеотидных производных сахаров в синтезе полисахаридов, Эрл Сазерленд (1971) за открытие cAMP и установление его роли в регуляции метаболизма углеводов, Кристиан де Дюв (1974) за открытия в области структурной и функциональной организации клетки, Эдвин Кребс (1991) за открытие киназы фосфорилазы.

Супруги Кори в лаборатории Герти Кори. Около 1947 г.

Участие нуклеотидных производных сахаров в реакциях биосинтеза вытекает из нескольких приведенных ниже соображений.

1. Образование этих соединений происходит необратимо, что способствует необратимости тех метаболических путей, в которых они задействованы. Реакция конденсации нуклеозидтрифосфата с гексозо-1-фосфатом характеризуется небольшим положительным изменением свободной энергии, однако при этом освобождается неорганический пирофосфат PP_i, который в ходе экзергонической реакции быстро гидролизуется под действием неорганической пирофосфатазы ($\Delta G'^{\circ} = -19{,}2$ кДж/моль; **рис. 15-29**). В результате концентрация PP_i в клетке остается низкой, а реальное изменение свободной энергии всего процесса оказывается благоприятным. Как и во многих биохимических реакциях полимеризации в живых организмах, быстрое удаление продукта, в данном случае связанное с отрицательным изменением свободной энергии при гидролизе PP_i, способствует продвижению всего процесса синтеза.

2. Хотя в химических реакциях с участием нуклеотидных производных сахаров нуклеозиды непосредственно не задействованы, различные функциональные группы нуклеозидов

могут вступать в нековалентные взаимодействия с ферментом, при этом дополнительная свободная энергия связывания может вносить заметный вклад в каталитическую активность фермента (гл. 6; см. также т. 1, с. 425).

3. Подобно фосфату, нуклеотиды (например, UMP или AMP) — прекрасные уходящие группы и облегчают нуклеофильную атаку, активируя тот атом углерода в остатке сахара, с которым они связаны.

4. «Помечая» определенные молекулы гексоз нуклеотидными группами, клетка может использовать их для различных целей (например, для синтеза гликогена), отделив таким образом от гексозофосфатов, направляемых в другие реакции (например, гликолиз).

Синтез гликогена происходит практически во всех тканях организма, но особенно интенсивно в печени и скелетных мышцах. Отправной точкой для синтеза служит глюкозо-6-фосфат. Как мы уже показали, это соединение может образоваться из свободной глюкозы под действием изоферментов — гексокиназы I и гексокиназы II в мышцах или гексокиназы IV (глюкокиназы) в печени:

D-Глюкоза + ATP → D-глюкозо-6-фосфат + ADP

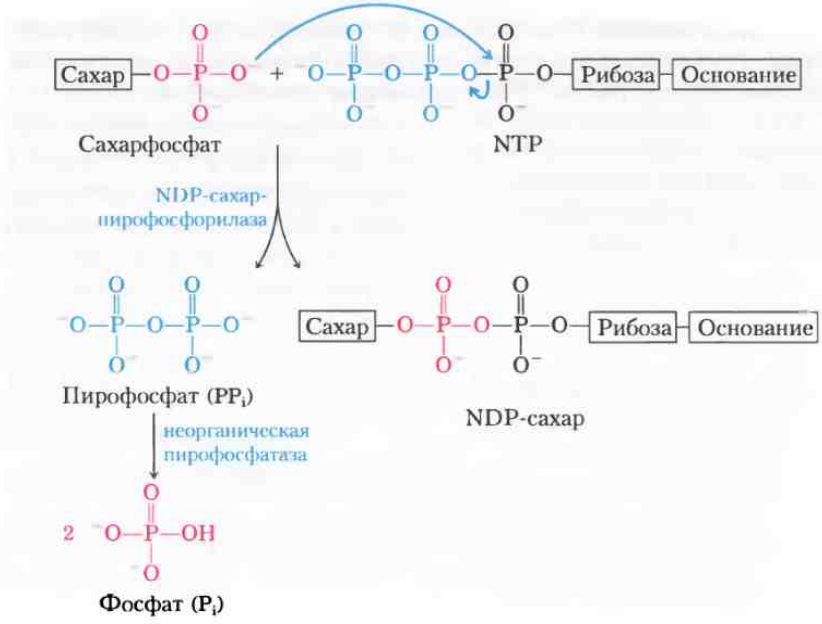
Однако некоторая часть глюкозы, попадающей в организм с пищей, вовлекается в гликолиз более сложным путем. Она сначала захватывается эритроцитами и в процессе гликолиза превращается в лактат, затем лактат попадает в печень и в результате глюконеогенеза превращается там в глюкозо-6-фосфат.

На первом этапе синтеза гликогена глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат под действием фосфоглюкомутазы:

Глюкозо-6-фосфат ⇌ глюкозо-1-фосфат

Ключевым моментом в синтезе гликогена является превращение продукта реакции в UDP-глюкозу с помощью фермента **UDP-глюкозопирофосфорилазы**:

Глюкозо-1-фосфат + UTP → UDP-глюкоза + PP_i



Суммарная реакция: сахарофосфат + NTP → NDP-сахар + $2P_i$

Рис. 15-29. Образование нуклеозиддифосфатсахаров. Между сахарофосфатом и нуклеозидтрифосфатом (NTP) происходит реакция конденсации. Отрицательно заряженный кислород сахарофосфата выступает в роли нуклеофила, атакуя α-фосфат нуклеозидтрифосфата и вытесняя пирофосфат. Равновесие реакции сдвинуто вправо, поскольку образующийся PP_i быстро гидролизуется неорганической пирофосфатазой.

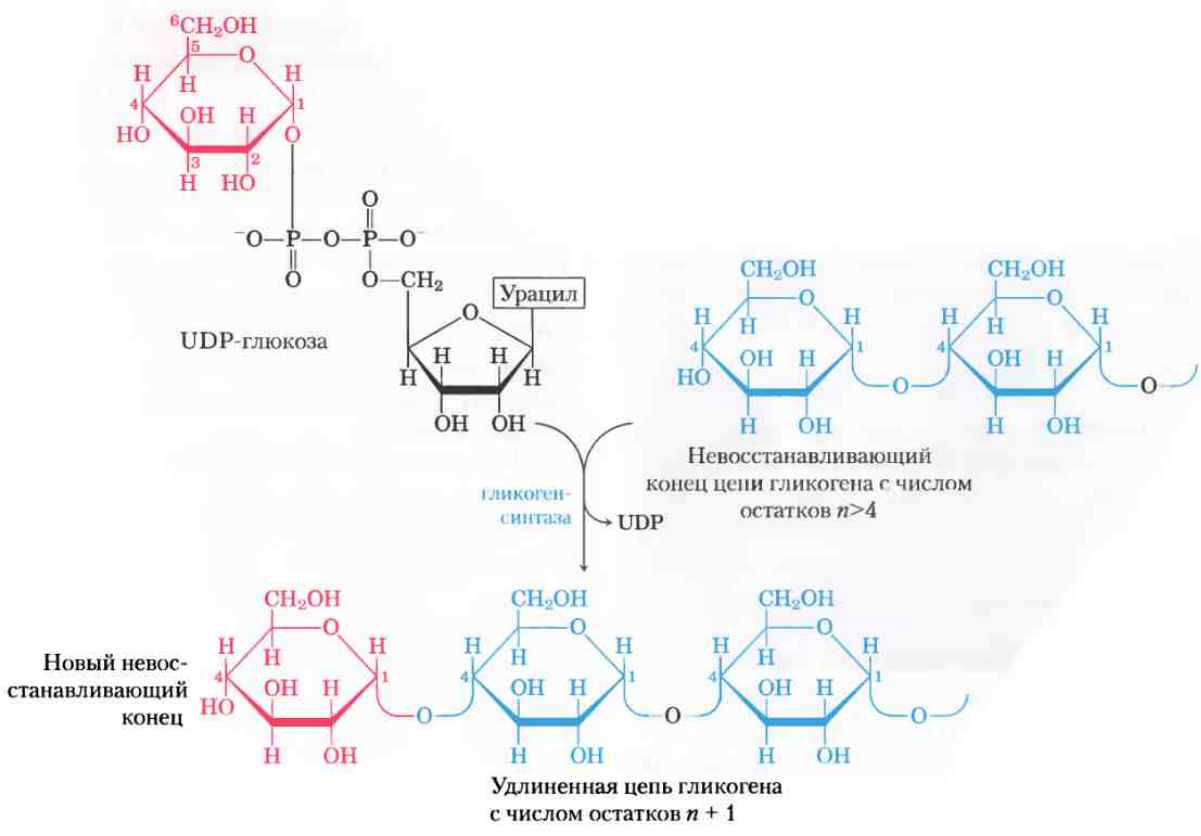


Рис. 15-30. Синтез гликогена. Удлинение цепи гликогена происходит под действием гликогенсинтазы. Фермент переносит остаток глюкозы от UDP-глюкозы на невосстанавливающий конец цепи гликогена (см. рис. 7-14), создавая новую (α1→4)-связь.

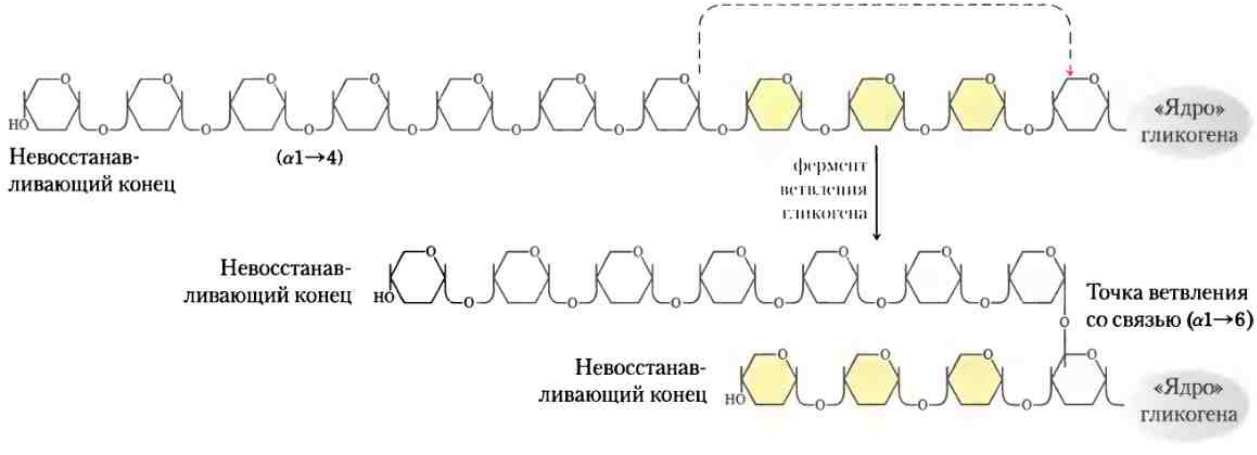


Рис. 15-31. Образование разветвлений в цепи гликогена. Фермент ветвления гликогена 1,4→1,6-трансгликозидаза (или гликозил-4,6-трансфераза) в процессе синтеза гликогена создает новые точки ветвления.

Обратите внимание, что название данного фермента связано с обратной реакцией. В клетке реакция протекает в сторону образования UDP-глюкозы, поскольку выделяющийся пирофосфат быстро гидролизуется под действием неорганической пирофосфатазы (рис. 15-29).

UDP-глюкоза выступает в качестве прямого донора остатков глюкозы в реакции, катализируемой **гликогенсинтазой**, которая способствует переносу остатка глюкозы от UDP-глюкозы на невосстанавливающий конец разветвленной молекулы гликогена (**рис. 15-30**). Общее равновесие при встраивании глюкозо-6-фосфата в растущую цепь гликогена сильно сдвинуто в сторону синтеза.

Гликогенсинтаза не может формировать (α1→6)-связи, находящиеся в точках ветвления молекул гликогена. Эти связи создает специальный фермент ветвления гликогена — **1,4→1,6-трансгликозидаза (гликозил-4,6-трансфераза)**. Данный фермент катализирует перенос концевого участка из 6–7 остатков глюкозы от невосстанавливающего конца цепи гликогена, состоящего не менее чем из 11 остатков, на ОН-группу атома С-6 остатка глюкозы, расположенного ближе к началу той же или другой цепи гликогена, создавая тем самым новую ветвь (**рис. 15-31**). Дальнейшее удлинение этого фрагмента осуществляет гликогенсинтаза. Биологический «смысл» синтеза разветвленного полимера состоит в улучшении его растворимости и создании максимального количества невосстанавливающих концов. Тем самым достигается увеличение числа участков, доступных для гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы, поскольку оба фермента действуют только на невосстанавливающие концы цепи.

Гликогенин обеспечивает связывание первых остатков сахара при синтезе гликогена

Гликогенсинтаза не может инициировать синтез цепи гликогена *de novo*. Для этого необходим праймер, в качестве которого обычно выступает фрагмент цепи, по меньшей мере, из восьми остатков глюкозы, связанных (α1→4)-связью. Как же происходит связывание *первых* остатков глюкозы в молекуле гликогена? Замечательный белок **гликогенин (рис. 15-32)** является одновременно и праймером, на котором происходит сборка новой цепи, и ферментом, катализирующим процесс

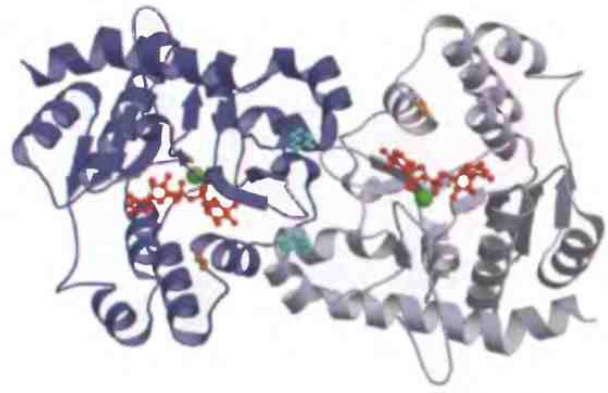


Рис. 15-32. Структура гликогенина (PDB ID 1772). Мышечный гликогенин (M_r = 37 000 Да) в растворе существует в виде димера. В печени человека присутствует другая изоформа белка — гликогенин-2. Субстрат UDP-глюкоза (изображена в виде красной структуры из шариков и стержней) связан с укладкой Россмана в N-концевой области белка на некотором удалении от остатка Tyr^{194} (бирюзового цвета): на расстоянии 15 Å от этого остатка «своей» мономерной единицей и 12 Å от него второй молекулой в составе димера. Каждая молекула UDP-глюкозы связана через фосфатную группу с ионом Mn^{2+} (зеленый), который играет важную роль в катализе. Считается, что Mn^{2+} выступает в качестве акцептора электронной пары (кислоты Льюиса), стабилизируя уходящую группу (UDP). В продукте реакции реакции гликозидная связь имеет такую же конфигурацию при атоме С-1, как в UDP-глюкозе, вероятно, перенос глюкозы от UDP на Tyr^{194} происходит в две стадии: сначала остаток Asp^{162} (оранжевый) осуществляет нуклеофильную атаку, приводящую к образованию промежуточного продукта с обращенной конфигурацией, а следующая нуклеофильная атака остатком Tyr^{194} восстанавливает исходную конфигурацию.

сборки. Первый шаг на пути синтеза новой молекулы гликогена состоит в переносе остатка глюкозы от UDP-глюкозы на гидроксильную группу Tyr^{194} гликогенина под действием глюкозилтрансферазной активности фермента (**рис. 15-33**). Зарождающаяся цепь удлиняется путем присоединения еще семи остатков глюкозы, каждый из которых поступает от UDP-глюкозы. Катализатором этих реакций вновь выступает гликогенин. Далее к процессу подключается гликогенсинтаза, удлиняющая цепь гликогена. Будучи ковалентно связан с одним восстанавливающим концом молекулы гликогена, гликогенин остается внутри образующейся гранулы глигена (рис. 15-33, *б*).

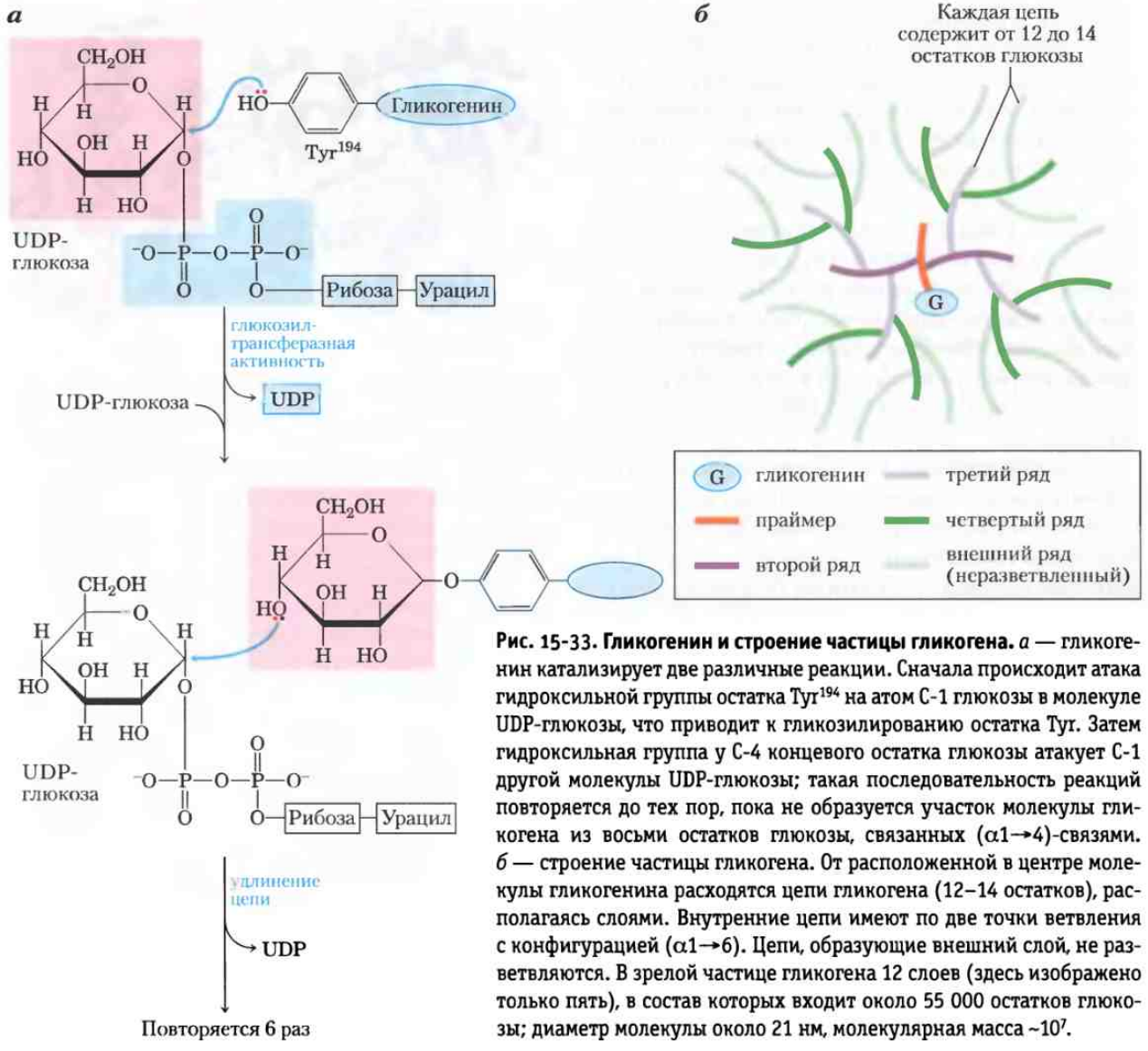


Рис. 15-33. Гликогенин и строение частицы гликогена. *а* — гликогенин катализирует две различные реакции. Сначала происходит атака гидроксильной группы остатка Тир[194] на атом С-1 глюкозы в молекуле UDP-глюкозы, что приводит к гликозилированию остатка Тир. Затем гидроксильная группа у С-4 концевого остатка глюкозы атакует С-1 другой молекулы UDP-глюкозы; такая последовательность реакций повторяется до тех пор, пока не образуется участок молекулы гликогена из восьми остатков глюкозы, связанных (α1→4)-связями. *б* — строение частицы гликогена. От расположенной в центре молекулы гликогенина расходятся цепи гликогена (12–14 остатков), располагаясь слоями. Внутренние цепи имеют по две точки ветвления с конфигурацией (α1→6). Цепи, образующие внешний слой, не разветвляются. В зрелой частице гликогена 12 слоев (здесь изображено только пять), в состав которых входит около 55 000 остатков глюкозы; диаметр молекулы около 21 нм, молекулярная масса ~10^7.

Краткое содержание раздела 15.4
МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОГЕНА В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ

- Гликоген запасается в мышцах и печени в виде крупных гранул. Внутри этих гранул содержатся также ферменты, участвующие в метаболизме гликогена, и регуляторные ферменты.

- Гликогенфосфорилаза катализирует фосфоролиз цепи гликогена, начиная от невосстанавливающего конца молекулы, в результате чего образуется глюкозо-1-фосфат. Специальный фермент, расщепляющий связи в участках ветвления, переносит остатки ветвей на основную цепь, а последний остаток, присоединенный (α1→6)-связью, высвобождает в виде молекулы глюкозы.

- Фосфоглюкомутаза осуществляет взаимопревращения глюкозо-1-фосфата и глюкозо-6-фосфата. Глюкозо-6-фосфат может далее подвергаться гликолизу или (в печени) под действием глюкозо-6-фосфатазы превращаться в свободную глюкозу в эндоплазматическом ретикулуме, а затем поступать в кровоток.

- Производное сахара и нуклеотида — UDP-глюкоза — предоставляет остаток глюкозы для синтеза гликогена под действием гликогенсинтазы; остатки присоединяются к невосстанавливающему концу цепи. Специальный фермент ветвления гликогена создает (α1→6)-связи в точках ветвления.

- Формирование новой частицы гликогена начинается с образования гликозидной связи между остатком глюкозы в UDP-глюкозе и остатком Tyr в белке гликогенине. Затем из нескольких остатков глюкозы образуется короткий фрагмент-праймер для дальнейшего синтеза гликогена под действием гликогенсинтазы. Обе стадии процесса катализирует сам гликогенин.

15.5. Согласованная регуляция синтеза и распада гликогена

Как мы уже обсудили выше, использование запасенного гликогена начинается с действия гликогенфосфорилазы, отщепляющей от гликогена молекулы глюкозо-1-фосфата (рис. 15-25). Регуляция гликогенфосфорилазы — весьма поучительный пример ферментативной регуляции. Для данного фермента одного из первых было обнаружено наличие аллостерической регуляции, и для него впервые было показано, как активность может контролироваться путем обратимого фосфорилирования. Кроме того, он был в ряду первых аллостерических белков, для которых методом рентгеноструктурного анализа была определена детальная трехмерная структура как в активном, так и в неактивном состояниях. На примере гликогенфосфорилазы можно также показать различные функции изоферментов в тканях организма.

Гликогенфосфорилаза подвержена аллостерической и гормональной регуляции

В конце 1930-х гг. Карл и Герти Кори (доп. 15-4) открыли две взаимопревращающиеся формы мышечной гликогенфосфорилазы: каталитически активную **гликогенфосфорилазу a** и менее активную **гликогенфосфорилазу b** (рис. 15-34). Исследования, проведенные позднее Эрлом Сазерлендом, показали, что в мышцах в состоянии

Эрл Сазерленд мл., 1915–1974

покоя преобладает фосфорилаза b, а при активной мышечной деятельности гормон адреналин дает команду фосфорилирования специфического остатка Ser в молекуле фосфорилазы b, в результате чего она превращается в более активную фосфорилазу a. Обратите внимание, что гликогенфосфорилазу часто называют просто

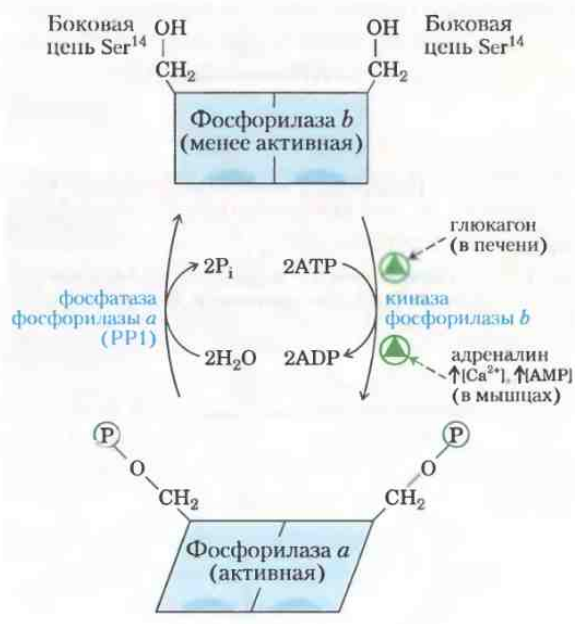


Рис. 15-34. Регуляция мышечной гликогенфосфорилазы путем ковалентной модификации. В более активной форме фермента, называемой фосфорилазой a, остаток Ser^{14} в каждой субъединице фосфорилирован. Фосфорилаза a превращается в менее активную фосфорилазу b в результате ферментативного отщепления этих фосфорильных групп, катализируемого фосфатазой фосфорилазы a (PP1). Фосфорилаза b может вновь превратиться в активную фосфорилазу a под действием киназы фосфорилазы b. (О регуляции гликогенфосфорилазы также см. рис. 6-36.)

фосфорилазой, поскольку она была первой изученной фосфорилазой; такое укороченное название закрепилось и в литературе.

Фермент (киназа фосфорилазы b), ответственный за активацию фосфорилазы путем переноса фосфорильной группы на остаток Ser, активируется адреналином или глюкагоном в серии реакций, изображенных на **рис. 15-35**. Сазерленд открыл вторичный мессенджер cAMP, концентрация которого увеличивается при стимуляции адреналином (в мышцах) или глюкагоном (в печени). Повышенная концентрация cAMP инициирует **ферментативный каскад** — один катализатор активирует другой, а тот в свою очередь, активирует третий. Каскадный механизм позволяет значительно усилить первоначальный сигнал (см. выделение в рамках розового цвета на рис. 15-35). Увеличение концентрации cAMP активирует cAMP-зависимую протеинкиназу, иначе называемую протеинкиназой A (PKA). Затем PKA фосфорилирует и активирует **киназу фосфорилазы b**, которая катализирует фосфорилирование остатка Ser в каждой из двух идентичных субъединиц гликогенфосфорилазы, что приводит к активации

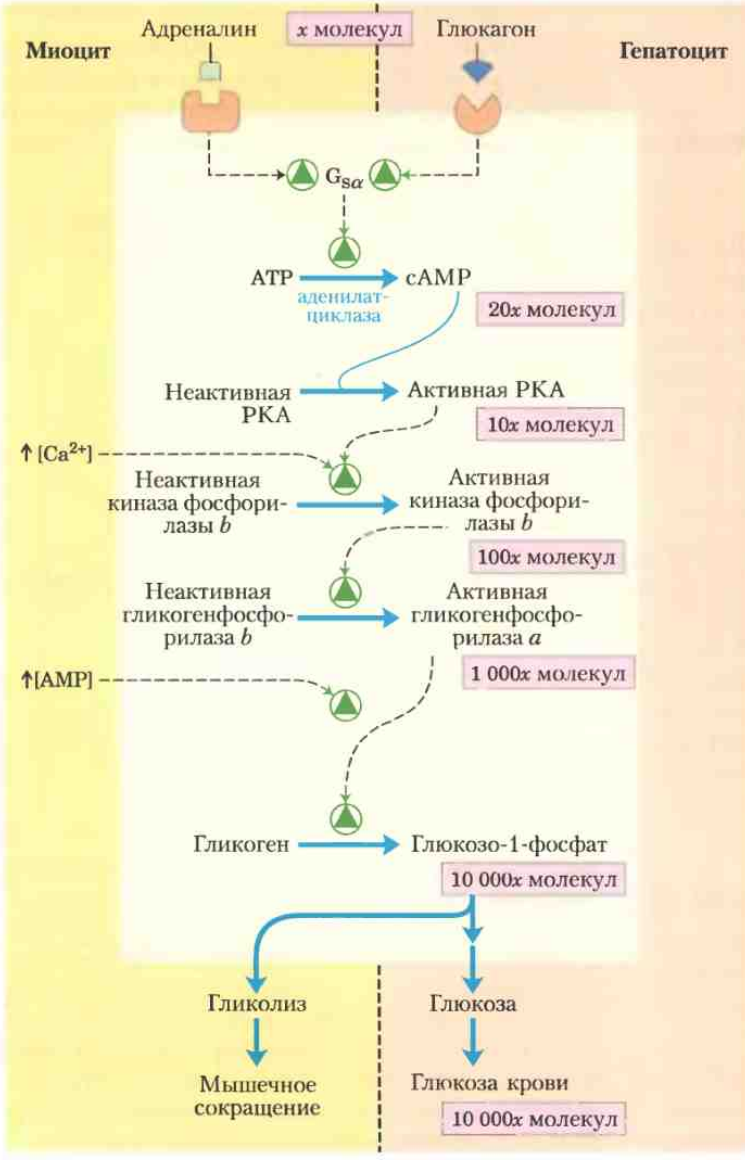


Рис. 15-35. Каскадный механизм действия адреналина и глюкагона. Действие адреналина на клетки мышц (*слева*) или глюкагона на клетки печени (*справа*), опосредованное специфическими рецепторами на поверхности клеток, приводит к активации GTP-связывающего белка $G_{s\alpha}$ (см. рис. 12-12). Активный $G_{s\alpha}$ способствует повышению концентрации cAMP, тем самым активируя PKA. Данные события вызывают серию реакций фосфорилирования; PKA активирует киназу фосфорилазы b, которая затем активирует гликогенфосфорилазу. Подобный каскадный механизм приводит к значительному усилению исходного сигнала; цифры в розовых рамках указывают нижние границы реального увеличения числа молекул на каждой ступени каскада. В результате разложения гликогена образуется глюкоза, которая в миоцитах может стать источником ATP (путем гликолиза) для мышечной активности, а через гепатоциты может выделиться в кровь для повышения слишком низкой концентрации глюкозы крови.

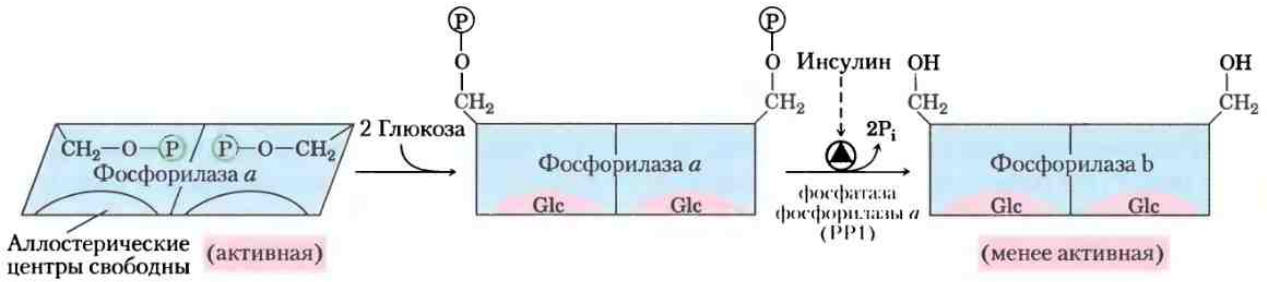


Рис. 15-36. Гликогенфосфорилаза печени как сенсор глюкозы. Связывание глюкозы в аллостерическом центре изофермента фосфорилазы a в печени вызывает конформационные изменения, приводящие к тому, что фосфорилированные остатки Ser в молекуле фермента становятся доступны для действия фосфатазы фосфорилазы a (PP1). Эта фосфатаза превращает фосфорилазу a в фосфорилазу b, резко снижая активность фермента и замедляя разложение гликогена; так происходит при высоком уровне глюкозы крови. Косвенным образом инсулин также стимулирует PP1 и замедляет разложение гликогена.

фермента и стимулирует разложение гликогена. В мышцах этот процесс способствует получению энергии для гликолиза, необходимого для поддержания активности мышц в реакции «борьбы или бегства», сигналом которой служит адреналин. Разложение гликогена и образование глюкозы в печени направлено против снижения уровня глюкозы крови — сигналом служит глюкагон. Различие функций адреналина и глюкагона нашло свое отражение в тонких деталях механизмов регуляции ферментов в мышцах и печени. Гликогенфосфорилазы мышц и печени — изоферменты, они кодируются разными генами и имеют собственные особенности регуляции.

В мышцах регуляция фосфорилазы достигается в результате ковалентной модификации и двух механизмов аллостерического взаимодействия (рис. 15-35). Ионы Ca^{2+}, служащие сигналом мышечного сокращения, связываются с киназой фосфорилазы b и активируют ее, в результате чего она превращается в активную форму a. Ионы Ca^{2+} связывают киназу фосфорилазы b через ее Δ-субъединицу, представляющую собой кальмодулин (см. рис. 12-11). При активной работе мышц в результате разложения ATP накапливается AMP, который связывается фосфорилазой и активирует ее, ускоряя тем самым высвобождение глюкозо-1-фосфата из гликогена. При определенной концентрации ATP блокирует аллостерический центр, с которым связывается AMP, и тем самым инактивирует фосфорилазу.

Когда мышцы возвращаются в состояние покоя, фермент **фосфатаза фосфорилазы a**, иначе называемая **фосфопротеинфосфатазой-1 (PP1)**, удаляет от фосфорилазы a фосфатную группу, превращая ее в менее активную фосфорилазу b.

Подобно ферменту из мышц, гликогенфосфорилаза из печени подвержена как гормональной (путем фосфорилирования и дефосфорилирования), так и аллостерической регуляции. Дефосфорилированная форма фермента практически неактивна. При очень низком уровне глюкозы крови глюкагон (в соответствии с тем же каскадным механизмом, что изображен на рис. 15-35) активирует киназу фосфорилазы b, что превращает ее в активную форму a и способствует поступлению в кровь глюкозы. При возвращении уровня глюкозы крови к норме глюкоза проникает в гепатоциты и связывается с ингибиторным аллостерическим центром молекулы фосфорилазы a. Это связывание также приводит к конформационным изменениям, в результате которых фосфорилированные остатки Ser становятся доступными для действия PP1, которая катализирует их дефосфорилирование и инактивирует фосфорилазу (**рис. 15-36**). Наличие аллостерического центра связывания глюкозы позволяет печеночной форме гликогенфосфорилазы действовать в качестве сенсора глюкозы и соответствующим образом реагировать на изменения уровня глюкозы крови.

Регуляция гликогенсинтазы также осуществляется путем фосфорилирования–дефосфорилирования

Подобно гликогенфосфорилазе, гликогенсинтаза может существовать в фосфорилированной и дефосфорилированной формах (**рис. 15-37**). Активная форма этого фермента — **гликогенсинтаза a** — не фосфорилирована. Фосфорилирование гидроксильных групп некоторых остатков Ser в обеих субъединицах фермента превращает гликогенсинтазу a в **гликогенсинтазу b**, которая проявляет активность только в присутствии своего аллостерического активатора глюкозо-6-фосфата. Интересно, что фосфорилирование различных остатков гликогенсинтазы могут осуществлять 11 различных протеинкиназ. Наиболее важную роль в регуляции играет **киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3)**, присоединяющая фосфатные группы к трем остаткам серина вблизи С-конца молекулы гликогенсинтазы, что полностью инактивирует фермент. Действие GSK3 подчиняется определенной иерархии: она не может осуществлять фосфорилирование до тех пор, пока расположенный поблизости остаток гликогенсинтазы не будет фосфорилирован (**праймирован**) ферментом **казеинкиназой II (CKII**; **рис. 15-38, *а***).

В печени превращение гликогенсинтазы b в активную форму осуществляется при помощи PP1, которая связана с гранулой гликогена. PP1 удаляет фосфатные группы с трех остатков серина, фосфорилированных под действием GSK3. Глюкозо-6-фосфат может связываться с аллостерическим центром на молекуле гликогенсинтазы b, что усиливает дефосфорилирующую активность PP1. По аналогии с гликогенфосфорилазой, действующей в качестве сенсора глюкозы, гликогенсинтазу можно рассматривать как сенсор глюкозо-6-фосфата. Ту роль, что PP1 играет в печени, в мышцах может исполнять другая фосфатаза, которая также активирует гликогенсинтазу путем дефосфорилирования.

Действие инсулина опосредовано киназой 3 гликогенсинтазы

Как мы обсуждали в гл. 12, один из способов действия инсулина — активация протеинкиназы (протеинкиназы B, PKB), которая в свою очередь фосфорилирует и инактивирует GSK3 (**рис. 15-39**; см. также рис. 12-16). Фосфорилирование остатка Ser в N-концевой области GSK3 превращает этот фрагмент белка в псевдосубстрат, который занимает участок, где в норме должно происходить

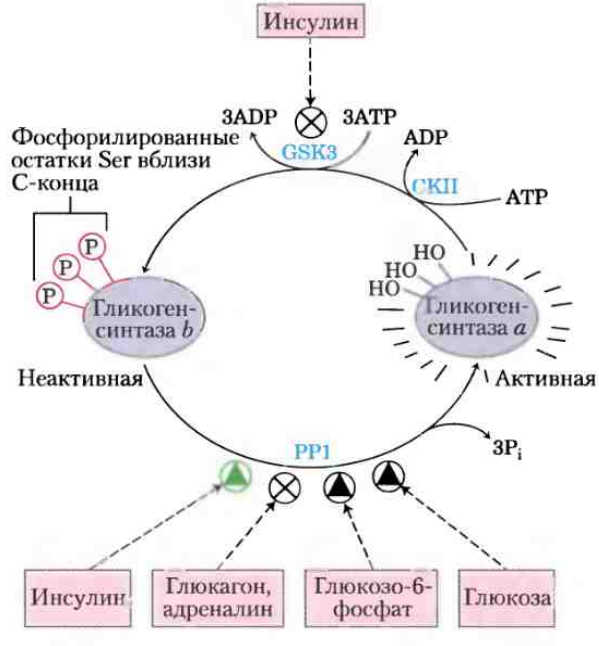


Рис. 15-37. Влияние GSK3 на активность гликогенсинтазы. Активная форма фермента — гликогенсинтаза a — в С-концевой области имеет три остатка Ser, которые фосфорилирует киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3), переводя фермент в неактивную форму b (GSb). GSK3 может начать свое действие лишь после того, как казеинкиназа (CKII) осуществит фосфорилирование соседнего остатка. Инсулин способствует активации гликогенсинтазы b путем ингибирования GSK3 (подробнее см. рис. 12-16) и стимуляции фосфопротеинфосфатазы (PP1 в мышцах и другой фосфатазы в печени). В мышцах адреналин активирует PKA, которая фосфорилирует гликогенсвязывающий белок G_M (см. рис. 15-40) в определенном участке, что приводит к высвобождению PP1 из комплекса с гликогеном. Глюкозо-6-фосфат благоприятствует дефосфорилированию гликогенсинтазы, поскольку при его связывании фермент принимает такую конформацию, в которой он является хорошим субстратом для PP1. Глюкоза также способствует дефосфорилированию; связывание глюкозы с гликогенфосфорилазой a приводит к конформационным изменениям, благоприятствующим ее дефосфорилированию и превращению в гликогенфосфорилазу b, в результате чего снимается ингибирование PP1 (см. рис. 15-39).

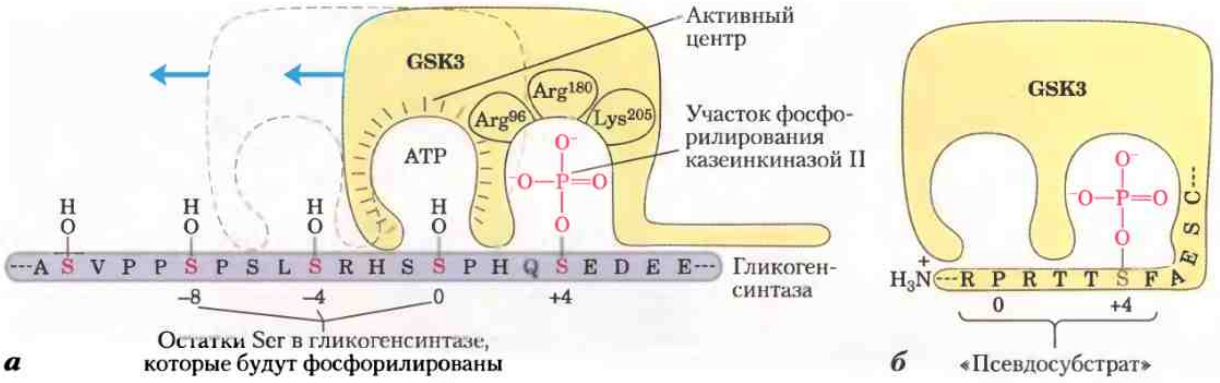


Рис. 15-38. Фосфорилирование гликогенсинтазы под действием GSK3. *а* — киназа 3 гликогенсинтазы сначала связывается со своим субстратом (гликогенсинтазой) путем взаимодействия между тремя положительно заряженными остатками (Arg^{96}, Arg^{180} и Lys^{205}) и фосфорилированным остатком Ser в положении +4 в молекуле субстрата. (Здесь тот остаток Thr или Ser в молекуле субстрата, который фосфорилируется первым, находится в положении 0. Остатки, расположенные ближе к N-концу, имеют нумерацию –1, –3 и т. д., а те, что находятся ближе к C-концу, соответствуют положениям +1, +2 и т. д.) Взаимодействие приводит к совмещению активного центра фермента и остатка Ser в положении 0, который и фосфорилируется. После этого фермент сдвигается вдоль полипептидной цепи и последовательно фосфорилирует остатки Ser в положениях –4 и –8. *б* — в N-концевой области GSK3 существует остаток Ser, который может подвергаться фосфорилированию под действием PKA или PKB (см. рис. 15-39). В результате такого фосфорилирования образуется участок, имитирующий субстрат, который закрывает активный центр и делает его недоступным для нормального субстрата. Это ингибирует активность GSK3 до тех пор, пока фосфатная группа в этой «псевдосубстратной» области не будет удалена при помощи PP1. Чтобы GSK3 могла начать свою работу, другие белки — субстраты GSK3 — также должны быть предварительно фосфорилированы по положению +4 под действием другой протеинкиназы. (О регуляции гликогенсинтазы см. также рис. 6-37 и 12-22, *б*.)

связывание предварительно фосфорилированного остатка серина (рис. 15-38, *б*). Это предотвращает связывание GSK3 с нормальным фосфорилированным субстратом, что в результате инактивирует фермент и смещает равновесие в сторону дефосфорилирования гликогенсинтазы под действием PP1. Гликогенфосфорилаза также может влиять на фосфорилирование гликогенсинтазы: активная гликогенфосфорилаза ингибирует PP1, не давая ей активировать гликогенсинтазу (рис. 15-37).

Хотя сначала была выяснена роль GSK3 в метаболизме гликогена (отсюда и название фермента — киназа гликогенсинтазы), очевидно, что фермент имеет гораздо более широкий диапазон функций, чем только регуляция гликогенсинтазы. Он осуществляет передачу сигнала от инсулина и других факторов роста и питательных веществ, а также принимает участие в определении клеточного развития в эмбриональной фазе. Его мишенями являются белки цитоскелета, а также важные белки, задействованные в синтезе мРНК и белка. Эти мишени, подобно гликогенсинтазе, до начала действия GSK3 должны подвергнуться фосфорилированию другой протеинкиназой.

Центральная роль фосфопротеинфосфатазы 1 в метаболизме гликогена

Один и тот же фермент PP1 способен удалять фосфатные группы со всех трех ферментов, фосфорилированных в ответ на сигнал глюкагона (в печени) и адреналина (в печени и мышцах): киназы фосфорилазы, гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы. Инсулин стимулирует синтез гликогена путем активации PP1 и инактивации GSK3.

PP1 не существует в свободной форме в цитозоле; она прочно связана со своими белками-мишенями (киназой фосфорилазы, гликоген-

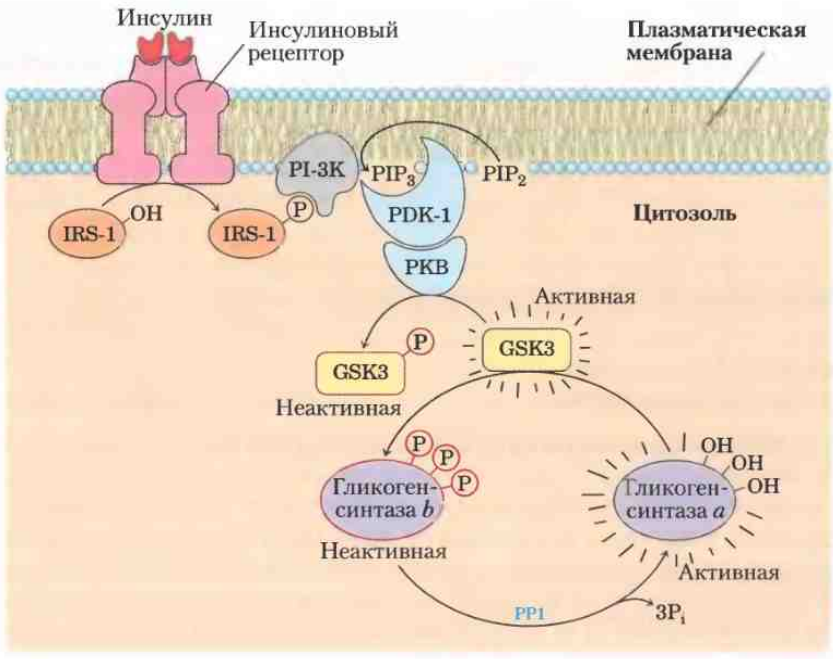


Рис. 15-39. Связь между инсулином, GSK3 и гликогенсинтазой. Связывание инсулина с его рецептором активирует тирозинкиназную активность рецептора, что приводит к фосфорилированию субстрата-1 инсулинового рецептора (IRS-1). Далее фосфотирозин данного белка связывается фосфатидилинозит-3-киназой (PI-3K), превращающей фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат (PIP_2) в плазматической мембране в фосфатидилинозит-3,4,5-трисфосфат (PIP_3). Протеинкиназа PDK-1, активирующаяся при связывании с PIP_3, активирует вторую протеинкиназу (PKB), что приводит к фосфорилированию киназы 3 гликогенсинтазы (GSK3) и образованию в ее молекуле «псевдосубстратной» области; это инактивирует фермент в соответствии с механизмом, изображенным на рис. 15-38, *б*. Инактивация GSK3 позволяет фосфопротеинфосфатазе-1 (PP1) дефосфорилировать гликогенсинтазу и перевести ее в активное состояние. Таким образом инсулин стимулирует синтез гликогена. Подробнее действие инсулина изображено на рис. 12-16.

фосфорилазой и гликогенсинтазой) с помощью одного из белков из семейства **гликогенсвязывающих белков**, который связывает гликоген (**рис. 15-40**). Сама PP1 является объектом ковалентной и аллостерической регуляции; она инактивируется при фосфорилировании под действием PKA и активируется при аллостерическом взаимодействии с глюкозо-6-фосфатом.

Аллостерические и гормональные сигналы координируют метаболизм углеводов

Рассмотрев механизмы, управляющие работой отдельных ферментов, мы можем обратиться к тем изменениям в метаболизме углеводов, которые происходят при нормальном питании, при голодании и при реакции «борьба или бегство»; их сигналами служат инсулин, глюкагон и адреналин соответственно. Мы рассмотрим два случая, в которых регуляция направлена на разные цели: 1) обеспечение крови глюкозой с помощью гепатоцитов; 2) использование углеводов в качестве источника энергии другими тканями (в частности, миоцитами скелетных мышц) для обеспечения собственных нужд.

После приема богатой углеводами пищи происходит повышение уровня глюкозы крови, что приводит к высвобождению инсулина (верхняя часть **рис. 15-41**). В гепатоцитах инсулин немедленно оказывает два действия: инактивирует GSK3 через каскад, изображенный на рис. 15-39, и активирует протеинфосфатазу, возможно, PP1. Эти два действия полностью активируют гликогенсинтазу. Кроме того, путем дефосфорилиро-

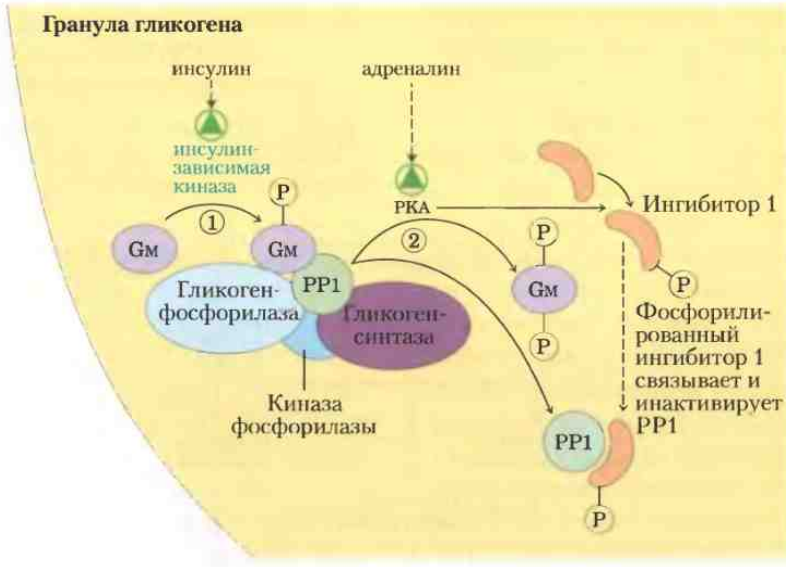


Рис. 15-40. Гликогенсвязывающий белок G_M. Гликогенсвязывающий белок G_M относится к семейству белков, связывающих другие белки (в том числе PP1) с гранулами гликогена. В ответ на сигнал инсулина или адреналина белок G_M может фосфорилироваться по двум различным положениям. 1) Фосфорилирование G_M в участке 1, стимулированное инсулином, активирует PP1, которая дефосфорилирует киназу фосфорилазы, гликогенфосфорилазу и гликогенсинтазу. 2) Фосфорилирование G_M в участке 2, вызванное адреналином, приводит к диссоциации PP1 из частицы гликогена, перекрывая ей доступ к гликогенфосфорилазе и гликогенсинтазе. PKA также фосфорилирует ингибитор 1, который в фосфорилированном состоянии ингибирует PP1. Так инсулин ингибирует разложение гликогена и стимулирует его синтез; адреналин (или глюкагон в печени) оказывает противоположное действие.

вания PP1 инактивирует гликогенфосфорилазу а и киназу фосфорилазы, что останавливает разложение гликогена. Глюкоза поступает в гепатоциты с помощью GLUT2, который всегда присутствует в плазматической мембране; повышенный уровень внутриклеточной глюкозы приводит к диссоциации гексокиназы IV (глюкокиназы) из комплекса с ядерным белком. Гексокиназа IV проникает в цитозоль и фосфорилирует глюкозу, стимулируя гликолиз и поставляя субстрат для синтеза гликогена. В таких условиях гепатоциты используют глюкозу крови для синтеза гликогена, количество которого может достигать 10% общей массы печени.

Между приемами пищи или в период продолжительного голодания падение уровня глюкозы крови приводит к высвобождению глюкагона, который активирует PKA, действуя через каскадный механизм, изображенный на рис. 15-35. PKA опосредует все эффекты, оказываемые глюкагоном (нижняя область рис. 15-41), — фосфорилирует киназу фосфорилазы, активируя ее и приводя к активации гликогенфосфорилазы; фосфорилирует гликогенсинтазу, инактивируя ее и блокируя синтез гликогена; она фосфорилирует белок с активностью PFK-2/FBPазы-2, что приводит к снижению концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата, а это выражается в свою очередь в инактивации фермента гликолиза PFK-1 и активации фермента глюконеогенеза FBPазы-1; наконец, PKA фосфорилирует и инактивирует гликолитический фермент пируваткиназу. При таких условиях в результате распада гликогена и глюконеогенеза в печени происходит образование глюкозо-6-фосфата, прекращается использование глюкозы для обеспечения энергией гликолиза или для синтеза гликогена, и все это увеличивает количество глюкозы, поступающей из печени в кровь.

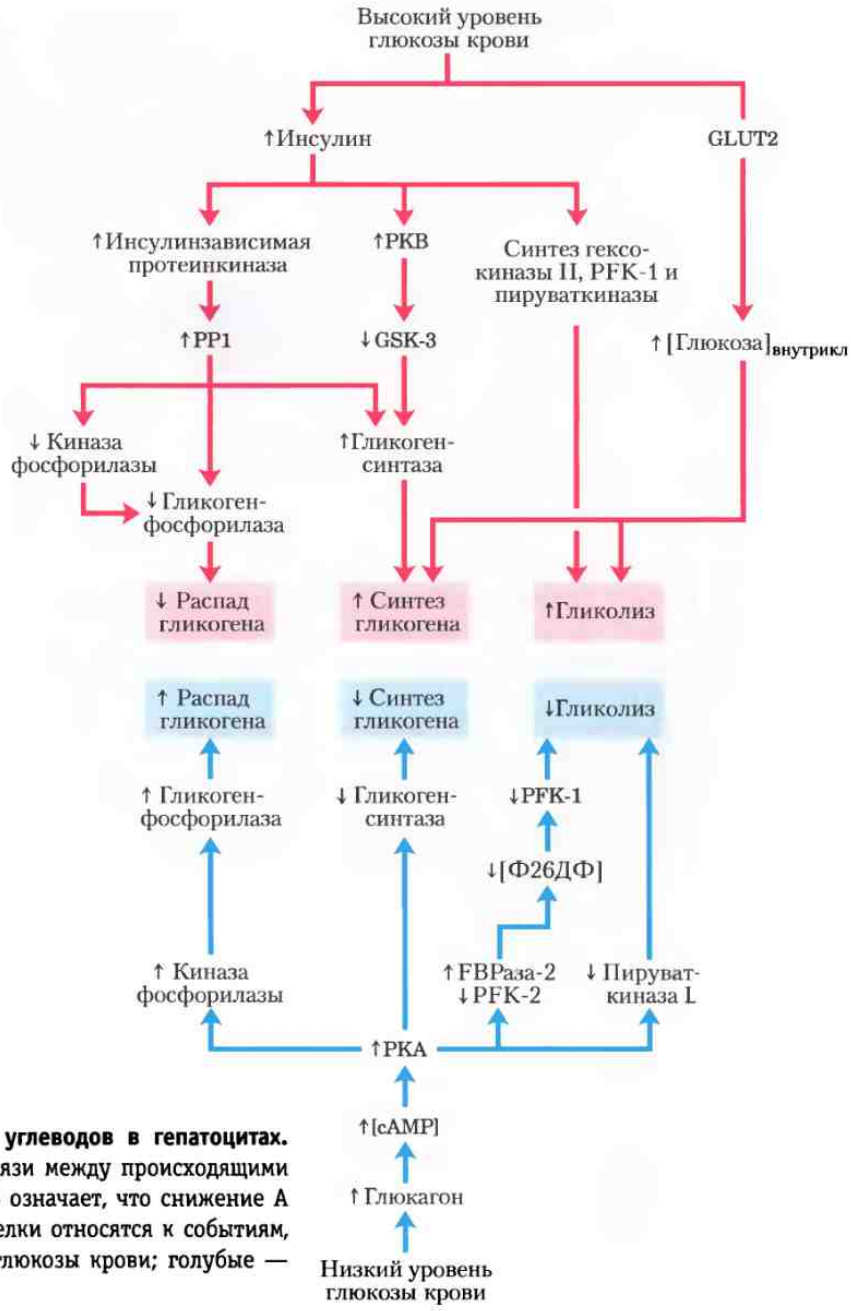


Рис. 15-41. Регуляция метаболизма углеводов в гепатоцитах. Стрелки указывают на причинные связи между происходящими изменениями. Обозначение ↓A → ↑B означает, что снижение A вызывает повышение B. Розовые стрелки относятся к событиям, происходящим при высоком уровне глюкозы крови; голубые — при низком уровне глюкозы.

Подобное высвобождение глюкозы возможно только в печени, поскольку в других тканях отсутствует глюкозо-6-фосфатаза (рис. 15-28).

В регуляции метаболизма физиология скелетных мышц отличается от физиологии печени по трем важным пунктам (рис. 15-42). 1) Мышцы используют запасенный в них гликоген только для собственных нужд. 2) При переходе от состояния покоя к активному мышечному сокращению сильно меняются потребности мышц в АТР, которые обеспечиваются гликолизом. 3) Мышцы не имеют необходимого ферментативного аппарата для проведения глюконеогенеза. Регуляция метаболизма углеводов в мышцах как раз и отражает эти отличия от метаболизма в печени. Во-первых, в миоцитах нет рецептора глюкагона. Во-вторых, мышечная изоформа пируваткиназы не фосфорилируется PKA, так что

гликолиз не прекращается при высокой концентрации cAMP. На самом деле cAMP повышает скорость гликолиза в мышцах, возможно, путем активации гликогенфосфорилазы. При поступлении в кровь адреналина при реакции «борьба или бегство» увеличение концентрации cAMP приводит к активации PKA, которая фосфорилирует и активирует киназу гликогенфосфорилазы. Фосфорилирование и активация гликогенфосфорилазы приводят к ускорению распада гликогена. При слабом стрессе адреналин не выделяется, но при любоq нейрональной стимуляции мышц концентрация Ca^{2+} в цитозоле быстро увеличивается, что активирует киназу фосфорилазы через ее субъединицу кальмодулин.

Повышенный уровень инсулина приводит к усилению синтеза гликогена в миоцитах через активацию PP1 и инактивацию GSK3. В отличие от гепатоцитов в миоцитах GLUT4 запасается во внутриклеточных везикулах. Инсулин провоцирует их перемещение к плазматической мембране, где они усиливают захват глюкозы. Следовательно, в ответ на сигнал инсулина миоциты помогают снизить уровень глюкозы крови, усиливая ее поглощение, синтез гликогена и гликолиз.

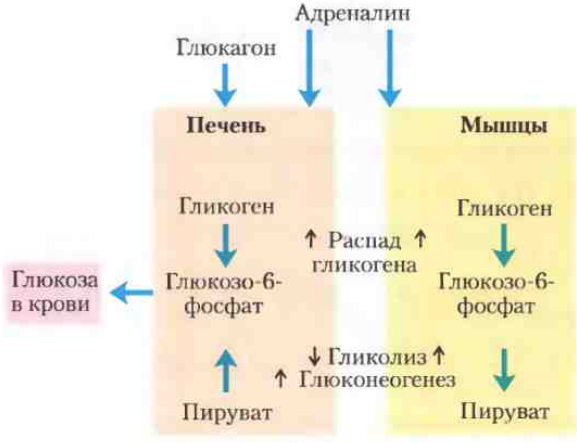


Рис. 15-42. Различная регуляция углеводного обмена в печени и в мышцах. В печени либо глюкагон (при низкой концентрации глюкозы в крови), либо адреналин (в ситуации «борьбы или бегства») вызывают максимальный выброс глюкозы в кровоток. В мышцах адреналин увеличивает распад гликогена и гликолиз, и эти процессы обеспечивают образование необходимого для сокращения количества ATP.

Метаболизм углеводов и жиров связаны гормональными и аллостерическими механизмами регуляции

Как ни сложна регуляция метаболизма углеводов, это лишь часть регуляции всего энергетического обмена. Метаболизм жиров и жирных кислот самым тесным образом связан с метаболизмом углеводов. Такие гормональные сигналы, как сигнал инсулина, изменение питания или физическая нагрузка оказывают одинаково важное воздействие на регуляцию метаболизма жиров и его связь с метаболизмом углеводов. Мы обратимся к теме общего метаболизма у млекопитающих в гл. 23, рассмотрев предварительно пути метаболизма жиров и аминокислот (гл. 17 и 18). Здесь мы лишь хотим подчеркнуть, что пути метаболизма подчиняются строгому контролю, который чрезвычайно чутко реагирует на изменения метаболической ситуации. Механизмы регуляции направлены на то, чтобы привести поток метаболитов через метаболические пути в соответствие с текущими нуждами клетки и организма и сделать это с минимальными изменениями концентраций интермедиатов, задействованных в других метаболических путях.

Краткое содержание раздела 15.5 СОГЛАСОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА И РАСПАДА ГЛИКОГЕНА

- Гликогенфосфорилаза активируется в ответ на действие глюкагона или адреналина, которое повышает концентрацию cAMP и активирует PKA. Далее PKA фосфорилирует и активирует киназу фосфорилазы, которая превращает гликогенфосфорилазу b в активную форму a. Фосфопротеинфосфатаза 1 (PP1) осуществляет обратную реакцию, инактивируя фосфорилазу a. Глюкоза связывается с печеночным изоферментом гликогенфосфорилазой a, способствуя его дефосфорилированию и инактивации.

- Гликогенсинтаза a инактивируется в результате фосфорилирования, катализируемого GSK3. Инсулин блокирует действие GSK3. Активируемая инсулином PP1 снимает ингибирование путем дефосфорилирования гликогенсинтазы b.

- Инсулин усиливает поглощение глюкозы миоцитами и адипоцитами, способствуя перемещению переносчика глюкозы GLUT4 к плазматической мембране.

- Инсулин стимулирует синтез гексокиназ II и IV, PFK-1, пируваткиназы и нескольких ферментов, задействованных в синтезе липидов. Инсулин стимулирует синтез гликогена в печени и мышцах.

- В печени глюкагон активизирует распад гликогена и глюконеогенез и блокирует гликолиз, тем самым сохраняя глюкозу для нужд головного мозга и других тканей.

- В мышцах адреналин стимулирует распад гликогена и гликолиз, обеспечивая клетки АТР для мышечного сокращения.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

4-α-D-глюкано-трансфераза 156
GLUT2 142
UDP-глюкозопирофосфорилаза 161
аденилаткиназа 130
AMP-зависимая протеинкиназа (AMPK) 130
гексокиназа I 141
гексокиназа II 140
гексокиназа IV 141
гликогенез 155
гликогенин 163
гликогенолиз 155
гликогенсвязывающие белки 170
гликогенсинтаза a 168
гликогенсинтаза b 168
гликогенфосфорилаза a 165
гликогенфосфорилаза b 165
глюкагон 144
глюкозо-1-фосфат 155
глюкозо-6-фосфат 121
глюконеогенез 139
гомеостаз 123
дифференцировка клеток 124
казеинкиназа II (CKII) 168
киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3) 168
киназа фосфорилазы b 166
коэффициент управления C 134, 135
коэффициент эластичности ε 134, 136
метаболическая регуляция 127
метаболический контроль 127
метаболом 126
оборот 125
отклик R 135, 136
отношение действующих масс *Q* 128
праймирование 168
протеом 126
респонсивный элемент 124
сахаронуклеотиды 158
субстратный цикл 140
1,4→1,6-трансгликозидаза 163
транскриптом 126
фактор транскрипции 124
фактор транскрипции ChREBP 150
фактор транскрипции CREB 151
фактор транскрипции FOXO1 151
фактор транскрипции SREBP 151
фермент, расщепляющий участок ветвления 156
ферментативный каскад 166
фиксация замораживанием 176
фосфоглюкомутаза 157
фосфопротеинфосфатаза 1 (PP1) 167
фосфофруктокиназа-2 (PFK-2) 146
фруктозо-2,6-бисфосфат 144
фруктозо-2,6-бисфосфата-за (FBPаза-2) 146
холостой цикл 140

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Регуляция путей метаболизма

Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Подробный обзор среднего уровня сложности.

Gibson, D. & Harris, R.A. (2001) *Metabolic Regulation in Mammals*, Taylor & Francis, New York.

Прекрасно описана регуляция метаболизма.

Storey, K.B. (ed.). (2004) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss, Inc., Hoboken, NJ.

Превосходное обсуждение принципов регуляции метаболизма, передачи сигналов, контроля транскрипции и энергетического метаболизма в норме и при патологии.

Теория контроля метаболизма

Fell, D.A. (1992) Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development. *Biochem. J.* **286**, 313–330.

Четко изложены принципы теории контроля метаболизма.

Fell, D.A. (1997) *Understanding of the Control of Metabolism*, Portland Press, Ltd., London.

Очень понятно объяснена метаболическая регуляция с привлечением теории контроля метаболизма. Если вы хотите ограничиться изучением лишь одной книги по теории контроля метаболизма — прочтите эту.

Heinrich, R. & Rapoport, T.A. (1974) A linear steady-state treatment of enzymatic chains: general properties, control and effector strength. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89–95.

Одна из пионерских работ, где приведен отчет об экспериментах по изучению контроля метаболизма. См. (ниже) также работу Kacser & Burns.

Jeffrey, F.M.H., Rajagopal, A., Maloy, C.R., & Sherry, A.D. (1991) ^{13}C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 5–10.

Краткий обзор среднего уровня сложности.

Kacser, H. & Burns, J.A. (1973) The control of flux. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **32**, 65–104.

Классическая работа по данной теме.

Kacser, H., Burns, J.A., & Fell, D.A. (1995) The control of flux: 21 years on. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 341–366.

Schilling, C.H., Schuster, S., Palsson, B.O., & Heinrich, R. (1999) Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol. Prog.* **15**, 296–303.

Краткое обсуждение теоретических выкладок, имеющих целью отыскать пути управления метаболизмом для оптимизации образования продуктов метаболизма. Среднего уровня сложности.

Schuster, S., Fell, D.A., & Dandekar, T. (2000) A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat. Biotechnol.* **18**, 326–332.

Интересное теоретическое рассмотрение связи между пентозофосфатным путем и гликолизом.

Westerhoff, H.V., Hofmeyr, J.-H.S., & Kholodenko, B.N. (1994) Getting to the inside of cells using metabolic control analysis. *Biophys. Chem.* **50**, 273–283.

Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза

Armoni, M., Harel, C., & Karnieli, E. (2007) Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 100–107.

Barthel, A., Schmoll, D., & Unterman, T.G. (2005) FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 183–189.

Обзор среднего уровня сложности о влиянии факторов транскрипции на метаболизм углеводов.

Brady, M.J., Pessin, J.E., & Saltiel, A.R. (1999) Spatial compartmentalization in the regulation of glucose metabolism by insulin. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 408–413.

Обзор среднего уровня сложности.

Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 18–24.

Обзор среднего уровня сложности по AMPK и ее роли в энергетическом метаболизме.

de la Iglesia, N., Mukhtar, M., Seoane, J., Guinovart, J.J., & Agius, L. (2000) The role of the regulatory protein of glucokinase in the glucose sensory mechanism of the hepatocyte. *J. Biol. Chem.* **275**, 10597–10603.

Об экспериментальном определении коэффициента управления потока для глюкокиназы и ее регуляторного белка в гепатоцитах.

Dean, L. & McEntyre, J. (2004) The Genetic Landscape of Diabetes, National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=diabetes.

Отличная очень легкая для чтения книга (имеется в свободном доступе в интернете). Введение в проблему диабета, история изучения диабета и главы, посвященные генетическим факторам в развитии ИЗСД, ИНЗСД и MODY.

Desverne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Исчерпывающий обзор повышенного уровня сложности по факторам транскрипции, включая те, которые регулируют метаболизм углеводов и жиров.

Hardie, D.G. (2007) AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 185–210.

Обзор повышенного уровня сложности с акцентом на возможную роль этого фермента при диабете II типа.

Herman, M.A. & Kahn, B.B. (2006) Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin. Invest.* **116**, 1767–1775.

Прекрасно иллюстрированный обзор среднего уровня сложности.

Hers, H.G. & Van Schaftingen, E. (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem. J.* **206**, 1–12.

Классическое описание регуляторных молекул и их роли в регуляции метаболизма углеводов.

Hue, L. & Rider, M.H. (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J.* **245**, 313–324.

Jorgensen, S.B., Richter, E.A., & Wojtaszewski, J.F.P. (2006) Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J. Physiol.* **574**, 17–31.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D.G. (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25.

Хорошо иллюстрированный обзор среднего уровня сложности.

Long, Y.C. & Zierath, J.R. (2006) AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1776–1783.

Краткий обзор повышенного уровня сложности по роли AMPK в метаболизме; содержит данные о нокаутных мышах.

Nordlie, R.C., Foster, J.D., & Lange, A.J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 379–406.

Полный обзор.

Okar, D.A., Manzano, A., Navarro-Sabate, A., Riera, L., Bartrons, R., & Lange, A.L. (2001) PFK-2/FBPase-2: ma-

ker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 30–35.

Краткий обзор, посвященный бифункциональной киназе/фосфатазе.

Pilkis, S.J. & Granner, D.K. (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885–909.

Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P.-D., & Girard, J. (2007) ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **27**, 179–192.

Обзор среднего уровня сложности по роли транскрипционного фактора ChREBP в метаболизме углеводов.

Shirmer, T. & Evans, P.R. (1990) Structural basis of the allosteric behavior of phosphofructokinase. *Nature* **343**, 140–145.

Towle, H.C. (2005) Glucose as a regulator of eukaryotic gene transcription. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 489–494.

Обзор среднего уровня сложности.

Towler, M.C. & Hardie, D.G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* **100**, 328–341.

van Shaftingen, E. & Gerin, I. (2002) The glucose-6-phosphatase system. *Biochem. J.* **362**, 513–532.

Veech, R.L. (2003) *A humble hexose monophosphate pathway metabolite regulates sort- and long-term control of lipogenesis.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 5578–5580.

Краткий обзор по работам лаборатории К. Уйеда по изучению роли ксилулозо-5-фосфата в метаболизме углеводов и жиров. Цитированы работы К. Уйеда.

Yamada, K. & Noguchi, T. (1999) Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* **337**, 1–11.

Подробный обзор новых работ по генам и белкам данной системы регуляции.

Метаболизм гликогена у животных

Whelan, W.J. (1976) On the origin of primer for glycogen synthesis. *Trends Biochem. Sci.* **1**, 13–15.

Обзор среднего уровня сложности по открытию, свойствам и роли гликогенина.

Согласованная регуляция синтеза и распад гликогена

Aiston, S., Hampson, L., Gomez-Foix, A.M., Guinovart, J.J., & Agius, L. (2001) Hepatic glycogen synthesis is highly sensitive to phosphorylase activity: evidence from metabolic control analysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 23858–23866.

Jope, R.S. & Johnson, G.V.W. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102.

Хорошо иллюстрированный обзор среднего уровня сложности.

Вопросы и задачи

1. Измерение внутриклеточных концентраций метаболитов. Измерение концентраций промежуточных продуктов (интермедиатов) метаболизма в живой клетке сопряжено с большими экспериментальными трудностями; обычно для определения концентрации метаболита клетки приходится разрушать. Поскольку ферментативные превращения метаболитов происходят очень быстро, обычно измерения дают не физиологическую, а равновесную концентрацию метаболита. Поэтому надежна только такая экспериментальная методика, которая позволяет мгновенно остановить все ферментативные реакции в интактной ткани и тем самым предотвратить дальнейшие превращения промежуточных продуктов метаболизма. Этого можно достичь, быстро поместив ткань между большими алюминиевыми пластинами, которые охлаждаются жидким азотом (−190 °C); этот метод называется **«фиксацией замораживанием»**. После замораживания, мгновенно подавляющего ферментативную активность, ткань измельчают, а ферменты инактивируют путем осаждения хлорной кислотой. Осадок удаляют центрифугированием, а в прозрачной надосадочной жидкости определяют содержание метаболитов. Для расчета внутриклеточных концентраций метаболитов определяют объем внутриклеточного пространства исходя из общего содержания воды в ткани и внеклеточного объема.

В таблице приведены внутриклеточные концентрации субстратов и продуктов реакции, катализируемой фосфофруктокиназой-1, в ткани сердца крысы.

Метаболит	Концентрация (мкМ)*
Фруктозо-6-фосфат	87
Фруктозо-1,6-бисфосфат	22
ATP	11 400
ADP	1 320

Источник: Williamson, J. R. (1965) Glycolytic control mechanisms I: inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* **240**, 2308–2321.

* Размерность — мкмоль/мл внутриклеточной воды.

а) Рассчитайте для реакции, катализируемой PFK-1 в физиологических условиях, отношение действующих масс

$$Q = \frac{[\text{фруктозо-1,6-бисфосфат}][\text{ADP}]}{[\text{фруктозо-6-фосфат}][\text{ATP}]}$$

б) $\Delta G'^{\circ} = -14{,}2$ кДж/моль. Рассчитайте константу равновесия реакции, катализируемой PFK-1.

в) Сравните значения Q и K'_{eq}. Близка ли эта физиологическая реакция к состоянию равновесия? Объясните ответ. Что данный эксперимент говорит о роли PFK-1 в качестве регуляторного фермента?

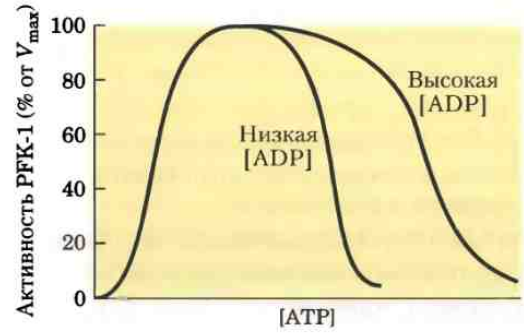
2. Равновесны ли метаболические реакции?

а) Фосфоенолпируват (ФЕП) — один из двух доноров фосфорильных групп для синтеза ATP при гликолизе. В эритроцитах человека стационарная концентрация ATP составляет 2,24 мМ, ADP 0,25 мМ, пирувата 0,051 мМ. Определите концентрацию ФЕП при 25 °С, считая, что в клетке реакция, катализируемая пируваткиназой (см. рис. 13-13), происходит в равновесных условиях.

б) Физиологическая концентрация ФЕП в эритроцитах человека составляет 0,023 мМ. Сравните это значение с тем, что вы получили при ответе на вопрос (а). Чем объясняется различие этих значений?

3. Влияние содержания кислорода на скорость реакций гликолиза. Регулируемые стадии гликолиза в интактных клетках можно идентифицировать, изучая катаболизм глюкозы в целых тканях и органах. Например, потребление глюкозы сердечной мышцей можно найти, если осуществить искусственную циркуляцию крови через изолированное сердце и измерить концентрацию глюкозы в крови до поступления в сердце и на выходе. Если пропускать через сердце кровь без кислорода, то мышца потребляет глюкозу со стационарной скоростью. При обогащении крови кислородом скорость потребления глюкозы резко падает, а затем устанавливается на новом, более низком уровне. Объясните это.

4. Регуляция фосфофруктокиназы-1. Влияние ATP на активность аллостерического фермента PFK-1 показано на рисунке. При определенной концентрации фруктозо-6-фосфата активность PFK-1 увеличивается с ростом концентрации ATP; однако после достижения некоторой точки рост концентрации ATP начинает ингибировать действие фермента.



а) Объясните, почему ATP является как субстратом, так и ингибитором PFK-1. Каким образом ATP осуществляет регуляцию фермента?

б) Каким образом гликолиз регулируется в зависимости от уровня ATP?

в) Ингибирование PFK-1 под действием ATP ослабевает при высокой концентрации ADP, как показано на рисунке. Как вы можете объяснить это явление?

5. Концентрация глюкозы в клетке. Концентрация глюкозы в плазме крови человека поддерживается на уровне 5 мМ, а концентрация свободной глюкозы в миоцитах значительно ниже. Почему концентрация глюкозы в клетках низкая? Что происходит с глюкозой после ее проникновения в клетку? Некоторым пациентам назначают внутривенное введение глюкозы в качестве источника питания. Превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат происходит с затратой ATP, так почему же больным не вводят внутривенно вместо глюкозы глюкозо-6-фосфат?

6. Ферментативная активность и физиологическая функция. Для гликогенфосфорилазы из скелетных мышц V_{max} намного превосходит V_{max} для того же фермента из печени.

а) Каковы физиологические функции гликогенфосфорилазы в скелетных мышцах и в печени?

б) Почему в случае мышечной формы фермента V_{max} должно быть больше, чем в случае фермента из печени?

7. Равновесие реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой. Гликогенфосфорилаза катализирует отщепление глюкозы от молекулы гликогена. $\Delta G'^{\circ}$ этой реакции составляет 3,1 кДж/моль.

а) Определите отношение $[P_i]/[$глюкозо-1-фосфат$]$ для реакции, находящейся в равновесии. (*Подсказка*. Отщепление глюкозы от полимерной молекулы гликогена не влияет на концентрацию гликогена.)

б) В физиологических условиях отношение $[P_i]/[$глюкозо-1-фосфат$]$ в миоцитах превышает 100 : 1. Что это говорит о направлении потока метаболитов в реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой в мышцах?

в) Почему при равновесии и в физиологических условиях значения различаются? В чем смысл этого различия?

8. Регуляция гликогенфосфорилазы. Скорость превращения гликогена в глюкозо-6-фосфат в мышечной ткани определяется отношением концентраций активной фосфорилазы a и менее активной фосфорилазы b. Определите, как изменится скорость расщепления гликогена, если образец мышечной ткани, содержащий гликогенфосфорилазу, обработать а) киназой фосфорилазы и ATP; б) PP1; в) адреналином.

9. Расщепление гликогена в мышцах кролика. Расходование гликогена и глюкозы в клетке регулируется на четырех стадиях гликолиза. Для сравнения регуляции гликолиза при избытке и при недостатке кислорода рассмотрим расходование глюкозы и гликогена в мышцах лап кролика в двух физиологических ситуациях: в состоянии покоя, для которого характерны небольшие затраты ATP, и при приближении смертельного врага кролика койота, от которого кролик вынужден прятаться в норе. Для каждого случая определите относительное содержание (высокое, промежуточное или низкое) AMP, ATP, цитрата и ацетил-CoA, а также влияние, которое оказывает их уровень на поток метаболитов в гликолизе, регулируемый специфическими ферментами. В моменты стресса мышцы лап кролика вырабатывают большую часть ATP путем анаэробного гликолиза (молочнокислого брожения) и лишь немного — при окислении ацетил-CoA, образующегося в результате расщепления жиров.

10. Расщепление гликогена у перелетных птиц. В отличие от кролика, ненадолго скрывающегося в норе, перелетные птицы нуждаются в запасах энергии для длительных перелетов. Например, утки при ежегодной миграции преодолевают расстояния в несколько тысяч километров. Мышцы перелетных птиц обладают высокой окислительной способностью и получают необходимый ATP при окислении ацетил-CoA (из жиров) через цикл лимонной кислоты. Сравните регуляцию гликолиза при краткосрочной активности мышц спасающегося бегством кролика и при длительной активности мышц уток, совершающих перелет. Почему регуляция гликолиза в этих двух случаях должна быть различной?

11. Недостаточность ферментов в метаболизме углеводов. Ниже описаны четыре клинических случая. Для каждого из них определите дефектный фермент и предложите метод лечения из тех, что указаны ниже. Поясните ответ. Ответьте на вопросы, приведенные в описании каждого случая. Возможно, вам придется обратиться к информации, изложенной в гл. 14.

Случай 1. Сразу после употребления молока у больного начинается рвота и понос. Проведен тест на переносимость лактозы: пациент получал определенное количество лактозы, после чего через некоторые промежутки времени у него в плазме крови определяли концентрации глюкозы и галактозы. В норме уровень этих веществ достигает максимального через час, а затем снижается. У больного концентрации глюкозы и галактозы в плазме крови не увеличивались. Объясните, почему при проведении теста у здоровых людей концентрация этих сахаров в крови сначала возрастает, а затем снижается. Почему этого не происходит у больного?

Случай 2. После употребления молока у больного начинается рвота и понос. В крови пациента концентрация глюкозы низкая, но концентрация восстанавливающих сахаров значительно выше нормы. В моче обнаружена галактоза. Почему повышена концентрация восстанавливающих сахаров в крови? Почему в моче появляется галактоза?

Случай 3. У больного после напряженной физической работы появляются судороги, но в остальном он чувствует себя здоровым. Биопсия мышечной ткани выявила повышенную концентрацию гликогена. Почему происходит накопление гликогена?

Случай 4. Пациентка находится в состоянии вялости и апатии. Печень увеличена, при биопсии в печени обнаружено повышенное содержание

гликогена. У больной понижен уровень глюкозы крови. С чем связано понижение концентрации глюкозы в крови у пациентки?

Дефектные ферменты

а) Мышечная фосфофруктокиназа-1
б) Фосфоманноизомераза
в) Галактозо-1-фосфатуридилилтрансфераза
г) Фосфорилаза печени
д) Триозокиназа
е) Лактаза в слизистой кишечника
ж) Мальтаза в слизистой кишечника
з) Мышечный фермент, расщепляющий связи в участках ветвления гликогена

Возможное лечение

1. Ежедневный бег трусцой на 5 км
2. Диета с низким содержанием жиров
3. Диета с низким содержанием лактозы
4. Запрет на тяжелую физическую нагрузку
5. Большие дозы ниацина (предшественника NAD^+)
6. Частый регулярный прием (небольшого количества) обычной пищи

12. Проявления недостаточности инсулина у больного диабетом. Человек с инсулинзависимым диабетом попал в больницу в состоянии, близком к коматозному. Во время отпуска в уединенном месте он потерял лекарства и не принимал инсулин на протяжении двух дней.

а) Для каждой из перечисленных ниже тканей укажите, является ли конкретное метаболическое превращение в данной ситуации более быстрым, более медленным или таким же, как у того же человека при регулярном введении инсулина.

б) Для каждого метаболического пути опишите хотя бы один контрольный механизм, ответственный за предсказанные вами изменения.

Ткани и метаболические пути

1. Жировая ткань: синтез жирных кислот
2. Мышечная ткань: гликолиз, синтез жирных кислот, синтез гликогена
3. Печень: гликолиз, глюконеогенез, синтез гликогена, синтез жирных кислот, пентозофосфатный цикл

13. Уровень метаболитов в крови при недостаточности инсулина. Предскажите уровень следующих метаболитов в крови у пациента, описанного в задаче 12, до проведения лечения в больнице по сравнению с уровнем этих же метаболитов в условиях нормального приема лекарства: (а) глюкоза; (б) кетоновые тела; (в) свободные жирные кислоты.

14. Влияние мутации фермента на метаболизм. Предскажите и объясните влияние каждого дефекта, вызванного мутацией, на метаболизм гликогена: (а) потеря cAMP-связывающего участка на регуляторной субъединице протеинкиназы A (PKA); (б) отсутствие ингибитора протеинфосфатазы (ингибитора 1 на рис. 15-40); (в) повышение уровня экспрессии киназы фосфорилазы b в печени; (г) дефект рецепторов глюкагона в печени.

15. Гормональный контроль метаболических превращений. Между ужином и завтраком уровень глюкозы крови падает, и печень начинает производить, а не расходовать глюкозу. Опишите гормональную основу этих процессов и объясните, каким образом гормональные изменения вызывают синтез глюкозы в печени.

16. Метаболизм генетически измененных мышей. Ученые могут манипулировать генами мыши таким образом, что конкретный ген в конкретной ткани начинает кодировать либо неактивный белок (так называемая «нокаутная» мышь с «выключенным» геном), либо постоянно активированный (конститутивно активный) белок. Какие изменения метаболизма произойдут в организме мыши со следующими генетическими изменениями: (а) выключение в печени фермента, расщепляющего участки ветвления гликогена; (б) выключение гексокиназы IV в печени; (в) выключение фруктозо-1,6-бисфосфатазы-2 (FBPазы-2) в печени; (г) конститутивная активность FBPазы-2 в печени; (д) конститутивная активность AMP-зависимой протеинкиназы в мышцах; (е) конститутивная активность белка ChREBP в печени?

Анализ экспериментальных данных

17. Строение гликогена. При физической нагрузке мышечным клеткам необходимо быстрое поступление больших количеств глюкозы. Глюкоза запасена в печени и в скелетных мышцах в полимерной форме в виде гранул гликогена. Обычно

гранула гликогена содержит около 55 000 остатков глюкозы (см. рис. 15-33, *б*). Мелендез-Хевиа, Уэдделл и Шелтон в 1993 г. рассмотрели некоторые теоретические аспекты строения гликогена, что изложено в данной задаче.

а) Концентрация гликогена в клетках печени составляет около 0,01 М. Какой должна быть концентрация свободной глюкозы в клетках, чтобы ее количество было эквивалентно этой величине? Почему такое содержание свободной глюкозы проблематично для клетки?

Глюкоза высвобождается из гликогена с помощью фермента гликогенфосфорилазы, который отщепляет от одного конца цепи гликогена по одному остатку глюкозы. Цепи гликогена разветвленные (см. рис. 15-26 и 15-33, *б*), а степень ветвления (т. е. количество ветвлений в каждой цепи) сильно влияет на скорость высвобождения глюкозы.

б) Почему при слишком низкой степени ветвления (ниже оптимального уровня) скорость высвобождения глюкозы снижается? (*Подсказка.* Рассмотрите предельный случай с неразветвленной цепью из 55 000 остатков глюкозы.)

в) Почему при слишком высокой степени ветвления скорость высвобождения глюкозы также снижается? (*Подсказка.* Подумайте о физических ограничениях.)

Мелендез-Хевиа с коллегами провели серию расчетов и получили, что оптимальной степенью ветвления является наличие двух ветвлений на одну цепь гликогена (см. рис. 15-33, *б*). Именно такой гликоген обнаруживают в мышцах и печени.

Для определения оптимального числа глюкозных звеньев в цепи гликогена были рассмотрены два ключевых параметра, определяющих строение гранулы гликогена: t — количество слоев глюкозных цепей в грануле (молекула на рис. 15-33, *б* имеет пять таких слоев) и g_c — число остатков глюкозы в каждой цепи. Была предпринята попытка найти значения t и g_c, которые позволяли бы получить максимальные значения следующих параметров: (1) количество глюкозы в грануле гликогена (G_T), приходящееся на единицу объема; (2) количество неразветвленных цепей глюкозы (C_A) в единице объема (т. е. количество цепей в наружном слое, легко доступном для гликогенфосфорилазы); и (3) количество глюкозы, доступное для фосфорилазы в этих неразветвленных цепях (G_{PT}).

г) Покажите, что $C_A = 2^{t-1}$. Это число цепей, доступных для гликогенфосфорилазы до начала действия деветвящего фермента.

д) Покажите, что C_T (общее число цепей в грануле) определяется уравнением $C_T = 2^t - 1$. Таким образом, $G_T = g_c(C_T) = g_c(2^t - 1)$ определяет общее число остатков глюкозы в грануле гликогена.

е) Гликогенфосфорилаза не может отщеплять остатки глюкозы от цепей гликогена, содержащих менее пяти остатков глюкозы. Покажите, что $G_{PT} = (g_c - 4)(2^{t-1})$. Это количество глюкозы, доступной для гликогенфосфорилазы.

ж) Исходя из размера остатка глюкозы и расположения ветвей получается, что толщина одного слоя цепей гликогена составляет $0{,}12g_c + 0{,}35$ нм. Покажите, что объем гранулы гликогена (V_S) задается уравнением: $V_S = {}^4/_3 \cdot \pi t^3(0{,}12g_c + 0{,}35)^3$ нм^3.

Далее были определены оптимальные значения t и g_c — те значения, при которых достигается максимум функции качества (f), при которой G_T, C_A и G_{PT} имеют максимальные значения, а V_S минимальные: $f = (G_T C_A G_{PT})/V_s$. Установлено, что оптимальное значение g_c не зависит от t.

з) Выберите t в интервале от 5 до 15 и найдите оптимальное значение g_c. Сравните найденное значение g_c с g_c для гликогена в печени (см. рис. 15-33, *б*). (*Подсказка.* Можно воспользоваться электронными таблицами.)

Литература

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., & Shelton, E.D. (1993) Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**, 477–483.

> При добавлении цитрата скорость клеточного дыхания часто увеличивается... и при этом потребление кислорода даже значительно больше, чем могло бы быть при полном окислении цитрата... Поскольку лимонная кислота участвует в каталитических реакциях в тканях, возможно, она расходуется в первой реакции, но вновь образуется в последующих реакциях.
>
> *Х. А. Кребс и В. А. Джонсон*, из статьи в журнале Enzymologia, *1937*

16

Цикл лимонной кислоты

16.1. Образование ацетил-CoA — активированного ацетата 182

16.2. Реакции цикла лимонной кислоты 188

16.3. Регуляция цикла лимонной кислоты 208

16.4. Глиоксилатный цикл 211

Как мы видели в гл. 14, некоторые клетки получают энергию (ATP) в результате брожения, т. е. расщепляют глюкозу в отсутствие кислорода. Для большинства эукариотических клеток и многих бактерий, живущих в аэробных условиях и окисляющих органические молекулы до CO_2 и воды, гликолиз — это лишь первая стадия полного окисления глюкозы. При этом пируват, образующийся при гликолизе, окисляется далее до CO_2 и H_2O, а не восстанавливается до лактата, этилового спирта или другого продукта брожения. Эту аэробную фазу катаболизма в биохимии называют **дыханием**. В более общем физиологическом, или макроскопическом, смысле под дыханием подразумевают потребление кислорода и выделение углекислого газа многоклеточными организмами. Однако в биохимии и цитологии этот термин используют в более узком смысле — для описания молекулярных процессов поглощения O_2 и выделения CO_2 клеткой; данный процесс точнее можно назвать **клеточным дыханием**.

Клеточное дыхание включает три основные стадии (**рис. 16-1**). На первой стадии топливные органические молекулы глюкоза, жирные кислоты и некоторые аминокислоты окисляются до двухуглеродных фрагментов, а именно до ацетогруппы ацетилкофермента А (ацетил-CoA). Далее (во второй стадии) ацетогруппа поступает в цикл лимонной кислоты, где ферментативным путем окисляется до CO_2; высвобождающаяся при этом энергия сохраняется в форме восстановленных переносчиков электронов NADH или $FADH_2$. На третьей стадии клеточного дыхания эти восстановленные формы коферментов в свою очередь окисляются, при этом образуются протоны (H^+) и электроны, которые затем передаются по цепи переноса электронов, иначе называемой дыхательной цепью, на финальный акцептор электронов — молекулярный кислород. Процесс переноса электронов называется окислительным фосфорилированием (гл. 19) и сопровождается выделением большого количества энергии, которая запасается в форме ATP. Клеточное дыхание гораздо сложнее, чем гликолиз; принято считать, что в ходе эволюции дыхание появилось намного позже гликолиза — после возникновения цианобактерий. Метаболическая активность цианобактерий сыграла важную роль в повышении содержания кислорода в атмосфере Земли, что и стало поворотным пунктом в эволюции.

В первую очередь мы рассмотрим превращение пирувата в ацетогруппу, а затем обратимся к изучению включения ацетогруппы в **цикл лимонной кислоты**, иначе называемый **циклом трикарбоновых кислот** или **циклом Кребса** — по имени открывшего его Ханса Кребса. Далее остановимся на изучении реакций цикла Кребса и участвующих в нем ферментов. Поскольку интермедиаты цикла Кребса выводятся из цикла в качестве предшественников для синтеза других веществ, мы рассмотрим некоторые пути вос-

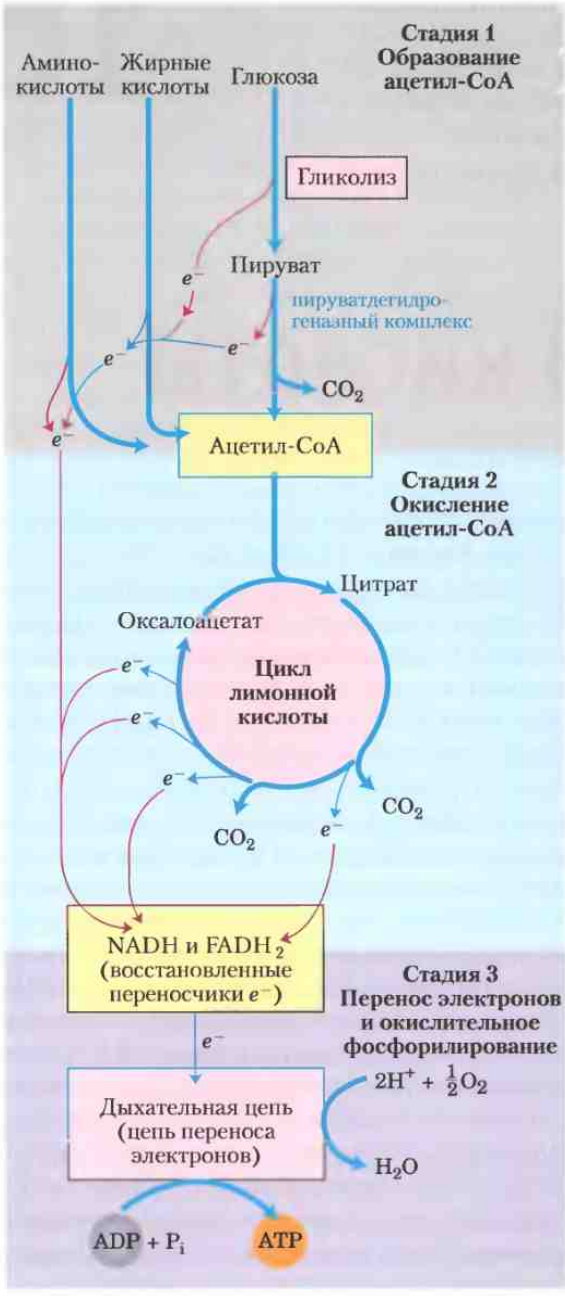


Рис. 16-1. Катаболизм белков, жиров и углеводов в трехстадийном процессе клеточного дыхания. Стадия 1 — окисление жирных кислот, глюкозы и некоторых аминокислот приводит к образованию ацетил-CoA. Стадия 2 — окисление ацетогрупп в цикле лимонной кислоты включает четыре реакции, сопряженные с удалением электронов. Стадия 3 — электроны с помощью NADH и $FADH_2$ поступают в дыхательную цепь (цепь переноса электронов в митохондриях или на плазматической мембране у бактерий), восстанавливая в итоге O_2 до H_2O. Поток электронов обеспечивает образование ATP.

Ханс Кребс, 1900–1981

полнения этих интермедиатов. Цикл лимонной кислоты — ключевой в метаболизме: к нему приводят пути катаболизма, от него начинаются пути анаболизма и его регуляция осуществляется в соответствии с другими метаболическими путями. Заключительная часть данной главы посвящена глиоксилатному пути — последовательности метаболических реакций для синтеза глюкозы из запасных триацилглицеринов у некоторых видов организмов, в которой используются отдельные реакции и ферменты, задействованные в цикле лимонной кислоты.

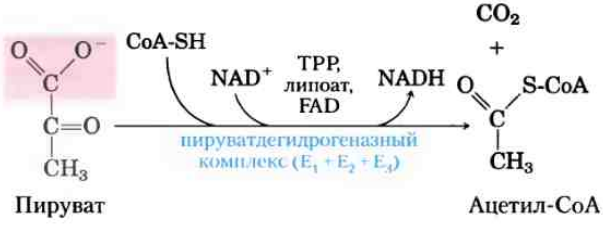
16.1. Образование ацетил-CoA — активированного ацетата

У аэробных организмов глюкоза и другие сахара, а также жирные кислоты и многие аминокислоты в цикле лимонной кислоты и в дыхательной цепи окисляются в итоге до CO_2 и H_2O. Однако прежде чем войти в цикл лимонной кислоты, углеродный скелет сахара или жирной кислоты должен быть разрушен с образованием ацетогруппы ацетилкофермента А, поскольку большая часть топливных молекул вступает в цикл именно в этой форме. Многие аминокислоты начинают этот путь аналогичным образом, хотя некоторые из них разлагаются до других интермедиатов цикла. Для начала рассмотрим окисление образованного в процессе гликолиза из глюкозы или других сахаров пирувата до ацетил-CoA и CO_2 под действием **пируватдегидрогеназного (ПДГ) комплекса**, который состоит из множества копий трех ферментов и локализован в митохондриях эукариотических клеток и в цитозоле бактерий.

Тщательное изучение этого ферментного комплекса полезно по нескольким причинам. Пируватдегидрогеназный комплекс представляет собой классический и известный в деталях пример полиферментного комплекса, в котором интермедиаты остаются связанными с молекулами ферментов по мере превращения субстрата в конечный продукт. В данном процессе принимают участие пять кофакторов, четыре из которых — производные витаминов. На примере этого ферментного комплекса можно также показать, каким образом комбинация ковалентной модификации и аллостерической регуляции позволяет четко регулировать поток метаболитов через определенную стадию пути. Наконец, пируватдегидрогеназный комплекс выступает в качестве прототипа двух других важных ферментных комплексов — α-кетоглутаратдегидрогеназы в цикле лимонной кислоты и дегидрогеназы α-кетокислот с разветвленной цепью в процессе окисления некоторых аминокислот (см. рис. 18-28). Удивительное сходство белковой структуры этих трех комплексов, потребность в кофакторах и механизмы реакций — все это однозначно говорит об их эволюционном родстве.

Пируват окисляется до ацетил-CoA и CO_2

Суммарная реакция **окислительного декарбоксилирования**, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом, представляет собой необратимый процесс окисления, при котором карбоксильная группа пирувата удаляется в виде молекулы CO_2, а два оставшихся атома углерода формируют ацетогруппу ацетилкофермента А **(рис. 16-2)**. Образующийся в этой реакции NADH поставляет в дыхательную цепь гидрид-ион ($:H^-$), который переносит два электрона на кислород или у анаэробных организмов на другой акцептор электронов (нитрат или сульфат) (рис. 16-1). Перенос электронов от NADH на кислород в итоге приводит к образованию 2,5 молекул ATP в расчете на пару электронов. Необратимость реакции, катализируемой пируватдегидрогеназным комплексом, была подтверждена с помощью экспериментов с изотопной меткой: данный комплекс не способен присоединять к ацетил-CoA радиоактивно меченный CO_2 с образованием меченного по карбоксильной группе пирувата.



$\Delta G'^{\circ} = -33{,}4$ кДж/моль

Рис. 16-2. Суммарная реакция, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом. В тексте обсуждаются пять коферментов, участвующих в данной реакции, и три фермента, входящие в состав комплекса.

В работе пируватдегидрогеназного комплекса участвуют пять коферментов

Дегидрирование и декарбоксилирование пирувата с образованием ацетогруппы ацетил-CoA (рис. 16-2) требует последовательного участия трех различных ферментов и пяти различных коферментов, или простетических групп, — тиаминпирофосфата (TPP), флавинадениндинуклеотида (FAD), кофермента А (CoA, который иногда обозначают как CoA-SH, что подчеркивает роль его SH-группы), никотинамидадениндинуклеотида (NAD) и липоевой кислоты (липоата). Среди компонентов данной системы четыре витамина, которые человек должен получать с пищей: тиамин (для TPP), рибофлавин (для FAD), ниацин (для NAD) и пантотенат (для CoA). Мы уже говорили о роли FAD и NAD в качестве переносчиков электронов (гл. 13), а с TPP мы сталкивались ранее как с коферментом пируватдекарбоксилазы (см. рис. 14-14).

Кофермент А **(рис. 16-3)** содержит реакционноспособную тиоловую группу (—SH), которая играет важнейшую роль в осуществлении функции CoA в качестве переносчика ацильной группы в ряде метаболических реакций. Ацил ковалентно связывается с тиолом, образуя **тиоэфир**. Благодаря относительно большим величинам стандартной свободной энергии гидролиза тиоэфиров (см. рис. 13-6, 13-7) они способны переносить ацильные группы и передавать их различным акцепторным молекулам. Таким образом, ацил, связанный с коферментом А, можно рассматривать в качестве «активированной» группы.

Пятый кофактор пируватдегидрогеназного комплекса **липоат (рис. 16-4)** содержит две

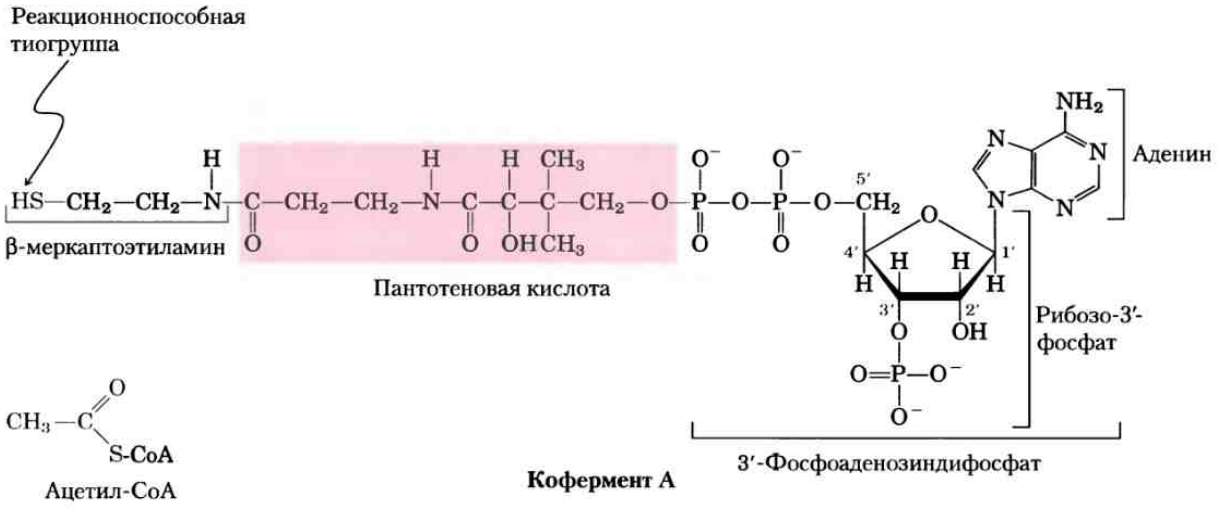


Рис. 16-3. Кофермент А (CoA). Гидроксильная группа пантотеновой кислоты соединена с модифицированным остатком ADP фосфоэфирной связью, а ее карбоксильная группа соединена с β-меркаптоэтиламином амидной связью. Гидроксильная группа в 3′-положении остатка ADP связана с фосфорильной группой, отсутствующая в свободном ADP. SH-группа меркаптоэтиламина образует тиоэфир с ацетогруппой ацетилкофермента А (ацетил-CoA; *внизу слева*).

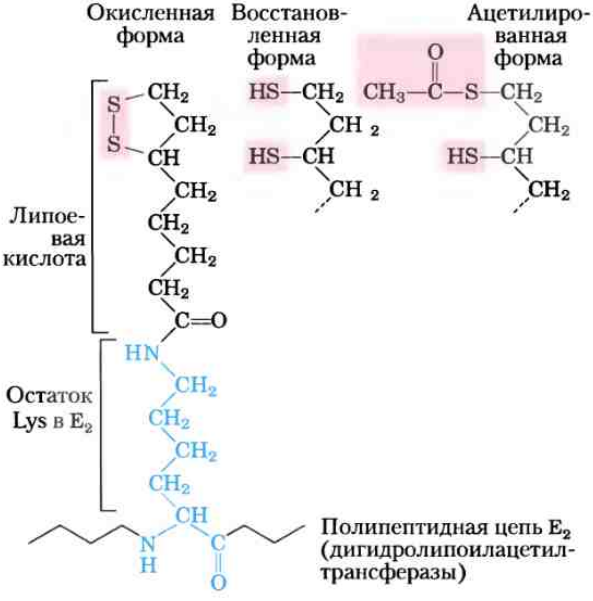


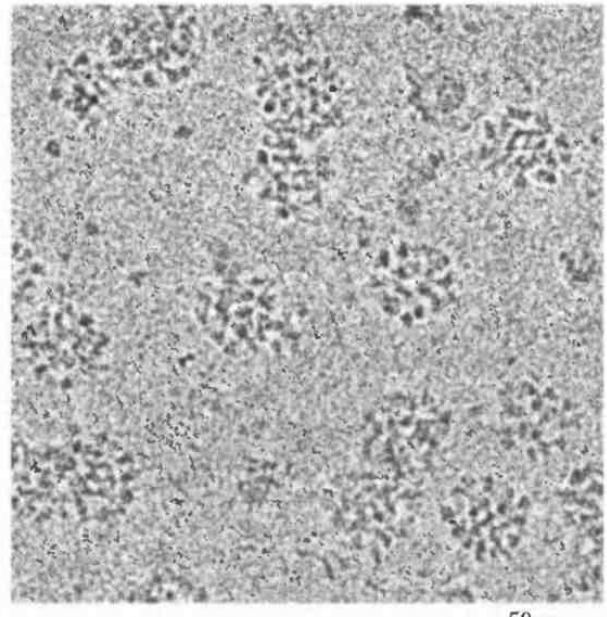
Рис. 16-4. Липоевая кислота (липоат) образует амидную связь с остатком лизина. Липоиллизиновая группа является простетической группой дигидролипоилацетилтрансферазы (фермента E_2 в комплексе ПДГ). Липоильная группа может существовать в окисленной (дисульфидной) и восстановленной (дитиоловой) форме и поэтому способна действовать как переносчик водорода и ацетильных (или других ацильных) групп.

тиоловые группы, которые могут обратимо окисляться, образуя дисульфидную связь (—S—S—), аналогичную дисульфидному мостику между двумя остатками Cys в белках. Благодаря своей способности подвергаться окислительно-восстановительным превращениям липоат может выполнять функцию переносчика как водорода, так и ацильной группы, что мы увидим далее.

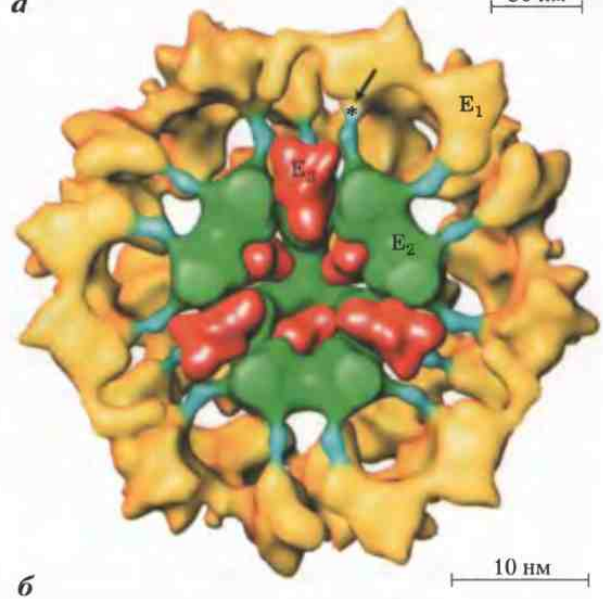
Пируватдегидрогеназный комплекс состоит из трех разных ферментов

В ПДГ-комплекс входят три фермента: **пируватдегидрогеназа** (E_1), **дигидролипоилацетилтрансфераза** (E_2) и **дигидролипоилдегидрогеназа** (E_3), причем каждый фермент может присутствовать в виде множества копий. У разных видов организмов число копий каждого фермента и, следовательно, размер этого комплекса различаются. Диаметр ПДГ-комплекса, выделенного из тканей млекопитающих, около 50 нм, что более чем в 5 раз превышает размер рибосомы, и его можно «увидеть» в электронный микроскоп (**рис. 16-5, *а***). В ферментном комплексе быка 60 одинаковых копий E_2 образуют пентагональный додекаэдр (ядро), диаметр которого

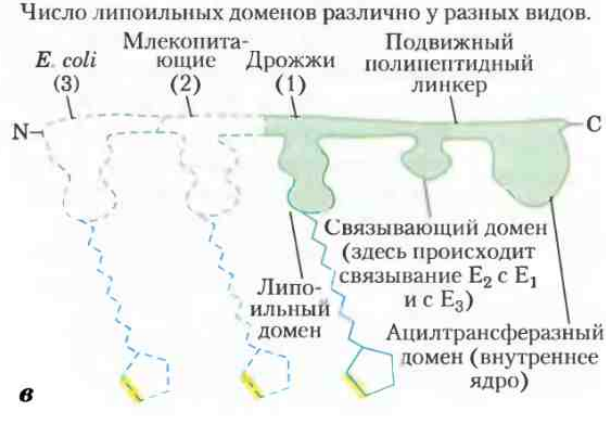
составляет около 25 нм (рис. 16-5, *б*). Ядро ферментного комплекса в клетках *Escherichia coli* содержит 24 копии E_2. Белок E_2 служит участком прикрепления липоата, образующего амидную связь с ε-аминогруппой остатка Lys (рис. 16-4). В белке E_2 три функционально различимых домена (рис. 16-5, *в*): N-концевой *липоильный домен*, содержащий остатки Lys; центральный *домен, отвечающий за связывание* E_1 и E_3; а также внутреннее ядро — *ацилтрансферазный домен*, содержащий активный центр ацилтрансферазы. ПДГ-комплекс дрожжей имеет единственный липоильный домен, с которым связывается липоат, в ферментных комплексах млекопитающих два таких домена, а в клетках *E. coli* их обнаружено три (рис. 16-5, *в*). Домены в молекуле E_2 разделены линкерными последовательностями длиной от 20 до 30 аминокислотных остатков, для которых характерно высокое содержание



а



б



в

Рис. 16-5. Пируватдегидрогеназный комплекс. *а* — криоэлектронная микрофотография ПДГ-комплекса из почки быка. При проведении криоэлектронной микроскопии биологические образцы исследуют при экстремально низких температурах, что позволяет избежать артефактов обезвоживания, фиксации и окрашивания. *б* — трехмерное изображение ПДГ-комплекса, позволяющее увидеть строение субъединиц: пируватдегидрогеназы (E_1), дигидролипоилацетилтрансферазы (E_2) и дигидролипоилдегидрогеназы (E_3). Изображение создано на основе обработки большого числа снимков, аналогичных *а*, а также по данным кристаллографического исследования отдельных субъединиц. Ядро комплекса (выделено зеленым цветом) состоит из 60 молекул E_2, организованных в 20 тримеров и образующих пентагональный додекаэдр. Липоильные домены E_2 (синие) направлены наружу и достигают активных центров молекул E_1 (желтые), окружающих ядро E_2. Некоторые субъединицы E_3 (красные) также связаны с ядром, при этом подвижное плечо E_2 может достичь их активных центров. Звездочкой обозначен участок, в котором липоильная группа прикрепляется к липоильному домену E_2. Направленная к читателю внешняя половина комплекса не показана. Данная модель была предложена в работе [Z. H. Zhou et al. (2001)]; в другой модели [J. L. S. Milne et al. (2002)] субъединицы E_3 расположены ближе к периферии комплекса (см. дополнительную литературу). *в* — белок E_2 содержит домены трех типов, связанные короткими полипептидными линкерами: каталитический ацилтрансферазный домен, домен связывания E_1 и E_3 с E_2, а также один или несколько липоильных доменов.

Ala и Pro, а также заряженных остатков. Линкерные последовательности находятся в развернутой форме, благодаря чему три белковых домена удалены друг от друга.

В активном центре белка E_1 связан TPP, а в активном центре E_3 — FAD. Кроме того, в состав комплекса входят два регуляторных белка — протеинкиназа и фосфопротеинфосфатаза (см. ниже). В процессе эволюции структура комплекса E_1–E_2–E_3 в основном сохранилась; она присутствует в ряде схожих метаболических процессов, в том числе в окислении α-кетоглутарата в цикле лимонной кислоты (см. ниже) и в окислении α-кетокислот, образующихся при разложении аминокислот с разветвленным углеродным скелетом, таких как валин, изолейцин и лейцин (см. рис. 18-28). В пределах одного вида белок E_3 из ПДГ-комплекса идентичен белку E_3, входящему в состав двух других ферментных комплексов. Связывание липоата с боковой цепью Lys в молекуле E_2 приводит к образованию длинного и гибкого «плеча», способного перемещаться от активного центра E_1 к активным центрам E_2 и E_3, которые отстоят друг от друга на 5 нм или более.

Промежуточные вещества, образующиеся в процессе превращения субстрата, не покидают поверхности фермента

На **рис. 16-6** показано действие пируватдегидрогеназного комплекса, осуществляющего пять последовательных реакций декарбоксилирования и дегидрирования пирувата. Стадия ① практически идентична реакции, катализируемой пируватде-

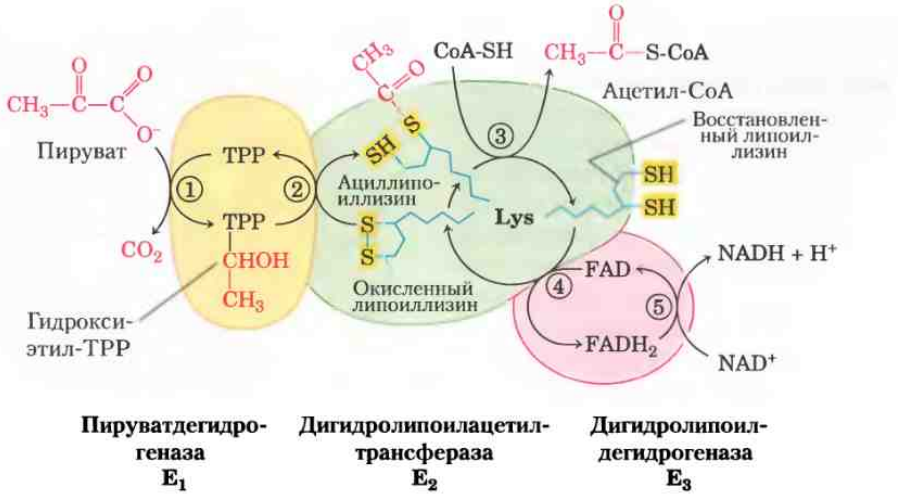


Рис. 16-6. Окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-CoA под действием пируватдегидрогеназного комплекса. Изменения, происходящие с молекулой пирувата, выделены красным цветом. На стадии ① пируват реагирует с тиаминпирофосфатом (TPP), связанным с пируватдегидрогеназой (E_1), и претерпевает декарбоксилирование с образованием гидроксиэтильного производного (см. рис. 14-13). Пируватдегидрогеназа осуществляет также стадию ②, а именно, перенос двух электронов и ацетогруппы от TPP на окисленную липоиллизиновую группу центрального фермента дигидролипоилацетилтрансферазы (E_2) с образованием ацетилтиоэфира восстановленной липоильной группы. Стадия ③ представляет собой реакцию трансэтерификации, при которой SH-группа CoA замещает SH-группу фермента E_2, в результате чего образуется ацетил-CoA и полностью восстановленная (дитиоловая) форма липоильной группы. На стадии ④ дигидролипоилдегидрогеназа (E_3) обеспечивает перенос двух атомов водорода от восстановленных липоильных групп E_2 на простетическую группу (FAD) молекулы E_3, что вновь приводит к появлению окисленной формы липоиллизиновой группы E_2. На стадии ⑤ восстановленный $FADH_2$ в белке E_3 переносит гидрид-ион на молекулу NAD^+ с образованием NADH. Теперь ферментный комплекс готов к следующему каталитическому циклу. Цвета субъединиц соответствуют таковым на рис. 16-5, *б*.

карбоксилазой (см. рис. 14-14, *в*); атом С-1 молекулы пирувата высвобождается в виде CO_2, а атом С-2, который в молекуле пирувата находится в такой же степени окисления, как в альдегиде, присоединен к ТРР в составе гидроксиэтильной группы. Эта стадия самая медленная и, следовательно, она лимитирует скорость суммарного процесса. Кроме того, именно в этой реакции проявляется субстратная специфичность ПДГ-комплекса. На стадии ② гидроксиэтильная группа окисляется до карбоксильной группы (ацетата). Два электрона, удаляемые в этой реакции, восстанавливают связь —S—S— в липоильной группе белка E_2 с образованием двух SH-групп. Ацетогруппа, возникающая в результате этой окислительно-восстановительной реакции, сначала образует эфирную связь с одной из липоильных SH-групп, а затем при трансэтерификации переносится на CoA с образованием ацетил-CoA (стадия ③). Таким образом, энергия окисления способствует образованию богатого энергией ацетилтиоэфира. На заключительных стадиях, катализируемых ферментом E_3 ПДГ-комплекса (стадии ④ и ⑤), происходит перенос электронов, необходимый для регенерации окисленной (дисульфидной) формы липоильных групп E_2, и возвращение ферментного комплекса к исходному состоянию. Электроны гидроксиэтильной группы, образовавшейся из пирувата, передаются на FAD, а затем на NAD^+.

Очень важную роль в функционировании пируватдегидрогеназного комплекса играет смещение липоиллизинового «плеча» белка E_2, которое принимает от E_1 два электрона и ацетогруппу, образующуюся из пирувата, и переносит их на E_3. Все перечисленные ферменты и коферменты организованы в кластерную структуру, что позволяет интермедиатам быстро взаимодействовать, не уходя с поверхности ферментного комплекса. Последовательность из пяти реакций, изображенная на рис. 16-6 — пример **туннелирования субстрата**. В многостадийном процессе интермедиаты никогда не покидают комплекс, и локальная концентрация субстрата для фермента E_2 все время очень высокая. Туннелирование, кроме того, предотвращает «похищение» активированной ацетогруппы другими ферментами, использующими ее в качестве субстрата. Как мы увидим далее, подобный ограничительный механизм туннелирования субстрата между активными центрами реализуется и в некоторых других ферментах, использующих в качестве кофакторов липоевую кислоту, биотин или CoA-подобные вещества.

Понятно, что мутации генов, кодирующих субъединицы пируватдегидрогеназного комплекса, или недостаточность поступающего с пищей тиамина имеют весьма серьезные негативные последствия. Животные с тиаминовой недостаточностью не могут нормально окислять пируват. Особенно сильное влияние это оказывает на головной мозг, который получает всю необходимую энергию от аэробного окисления глюкозы по метаболическому пути, включающему окисление пирувата. В результате тиаминовой недостаточности возникает болезнь бери-бери, которая характеризуется нарушением работы нервной системы. Это заболевание в первую очередь встречается среди населения, основной пищей которого является белый очищенный рис, поскольку в рисе тиамин в основном содержится именно в рисовой шелухе. Тиаминовая недостаточность может развиваться у людей, постоянно употребляющих большие дозы алкоголя, поскольку значительную часть их рациона составляют не содержащие витаминов «пустые» калории из спирта. Признаком нарушения окисления пирувата, вызванного одной из этих причин, часто является повышенный уровень пирувата в крови. ■

Краткое содержание раздела 16.1 ОБРАЗОВАНИЕ АЦЕТИЛ-CoA — АКТИВИРОВАННОГО АЦЕТАТА

- Образующийся в результате гликолиза пируват под действием пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ) превращается в ацетил-CoA — исходное соединение в цикле лимонной кислоты.

- В состав пируватдегидрогеназного комплекса может входить множество копий трех ферментов: пируватдегидрогеназы (E_1) со связанным кофактором ТРР, дигидролипоилацетилтрансферазы (E_2) с ковалентно связанной липоильной группой, а также дигидролипоилдегидрогеназы (E_3) с ее кофакторами FAD и NAD.

- Фермент E_1 катализирует сначала декарбоксилирование пирувата, что приводит к образованию гидроксиэтил-ТРР, а затем окисляет

гидроксиэтильную группу до ацетогруппы. Электроны, высвобождающиеся в этом окислительном процессе, восстанавливают дисульфидную связь липоата, связанного с E_2, а ацетогруппа переносится на тиоэфирную связь с одной SH-группой восстановленного липоата.

- Фермент E_2 катализирует перенос ацетогруппы на кофермент А, что приводит к образованию ацетил-СоА.
- Фермент E_3 катализирует регенерацию окисленной (дисульфидной) формы липоата; электроны сначала передаются на FAD, а оттуда на NAD^+.
- Длинное липоиллизиновое плечо перемещается между активными центрами E_1, E_2 и E_3, удерживая интермедиаты на поверхности ферментного комплекса и способствуя туннелированию субстрата.
- Организация пируватдегидрогеназного комплекса очень похожа на организацию ферментных комплексов, катализирующих окисление α-кетоглутарата и α-кетокислот с разветвленной цепью.

16.2. Реакции цикла лимонной кислоты

Теперь мы готовы к рассмотрению окисления ацетил-СоА. Эти химические реакции осуществляются в цикле лимонной кислоты — первом *циклическом* пути метаболизма, с которым мы встретились (**рис. 16-7**). Чтобы начать цикл реакций, ацетил-СоА передает свою ацетогруппу четырехуглеродному соединению оксалоацетату — образуется цитрат, состоящий из шести атомов углерода. Затем цитрат превращается в изоцитрат, также шестиуглеродный, который при дегидрировании теряет молекулу CO_2 и переходит в α-кетоглутарат (иначе называемый оксоглутаратом), состоящий из пяти атомов углерода. α-Кетоглутарат теряет еще одну молекулу CO_2 и превращается в четырехуглеродное соединение сукцинат. Сукцинат в трехстадийном ферментативном процессе превращается в оксалоацетат, который готов реагировать с новой молекулой ацетил-СоА. При каждом обороте цикла в него вступает одна ацетогруппа (два атома углерода) в форме ацетил-СоА, а две молекулы CO_2 его покидают. Одна молекула оксалоацетата используется на образование цитрата, а еще одна — регенерируется, т. е. в суммарном процессе оксалоацетат не расходуется. Теоретически одна молекула оксалоацетата может использоваться для окисления бесконечного числа ацетогрупп; и на самом деле концентрация оксалоацетата в клетке очень низкая. Четыре из восьми стадий описанного процесса являются реакциями окисления, энергия которых очень эффективно сохраняется в форме восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$.

Как уже упоминалось выше, хотя цикл лимонной кислоты занимает центральное положение в энергетическом метаболизме, его роль не ограничивается накоплением энергии. Четырех- и пятиуглеродные интермедиаты цикла служат предшественниками множества разнообразных продуктов. Для восполнения интермедиатов, расходующихся на эти нужды, клетка использует анаплеротические (компенсирующие) реакции, которые мы обсудим ниже.

В 1948 г. Юджин Кеннеди и Альберт Ленинджер показали, что в клетках эукариот все реакции цикла лимонной кислоты осуществляются в митохондриях. В изолированных митохондриях были обнаружены не только все ферменты и коферменты цикла, но также все ферменты и белки, необходимые для осуществления заключительной стадии дыхания — перенос электронов и синтеза АТР путем окислительного фосфорилирования. Как мы увидим в заключительных главах книги, митохондрии, кроме того, содержат ферменты, необходимые для окисления жирных кислот и некоторых аминокислот до ацетил-СоА, а также для окислительного разложения других аминокислот до α-кетоглутарата, сукцинил-СоА или оксалоацетата. Таким образом, у нефотосинтезирующих эукариот именно в митохондриях осуществляется большинство окислительных реакций, приводящих к накоплению энергии, а также сопряженный с этим синтез АТР. У фотосинтезирующих эукариот в темноте АТР синтезируется в основном в митохондриях, а на свету АТР производят главным образом хлоропласты. У большинства бактерий ферменты цикла лимонной кислоты сосредоточены в цитозоле, а плазматическая мембрана играет роль, аналогичную той, что выполняет внутренняя митохондриальная мембрана в синтезе АТР (гл. 19).

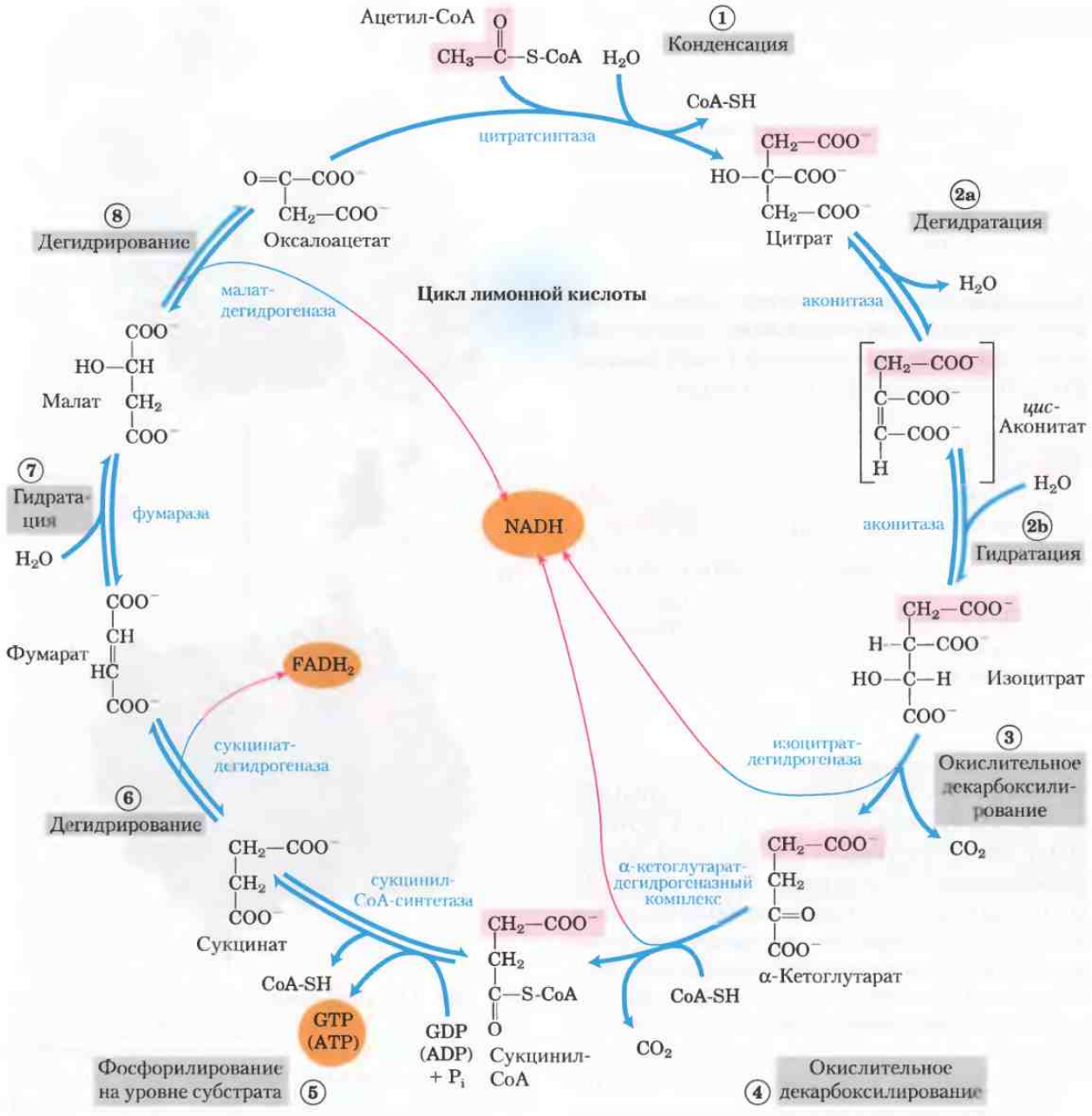
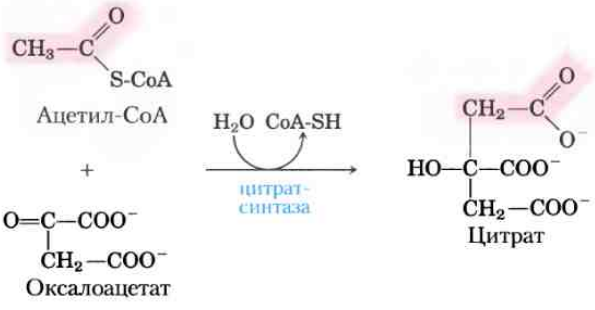


Рис. 16-7. Реакции цикла лимонной кислоты. Розовым цветом выделены атомы углерода, ведущие свое происхождение из ацетогруппы ацетил-CoA, поступающего в самый первый цикл; это *не те* атомы углерода, которые выделяются в первом раунде в виде CO_2 (стадия ③). Обратите внимание, что в молекулах сукцината и фумарата эту группу из двух атомов углерода невозможно определить однозначно: поскольку сукцинат и фумарат имеют симметричное строение, атомы C-1 и C-2 в этих молекулах неразличимы с атомами C-4 и C-3. Порядковый номер, которым обозначена каждая реакционная стадия, соответствует принятой в тексте нумерации. Красные стрелки указывают на те участки, в которых происходит запасание энергии от переноса электронов на FAD или NAD^+, в результате чего образуются $FADH_2$ или NADH + H^+ соответственно. Стадии ①, ③ и ④ в клетке практически необратимы, а остальные реакции обратимые. Продуктом реакции ⑤ может быть как ATP, так и GTP, что зависит от того, какой изофермент сукцинил-CoA-синтетазы катализирует данную стадию.

Цикл лимонной кислоты осуществляется в восемь стадий

Обсуждая восемь последовательных реакций цикла лимонной кислоты, мы особое место уделим тем, которые происходят при окислении цитрата, образующегося из ацетил-CoA и оксалоацетата с выделением CO_2 и энергии, запасающейся в форме восстановленных коферментов NADH и $FADH_2$.

① **Образование цитрата.** Первая реакция цикла, катализируемая **цитратсинтазой**, представляет собой конденсацию ацетил-CoA с **оксалоацетатом**, приводящую к образованию **цитрата**:



$\Delta G'^{\circ} = -32{,}2$ кДж/моль

В данной реакции метильный углерод ацетогруппы ацетил-CoA присоединяется к карбонильной группе (C-2) оксалоацетата. Промежуточным продуктом, образующимся в активном центре фермента, является цитроил-CoA (см. рис. 16-9). Он быстро гидролизуется до свободного CoA и цитрата, которые покидают активный центр. Гидролиз этого богатого энергией тиоэфирного производного способствует тому, что реакция оказывается экзергонической. Большая отрицательная величина изменения стандартной свободной энергии реакции, катализируемой цитратсинтазой, имеет важное значение для всего цикла, поскольку, как отмечалось ранее, концентрация оксалоацетата в клетке обычно очень низкая. Высвобождаемый в этой реакции CoA вновь используется для окислительного декарбоксилирования другой молекулы пирувата под действием пируватдегидрогеназного комплекса.

Цитратсинтаза из митохондрий была получена в виде кристаллов, что дало возможность проведения рентгеноструктурного анализа этого фермента в присутствии субстратов и ингибиторов и без них (**рис. 16-8**). Каждая субъединица

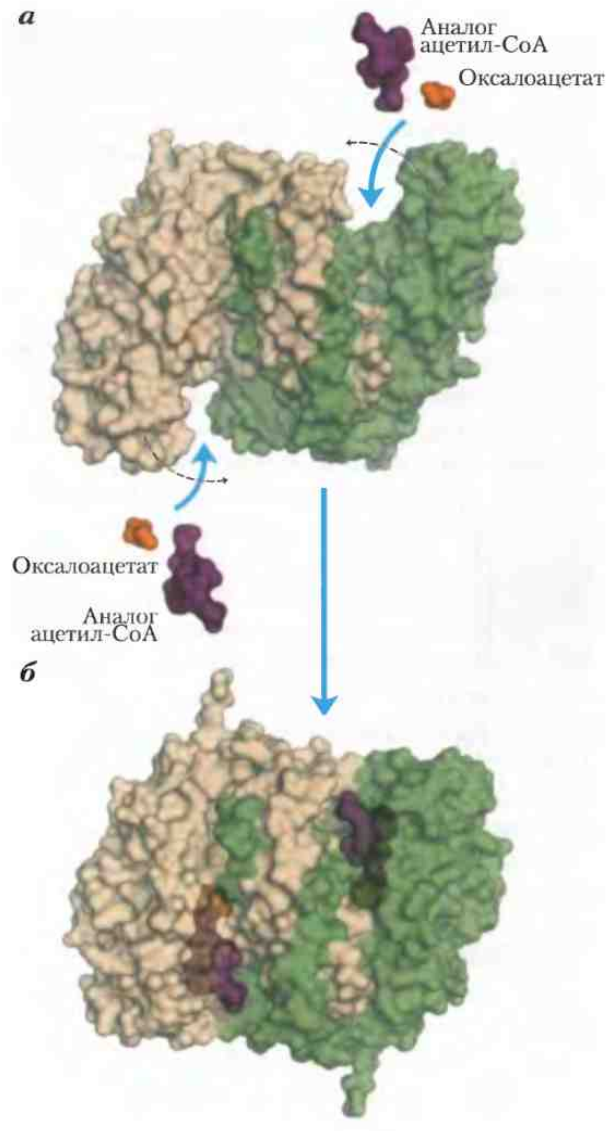
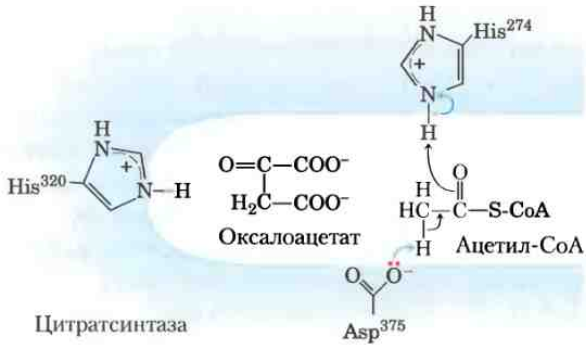


Рис. 16-8. Структура цитратсинтазы. При связывании оксалоацетата гибкий домен каждой субъединицы претерпевает большие конформационные изменения, в результате которых формируется центр связывания ацетил-CoA. *а* — открытая форма фермента (PDB ID 5CSC). *б* — закрытая форма фермента со связанным оксалоацетатом (желтый) и стабильным аналогом ацетил-CoA (карбоксиметил-CoA, красный) (PDB ID 5CTS).

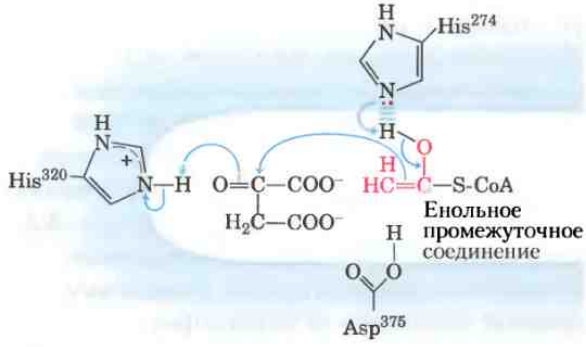
этого гомодимерного фермента представляет собой полипептид, состоящий из двух доменов: большого домена с довольно жесткой структурой и меньшего более гибкого домена; активный центр фермента располагается между этими двумя доменами. Оксалоацетат, который первым

связывается с ферментом, вызывает сильные конформационные изменения в гибком домене, в результате чего формируется центр связывания второго субстрата — ацетил-CoA. При образовании в активном центре цитрил-CoA вновь происходят конформационные изменения, которые на этот раз приводят к гидролизу тиоэфира и высвобождению CoA-SH. Такое индуцированное соответствие между ферментом и его субстратом, а затем интермедиатом снижает вероятность преждевременного и непродуктивного расщепления тиоэфирной связи в ацетил-CoA. Результаты кинетических исследований согласуются с подобным упорядоченным двухсубстратным механизмом реакции (см. рис. 6-13, т. 1). Реакция, катализируемая цитратсинтазой, это по сути конденсация Кляйзена (с. 23) с участием тиоэфира (ацетил-CoA) и кетона (оксалоацетат) **(рис. 16-9)**.



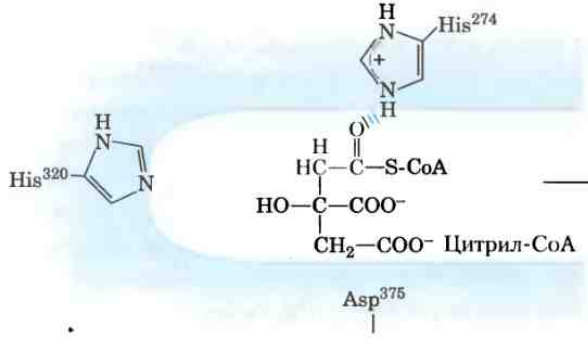
Тиоэфирная связь в ацетил-CoA активирует атомы водорода метильной группы, так что Asp375 способен оттягивать один из протонов, образуя енолят. Енольная структура промежуточного соединения стабилизируется водородными связями и(или) протонированием с участием His274 (изображена полностью протонированная форма).

①

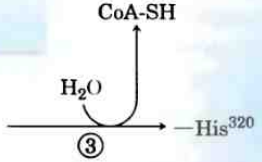


Енолят претерпевает перегруппировку и атакует карбонильный атом углерода в молекуле оксалоацетата, причем His274 принимает ранее отданный им протон. Остаток His320 выступает в роли общей кислоты. В результате реакции конденсации образуется цитрил-CoA.

②



③



Далее тиоэфир гидролизуется, приводя к высвобождению CoA-SH и образованию цитрата.

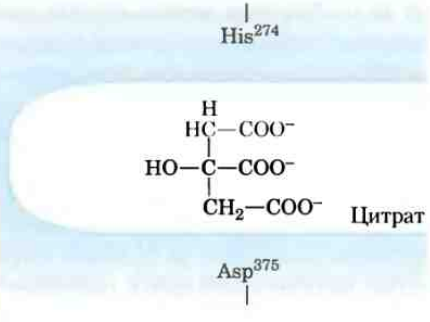
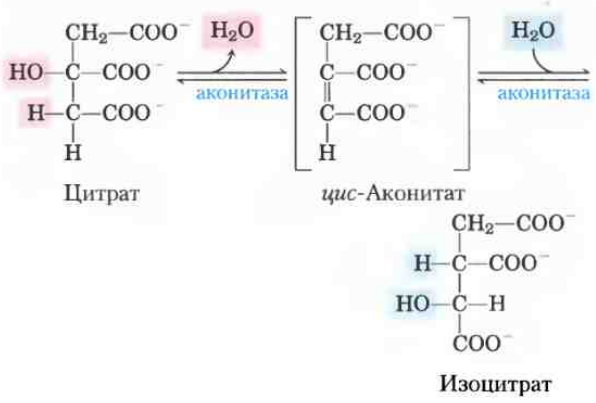


Рис. 16-9. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Цитратсинтаза. Реакция, катализируемая цитратсинтазой в клетках млекопитающих, происходит в строго определенном порядке, при этом первым связывается оксалоацетат. Это связывание приводит к конформационным изменениям, открывающим центр связывания ацетил-CoA. В активном центре фермента оксалоацетат ориентирован определенным образом, что объясняется взаимодействием двух его карбоксильных групп с двумя положительно заряженными остатками Arg (не показаны). ● **Механизм действия цитратсинтазы**

② Превращение цитрата в изоцитрат через *цис*-аконитат. Фермент **аконитаза** (точнее **аконитат-гидратаза**) катализирует обратимое превращение цитрата в **изоцитрат**. Промежуточным продуктом реакции (в норме не отделяющимся от активного центра фермента) является трикарбоновая кислота ***цис*-аконитат**. Аконитаза может катализировать обратимое присоединение молекулы воды по двойной связи связанного с ферментом *цис*-аконитата двумя путями: в одном случае образуется цитрат, а в другом — изоцитрат:



$\Delta G'^{\circ}$ = 13,3 кДж/моль

В равновесной смеси при pH 7,4 и 25 °C содержится менее 10% изоцитрата, однако в клетке реакция протекает с высокой скоростью, поскольку изоцитрат быстро расходуется в следующей стадии цикла, что снижает его стационарную концентрацию. Фермент аконитаза содержит так называемый **железо-серный центр (рис. 16-10)**, который служит как для связывания субстрата в активном центре, так и для каталитического присоединения и удаления молекулы воды. При недостатке в клетках железа аконитаза теряет свой железо-серный кластер и начинает выполнять новую функцию в регуляции гомеостаза железа. Аконитаза — один из многочисленных белков, выполняющих кроме своей основной функции еще и другие функции (так называемые ферменты со скрытой функцией; см. доп. 16-1).

③ Окисление изоцитрата до α-кетоглутарата и CO_2. На следующей стадии под действием **изоцитратдегидрогеназы** происходит окислительное декарбоксилирование изоцитрата с образованием **α-кетоглутарата (рис. 16-11)**. Ион Mn^{2+} в активном центре взаимодействует с карбонильной группой в промежуточном соединении (оксалосукцинате), которое не покидает активного центра, пока в результате декарбоксилирования не превратится в α-кетоглутарат. Кроме того, Mn^{2+} стабилизирует енольную структуру, образующуюся в процессе декарбоксилирования.

В клетках существуют две формы изоцитратдекарбоксилазы, одна использует NAD^+ как акцептор электронов , а другая — $NADP^+$. В остальном реакции, катализируемые этими изоферментами, идентичны. В эукариотических клетках NAD-зависимый фермент находится в матриксе митохондрий и принимает участие в цикле лимонной кислоты. Возможно, основная функция NADP-зависимой формы фермента, встречающейся как в митохондриях, так и в цитозоле, — образование NADPH, необходимого для восстановительных анаболических реакций.

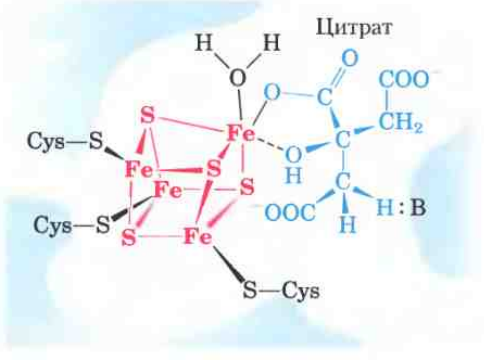


Рис. 16-10. Структура железо-серного центра в аконитазе. Железо-серный центр показан красным цветом, а молекула цитрата — синим. Три атома железа связывают три остатка Cys в молекуле фермента; четвертый атом железа связан с одной из карбоксильных групп цитрата, а также принимает участие в нековалентном взаимодействии с гидроксильной группой цитрата (штриховая линия). Остаток фермента (:B) имеет основные свойства и помогает определенным образом расположить цитрат в активном центре. Железо-серный центр принимает участие как в связывании субстрата, так и в катализе. Свойства железо-серных центров обсуждаются в гл. 19 (см. рис. 19-5).

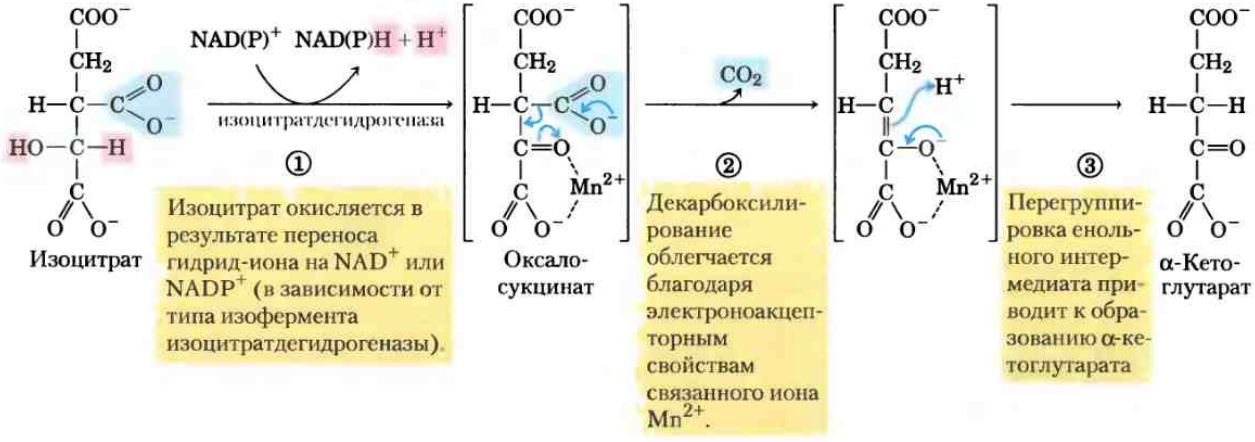


Рис. 16-11. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Действие изоцитратдегидрогеназы. Субстрат (изоцитрат) теряет один атом углерода в результате окислительного декарбоксилирования. Подробнее о переносе гидрид-иона с участием NAD+ и NADP+ см. на рис. 14-13.

Дополнение 16–1 Ферменты со скрытой функцией

Формула «один ген — один фермент», высказанная в 1940 г. Джорджем Бидлом и Эдвардом Тейтемом (см. гл. 24, т. 3), считалась справедливой на протяжении всего XX в.; считалось также, что каждый белок в клетке выполняет всего одну конкретную функцию. Однако в последнее время было обнаружено множество удивительных примеров того, что один белок, кодируемый одним геном, выполняет в клетке не одну, а несколько функций. Один из таких белков — аконитаза, которая действует и как фермент, и как регулятор синтеза белка.

В эукариотических клетках есть две изоформы аконитазы. Митохондриальная форма фермента превращает цитрат в изоцитрат в цикле лимонной кислоты. Цитозольный фермент выполняет две разные функции. Он катализирует превращение цитрата в изоцитрат, поставляя субстрат для цитозольной изоцитратдегидрогеназы, которая образует NADPH в качестве восстановителя для синтеза жирных кислот и других процессов анаболизма в цитозоле. Кроме того, эта форма аконитазы участвует в регуляции гомеостаза железа в клетке.

Железо нужно всем клеткам, поскольку многие клеточные белки используют его в качестве кофактора. Дефицит железа в организме человека приводит к анемии, недостатку эритроцитов и снижению кислородной емкости крови, что может угрожать жизни человека. Слишком высокий уровень железа также опасен: железо накапливается в печени и повреждает ее (гемохроматоз и другие заболевания). Получаемое с пищей железо переносится в крови белком **трансферрином** и попадает в клетки путем эндоцитоза, опосредованного **рецепторами трансферрина**. Внутри клеток железо используется для синтеза гема, цитохромов, железо-серных белков и других железозависимых белков, а избыток железа запасается в комплексе с белком **ферритином**. Таким образом, содержание трансферрина, рецепторов трансферрина и ферритина — все это играет важную роль в гомеостазе железа в клетке. Синтез этих белков регулируется в зависимости от доступности железа, а «скрытая» функция аконитазы как раз и играет ключевую регуляторную роль в этом процессе.

В активном центре аконитазы содержится железо-серный кластер (см. рис. 16-10). Когда в клетке мало железа, этот Fe-S кластер разбирается, и аконитаза теряет свою ферментативную активность. Однако образующийся при этом апофермент (аконитаза без Fe-S-кластера) приобретает другую способность — связываться со специфическими последовательностями мРНК трансферринового рецептора и ферритина и регулировать синтез этих белков на уровне трансляции. Независимо друг от друга были открыты два **регуляторных белка IRP1** и **IRP2**, участвующие в метаболизме железа. Оказалось, что белок IRP1 идентичен цитозольной форме апоаконитазы, а IRP2

Дополнение 16–1 **Ферменты со скрытой функцией (*продолжение*)**

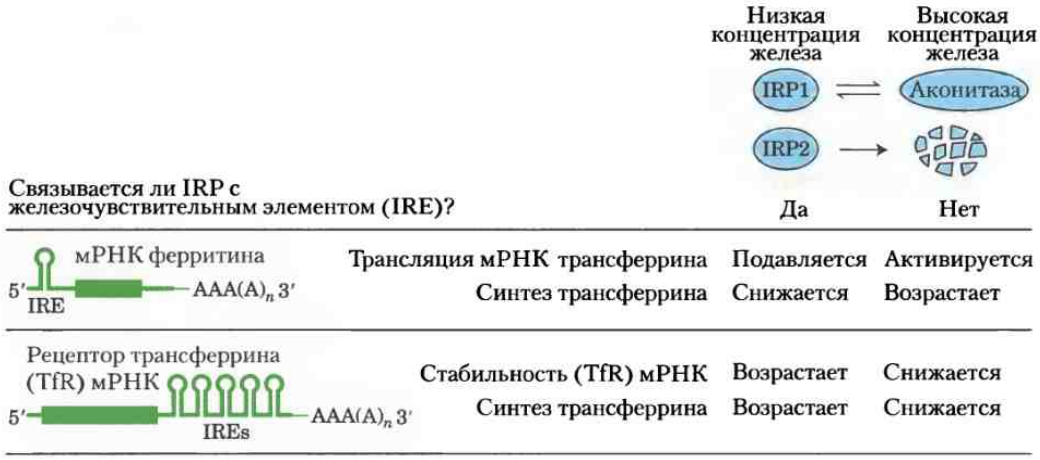


Рис. 1. Взаимодействие IRP1 и IRP2 с мРНК ферритина и рецептора трансферрина.

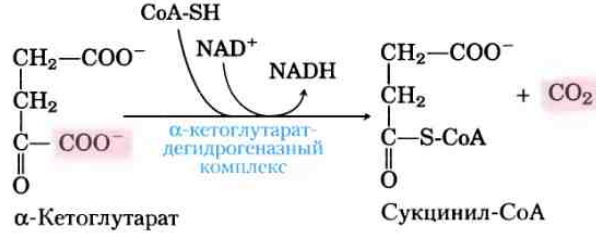
очень близок к нему по структуре и функции, однако в отличие от IRP1 он не может превратиться в каталитически активную аконитазу. Как IRP1, так и IRP2 связываются с участками мРНК, кодирующей ферритин и рецептор трансферрина, что приводит к мобилизации и поглощению железа клеткой. Эти участки мРНК являются фрагментами шпилечной структуры (с. 409, т. 1), называемой **железо-чувствительными элементами (IRE**, от англ. ***iron response elements***), расположенной на 5′ и 3′-концах мРНК (рис. 1). При связывании белков IRP с нетранслируемой 5′-областью мРНК ферритина происходит остановка синтеза ферритина. При связывании белков IRP с нетранслируемой 3′-областью последовательности IRE в мРНК рецептора трансферрина происходит стабилизация мРНК, предотвращается ее деградация и появляется возможность синтеза нескольких копий белка с одной молекулы мРНК. Таким образом, при недостатке железа эффективность захвата железа клеткой возрастает, а накопление запасного железа (связанного с ферритином) замедляется. При достижении нормального уровня железа в клетке белок IRP1 превращается в аконитазу, а белок IRP2 подвергается протеолитическому расщеплению.

Каталитически активная аконитаза и регуляторная апоаконитаза имеют разную структуру. У активной аконитазы имеются две доли, окружающие железо-серный кластер, а в белке IRP1 две доли раскрыты, в результате чего открывается доступ к участку связывания мРНК (рис. 2).

Аконитаза — это лишь один пример из большого и продолжающего свое увеличение списка ферментов, которые, как выяснилось, имеют вторую, «скрытую» функцию. К этой группе относятся многие гликоли-

---

④ Окисление α-кетоглутарата до сукцинил-CoA и CO_2. Следующая стадия вновь представляет собой реакцию окислительного декарбоксилирования, где α-кетоглутарат превращается в **сукцинил-CoA** и CO_2 под действием **α-кетоглутарат-дегидрогеназного комплекса**. NAD^+ выступает в качестве акцептора электронов, а CoA — переносчика сукцинильной группы. Энергия от окисления α-кетоглутарата запасается в тиоэфирной связи в молекуле сукцинил-CoA:



$\Delta G'^{\circ} = -33{,}5$ кДж/моль

тические ферменты. Пируваткиназа действует в ядре, регулируя транскрипцию генов, чувствительных к гормонам щитовидной железы. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа выступает в роли урацил-ДНК-гликозилазы, участвуя в репарации поврежденной ДНК, и регулирует транскрипцию гистона H2B. В хрусталиках глаза позвоночных также есть гликолитические ферменты с дополнительными функциями, в числе которых фосфоглицераткиназа, триозофосфатизомераза и лактатдегидрогеназа.

До недавнего времени открытие белка, выполняющего несколько функций, происходило в какой-то степени по воле случая: две группы исследователей изучали две несвязанные проблемы и неожиданно выясняли, что «их» белки имеют сходные свойства, проводили сравнительный анализ и понимали, что эти белки идентичны. С увеличением количества аннотированных последовательностей в базах данных белков и ДНК поиск таких белков становится целенаправленным: исследователи ищут белок с такой же последовательностью, но с другой функцией. Это также означает, что белок, про который известно, что он выполняет какую-то определенную функцию, совсем не обязательно имеет только одну эту функцию в клетке. Кроме того, открытие ферментов с несколькими функциями может объяснить эксперименты, в которых клеточные ферменты с известной функцией были инактивированы с помощью мутаций, а в соответственном мутантном организме наблюдались измененные, т. е. иные, функции.

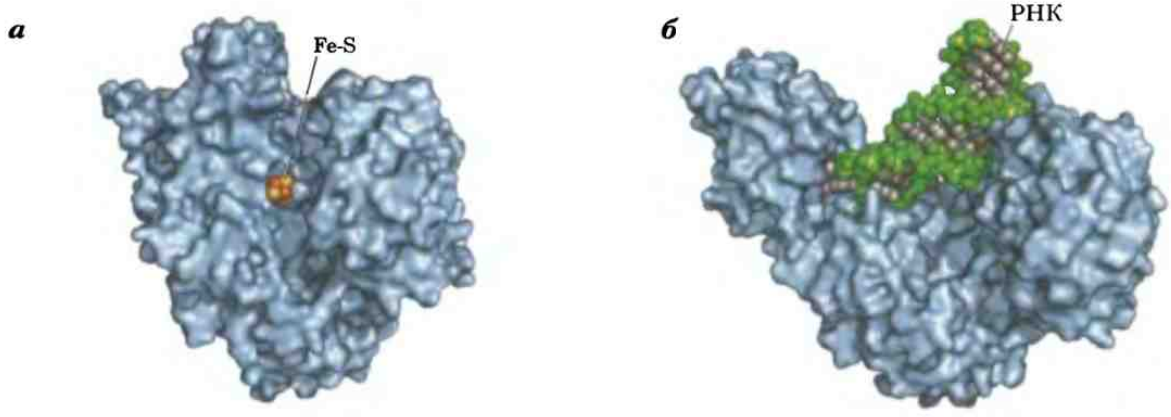


Рис. 2. Две формы цитозольной аконитазы/IRP1 с двумя различными функциями. *а* — в молекуле аконитазы две большие доли окружают железо-серный кластер; в данном случае белок изображен прозрачным, что позволяет увидеть этот кластер (PDB ID 2B3Y). *б* — в белке IRP1 две доли раскрываются, давая доступ к участку связывания шпильки мРНК субстрата (PDB ID 2IPY).

Эта реакция практически идентична реакции, которую мы уже обсуждали выше — реакции, катализируемой пируватдегидрогеназным комплексом, причем α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс очень напоминает ПДГ-комплекс как по строению, так и по функции. Данный комплекс содержит три фермента, гомологичные E_1, E_2 и E_3 в ПДГ-комплексе, а также связанный с ферментом ТРР, связанный липоат, FAD, NAD и кофермент А. Можно совершенно определенно сказать, что оба комплекса произошли от общего эволюционного предшественника. Хотя в составе E_1 обоих комплексов имеются сходные структуры, их аминокислотные последовательности различаются и, конечно же, они обладают разной субстратной специфичностью: фермент E_1 ПДГ-комплекса связывает пируват, а E_1 α-кетоглутаратдегидрогеназного комплекса связывает α-кетоглутарат. В составе E_2 обоих комплексов также очень похожего, причем в обоих

комплексах содержатся ковалентно связанные липоильные группы. Ферменты E_3 этих двух комплексов идентичны.

⑤ Превращение сукцинил-CoA в сукцинат. В сукцинил-CoA, как в ацетил-CoA, имеется тиоэфирная связь, характеризующаяся большой отрицательной величиной стандартной свободной энергии гидролиза ($\Delta G'^\circ \approx -36$ кДж/моль). На следующей стадии цикла лимонной кислоты происходит гидролиз этой связи, а высвобождающаяся при этом энергия направляется на синтез фосфоангидридной связи в молекуле GTP или ATP, причем в сумме $\Delta G'^\circ$ составляет всего −2,9 кДж/моль. В результате данной реакции образуется сукцинат:

$\Delta G'^\circ = -2{,}9$ кДж/моль

Фермент, катализирующий это превращение, называется **сукцинил-CoA-синтетазой**, или **сукцинилтиокиназой**; оба названия указывают на участие в реакции нуклеозидтрифосфата (доп. 16-2).

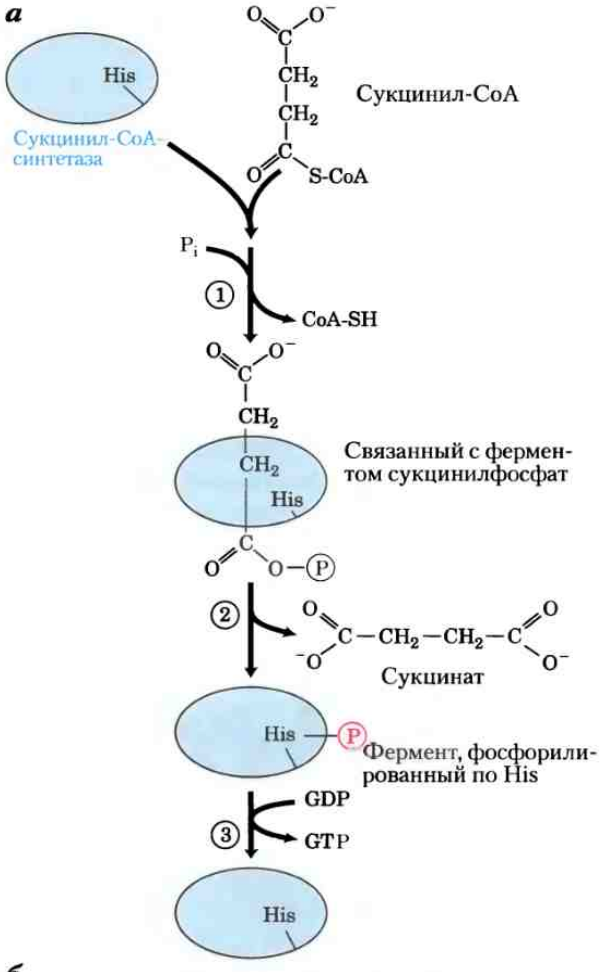


Рис. 16-12. Реакция, катализируемая сукцинил-CoA-синтетазой. *а* — на стадии ① фосфорильная группа замещает CoA в связанной с ферментом молекуле сукцинил-CoA, в результате чего образуется богатый энергией ацилфосфат. На стадии ② сукцинилфосфат передает свою фосфатную группу на остаток His в молекуле фермента, и при этом образуется богатое энергией промежуточное соединение — фосфорилированный фермент. На стадии ③ фосфатная группа переносится с остатка His к концевой фосфатной группе GDP (или ADP), что приводит к образованию GTP (или ATP). *б* — сукцинил-CoA-синтетаза *E. coli* (по PDB ID 1SCU). Активный центр построен из элементов как α- (сиреневая), так и β- (коричневая) субъединиц. Частичные положительные заряды силовых спиралей (сиреневая и коричневая) расположены вблизи фосфатной группы на остатке His^{246} в α-цепи, что стабилизирует данное промежуточное соединение. Кофермент A показан в виде стержневой структуры (красный цвет). У ферментов бактерий и млекопитающих сходные аминокислотные последовательности и трехмерные структуры.

Дополнение 16–2 Синтазы и синтетазы, лигазы и лиазы, киназы, фосфатазы и фосфорилазы. Да такие названия кого угодно могут сбить с толку!

Цитратсинтаза — это лишь один из многочисленных ферментов, катализирующих реакции конденсации, продукты которых имеют более сложное химическое строение, чем исходные вещества. **Синтазы** катализируют реакции конденсации, которые не требуют участия нуклеозидтрифосфатов (ATP, GTP и др.) в качестве источника энергии. **Синтетазы**, напротив, катализируют реакции конденсации, в которых энергию обязательно поставляет ATP или другой нуклеозидтрифосфат. Пример такого фермента — сукцинил-CoA-синтетаза. **Лигазы** (от лат. *ligare* — соединять) катализируют реакции конденсации, в которых два атома соединяются друг с другом, используя энергию ATP или другого источника, т. е. синтетазы — частный случай лигаз. Например, ДНК-лигаза зашивает разрывы в молекулах ДНК, используя при этом энергию ATP или NAD^+. Этот фермент широко используется в генетической инженерии для соединения фрагментов ДНК. Лигазы не следует путать с **лиазами**, которые катализируют расщепление (обратная реакция — присоединение), сопровождающееся переносом электронов. Пируватдегидрогеназный комплекс, который окисляет пируват с отщеплением молекулы CO_2, относится к большому классу лиаз.

Киназами называют ферменты, которые переносят фосфорильную группу от нуклеозидтрифосфата (например, ATP) на акцепторную молекулу — сахар (гексокиназа и глюкокиназа), белок (киназа гликогенфосфорилазы), другой нуклеотид (нуклеозиддифосфаткиназа) или интермедиат метаболизма, такой как оксалоацетат (ФЕП-карбоксикиназа). Реакции, катализируемые киназами, называют реакциями *фосфорилирования*. Напротив, *фосфоролиз* — это реакция замещения, в которой фосфатная группа осуществляет атаку и ковалентно связывается по месту разрыва связи. Такие реакции катализируются **фосфорилазами**. Например, гликогенфосфорилаза катализирует фосфоролиз гликогена, в результате чего образуется глюкозо-1-фосфат. *Дефосфорилирование* — удаление фосфорильной группы из эфира фосфорной кислоты — катализируется **фосфатазами**; в качестве атакующего агента при этом выступает вода. Фруктозобисфосфатаза-1 превращает фруктозо-1,6-бисфосфат в фруктозо-6-фосфат в процессе глюконеогенеза, а фосфатаза фосфорилазы а удаляет фосфатную группу от фосфосерина в фосфорилированной гликогенфосфорилазе. Вот так!

К сожалению, классы ферментов перекрываются, и многие ферменты имеют два или несколько названий. Например, сукцинил-CoA-синтетазу иначе называют сукцинилтиокиназой; данный фермент выступает синтетазой в цикле лимонной кислоты и киназой при осуществлении синтеза сукцинил-CoA. Все это только увеличивает путаницу с названиями. Например, фермент мог быть открыт в исследовании, при котором A превращалось в B, и получил свое название в соответствии с этим процессом. Однако позднее могло оказаться, что в клетке этот фермент в основном осуществляет превращение B в A. Часто в подобных случаях первое название продолжает использоваться, хотя метаболическую функцию фермента лучше описывает название, соответствующее обратной реакции. Пример подобной ситуации — гликолитический фермент пируваткиназа (с. 79). Начинающего изучать биохимию подобная путаница может сбить с толку. Международные организации прилагали титанические усилия для создания единой номенклатуры ферментов (см. табл. 6-3, т. 1), но некоторые систематические названия оказались слишком длинными и неуклюжими, так что их нечасто используют в биохимическом сообществе.

В данной книге мы старались приводить названия ферментов, которые приняты в биохимической практике, но при этом указывать случаи, когда фермент имеет несколько широко распространенных названий. Для ознакомления с действующей номенклатурой ферментов можно обратиться к рекомендациям Комитета по номенклатуре Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (IUBMB; www.chem.qmw.ac.uk/iumbmb/nomenclature/).

У данной энергозапасающей реакции есть промежуточная стадия, на которой происходит фосфорилирование самого фермента по остатку His в активном центре (**рис. 16-2, *а***). Именно эта богатая энергией фосфатная группа переносится на ADP (или GDP) с образованием ATP (или GTP). В животных клетках существуют два изофермента сукцинил-CoA-синтетазы, один из которых специфичен к ADP, а другой — к GDP. Фермент состоит из двух субъединиц: α (M_r 32 000) с фосфорилированным остатком His (His^{246}) и центром связывания CoA и β (M_r 42 000), который

определяет специфичность к ADP или GDP. Активный центр фермента расположен между двумя субъединицами. Исследование кристаллической структуры сукцинил-CoA-синтетазы выявило наличие двух «силовых» спиралей (по одной на каждой субъединице), ориентированных таким образом, что частичный положительный заряд электрических диполей локализован вблизи отрицательно заряженного Ⓟ-His (рис. 16-12, *б*), что стабилизирует фосфорилированный фермент. Вспомните, что похожую роль играют образуемые спиралями диполи в стабилизации ионов K^+ в калиевых каналах (см. рис. 11-48, т. 1).

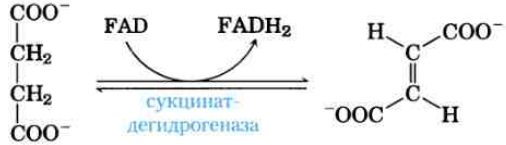
Образование ATP (или GTP) за счет энергии, высвобождаемой при окислительном декарбоксилировании α-кетоглутарата, представляет собой фосфорилирование на уровне субстрата, с которым мы уже сталкивались при обсуждении синтеза ATP в реакциях гликолиза, катализируемых глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и пируваткиназой (см. рис. 14-2). Образующийся при действии сукцинил-CoA-синтетазы GTP способен передавать концевую фосфорильную группу на ADP с образованием ATP; данную обратимую реакцию катализирует **нуклеозиддифосфаткиназа** (с. 41):

$$GTP + ADP \rightarrow GDP + ATP$$

$$\Delta G'^\circ = 0 \text{ кДж/моль}$$

Таким образом, итог действия любого изофермента сукцинил-CoA-синтетазы состоит в сохранении энергии в форме ATP. Реакция, катализируемая нуклеозиддифосфаткиназой, не сопровождается изменением свободной энергии; по количеству запасаемой энергии ATP и GTP эквивалентны.

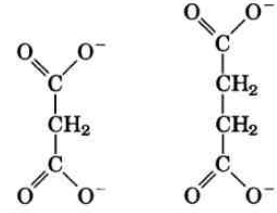
⑥ Окисление сукцината с образованием фумарата. Образовавшийся из сукцинил-CoA сукцинат далее окисляется до **фумарата** под действием флавопротеина **сукцинатдегидрогеназы**:



Сукцинат — Фумарат

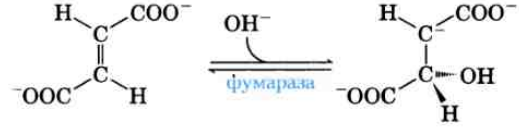
$$\Delta G'^\circ = 0 \text{ кДж/моль}$$

У эукариот сукцинатдегидрогеназа прочно связана с внутренней митохондриальной мембраной, а у прокариот — с плазматической мембраной. Фермент содержит три различных железо-серных кластера и одну ковалентно связанную молекулу FAD (см. рис. 19-10). Прежде чем попасть в цепь переноса электронов во внутренней мембране митохондрий (или в плазматической мембране бактерий) электроны от сукцината сначала проходят через FAD и железо-серные кластеры. Поток электронов от сукцината через эти структуры к окончательному акцептору электронов молекуле O_2 сопряжен с синтезом примерно 1,5 молекул ATP в пересчете на пару электронов (окислительное фосфорилирование в дыхательной цепи). Аналог сукцината малонат, которого обычно в клетке нет, является мощным конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы; его добавление к митохондриям блокирует цикл лимонной кислоты.

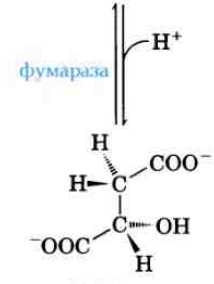


Малонат — Сукцинат

⑦ Гидратация фумарата с образованием малата. Обратимая гидратация фумарата с образованием **L-малата** катализируется ферментом **фумаразой** (более точное название — **фумаратгидратаза**). В переходном состоянии образуется карбанион:



Фумарат — Карбанион (переходное состояние)

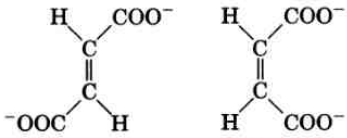


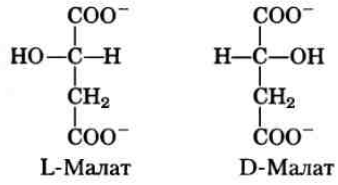
L-Малат

$$\Delta G'^\circ = -3{,}8 \text{ кДж/моль}$$

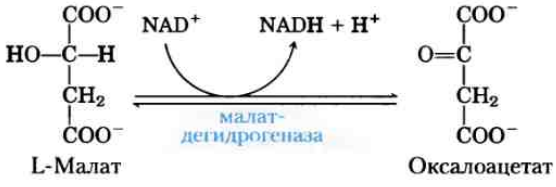
Фумараза обладает высокой стереоспецифичностью. Она катализирует гидратацию толь-

ко *транс*-формы двойной связи фумарата, но не действует на его *цис*-изомер (малеат). В обратной реакции фумараза также проявляет стереоспецифичность: D-малат не ее субстрат.





⑧ Окисление малата до оксалоацетата. На последней стадии цикла лимонной кислоты NAD-зависимая L-малатдегидрогеназа катализирует окисление L-малата до оксалоацетата:



$\Delta G'^{\circ}$ = 29,7 кДж/моль

В стандартных термодинамических условиях равновесие этой реакции сильно сдвинуто влево, но в клетке оксалоацетат постоянно удаляется в экзергонической реакции, катализируемой цитратсинтазой (стадия ① на рис. 16-7). В результате концентрация оксалоацетата в клетке остается очень низкой ($<10^{-6}$ М), что способствует протеканию малатдегидрогеназной реакции в сторону образования оксалоацетата.

Первые исследования отдельных реакций цикла лимонной кислоты проводились в условиях *in vitro* на образцах измельченной мышечной ткани, однако весь путь, а также его регуляция активно изучались *in vivo*. Использование радиоактивно меченных предшественников, таких как [^{14}C]пируват и [^{14}C]ацетат, позволило проследить судьбу отдельных атомов углерода в цикле лимонной кислоты. Некоторые из первых экспериментов с изотопной меткой дали неожиданные результаты и внесли значительные разногласия в представления о цикле и его регуляции. Казалось, что результаты этих экспериментов указывали на то, что первая трикарбоновая кислота, образующаяся в цикле, не цитрат. Некоторые подробности этого периода изучения цикла лимонной кислоты изложены в доп. 16-3. Сегодня поток метаболитов в цикле можно анализировать в живой ткани с помощью ^{13}C-меченных предшественников и ЯМР-спектроскопии целых тканей. Благодаря уникальности ЯМР-сигнала от соединения, содержащего ^{13}C, исследователь может проследить переход атомов углерода из молекулы-предшественника в интермедиаты и продукты цикла. Данный метод значительно продвинул изучение регуляции цикла лимонной кислоты и его связей с другими путями метаболизма, такими как гликолиз.

Дополнение 16–3 Цитрат: симметричная молекула с реакциями асимметричной природы

Когда более полувека назад стали доступны соединения, обогащенные тяжелым изотопом углерода ^{13}C и радиоактивными изотопами ^{11}C и ^{14}C, их сразу стали использовать для того, чтобы проследить путь атомов углерода в цикле лимонной кислоты. С одного из таких экспериментов началась дискуссия о роли лимонной кислоты. Меченный по карбоксильной группе ацетат ([1-^{14}C-ацетат) инкубировали с образцом животной ткани в аэробных условиях. В животных тканях ацетат ферментативным путем превращается в ацетил-CoA, поэтому в реакциях цикла можно было проследить путь меченого атома углерода ацетогруппы. После инкубации из препарата ткани выделили α-кетоглутарат, который затем подвергли химическому разложению для того, чтобы определить положение изотопа углерода.

Можно было ожидать, что при конденсации немеченого оксалоацетата с меченным по карбоксильной группе ацетатом образуется цитрат, содержащий метку в одной из двух первичных карбоксильных групп. Цитрат — симметричная молекула с двумя химически неразличимыми карбоксильными группами на концах. Следовательно, предполагалось, что половина молекул цитрата превратится в α-кетоглутарат, меченный

Дополнение 16–3 Цитрат: симметричная молекула с асимметричными по природе реакциями (*продолжение*)

Рис. 1. Включение углеродной метки (^{14}C) из ацетогруппы в α-кетоглутарат в цикле лимонной кислоты. Атомы углерода исходной ацетогруппы выделены красным цветом.

по α-карбоксильной группе, а вторая половина — в α-кетоглутарат, меченный по γ-карбоксильной группе, т. е. образуется смесь двух молекул, меченных по разным положениям (рис. 1, пути ① и ②). Однако выделенный из образца ткани α-кетоглутарат содержал метку ^{14}C только в γ-карбоксильной группе (рис. 1, путь ①). Отсюда был сделан вывод, что цитрат (или любая другая симметричная молекула) не может быть интермедиатом в процессе превращения ацетата в α-кетоглутарат, но первым продуктом, образующимся при конденсации ацетата и оксалоацетата, должна быть асимметричная трикарбоновая кислота, например *цис*-аконитат или изоцитрат.

Однако в 1948 г. Александер Огстон показал, что хотя цитрат не имеет хирального центра (см. рис. 1-19), он *может* реагировать асимметричным образом, если у фермента, с которым он взаимодействует, асимметричное строение активного центра. Огстон предположил, что активный центр аконитазы имеет три участка связывания цитрата, а цитрат специфическим образом должен связываться с этими тремя участками одновременно. Как показано на рис. 2, связывание цитрата с этими тремя точками может осуществляться единственным способом, что объясняет образование лишь одного типа меченого α-кетоглутарата. Подобные цитрату органические молекулы, не имеющие хирального центра, но способные реагировать асимметричным образом с асимметричным активным центром фермента, получили название **прохиральных молекул**.

Рис. 2. Лимонная кислота — пример прохирального соединения. *а* — структура цитрата; *б* — схема молекулы цитрата: X = –OH, Y = $-COO^-$, Z = $-CH_2COO^-$. *в* — комплементарность цитрата центру связывания на молекуле аконитазы. Возможен лишь один вариант, при котором специфические группы цитрата соответствуют трем участкам в центре связывания. В результате лишь одна из двух групп $-CH_2COO^-$ связывается с аконитазой.

Выделяющаяся в цикле лимонной кислоты энергия эффективно сохраняется

Итак, мы проследили цикл лимонной кислоты целиком (**рис. 16-13**). Ацетильная группа, состоящая из двух атомов углерода, вступила в цикл, взаимодействуя с оксалоацетатом. Два атома углерода высвободились из цикла в виде CO_2 при окислении изоцитрата и α-кетоглутарата. Энергия от этого окисления сохранилась в результате восстановления трех молекул NAD^+ и одной молекулы FAD, а также образования одной молекулы ATP или GTP. Молекула оксалоацетата регенерировалась в конце цикла. Обратите внимание, что два атома углерода, покидающие цикл в виде CO_2, — это не атомы углерода из входящей в цикл ацетильной группы. Для выделения этих атомов углерода в виде CO_2 цикл должен повториться еще несколько раз (рис. 16-7).

Хотя за один оборот цикла лимонной кислоты непосредственно образуется лишь одна молекула ATP (при превращении сукцинил-CoA в сукцинат), четыре окислительные стадии цикла создают значительный поток электронов в дыхательную цепь через молекулы NADH и $FADH_2$, тем самым способствуя образованию большого числа молекул ATP при окислительном фосфорилировании.

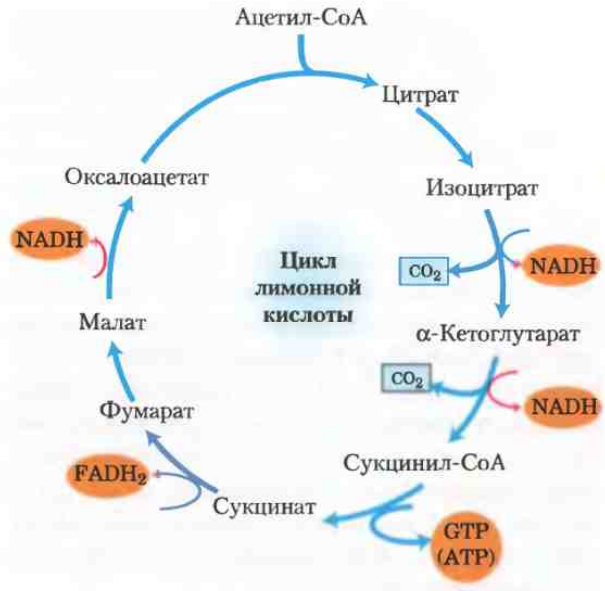


Рис. 16-13. Продукты одного оборота цикла лимонной кислоты. В каждом обороте цикла лимонной кислоты в результате реакций окислительного декарбоксилирования высвобождаются три молекулы NADH, одна $FADH_2$, одна GTP (или ATP) и две CO_2. Здесь и на нескольких следующих рисунках все стадии цикла изображены как необратимые, однако следует помнить, что на самом деле большинство реакций обратимы (см. рис. 16-7).

Таблица 16-1 Стехиометрия восстановления коферментов и образования ATP при аэробном окислении глюкозы через гликолиз, действие пируватдегидрогеназного комплекса, цикл лимонной кислоты и окислительное фосфорилирование

Реакция	Число образующихся молекул ATP или восстановленных коферментов	Число образующихся в итоге молекул ATP*
Глюкоза → глюкозо-6-фосфат	–1 ATP	–1
Фруктозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-бисфосфат	–1 ATP	–1
2 Глицеральдегид-3-фосфат → 2 1,3-дифосфоглицерат	2 NADH	3 или 5**
2 1,3-Дифосфоглицерат → 2 3-фосфоглицерат	2 ATP	2
2 Фосфоенолпируват → 2 пируват	2 ATP	2
2 Пируват → 2 ацетил-CoA	2 NADH	5
2 Изоцитрат → 2 α-кетоглутарат	2 NADH	5
2 α-Кетоглутарат → 2 сукцинил-CoA	2 NADH	5
2 Сукцинил-CoA → 2 сукцинат	2 ATP (или 2 GTP)	2
2 Сукцинат → 2 фумарат	2 $FADH_2$	3
2 Малат → 2 оксалоацетат	2 NADH	5
Всего		30–32

* Из расчета 2,5 ATP на NADH и 1,5 ATP на $FADH_2$; отрицательное число указывает на расход ATP.

** В зависимости от механизма передачи эквивалентов NADH из цитозоля в матрикс митохондрий; см. рис. 19-30 и 19-31.

В гл. 14 мы видели, что энергетический выход реакции образования двух молекул пирувата из одной молекулы глюкозы при гликолизе составляет 2 ATP и 2 NADH. При окислительном фосфорилировании (гл. 19) переход двух электронов от NADH на O_2 приводит к образованию примерно 2,5 ATP, а переход двух электронов от $FADH_2$ на O_2 — примерно 1,5 ATP. Исходя из этого мы можем рассчитать общий выход ATP при полном окислении глюкозы. Окисление двух молекул пирувата до $6CO_2$ посредством пируватдегидрогеназного комплекса и цикла лимонной кислоты, а также передача электронов на молекулярный кислород в результате окислительного фосфорилирования приводят к образованию 32 молекул ATP из одной молекулы глюкозы (табл. 16-1). Округляя числа, получаем, что это соответствует сохранению энергии в 32 · 30,5 кДж/моль = = 976 кДж/моль, или 34% теоретически возможной, т. е. максимальной, энергии при полном окислении глюкозы (~2840 кДж/моль). В этих расчетах были использованы величины стандартной свободной энергии; если учесть реальную ситуацию — свободную энергию для синтеза ATP в клетке (см. пример 13-2, с. 31), расчет приведет к эффективности процесса, близкой 65%.

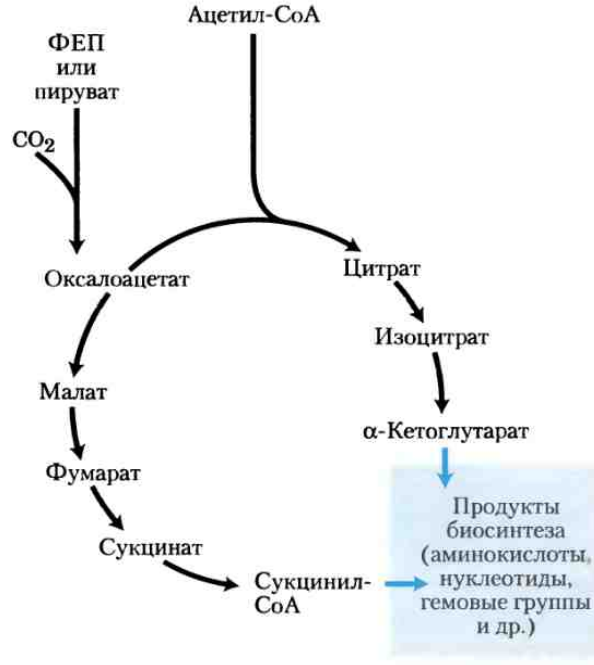


Рис. 16-14. Метаболические предшественники, образующиеся в неполном цикле лимонной кислоты у анаэробных бактерий. Эти анаэробные организмы не имеют α-кетоглутаратдегидрогеназы и поэтому не способны осуществлять полный цикл лимонной кислоты. α-Кетоглутарат и сукцинил-CoA являются предшественниками в различных путях биосинтеза. («Нормальная» последовательность реакций данного цикла изображена на рис. 16-13.)

Почему окисление ацетата осуществляется так сложно?

Восьмистадийный процесс окисления простой двухуглеродной ацетогруппы до CO_2 может показаться неоправданно сложным и противоречащим биологическому принципу максимальной экономии. Однако роль цикла лимонной кислоты не сводится к окислению ацетата. Этот путь является одним из центральных моментов в промежуточном метаболизме. Четырех- и пятиуглеродные конечные продукты многих катаболических путей поступают в цикл в качестве топливных молекул. Например, оксалоацетат и α-кетоглутарат образуются при разложении белков из аспарагиновой и глутаминовой кислот соответственно. При некоторых метаболических условиях интермедиаты покидают цикл и используются в качестве предшественников для биосинтеза многих других веществ.

Подобно всем другим путям метаболизма, цикл лимонной кислоты — «продукт» эволюции, значительный период которой происходил до появления аэробных организмов. Это вовсе не *кратчайший* путь от ацетата к CO_2, но он оказался наиболее выгодным при эволюционном отборе. Вполне вероятно, что первые анаэробы использовали некоторые реакции цикла лимонной кислоты в линейном биосинтетическом процессе. Действительно, некоторые ныне существующие анаэробные организмы используют неполный цикл лимонной кислоты не для получения энергии, а для производства предшественников в различных путях биосинтеза (**рис. 16-14**). В этих организмах в результате трех первых реакций цикла образуется α-кетоглутарат, но поскольку у них отсутствует α-кетоглутаратдегидрогеназа, они не могут осуществлять полностью весь цикл. У этих организмов есть четыре фермента, катализирующие обратимое превращение оксалоацетата в сукцинил-CoA, и они могут производить малат, фумарат, сукцинат и сукцинил-CoA из оксалоацетата в последовательности реакций, развивающихся в обратном направлении по сравнению

с «нормальным» (окислительным) процессом. Такой путь метаболизма — брожение, при котором NADH, образующийся в результате окисления изоцитрата, вновь превращается в NAD^+ при восстановлении оксалоацетата до сукцината.

С появлением цианобактерий, образующих O_2 из воды, земная атмосфера превратилась в аэробную, а организмы были вынуждены развивать аэробный метаболизм, который, как мы показали, гораздо более эффективен, чем анаэробное брожение.

Компоненты цикла лимонной кислоты — важные интермедиаты биосинтеза

У аэробных организмов цикл лимонной кислоты является одним из **амфиболических путей**, т. е. он задействован как в процессах катаболизма, так и в процессах анаболизма. Кроме участия в окислительном катаболизме углеводов, жирных кислот и аминокислот, цикл лимонной кислоты поставляет исходные молекулы для многих путей биосинтеза **(рис. 16-15)** с помощью реакций, которые служили для той же цели у анаэробных предков. Например, α-кетоглутарат и оксалоацетат превращаются в аспартат и глутамат путем простого трансаминирования (гл. 22). Через эти две аминокислоты атомы углерода из α-кетоглутарата и оксалоацетата далее служат для построения других аминокислот, а также пуриновых и пиримидиновых оснований. Оксалоацетат превращается в глюкозу в процессе глюконеогенеза (см. рис. 15-11). Сукцинил-CoA выступает центральным интермедиатом в синтезе порфиринового кольца гемовой группы, принимающей участие в переносе кислорода (в гемоглобине и миоглобине) и электронов (в цитохромах)

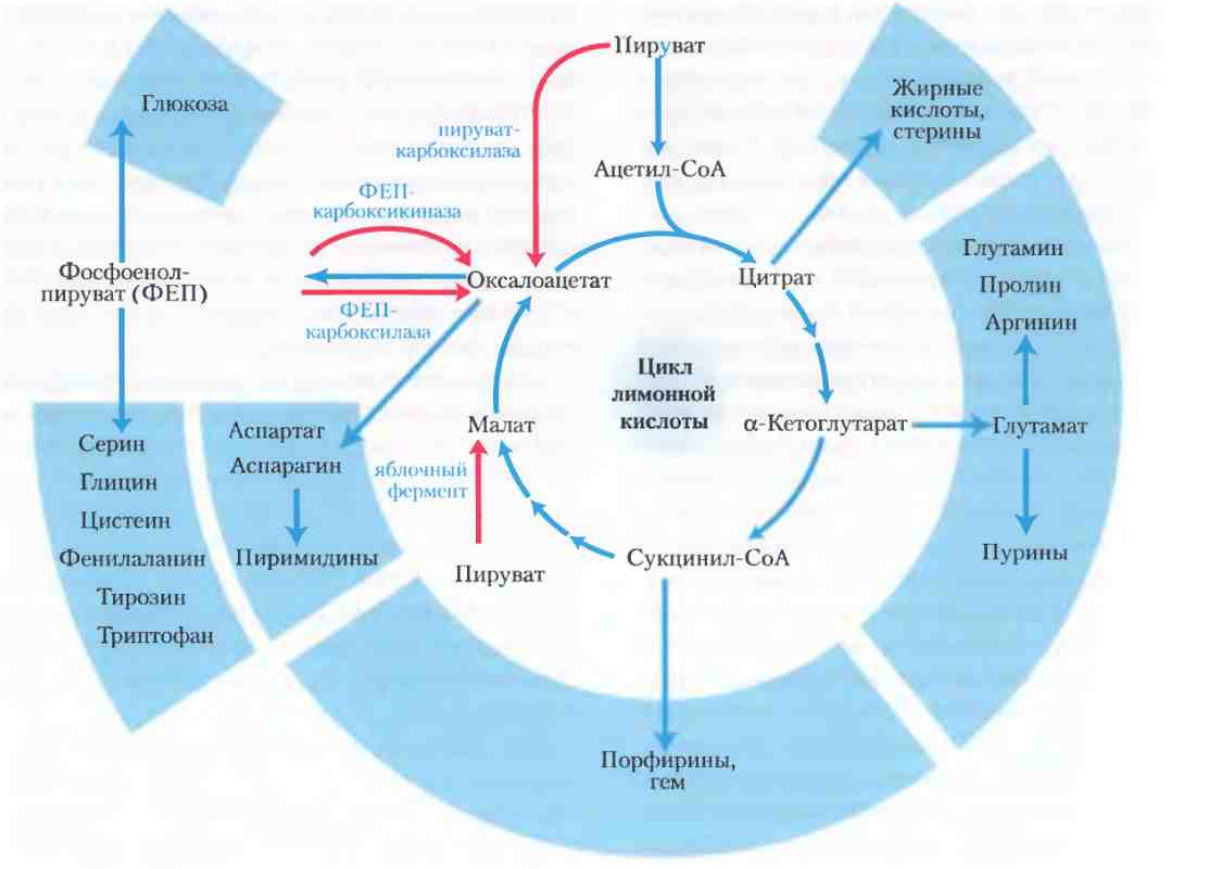


Рис. 16-15. Роль цикла лимонной кислоты в процессах анаболизма. Интермедиаты цикла лимонной кислоты выходят из цикла и служат предшественниками при биосинтезе различных веществ. Красным цветом выделены четыре анаплеротические реакции, восполняющие израсходованные интермедиаты цикла (см. табл. 16-2).

(см. рис. 22-23). А цитрат, образуемый некоторыми организмами, используют в различных коммерческих целях (доп. 16-4).

Анаплеротические реакции служат для восполнения затрат интермедиатов цикла лимонной кислоты

Поскольку интермедиаты цикла лимонной кислоты расходуются в качестве предшественников в биосинтезе, их необходимо постоянно восполнять, для чего служат **анаплеротические реакции** (рис. 16-15; табл. 16-2). В обычных условиях существует равновесие между реакциями, по которым интермедиаты покидают цикл лимонной кислоты и по которым они восполняются, так что концентрация интермедиатов остается практически неизменной.

В табл. 16-2 представлены наиболее распространенные анаплеротические реакции, все они превращают пируват или фосфоенолпируват в оксалат или малат в различных тканях и организмах. Наиболее важная анаплеротическая реакция в печени и почках млекопитающих — обратимое

Дополнение 16–4 Цитратсинтаза, газированные напитки и запасы продовольствия

Цитрат довольно широко используют в коммерческих целях. Если обратить внимание на состав большинства выпускаемых промышленностью безалкогольных напитков, можно обнаружить там лимонную кислоту, которую добавляют для придания кисловатого фруктового вкуса. Лимонная кислота применяется как пластификатор и ингибитор пенообразования в производстве некоторых сортов резины, для закрепления красителей, а также как антиоксидант для сохранения вкуса пищевых продуктов. В промышленных условиях источником лимонной кислоты служит гриб *Aspergillus niger*, выращенный на недорогом сахаросодержащем сырье, чаще всего на мелассе. Условия культивирования подбирают таким образом, чтобы предотвратить протекание реакций цикла лимонной кислоты и способствовать накоплению цитрата.

Если подойти к вопросу о цикле лимонной кислоты глубже, лимонная кислота может однажды быть очень полезной для предотвращения голода на нашей планете. Дело в том, что благодаря трем отрицательно заряженным карбоксильным группам цитрат является хорошим хелатирующим агентом, активно связывающим ионы металлов. Некоторые растения используют это свойство, выделяя цитрат в почву, где он связывает ионы металлов и предотвращает их всасывание растением. Особую роль играет связывание ионов алюминия Al^{3+}, которые токсичны для многих растений и на 30–40% снижают урожайность всех возделываемых земель. По распространенности в земной коре алюминий занимает первое место среди всех металлов, причем в основном он присутствует в виде биологически инертных соединений (таких как $Al(OH)_3$). Однако на почвах с pH <5 ионы алюминия переходят в растворимую форму и могут поглощаться корнями растений. Кислые почвы и токсичное влияние Al^{3+} чаще встречаются в тропических зонах, где по этой причине урожайность кукурузы может быть меньше на 80%! В Мексике из-за наличия алюминия в почве площади под папайей были сокращены до 20 000 га при общей площади сельскохозяйственных земель 3 млн га. Одно из возможных решений в этом случае — повышение pH почвы путем известкования, но это не лучший выход как с экономической, так и с природоохранной точек зрения. Другой путь — выведение устойчивых к алюминию сортов растений. В природе существуют виды, на которые не действует закисление почвы и присутствие там алюминия, и это может послужить основой для третьего способа решения проблемы — передачи необходимой устойчивости культурным сортам с помощью методов генетической инженерии.

Группа мексиканских исследователей вывела генетически модифицированные сорта табака и папайи, вырабатывающих повышенный уровень бактериальной цитратсинтазы. Эти растения секретируют в 5-6 раз больше лимонной кислоты, чем обычные растения, и поэтому могут расти на почве с уровнем Al^{3+}, в десятки раз превышающим соответствующие показатели для выживания контрольных растений. При таком уровне устойчивости в Мексике можно выращивать папайю на 3 млн га, которые в настоящее время не используются из-за высокого содержания Al^{3+}.

По прогнозам, численность населения Земли в следующие 50 лет может увеличиться до 9,6 млрд человек, что ставит перед цивилизацией задачу увеличения производства пищевых продуктов более чем в 3 раза. Долгосрочное решение этой проблемы может включать в себя повышение плодородия пахотных земель с высоким содержанием алюминия, причем важную роль здесь может сыграть лимонная кислота.

Таблица 16-2 Анаплеротические реакции

Реакция	Ткани/организмы
Пируват + HCO_3^- $\xrightleftharpoons{\text{пируваткарбоксилаза}}$ оксалоацетат + ADP + P_i	Печень, почки
Фосфоенолпируват (ФЕП) + CO_2 + GDP $\xrightleftharpoons{\text{ФЕП-карбоксикиназа}}$ оксалоацетат + GTP	Сердце, скелетные мышцы
Фосфоенолпируват (ФЕП) + HCO_3^- $\xrightleftharpoons{\text{ФЕП-карбоксилаза}}$ оксалоацетат + P_i	Высшие растения, дрожжи, бактерии
Пируват + HCO_3^- + NAD(P)H $\xrightleftharpoons{\text{малат-фермент}}$ малат + $NAD(P)^+$	Широко распространена у эукариот и прокариот

карбоксилирование пирувата до оксалоацетата, катализируемое **пируваткарбоксилазой**. При недостатке оксалоацетата или другого интермедиата цикла лимонной кислоты декарбоксилирование пирувата приводит к образованию дополнительного оксалоацетата. Ферментативное присоединение карбоксильной группы к пирувату происходит с затратой энергии, поставляемой в форме ATP; свободная энергия, необходимая для осуществления этой реакции, приблизительно равна свободной энергии, которую дает ATP.

Пируваткарбоксилаза — регуляторный фермент и практически неактивна без своего аллостерического активатора, ацетил-CoA. Если ацетил-CoA (топливная молекула в цикле лимонной кислоты) присутствует в избытке, происходит стимуляция пируваткарбоксилазной реакции и образуется больше оксалоацетата, что позволяет расходовать большее количество ацетил-CoA в реакции цикла, катализируемой цитратсинтазой.

Другие анаплеротические реакции (табл. 16-2) также подвержены регуляции, цель которой состоит в поддержании достаточно высокого уровня интермедиатов, необходимого для осуществления цикла лимонной кислоты. Так, ФЕП-карбоксилаза активируется в присутствии интермедиата гликолиза фруктозо-1,6-бисфосфата, который накапливается при слишком медленном продвижении цикла лимонной кислоты, когда образующийся в результате гликолиза пируват не успевает перерабатываться.

Биотин в составе пируваткарбоксилазы переносит группы CO_2

Реакция, катализируемая пируваткарбоксилазой, требует наличия **биотина** — простетической группы этого фермента (**рис. 16-16**). Витамин биотин играет очень важную роль во многих реакциях карбоксилирования. Это специализированный переносчик одноуглеродных групп в их наиболее окисленной форме — в форме CO_2. Перенос одноуглеродных групп в более восстановленной форме осуществляют другие кофакторы, такие как тетрагидрофолат и S-аденозилметионин (гл. 18). Активация карбоксильных групп происходит при расщеплении ATP и присоединении CO_2 к связанному с ферментом биотину. Затем этот «активированный» CO_2 передается на молекулу акцептора (в данном случае на пируват) в реакции карбоксилирования.

Пируваткарбоксилаза состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых содержит ковалентно связанный биотин, присоединенный амидной связью к ε-аминогруппе специфического остатка лизина в активном центре фермента. Карбоксилирование пирувата происходит в две стадии (рис. 16-16): сначала карбоксигруппа, поставляемая HCO_3^-, связывается с биотином, а затем переносится на пируват с образованием оксалоацетата. Эти две стадии протекают в разных активных центрах. Длинное гибкое «плечо» биотина переносит активированную карбоксильную группу от первого активного центра ко второму, действуя примерно так же, как липоиллизиновое «плечо» фермента E_2 в пируватдегидрогеназном комплексе (рис. 16-6) и длинное «плечо» CoA-подобного фрагмента в ацилпереносящем белке, участвующем в синтезе жирных кислот (см. рис. 21-5). Перечисленные структуры схематично представлены на **рис. 16-17**. Липоат, биотин и пантотенат проникают в клетку с помощью одного и того же переносчика; все они в аналогичных реакциях ковалентно связываются с белками, а также все они служат гибким «плечом», способствующим переносу интермедиатов

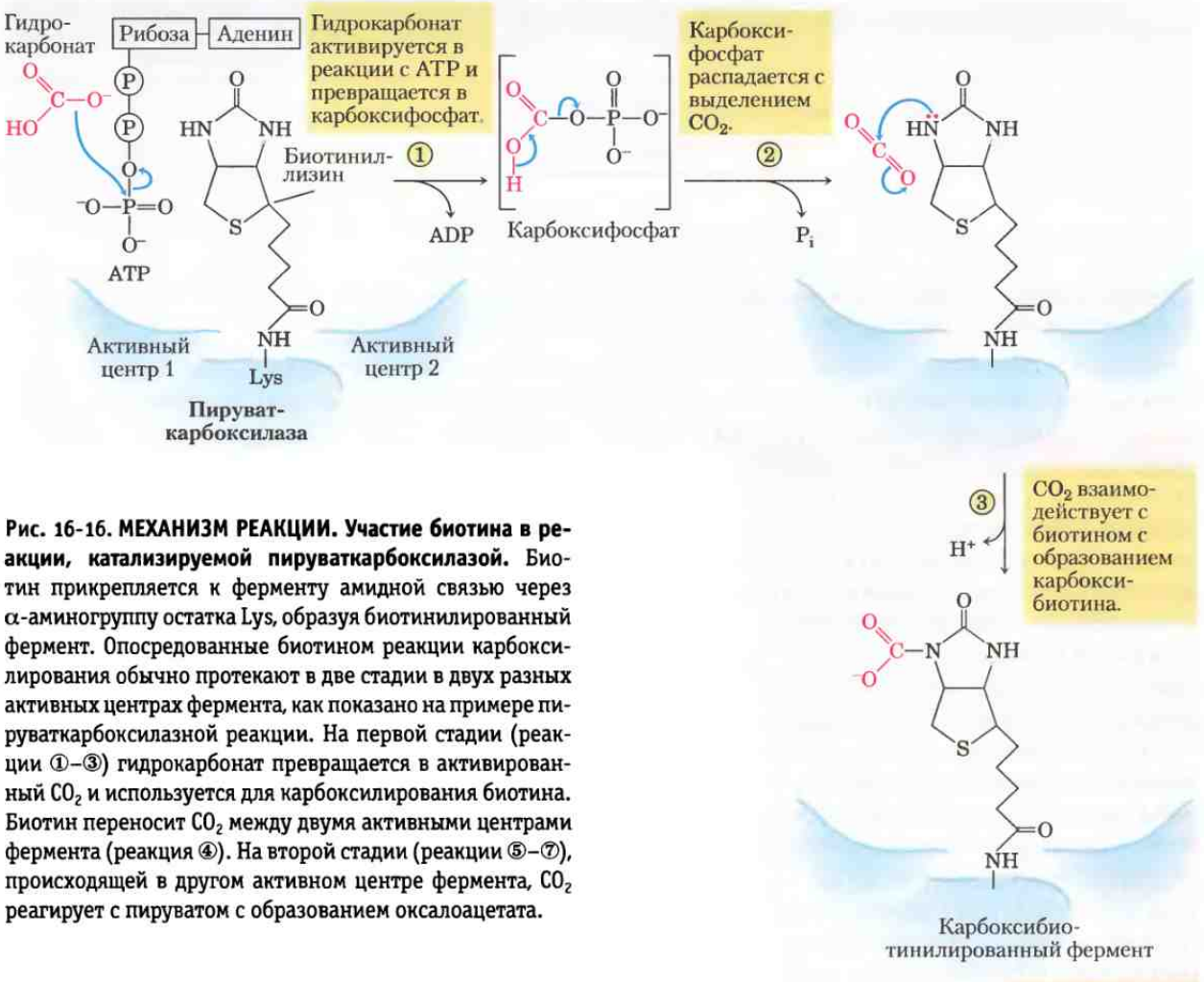


Рис. 16-16. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Участие биотина в реакции, катализируемой пируваткарбоксилазой. Биотин прикрепляется к ферменту амидной связью через α-аминогруппу остатка Lys, образуя биотинилированный фермент. Опосредованные биотином реакции карбоксилирования обычно протекают в две стадии в двух разных активных центрах фермента, как показано на примере пируваткарбоксилазной реакции. На первой стадии (реакции ①–③) гидрокарбонат превращается в активированный CO_2 и используется для карбоксилирования биотина. Биотин переносит CO_2 между двумя активными центрами фермента (реакция ④). На второй стадии (реакции ⑤–⑦), происходящей в другом активном центре фермента, CO_2 реагирует с пируватом с образованием оксалоацетата.

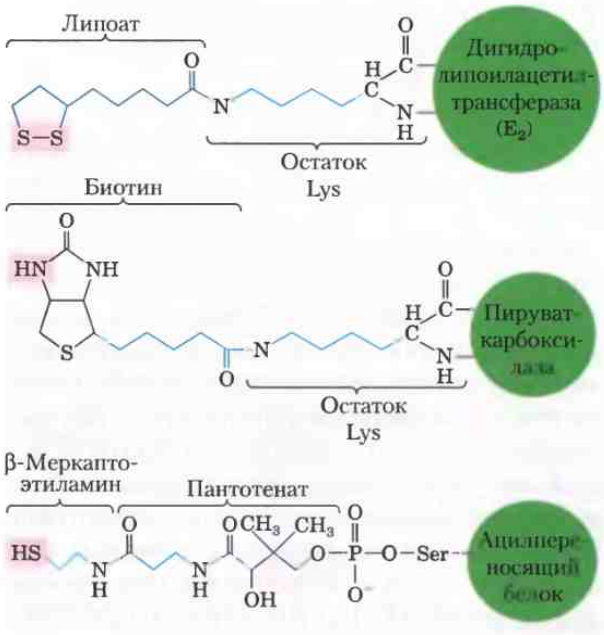


Рис. 16-17. Строение гибких «плеч», образованных липоатом, биотином и пантотенатом. Кофакторы липоат, биотин и β-меркаптоэтиламинпантотенат образуют длинные гибкие «плечи», присоединяясь к ферменту ковалентной связью. По этим «плечам» интермедиаты перемещаются от одного активного центра к другому. Розовым выделены группы, с которыми связывается активированный интермедиат.

из одного активного центра в другой без их диссоциации из ферментного комплекса, т. е. принимают участие в туннелировании субстрата.

Биотин необходим человеку для жизни; большое количество биотина содержится во многих продуктах, кроме того, он синтезируется микрофлорой кишечника. Дефицит биотина встречается редко, но иногда может быть вызван употреблением в пищу большого количества сырых яиц. Яичный белок содержит много белка **авидина** (M_r 70 000), который прочно связывает биотин и предотвращает его всасывание в кишечнике. Наличие авидина в яичном белке, возможно, защищает куриный эмбрион от бактериального заражения. При тепловой обработке яиц авидин, как и все другие белки, денатурирует и, следовательно, инактивируется. Очищенный авидин широко применяют в качестве реагента в биохимии и клеточной биологии. Белок, содержащий ковалентно связанный биотин (как искусственно сконструированный, так и образующийся *in vivo*), можно выделить с помощью аффинной хроматографии (см. рис. 3-17, *в*), пользуясь высоким сродством биотина к авидину. Связавшийся на колонке белок смывают избытком свободного биотина. Высокое сродство биотина к авидину также используют в лабораторной практике для создания «молекулярного клея», способного удерживать вместе две структуры (см. рис. 19-28).

Краткое содержание раздела 16.2
РЕАКЦИИ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

- Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса или цикл трикарбоновых кислот) является практически универсальным центральным путем катаболизма, в котором вещества, образующиеся при расщеплении углеводов, жиров и белков, окисляются до CO_2, а большая часть энергии этого окисления сохраняется в переносчиках электронов $FADH_2$ и NADH. При аэробном метаболизме электроны от этих переносчиков передаются на O_2, а энергия от переноса электронов запасается в форме ATP.

- Ацетил-CoA поступает в цикл лимонной кислоты (в митохондриях у эукариот или в цитозоле у прокариот), по мере того как фермент цитратсинтаза катализирует его конденсацию с оксалоацетатом, в результате которой образуется цитрат.

- В семи последующих реакциях, в том числе в двух реакциях декарбоксилирования, цитрат превращается в оксалоацетат и выделяются две молекулы CO_2. Данный путь метаболизма замкнут, т. е. интермедиаты цикла не расходуются: на каждую затраченную в цикле молекулу оксалоацетата образуется одна новая.

- Выигрыш энергии в пересчете на каждую окисленную молекулу ацетил-CoA составляет три молекулы NADH, одна молекула $FADH_2$ и одна молекула нуклеозидтрифосфата (ATP или GTP).

- В цикле лимонной кислоты может окисляться не только ацетил-CoA, но любое соединение, превращающееся в четырех- или пятиуглеродный интермедиат, например продукты распада многих аминокислот.

- Цикл лимонной кислоты амфиболический, он задействован как в путях катаболизма, так и анаболизма. Интермедиаты цикла могут расходоваться в качестве исходных веществ в биосинтезе множества различных продуктов.

- Поскольку интермедиаты цикла расходуются в других путях биосинтеза, их приходится восполнять в нескольких анаплеротических реакциях, где четырехуглеродные интермедиаты цикла образуются при карбоксилировании трехуглеродных соединений. Эти реакции катализируют ферменты пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксикиназа, ФЕП-карбоксилаза и малат-фермент (яблочный фермент). Ферменты, катализирующие карбоксилирование, часто используют биотин для активации и переноса CO_2 на молекулы пирувата или фосфоенолпирувата.

16.3. Регуляция цикла лимонной кислоты

Как мы видели в гл. 15, регуляция ключевых ферментов метаболических путей как при помощи аллостерических модуляторов, так и в результате ковалентной модификации обеспечивает образование интермедиатов с такой скоростью, которая необходима для поддержания в клетке устойчивого (стационарного) состояния без избыточного производства этих интермедиатов. Поток атомов углерода от пирувата до цикла лимонной кислоты и через него строго контролируется на двух уровнях: при превращении пирувата в стартовый метаболит цикла ацетил-CoA (реакция, катализируемая пируватдегидрогеназным комплексом), а также при вхождении ацетил-CoA в цикл (цитратсинтазная реакция). Ацетил-CoA образуется не только в результате действия ПДГ-комплекса, поскольку большинство клеток получают ацетил-CoA, окисляя жирные кислоты и некоторые аминокислоты, и доступность интермедиатов этих метаболических путей играет важную роль в регуляции окисления пирувата и в регуляции цикла лимонной кислоты. Кроме того, цикл регулируется на уровне реакций, катализируемых изоцитратдегидрогеназой и α-кетоглутаратдегидрогеназой.

Образование ацетил-CoA под действием пируватдегидрогеназного комплекса регулируется аллостерическими и ковалентными взаимодействиями

У млекопитающих действие ПДГ-комплекса сильно ингибируется ATP, а также ацетил-CoA и NADH — продуктами катализируемой комплексом реакции (**рис. 16-18**). Аллостерическое ингибирование окисления пирувата значительно усиливается при наличии длинноцепочечных жирных кислот. Напротив, AMP, CoA и NAD^+, накапливающиеся при очень низкой скорости поступления ацетата в цикл лимонной кислоты, в результате аллостерических взаимодействий активируют ПДГ-комплекс. Таким образом, данная ферментативная активность снижается при наличии достаточного количества топливных молекул — жирных кислот и ацетил-CoA, а также при высоких значениях отношений [ATP]/[ADP] и [NADH]/[NAD^+] в клетке, и усиливается вновь при увеличении энергетических запросов клетки и при необходимости интенсифицировать поступление ацетил-CoA в цикл лимонной кислоты.

У млекопитающих эти аллостерические механизмы регуляции дополняются вторым уровнем регуляции ковалентной модификацией белков. ПДГ-комплекс ингибируется в результате обратимого фосфорилирования специфического остатка Ser на одной из двух субъединиц белка E_1. Как отмечалось ранее, ПДГ-комплекс млекопитающих содержит не только белки E_1, E_2 и E_3, но и два регуляторных белка, чья единственная функция состоит в регуляции активности комплекса. Специфическая протеинкиназа фосфорилирует и тем самым инактивирует E_1, а специфическая фосфопротеинфосфатаза удаляет фосфорильную группу и тем самым реактивирует E_1. Киназа активируется путем аллостерического взаимодействия с ATP: при высокой концентрации ATP (свидетельствующей о достаточных запасах энергии) ПДГ-комплекс инактивируется в результате фосфорилирования E_1. При снижении концентрации ATP активность киназы уменьшается и фосфатаза удаляет фосфорильную группу от E_1, активируя комплекс.

У растений ПДГ-комплекс, расположенный в митохондриальном матриксе и в пластидах, ингибируется продуктами катализируемой им реакции — NADH и ацетил-CoA. Кроме того, ферментативная активность у растений также

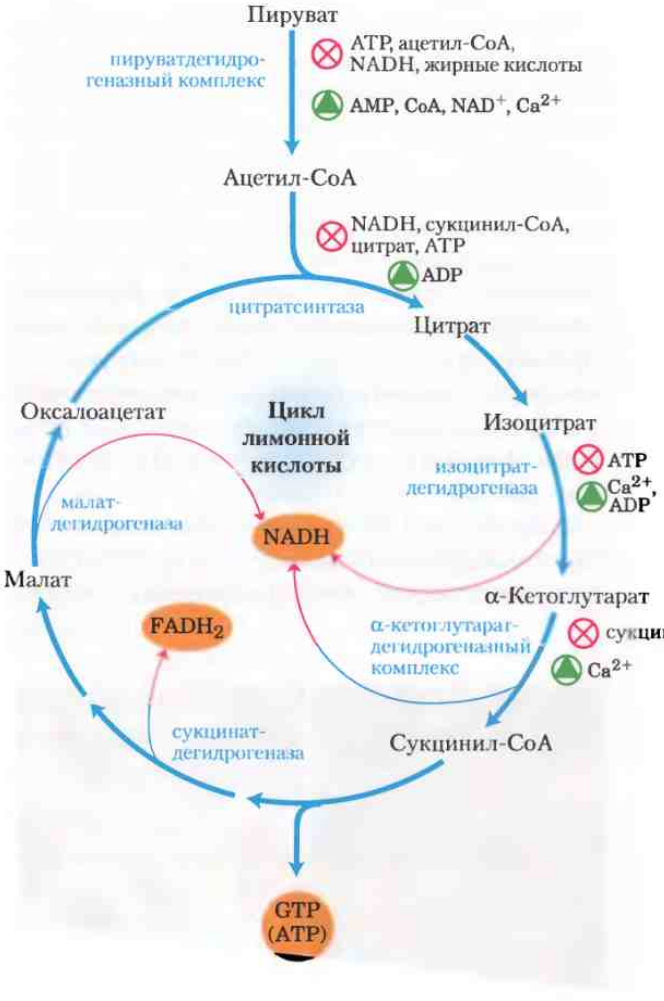


Рис. 16-18. Регуляция потока метаболитов от ПДГ-комплекса в цикле лимонной кислоты у млекопитающих. Аллостерическое ингибирование ПДГ-комплекса наблюдается при высоких значениях отношений [ATP]/[ADP], [NADH]/[NAD+] и [ацетил-CoA]/[CoA], что соответствует достаточному энергетическому запасу клетки. При уменьшении этих значений происходит аллостерическая активация окисления пирувата. Скорость потока метаболитов в цикле лимонной кислоты может ограничиваться доступностью субстратов цитратсинтазы (оксалоацетата и ацетил-CoA) или NAD+, который расходуется при превращении в NADH, что снижает скорость трех NAD-зависимых окислительных стадий. Ингибирование по принципу обратной связи, оказываемое сукцинил-CoA, цитратом и ATP, также замедляет цикл, тормозя его начальные стадии. В мышечной ткани ионы Ca^{2+} служат сигналом мышечного сокращения и, как показано на рисунке, стимулируют выработку энергии для восполнения запасов ATP, затраченных при сокращении мышц.

регулируется при помощи обратимого фосфорилирования: пируват ингибирует киназу, активируя ПДГ-комплекс, а NH_4^+ стимулирует киназу, способствуя инактивации комплекса. В клетках *E. coli* ПДГ-комплекс регулируется в результате аллостерических взаимодействий примерно так же, как в клетках млекопитающих, но, по-видимому, регуляция фосфорилированием отсутствует.

Регуляция цикла лимонной кислоты осуществляется на трех экзергонических стадиях

Поток метаболитов по циклу лимонной кислоты строго регулируется. Скорость потока в цикле определяется тремя факторами: доступностью субстратов, ингибированием продуктами реакций и аллостерическим ингибированием ферментов, катализирующих начальные стадии цикла, которое осуществляется по принципу обратной связи.

Любая из трех экзергонических стадий цикла, катализируемая цитратсинтазой, изоцитратдегидрогеназой или α-кетоглутаратдегидрогеназой (рис. 16-18), может в определенных условиях лимитировать скорость всего процесса. Доступность субстратов цитратсинтазы (ацетил-CoA и оксалоацетата) в клетке изменяется в зависимости от условий, что может ограничивать скорость образования цитрата. Возникающий в результате окисления изоцитрата и α-кетоглутарата NADH при определенных условиях может накапливаться, а согласно закону действующих масс при большом значении отношения [NADH]/[NAD+] обе дегидрогеназные реакции сильно ингибируются. Малатдегидрогеназная реакция в клетке

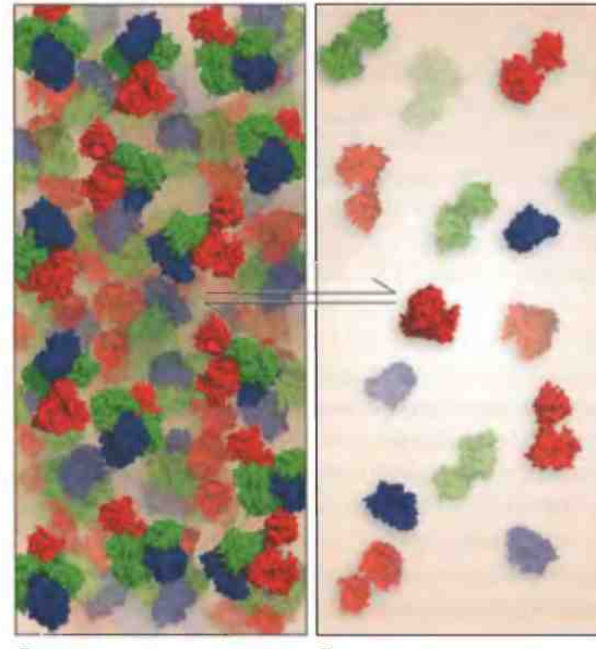
также происходит практически в стационарных условиях (ее скорость ограничена концентрацией субстратов) — и при больших значениях отношения [NADH]/[NAD^+] концентрация оксалоацетата низкая, отсюда и скорость первой стадии цикла мала. Накопление продуктов тормозит все три лимитирующие стадии цикла: сукцинил-CoA ингибирует α-кетоглутаратдегидрогеназу (а также цитратсинтазу), цитрат блокирует цитратсинтазу, а ATP ингибирует как цитратсинтазу, так и изоцитратдегидрогеназу. Ингибирующее действие ATP по отношению к цитратсинтазе снимается в присутствии ADP — аллостерического активатора данного фермента. В мышцах позвоночных ионы Ca^{2+}, которые служат сигналом мышечного сокращения и роста потребности в ATP, активируют как изоцитратдегидрогеназу, так и α-кетоглутаратдегидрогеназу и ПДГ-комплекс. Короче говоря, концентрации субстратов и интермедиатов цикла лимонной кислоты устанавливают скорость потока по этому пути на таком уровне, чтобы обеспечить оптимальные концентрации ATP и NADH.

В обычных условиях скорости гликолиза и цикла лимонной кислоты связаны таким образом, что из глюкозы образуется лишь то количество пирувата, которое нужно для снабжения цикла лимонной кислоты необходимым «топливом» — ацетильными группами для ацетил-CoA. Концентрации пирувата, лактата и ацетил-CoA обычно поддерживаются на стационарном уровне. Скорость гликолиза приводится в соответствие со скоростью цикла лимонной кислоты не только путем ингибирования высокими концентрациями ATP и NADH (а это обычно бывает при окислении глюкозы в процессах гликолиза и дыхания), но также путем изменения концентрации цитрата. Цитрат, продукт первой стадии цикла лимонной кислоты, — важный аллостерический ингибитор фосфофруктокиназы-1 в процессе гликолиза (см. рис. 15-14).

В цикле лимонной кислоты может происходить туннелирование субстрата, характерное для полиферментных комплексов

О ферментах цикла лимонной кислоты обычно говорят как о растворимых компонентах митохондриального матрикса (за исключением мембраносвязанной сукцинатдегидрогеназы), однако появляется все больше доказательств того, что в митохондриях эти ферменты существуют в виде полиферментного комплекса. При изучении ферментов цикла лимонной кислоты был успешно использован классический метод энзимологии — выделение и очистка отдельных ферментов из экстракта разрушенных клеток. Однако при разрушении клеток страдает в первую очередь сложная внутриклеточная организация — нековалентные связи. образуемые при обратимых взаимодействиях между белками (ферментами) в таких клеточных структурах, как мембраны, микротрубочки или микрофиламенты. При разрушении клеток их содержимое, в том числе ферменты, разбавляются в 100–1000 раз **(рис. 16-19)**.

Существует несколько доказательств того, что полиферментные комплексы в клетке обеспечивают эффективное продвижение продукта



Высокая концентрация ферментов в цитозоле способствует их ассоциации

В экстракте разрушенных клеток происходит разбавление клеточного содержимого буфером, приводящее к снижению концентрации ферментов и диссоциации их комплекса

Рис. 16-19. Разбавление раствора, содержащего комплекс нековалентно связанных белков (в данном случае состоящего из трех ферментов), способствует диссоциации комплекса на составляющие.

одной ферментативной реакции к следующему ферменту данного метаболического пути (подобные комплексы было предложено называть **метаболонами**). Некоторые ферменты цикла лимонной кислоты образуют надмолекулярные комплексы; они связаны с внутренней митохондриальной мембраной или скорость их диффузии в митохондриальном матриксе ниже, чем скорость перемещения для индивидуальных ферментов в растворе. Существуют неоспоримые доказательства туннелирования субстрата в полиферментных комплексах в других метаболических путях, и многие ферменты, которые принято считать «растворимыми», на самом деле в клетке функционируют как высокоорганизованные комплексы, осуществляющие туннелирование интермедиатов. Мы столкнемся с другими примерами туннелирования в гл. 22 при обсуждении биосинтеза аминокислот и нуклеотидов.

Некоторые мутации генов ферментов, участвующих в цикле лимонной кислоты, способствуют развитию рака

При серьезных метаболических нарушениях, затрагивающих регуляцию таких важных процессов, как цикл лимонной кислоты, могут развиваться тяжелые заболевания. У человека и других млекопитающих очень редко наблюдаются мутации генов ферментов, задействованных в цикле лимонной кислоты, но если они происходят, последствия чрезвычайно опасны. Дефект гена фумаразы приводит к развитию опухолей гладких мышц (лейома) и почек, мутации гена сукцинатдегидрогеназы — к опухолям надпочечников (феохромоцитома). В культурах клеток с данными мутациями накапливается фумарат (при мутации гена фумаразы) или в меньших количествах сукцинат (при мутации гена сукцинатдегидрогеназы), в результате чего активируется фактор транскрипции HIF-1α, индуцируемый гипоксией (см. доп. 14-1). Развитие опухоли, возможно, вызывает состояние псевдогипоксии. В клетках с подобными мутациями наблюдается повышение уровня экспрессии генов, в норме регулируемых HIF-1α. Подобная роль мутаций генов фумаразы и сукцинатдегидрогеназы указывает на то, что эти гены являются опухолевыми супрессорами (см. с. 670, т. 1). ■

Краткое содержание раздела 16.3 РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ

- Общая скорость цикла лимонной кислоты определяется скоростью превращения пирувата в ацетил-CoA, а также потоком метаболитов через стадии цикла, катализируемые цитратсинтазой, изоцитратдегидрогеназой и α-кетоглутаратдегидрогеназой. В свою очередь эти потоки в значительной степени зависят от концентраций субстратов и продуктов: конечные продукты ATP и NADH ингибируют реакции, а субстраты NAD^+ и ADP стимулируют их.

- Образование исходного субстрата цикла лимонной кислоты ацетил-CoA под действием ПДГ-комплекса подвержено аллостерическому ингибированию некоторыми метаболитами, избыток которых говорит о достаточном уровне метаболической энергии в клетке (ATP, ацетил-CoA, NADH и жирные кислоты), и стимулируется метаболитами, накопление которых говорит о снижении уровня энергии (AMP, NAD^+, CoA).

- В комплексах ферментов, действующих последовательно в определенном метаболическом пути, возможно туннелирование промежуточных продуктов метаболизма.

16.4. Глиоксилатный цикл

Позвоночные не могут превращать жирные кислоты или образующийся из них ацетат в углеводы. Превращения фосфоенолпирувата в пируват (с. 79) и пирувата в ацетил-CoA (рис. 16-2) характеризуются настолько значительным отрицательным изменением стандартной свободной энергии, что они практически необратимы. Если клетка не может превращать ацетат в фосфоенолпируват, то ацетат не может использоваться в качестве исходного соединения для глюконеогенеза, где из фосфоенолпирувата образуется глюкоза (см. рис. 15-11). Не обладая подобной способностью, клетка или организм не может использовать топливные молекулы или метаболиты для получения ацетата (жирные кислоты и некоторые аминокислоты) и углеводов.

Как мы отмечали при обсуждении анаплеротических реакций (табл. 16-2), фосфоенолпируват может быть синтезирован из оксалоацетата по обратимой реакции, катализируемой ФЕП-карбоксикиназой:

$$\text{Оксалоацетат} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{фосфоенолпируват} + CO_2 + \text{GDP}$$

Поскольку атомы углерода ацетатной группы, вступающей в цикл лимонной кислоты, спустя восемь стадий оказываются в составе молекулы оксалоацетата, этот путь, казалось бы, пригоден для получения оксалоацетата из ацетата и, таким образом, может поставлять фосфоенолпируват для глюконеогенеза. Однако, как следует из стехиометрии, в цикле лимонной кислоты *не* происходит полного превращения ацетата в оксалоацетат; у позвоночных на каждые два углерода, вступающих в цикл в виде ацетил-CoA, два углерода покидают его в виде CO_2. У многих других организмов для превращения ацетата в углеводы служит глиоксилатный цикл.

В глиоксилатном цикле из ацетата образуются четырехуглеродные соединения

Для растений, некоторых беспозвоночных и некоторых микроорганизмов (в том числе *E. coli* и дрожжей) ацетат может служить и топливом, и исходным соединением для образования фосфоенолпирувата в синтезе углеводов. У таких организмов ферменты **глиоксилатного цикла** катализируют полное превращение ацетата в сукцинат или другой четырехуглеродный интермедиат цикла лимонной кислоты:

$$2\ \text{Ацетил-CoA} + \text{NAD}^+ + 2H_2O \rightarrow \text{сукцинат} + 2\text{CoA} + \text{NADH} + H^+$$

В глиоксилатном цикле ацетил-CoA вступает в реакцию конденсации с оксалоацетатом с образованием цитрата, а цитрат превращается в изоцитрат — в точности как в цикле лимонной кислоты. Однако на следующей стадии изоцитрат разлагается не под действием изоцитратдегидрогеназы, а с помощью **изоцитратлиазы**, в результате чего образуются сукцинат и **глиоксилат**. Далее глиоксилат взаимодействует со следующей молекулой ацетил-CoA с образованием малата под действием **малатсинтазы**. Затем малат окисляется до оксалоацетата, который может реагировать с новой молекулой ацетил-CoA, начиная новый оборот цикла (**рис. 16-20**). В каждом обороте глиоксилатного цикла расходуются две молекулы ацетил-CoA и образуется одна молекула сукцината, доступная для дальнейших реакций биосинтеза. Сукцинат через фумарат и малат может превращаться в оксалоацетат, который, в свою очередь, может превращаться в фосфоенолпируват под действием ФЕП-карбоксикиназы и далее в глюкозу по пути глюконеогенеза. У позвоночных нет ферментов,

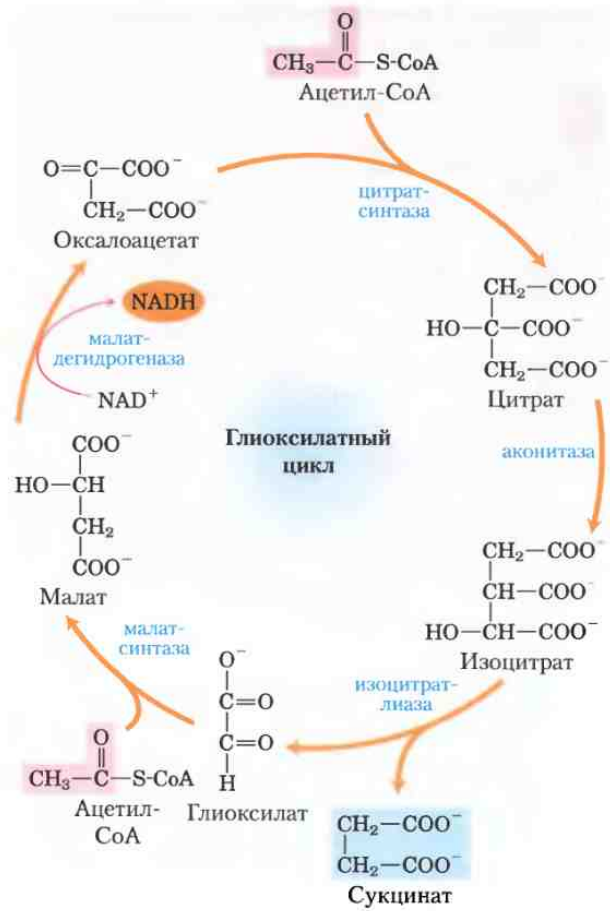


Рис. 16-20. Глиоксилатный цикл. Цитратсинтаза, аконитаза и малатдегидрогеназа глиоксилатного цикла — изоформы соответствующих ферментов цикла лимонной кислоты. Изоцитратлиаза и малатсинтаза специфичны только для глиоксилатного цикла. Обратите внимание, что две ацетильные группы (показаны розовым цветом) входят в цикл, а четыре атома углерода в форме сукцината (выделен голубым) его покидают. Глиоксилатный цикл был исследован Хансом Корнбергом и Нейлом Мэдсеном в лаборатории Ханса Кребса.

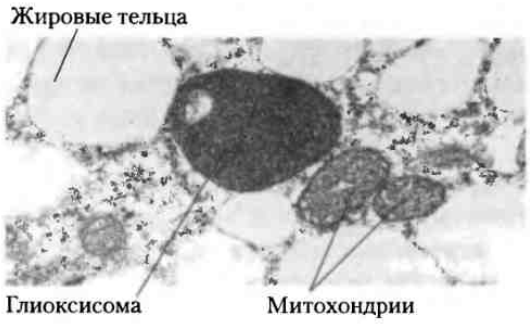


Рис. 16-21. Электронная микрофотография прорастающего семени огурца: видны глиоксисома, митохондрии и жировые тельца.

способных осуществлять глиоксилатный цикл (нет изоцитратлиазы и малатсинтазы), поэтому они не могут проводить синтез глюкозы из липидов.

У растений ферменты глиоксилатного цикла заключены в мембраносвязанные органеллы, называемые глиоксисомами, которые представляют собой специализированные пероксисомы (**рис. 16-21**). Общие для цикла лимонной кислоты и глиоксилатного цикла ферменты имеют две изоформы: одна специфична для митохондрий, другая — для глиоксисом. В растениях глиоксисомы существуют не всегда. Они появляются в богатых липидами семенах в процессе прорастания, прежде чем растение приобретет способность синтезировать глюкозу путем фотосинтеза. Кроме ферментов глиоксилатного цикла в глиоксисомах содержатся все ферменты, необходимые для расщепления жирных кислот, запасенных в семенах (см. рис. 17-13). Образующийся при расщеплении липидов ацетил-CoA далее превращается в сукцинат через глиоксилатный цикл, а сукцинат транспортируется в митохондрии, где преобразуется в малат под действием ферментов цикла лимонной кислоты. Цитозольная изоформа малатдегидрогеназы окисляет малат до оксалоацетата — исходного субстрата для глюконеогенеза. Таким образом, прорастающие семена способны конвертировать запасные жиры в глюкозу.

Цикл лимонной кислоты и глиоксилатный цикл регулируются согласованно

В прорастающих семенах растений ферментативные превращения ди- и трикарбоновых кислот происходят в трех внутриклеточных отделах: в митохондриях, в глиоксисомах и в цитозоле. Между этими отделами клетки постоянно происходит обмен метаболитами (**рис. 16-22**).

Углеродный скелет оксалоацетата из цикла лимонной кислоты (в митохондриях) переносится в глиоксисомы в форме аспартата. Аспартат

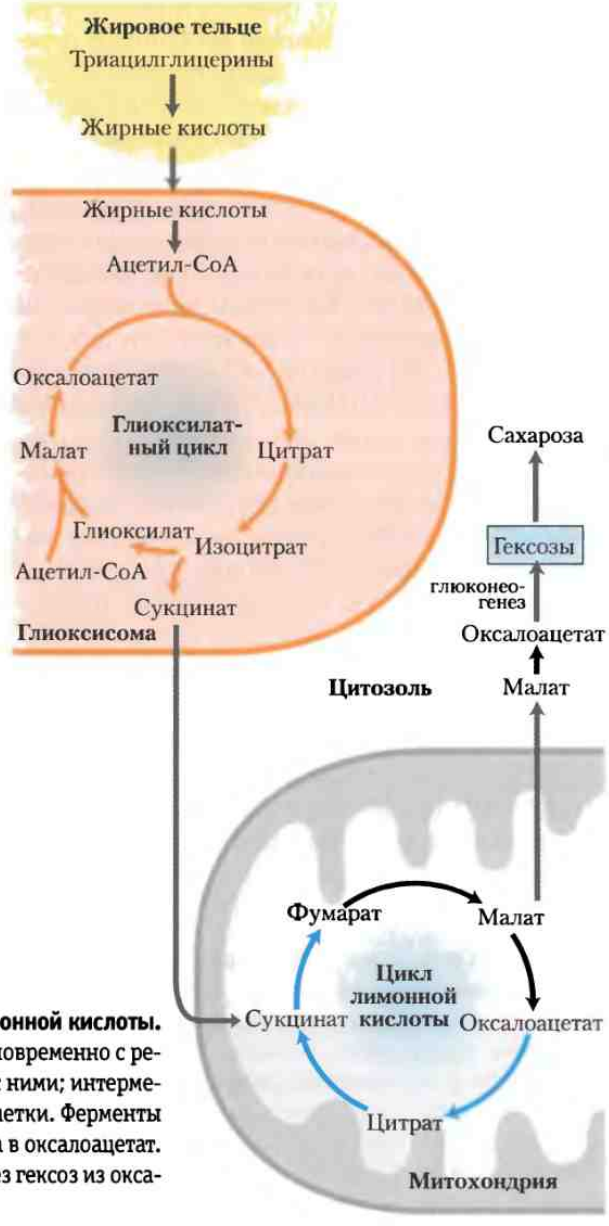


Рис. 16-22. Связь между глиоксилатным циклом и циклом лимонной кислоты. Реакции глиоксилатного цикла (в глиоксисомах) происходят одновременно с реакциями цикла лимонной кислоты (в митохондриях) и связаны с ними; интермедиаты обоих процессов перемещаются между этими отделами клетки. Ферменты цикла лимонной кислоты катализируют превращение сукцината в оксалоацетат. Окисление жирных кислот до ацетил-CoA описано в гл. 17; синтез гексоз из оксалоацетата обсуждается в гл. 20.

превращается в оксалоацетат, который вступает в реакцию конденсации с ацетил-CoA, возникшим в результате разложения жирных кислот. Образовавшийся таким образом цитрат далее под действием аконитазы превращается в изоцитрат, а затем под действием изоцитратлиазы расщепляется на глиоксилат и сукцинат. Сукцинат возвращается в митохондрии, где вновь включается в цикл лимонной кислоты и превращается в малат, который переходит в цитозоль и под действием цитозольной формы малатдегидрогеназы окисляется до оксалоацетата. Оксалоацетат путем глюконеогенеза преобразуется в гексозы и сахарозу, которые могут транспортироваться растущими корнями и побегами растения. В перечисленных превращениях задействованы четыре пути метаболизма: расщепление жирных кислот до ацетил-CoA (в глиоксисомах), глиоксилатный цикл (в глиоксисомах), цикл лимонной кислоты (в митохондриях) и глюконеогенез (в цитозоле).

Для использования общих интермедиатов необходимо, чтобы эти пути метаболизма регулировались согласованно. Ключевым интермедиатом в участке разветвления глиоксилатного цикла и цикла лимонной кислоты является изоцитрат **(рис. 16-23)**. Регуляция изоцитратдегидрогеназы осуществляется путем ковалентной модификации: специфическая протеинкиназа фосфорилирует и тем самым инактивирует этот фермент. В результате этой инактивации изоцитрат направляется в глиоксилатный цикл, где он служит отправной точкой для синтеза глюкозы. Фосфопротеинфосфатаза удаляет фосфорильную группу из изоцитратдегидрогеназы, вновь активируя фермент и способствуя тому, что большее количество изоцитрата направляется в цикл лимонной кислоты для получения энергии. Активностью протеинкиназы и фосфопротеинфосфатазы обладает один и тот же полипептид.

Некоторые бактерии, в том числе *E. coli*, содержат полный набор ферментов глиоксилатного цикла и цикла лимонной кислоты в цитозоле и поэтому могут использовать для своего роста ацетат в качестве единственного источника углерода и энергии. В свою очередь, фосфопротеинфосфатаза, активирующая изоцитратдегидрогеназу, стимулируется интермедиатами цикла лимонной кислоты и гликолиза, а также метаболитами, накапливающимися при снижении энергетических запасов клетки (рис. 16-23). Те же метаболиты *ингибируют* активность протеинкиназы — бифункционального полипептида. Таким образом, появление интермедиатов центральных путей образования энергии (что сигнализирует об исчерпании клеткой энергетических запасов) приводит к активации изоцитратдегидрогеназы. При

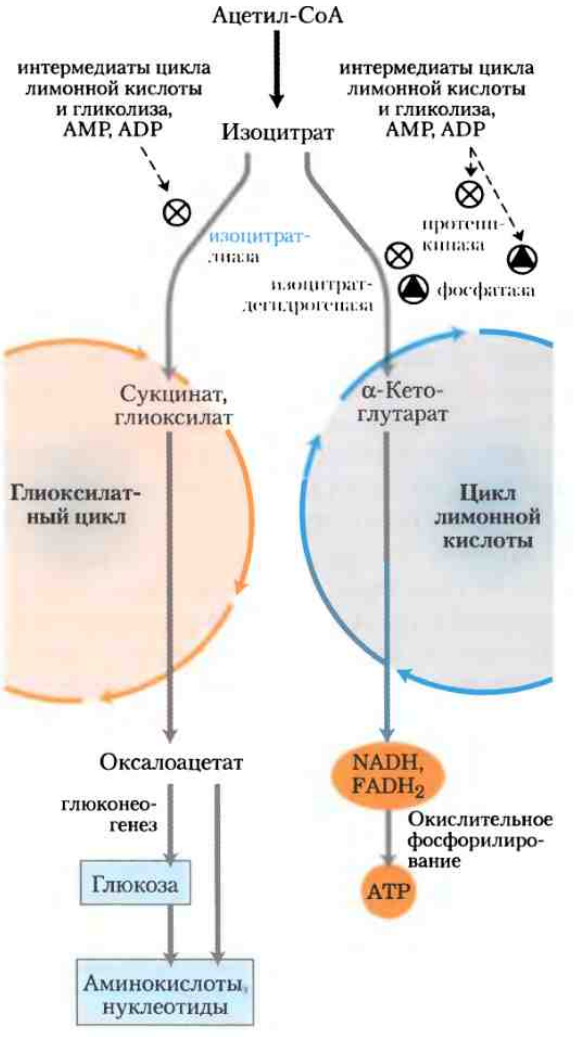


Рис. 16-23. Согласованная регуляция глиоксилатного цикла и цикла лимонной кислоты. Регуляция активности изоцитратдегидрогеназы определяет распределение изоцитрата между двумя циклами. При инактивации фермента фосфорилированием специфической протеинкиназой изоцитрат направляется на реакции биосинтеза через глиоксилатный цикл. При активации фермента специфической фосфатазой изоцитрат поступает в цикл лимонной кислоты для образования ATP.

снижении концентрации этих регуляторных молекул (означающем достаточную интенсивность потока метаболитов в цикле лимонной кислоты) изоцитратдегидрогеназа инактивируется под действием протеинкиназы.

Те же интермедиаты гликолиза и цикла лимонной кислоты, что активируют изоцитратдегидрогеназу, являются аллостерическими ингибиторами изоцитратлиазы. Если метаболизм, ведущий к накоплению энергии, достаточно интенсивен для поддержания на низком уровне концентраций общих интермедиатов гликолиза и цикла лимонной кислоты, изоцитратдегидрогеназа инактивируется, ингибирование изоцитратлиазы прекращается, а изоцитрат направляется в глиоксилатный цикл для дальнейшего использования в биосинтезе углеводов, аминокислот и других компонентов клетки.

Краткое содержание раздела 16.4 ГЛИОКСИЛАТНЫЙ ЦИКЛ

- Глиоксилатный цикл реализуется в проростках семян некоторых растений и у микроорганизмов, способных использовать ацетат в качестве единственного источника углерода. В глиоксилатном цикле задействованы некоторые ферменты цикла лимонной кислоты, а также два других фермента — изоцитратлиаза и малатсинтаза.

- Обходные реакции глиоксилатного цикла, заменяющие две стадии декарбоксилирования в цикле лимонной кислоты, делают возможным образование сукцината, оксалоацетата и других интермедиатов полностью из ацетил-CoA. Образующийся при этом оксалоацетат может быть использован для синтеза глюкозы через глюконеогенез.

- Распределение изоцитрата между циклом лимонной кислоты и глиоксилатным циклом контролируется на уровне изоцитратдегидрогеназы, активность которой регулируется обратимым фосфорилированием.

- У позвоночных глиоксилатный цикл не реализуется, поэтому они не могут синтезировать глюкозу из ацетата или жирных кислот через ацетил-CoA.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

авидин 207
амфиболический путь 203
анаплеротическая реакция 204
биотин 205
глиоксилатный цикл 212
дыхание 181
железо-серный центр (кластер) 192
α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс 194
киназы 197
клеточное дыхание 181
лиазы 197
лигазы 197
липоат 183
метаболон 211
нуклеозиддифосфаткиназа 198
окислительное декарбоксилирование 183
пируватдегидрогеназный (ПДГ) комплекс 182
прохиральная молекула 200
синтазы 197
синтетазы 197
тиоэфир 183
туннелирование субстрата 187
ферменты со скрытой функцией 193
фосфатазы 197
фосфорилазы 197
цикл Кребса 181
цикл лимонной кислоты 181
цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) 181

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая информация

Holmes, F. L. (1990, 1993) *Hans Krebs*, Vol. 1: *Formation of a Scientific Life, 1900–1933*; Vol. 2: *Architect of Intermediary Metabolism, 1933–1937*, Oxford University Press, Oxford.

Биография Кребса и его научные достижения в изложении известного историка науки с тщательным анализом работ, посвященных циклам мочевины и лимонной кислоты.

Kay, J. & Weitzman, P. D. J. (eds) (1987) *Krebs' Citric Acid Cycle: Half a Century and Still Turning*, Biochemical Society Symposium **54**, The Biochemical Society, London.

Сборник работ многих авторов, посвященный циклу лимонной кислоты, в том числе молекулярной генетике, регуляторным механизмам, вариациям цикла у микроорганизмов из необычных мест обитания, а также эволюции данного пути. Наиболее важны следующие главы: H. Gest, Evolutionary Roots of the Citric Acid Cycle in Prokaryotes; W. H. Holms, Control of Flux through the Citric Acid Cycle and the Glyoxylate Bypass in *Escherichia coli*; R. N. Perham et al., α-Keto Acid Dehydrogenase Complexes.

Пируватдегидрогеназный комплекс

Harris, R. A., Bowker-Kinley, M. M., Huang, B., & Wu, P. (2002) Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul.* **42**, 249–259.

Milne, J. L. S., Shi, D., Rosenthal, P. B., Sunshine, J. S., Domingo, G. J., Wu, X., Brooks, B. R., Perham, R. N., Henderson, R., & Subramaniam, S. (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *EMBO J.* **21**, 5587–5598.

Рассказано о возможностях метода криоэлектронной микроскопии при создания моделей, в данном случае при создании модели структуры ПДГ-комплекса. Сравните описанную модель с предложенной в другой работе [Zhou et al. — см. ниже].

Perham, R. N. (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 961–1004.

О функциях подвижного «плеча», содержащего липоат, биотин и пантотенат, в туннелировании субстрата в полиферментных комплексах.

Zhou, Z. N., McCarthy, D. B., O'Conner, C. M., Reed, L. J., & Stoops, J. K. (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 14802–14807.

Замечательная статья о том, как, используя метод криоэлектронной микроскопии можно построить модель ПДГ-комплекса. Сравните описанную модель с той, что предложена в другой работе [Milne et al. — см. выше].

Ферменты цикла лимонной кислоты

Fraser, M. D., James, M. N., Bridger, W. A., & Wolodko, W. T. (1999) A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J. Mol. Biol.* **285**, 1633–1653. (См. также поправку в *J. Mol. Biol.* **288**, 501 (1999)).

Goward, C. R. & Nicholls, D. J. (1994) Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci.* **3**, 1883–1888.

Краткий хороший обзор.

Hagerhall, C. (1997) Succinate:quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**, 107–141.

Обзор структуры и функций сукцинатдегидрогеназ.

Jitrapakdee, S. & Wallace, J. C. (1999) Structure, function, and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* **340**, 1–16.

Knowles, J. (1989) The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 195–221.

Matte, A., Tari, L. W., Goldie, H., & Delbaere, L. T. J. (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 8105–8108.

Ovadi, J. & Srere, P. (2000) Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 255–280.

Обзор повышенной сложности, посвященный туннельному эффекту и метаболонам.

Remington, S. J. (1992) Structure and mechanism of citrate synthase. Curr. Top. Cell. Regul. 33, 209–229.

Подробный обзор.

Singer, T. P. & Johnson, M. K. (1985) The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. *FEBS Lett.* **190**, 189–198.

Описание строения и функций железо-серных кластеров в этом ферменте.

Wolodko, W. T., Fraser, M. E., James, M. N. G., & Bridger, W. A. (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 10883–10890.

Ферменты со скрытой функцией

Eisenstein, R. S. (2000) Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **20**, 627–662.

Kim, J.-W. & Dang, C. V. (2006) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 142–150.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный ферментам со скрытой функцией.

Rouault, T. A. (2006) The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 406–414.

Обзор повышенного уровня сложности.

Регуляция цикла лимонной кислоты

Briere, J.-J., Favier, J., Gimenez-Roqueplo, A.-P., & Rustin, P. (2006) Tricarboxylic acid cycle dysfunction as a cause of human diseases and tumor formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, 1114–1120.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный влиянию мутаций сукцинатдегидрогеназы, фумаразы и α-кетоглутаратдегидрогеназы на здоровье человека.

Hansford, R. G. (1980) Control of mitochondrial substrate oxidation. Curr. Top. Bioenerget. 10, 217–278.

Подробный обзор по регуляции цикла лимонной кислоты.

Kaplan, N. O. (1985) The role of pyridine nucleotides in regulating cellular metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **26**, 371–381.

Прекрасное обсуждение общего плана о роли отношения $[NADH]/[NAD^+]$ в клеточной регуляции.

King, A., Selak, M. A., & Gottlieb, E. (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene* **25**, 4675–4682.

Reed, L. J., Damuni, Z., & Merryfield, M. L. (1985) Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation–dephosphorylation. *Curr. Top. Cell. Regul.* **27**, 41–49.

Глиоксилатный цикл

Eastmond, P. J. & Graham, I. A. (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* **6**, 72–77.

Обзор средней степени сложности, посвященный исследованиям глиоксилатного цикла у *Arabidopsis*.

Holms, W. H. (1986) The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr. Top. Cell. Regul.* **28**, 69–106.

Вопросы и задачи

1. Баланс цикла лимонной кислоты. В цикле лимонной кислоты принимают участие восемь ферментов: цитратсинтаза, аконитаза, изоцитратдегидрогеназа, α-кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинил-CoA-синтетаза, сукцинатдегидрогеназа, фумараза и малатдегидрогеназа.

а) Напишите уравнение реакции, катализируемой каждым ферментом.

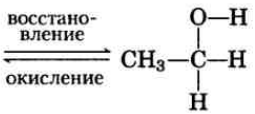
б) Назовите кофакторы, необходимые для действия каждого фермента.

в) Для каждого фермента укажите, к какому типу относится катализируемая им реакция: конденсация (образование связи углерод–углерод), дегидратация (отщепление воды), гидратация (присоединение воды), декарбоксилирование (отщепление CO_2), окислительно-восстановительная реакция, фосфорилирование на уровне субстрата или изомеризация.

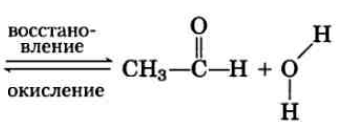
г) Напишите суммарное уравнение для превращения ацетил-CoA в CO_2.

2. Суммарные уравнения гликолиза и цикла лимонной кислоты. Напишите полные биохимические уравнения для метаболизма глюкозы при гликолизе, а также для цикла лимонной кислоты с учетом всех кофакторов.

3. Распознавание окислительно-восстановительных реакций в процессах метаболизма. Биохимическая стратегия многих живых организмов состоит в постепенном окислении органических веществ до CO_2 и H_2O и в сохранении большей части образующейся при этих процессах энергии в форме ATP. Важно уметь распознавать окислительно-восстановительные стадии метаболизма. Восстановление органической молекулы происходит в результате гидрирования по двойной связи (уравнение 1) или по простой связи с ее расщеплением (уравнение 2). Напротив, окисление является результатом дегидратации. В биохимических окислительно-восстановительных реакциях (ОВР) функцию гидрирования/дегидрирования осуществляют коферменты NAD и FAD в присутствии соответствующих ферментов.



(1)



(2)

Для каждого из перечисленных ниже превращений укажите, происходит ли окисление или восстановление. Напишите для каждой ОВР уравнение баланса, добавив H–H, а где необходимо H_2O.

а $CH_3{-}OH \longrightarrow H{-}C(=O){-}H$

Метанол — Формальдегид

б $H{-}C(=O){-}H \longrightarrow H{-}C(=O){-}O^- + H^+$

Формальдегид — Формиат

в $O{=}C{=}O \longrightarrow H{-}C(=O){-}O^- + H^+$

Диоксид углерода — Формиат

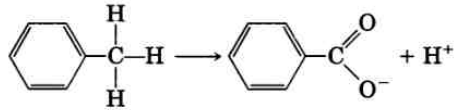
г $CH_2(OH){-}CH(OH){-}C(=O){-}O^- + H^+ \longrightarrow CH_2(OH){-}CH(OH){-}CHO$

Глицерат — Глицеральдегид

д

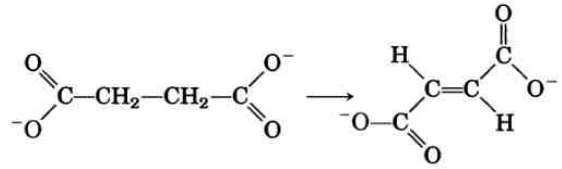
Глицерин Дигидроксиацетон

е



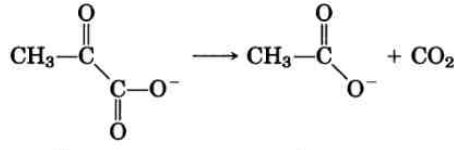
Толуол Бензоат

ж



Сукцинат Фумарат

з



Пируват Ацетат

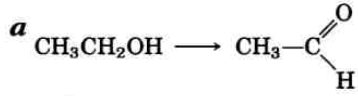
4. Взаимосвязь между энергетическим выходом реакции и степенью окисления углерода. Эукариотическая клетка способна использовать для клеточного дыхания глюкозу $C_6H_{12}O_6$ и гексановую (капроновую) кислоту $C_6H_{14}O_2$. Пользуясь структурными формулами этих веществ укажите, для какого из них при полном окислении (до CO_2 и H_2O) выделяется больше энергии в пересчете на 1 г.

5. Никотинамидные коферменты как переносчики водорода в окислительно-восстановительных реакциях. В присутствии соответствующей дегидрогеназы никотинамидные коферменты (см. рис. 13-24) могут участвовать в обратимых окислительно-восстановительных реакциях со специфическими субстратами. В таких реакциях NADH + H^+ служат источником водорода (см. задачу 2). Если кофермент окисляется, субстрат обязательно восстанавливается:

$$\underset{\text{Окисленный}}{\text{Субстрат}} + \underset{\text{Восстановленный}}{\text{NADH}} + H^+ \rightleftharpoons \underset{\text{Восстановленный}}{\text{продукт}} + \underset{\text{Окисленный}}{\text{NAD}^+}$$

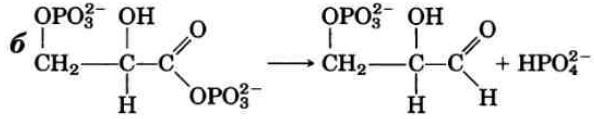
Для каждой из приведенных ниже реакций определите, окислился субстрат, восстановился или его состояние окисления не изменилось (см. задачу 2). Если состояние окисления субстрата изменилось, напишите уравнение, добавив необходимые количества NAD^+, NADH, H^+ и H_2O. Цель этого упражнения заключается в определении, в каких реакциях должен принимать участие окислительно-восстановительный кофермент.

а



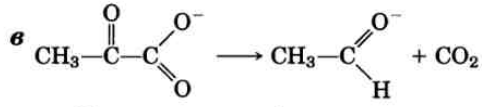
Этанол Ацетальдегид

б



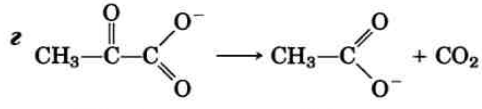
1,3-Бисфосфоглицерат Глицеральдегид-3-фосфат

в



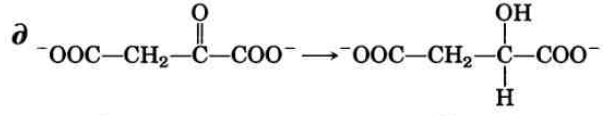
Пируват Ацетальдегид

г



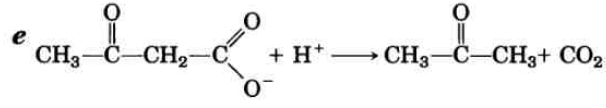
Пируват Ацетат

д



Оксалоацетат Малат

е



Ацетоацетат Ацетон

6. Кофакторы и механизм реакции, катализируемой пируватдегидрогеназой. Опишите роль каждого кофактора, участвующего в реакции, катализируемой пируватдегидрогеназным комплексом.

7. Дефицит тиамина в организме. У человека, получающего с пищей недостаточное количество тиамина, определяется высокий уровень пирувата в крови. Объясните причину.

8. Реакция, катализируемая изоцитратдегидрогеназой. Какой тип химической реакции

происходит при превращении изоцитрата в α-кетоглутарат? Назовите все кофакторы, задействованные в этой реакции, и объясните их роль. Какие (или какая) еще реакции в цикле лимонной кислоты относятся к тому же типу?

9. Стимуляция потребления кислорода оксалоацетатом и малатом. В начале 1930-х гг. Альберт Сент-Дьерди сообщил об интересном наблюдении: добавление небольшого количества оксалоацетата или малата к суспензии измельченной грудной мышцы голубя усиливало потребление кислорода препаратом. Удивительно, что количество потребляемого кислорода был в 7 раз выше необходимо для полного окисления добавленного оксалоацетата или малата (до CO_2 и H_2O). Почему добавление оксалоацетата и малата стимулирует потребление кислорода? Почему количество потребляемого кислорода во много раз превышает необходимое для полного окисления добавленного оксалоацетата или малата?

10. Образование оксалоацетата в митохондриях. На последней стадии цикла лимонной кислоты происходит дегидрирование малата, в результате чего вновь образуется оксалоацетат, необходимый для включения в цикл новой молекулы ацетил-CoA:

$$\text{L-Малат} + NAD^+ \rightarrow \text{оксалоацетат} + NADH + H^+$$

$$\Delta G'^\circ = 30 \text{ кДж/моль}$$

а) Определите константу равновесия реакции при 25 °C.

б) Поскольку $\Delta G'^\circ$ соответствует стандартному значению при pH 7, константа равновесия (пункт а) определяется формулой:

$$K'_{eq} = \frac{[\text{оксалоацетат}][NADH]}{[\text{L-малат}][NAD^+]}$$

Как показывают измерения, концентрация L-малата в митохондриях печени крыс составляет ~0,2 мМ, а $[NAD^+]/[NADH] = 10$. Определите концентрацию оксалоацетата в митохондриях печени крысы при pH 7.

в) Для оценки концентрации оксалоацетата в митохондриях рассчитайте число молекул оксалоацетата в одной митохондрии. Пусть митохондрия — сферическая частица диаметром 2 мкм.

11. Кофакторы в цикле лимонной кислоты. Предположим, приготовлен экстракт митохондрий, содержащий все растворимые ферменты матрикса, но при проведении диализа потеряны все низкомолекулярные кофакторы. Что нужно добавить в экстракт, чтобы там осуществлялось превращение ацетил-CoA в CO_2?

12. Дефицит рибофлавина в организме. Как недостаточность рибофлавина повлияет на функционирование цикла лимонной кислоты? Поясните ответ.

13. Содержание оксалоацетата. Какие факторы могут снизить количество оксалоацетата, поступающего в цикл лимонной кислоты? Каким образом можно пополнить количество оксалоацетата?

14. Выход энергии в цикле лимонной кислоты. Реакция, катализируемая сукцинил-CoA-синтетазой, приводит к образованию богатого энергией соединения GTP. Как свободная энергия, запасенная в GTP, «объединяется» с энергетическими запасами клетки, заключенными в ATP?

15. Изучение процесса клеточного дыхания в изолированных митохондриях. Клеточное дыхание можно изучать на выделенных митохондриях путем измерений количества потребляемого кислорода при различных условиях. Если к активно дышащим митохондриям, использующим в качестве источника энергии пируват, добавить 0,01 М раствор малоната натрия, дыхание быстро прекращается и начинает накапливаться один из интермедиатов метаболизма.

а) Какое строение имеет этот интермедиат?

б) Объясните, почему он накапливается.

в) Объясните, почему прекращается потребление кислорода.

г) Кроме непосредственного удаления малоната, каким еще способом можно снять вызванное им ингибирование? Объясните ответ.

16. Эксперименты с мечеными соединениями на изолированных митохондриях. Метаболические пути превращения органических соединений часто изучают, используя меченные радиоактивной меткой субстраты и прослеживая судьбу метки.

а) Как проверить, что глюкоза, добавляемая к суспензии изолированных митохондрий, превращается в CO_2 и H_2O?

б) К митохондриям импульсно добавили [3-^{14}C]пируват (меченный по метильной группе). Какое положение займет меченый углерод после одного оборота цикла лимонной кислоты? Объясните ответ, проследив путь метки на всем протяжении цикла. Через сколько оборотов цикла весь меченый пируват будет выведен в виде CO_2?

17. Судьба CO_2 в процессе глюконеогенеза. На первом обходном пути глюконеогенеза — превращении пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП) — пируват карбоксилируется с помощью пируваткарбоксилазы, образуя оксалоацетат, который далее декарбоксилируется до ФЕП под действием ФЕП-карбоксикиназы (гл. 14). Поскольку сразу за присоединением CO_2 происходит его отщепление, можно было бы ожидать, что ^{14}C из $^{14}CO_2$ не включается в ФЕП, глюкозу и другие интермедиаты глюконеогенеза. Однако выяснилось, что при синтезе глюкозы в присутствии $^{14}CO_2$ в печени крысы ^{14}C постепенно появляется в ФЕП, а затем в положениях С-3 и С-4 в молекуле глюкозы. Каким образом метка ^{14}C попадает в ФЕП и в глюкозу? (*Подсказка.* При глюконеогенезе в присутствии $^{14}CO_2$ некоторые из четырехуглеродных интермедиатов цикла лимонной кислоты также получают метку.)

18. Катаболизм [1-^{14}C]глюкозы. Активно дышащую бактериальную культуру короткое время инкубировали с [3-^{14}C]глюкозой, а затем выделили из нее интермедиаты цикла лимонной кислоты и гликолиза. Укажите положение метки в перечисленных ниже соединениях. Учитывайте при этом только ту метку, которая включается при первом прохождении меченой глюкозы через метаболические пути.

а) Фруктозо-1,6-бисфосфат.
б) Глицеральдегид-3-фосфат.
в) Фосфоенолпируват.
г) Ацетил-CoA.
д) Цитрат.
е) α-Кетоглутарат.
ж) Оксалоацетат.

19. Роль тиамина в организме. При заболевании бери-бери, вызванном дефицитом тиамина, в крови пациентов наблюдается повышенное содержание пирувата и α-кетоглутарата, особенно после употребления богатой глюкозой пищи. Как это связано с дефицитом тиамина?

20. Синтез оксалоацетата в цикле лимонной кислоты. Оксалоацетат образуется на последней стадии цикла лимонной кислоты при NAD^+-зависимом окислении L-малата. Возможен ли синтез оксалоацетата из ацетил-CoA только под действием ферментов и кофакторов цикла лимонной кислоты без затрат интермедиатов цикла? Объясните ответ. Как пополняются запасы оксалоацетата, выведенного из цикла для осуществления реакций биосинтеза?

21. Истощение (исчерпание) запасов оксалоацетата. В печени млекопитающих в качестве исходного материала для глюконеогенеза может использоваться оксалоацетат (гл. 14). Повлияет ли интенсивное использование оксалоацетата для глюконеогенеза на протекание цикла лимонной кислоты? Объясните ответ.

22. Механизм действия фторацетата, применяемого как средство против грызунов. Фторацетат используется для борьбы грызунами и поэтому производится промышленностью; это соединение содержится также в природе в одном из южноафриканских растений. Попадая в клетку, фторацетат превращается в фторацетил-CoA в реакции, катализируемой ацетаттиокиназой:

$$F-CH_2COO^- + CoA\text{-}SH + ATP \longrightarrow F-CH_2-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-S\text{-}CoA + AMP + PP_i$$

Токсическое действие фторацетата было изучено на изолированном сердце крыс. После перфузии сердца 0,22 мМ раствором фторацетата уменьшилось поглощение глюкозы, снизилась скорость гликолиза и стали накапливаться глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат. Определение интермедиатов цикла лимонной кислоты показало, что их концентрации были ниже нормы и лишь концентрация цитрата превышала норму в 10 раз.

а) На какой стадии происходит остановка цикла лимонной кислоты? Почему накапливается цитрат, а запасы других интермедиатов цикла истощаются?

б) В цикле лимонной кислоты фторацетил-CoA подвергается ферментативным превращениям. Какова структура конечного продукта метаболизма фторацетата? Почему он блокирует цикл лимонной кислоты? Каким образом можно снять это ингибирование?

в) Почему после перфузии сердца потребление глюкозы и гликолиз ослабевали? Почему накапливались гексозомонофосфаты?

г) Почему отравление фторацетатом смертельно?

23. Образование L-малата в виноделии. Терпкий вкус некоторых вин связан с высокой концентрацией в них L-малата. Напишите последовательность реакций, в результате которых дрожжи образуют L-малат из глюкозы в анаэробных условиях в присутствии растворенного CO_2 (HCO_3^-). Обратите внимание, что в суммарной реакции брожения не должно происходить расходования никотинамидных коферментов или интермедиатов цикла лимонной кислоты.

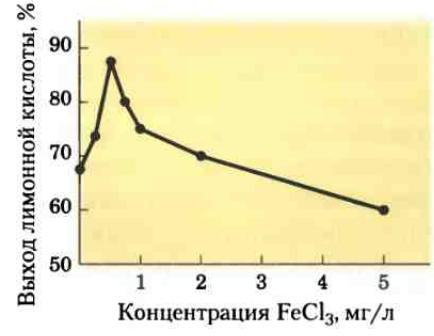
24. Синтез α-кетоглутарата. α-Кетоглутарат играет очень важную роль в биосинтезе некоторых аминокислот. Напишите последовательность ферментативных реакций, в результате которых из пирувата образуется α-кетоглутарат. В предложенной цепочке реакций не должно происходить суммарного потребления интермедиатов цикла лимонной кислоты. Напишите уравнение суммарной реакции и укажите источник каждого из реагирующих веществ.

25. Амфиболические пути. Объясните на примерах, что означает утверждение, что цикл лимонной кислоты является амфиболическим путем.

26. Регуляция активности пируватдегидрогеназного комплекса. В тканях животных скорость превращения пирувата в ацетил-CoA регулируется соотношением между активным (фосфорилированным) и неактивным (нефосфорилированным) ПДГ-комплексами. Как влияет на скорость данной реакции обработка препарата митохондрий из мышц кролика, содержащего ПДГ-комплекс, (а) киназой пируватдегидрогеназы, ATP и NADH; (б) фосфатазой пируватдегидрогеназы и Ca^{2+}; (в) малонатом.

27. Промышленный синтез лимонной кислоты. Лимонная кислота используется для придания вкуса безалкогольным напиткам и многим другим продуктам питания. Мировой рынок производства лимонной кислоты оценивается в сотни миллионов долларов в год. Для промышленного производства используют плесневый гриб *Aspergillus niger*, который выращивают на сахарозе в строго контролируемых условиях.

а) Выход лимонной кислоты сильно зависит от концентрации $FeCl_3$ в питательной среде (см. график). Почему выход лимонной кислоты снижается при концентрации Fe^{3+} выше или ниже оптимального ее значения в 0,5 мг/л?

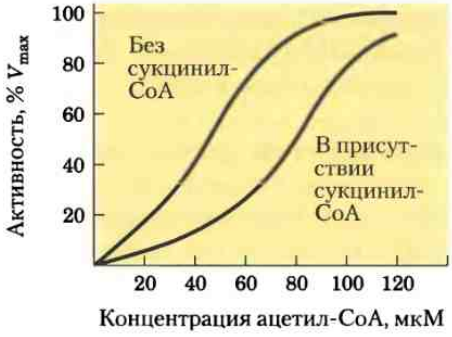


б) Предложите последовательность реакций, в соответствии с которой *A. niger* продуцирует лимонную кислоту из сахарозы. Напишите уравнение суммарной реакции.

в) Нужно ли проводить аэрацию питательной среды при культивировании гриба, т. е. является ли данный процесс аэробным или анаэробным? Объясните ответ.

28. Регуляция активности цитратсинтазы. В присутствии насыщающей концентрации оксалоацетата зависимость активности цитратсинтазы из ткани сердца свиньи от концентрации ацетил-CoA описывается S-образной (см. график). При добавлении сукцинил-CoA кривая сдвигается

вправо, а S-образная форма зависимости становится более выраженной.



На основании этих наблюдений предположите, каким образом сукцинил-CoA регулирует активность цитратсинтазы. (*Подсказка.* См. рис. 6-29, т. 1.) Почему сукцинил-CoA является подходящим сигналом для регуляции цикла лимонной кислоты? Каким образом регуляция цитратсинтазы контролирует скорость клеточного дыхания в ткани сердца свиньи?

29. Регуляция пируваткарбоксилазы. Карбоксилирование пирувата под действием фермента пируваткарбоксилазы без аллостерического активатора ацетил-CoA происходит с очень низкой скоростью. Объясните, каким образом эта особенность регуляции связана с тем, что после приема пищи, богатой жирными кислотами (триацилглицеринами) и бедной углеводами (глюкозой), ослабевает процесс окисления глюкозы до CO_2 и H_2O, но усиливается окисление ацетил-CoA, образующегося из жирных кислот.

30. Связь между клеточным дыханием и циклом лимонной кислоты. Хотя кислород непосредственно не участвует в цикле лимонной кислоты, цикл осуществляется только в присутствии кислорода. Почему?

31. Влияние отношения [NADH]/[NAD$^+$] на цикл лимонной кислоты. Каким образом цикл лимонной кислоты отреагирует на быстрое увеличение отношения [NADH]/[NAD$^+$] в митохондриальном матриксе? Объясните ответ.

32. Термодинамика цитратсинтазной реакции в клетках. Цитрат образуется при конденсации ацетил-CoA с оксалоацетатом, катализируемой цитратсинтазой:

$$\text{Оксалоацетат} + \text{ацетил-CoA} + H_2O \rightarrow \text{цитрат} + \text{CoA} + H^+$$

В митохондриях сердца крысы при pH 7,0 и 25 °C были определены концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции (мкМ): оксалоацетат 1, ацетил-CoA 1, цитрат 220, CoA 65. Изменение стандартной свободной энергии для этой реакции составляет −32,2 кДж/моль. Каково направление потока метаболитов в данной реакции в клетках сердца крысы? Объясните ответ.

33. Реакции пируватдегидрогеназного комплекса. Две стадии окислительного декарбоксилирования пирувата (стадии ④ и ⑤ на рис. 16-6) не затрагивают ни одного из трех атомов углерода в молекуле пирувата, но они важны для функционирования ПДГ-комплекса. Объясните этот факт.

34. Мутации в цикле лимонной кислоты. Многие заболевания человека связаны с потерей той или иной ферментативной активности в результате генетической мутации. Однако случаи потери активности какого-либо фермента, участвующего в цикле лимонной кислоты, встречаются чрезвычайно редко. Как это объяснить?

35. Цикл лимонной кислоты и глиоксилатный цикл. В организмах (например, *E. coli*), в которых реализуется как цикл лимонной кислоты, так и глиоксилатный цикл. В каких случаях изоцитрат направляется по одному, а в каких по другому пути?

Анализ экспериментальных данных

36. Как был открыт цикл лимонной кислоты. Подробный механизм цикла лимонной кислоты был установлен в работах нескольких ученых в течение нескольких десятилетий. Впервые описание этого пути метаболизма было сделано Кребсом и Джонсоном в 1937 г. по итогам собственных исследований, а также по публикациям других ученых.

Методы исследований того времени сильно отличались от современных биохимических методов. До 1940-х гг. радиоактивные метки прак-

тически не использовались, поэтому Кребсу и другим ученым приходилось применять другие методы анализа. Потребление кислорода измеряли на свежеприготовленных образцах грудных мышц голубя; для этого измельченную мышечную ткань в буфере помещали в запаянный сосуд и определяли объем кислорода (в микролитрах), потребляемого при различных условиях. С целью количественного анализа интермедиатов образцы обрабатывали кислотой для удаления примесей белка, а затем там определяли содержание низкомолекулярных органических молекул. Два основных наблюдения, позволившие Кребсу и его коллегам сделать вывод, что механизм цикла лимонной кислоты вовсе *не линейный* (каким является, например, гликолиз), были получены в следующих экспериментах.

Эксперимент I. Инкубировали 460 мг измельченной мышечной ткани в 3 мл буфера при 40 °С в течение 150 мин. Добавление *цитрата* повышало потребление O_2 на 893 мкл по сравнению с образцами без цитрата. По расчетам, основанным на потреблении O_2 в присутствии других углеродсодержащих веществ, ожидаемое потребление O_2, необходимое для полного исчерпания этого количества цитрата, составляло лишь 302 мкл.

Эксперимент II. Определяли потребление O_2 в присутствии 460 мг измельченной мышечной ткани в 3 мл буфера при инкубации с *цитратом* и/или с *1-глицерофосфатом* (было известно, что 1-глицерофосфат легко окисляется при клеточном дыхании) при 40 °С в течение 140 мин. Результаты экспериментов представлены в таблице.

Образец	Добавленный субстрат	Количество потребленного O_2, мкл
1	Нет	342
2	0,3 мл 0,2 М 1-глицерофосфата	757
3	0,15 мл 0,02 М цитрата	431
4	0,3 мл 0,2 М 1-глицерофосфата + 0,15 мл 0,02 М цитрата	1385

а) Почему измерение потребления O_2 позволяет с хорошей точностью оценить клеточное дыхание?

б) Почему образец 1 (мышечная ткань без добавления субстратов) потребляет какое-то количество кислорода?

в) Можно ли на основании результатов для образцов 2 и 3 заключить, что 1-глицерофосфат и цитрат являются субстратами в клеточном дыхании в данной системе? Объясните свои рассуждения.

г) На основании результатов этих экспериментов Кребс с коллегами заключили, что цитрат обладал «каталитическими» свойствами, т. е. он помогал мышечной ткани более полно метаболизировать 1-глицерофосфат. Каким образом этот вывод следует из представленных результатов?

д) Далее Кребс с соавторами утверждали, что цитрат не просто потребляется в данном процессе, но должен *регенерироваться*. Следовательно, этот процесс является *циклическим*, а не линейным. Можете ли вы путем обсуждений привденных результатов прийти к такому выводу?

Другие исследователи обнаружили, что *арсенат* AsO_4^{3-} ингибирует активность α-кетоглутаратдегидрогеназы, а *малонат* ингибирует активность сукцинатдегидрогеназы.

е) Кребс с сотрудниками выяснили, что мышечная ткань, обработанная арсенатом и цитратом, потребляет цитрат только в присутствии кислорода. На основании данных, отраженных на рис. 16-7, объясните, во что превращался цитрат в этом эксперименте и почему образец потреблял кислород?

Далее в своей статье Кребс и Джонсон сообщали следующее.

1. В присутствии арсената 5,48 ммоль цитрата превращалось в 5,07 ммоль α-кетоглутарата.
2. В присутствии малоната цитрат без остатка превращался в большое количество сукцината и небольшое количество α-кетоглутарата.
3. Добавление оксалоацетата в отсутствие кислорода приводило к образованию большого количества цитрата, причем количество цитрата еще сильнее возрастало при добавлении в среду глюкозы.

Для аналогичного образца мышечной ткани другие исследователи предложили такой путь превращений:

Сукцинат → фумарат → малат →
→ оксалоацетат → пируват

ж) Только на основании данных, изложенных в настоящей задаче, укажите порядок образования интермедиатов цикла лимонной кислоты. Как этот результат соотносится с данными, представленными на рис. 16-7? Поясните, как вы рассуждали.

з) Почему важно было продемонстрировать количественное превращение цитрата в α-кетоглутарат?

Статья Кребса и Джонсона, кроме того, содержит много других данных, позволяющих полностью восстановить ход цикла. В то время единственным неизвестным компонентом оставалось вещество, в результате взаимодействия с которым оксалоацетат превращался в цитрат.

Литература

Krebs, H. A. & Johnson, W. A. (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**, 148–156. [Reprinted (1980) in *FEBS Lett.* **117** (Suppl.), K2–K10.]

Не терпит жирного Джек Спрат,
А постного — жена,
Но вместе, что им ни подай,
Съедают всё до дна.

Джон Кларк, Paroemiologia Anglo-Latina
(Английские и латинские поговорки), *1639*

17

Катаболизм жирных кислот

17.1. Расщепление, активация и транспорт жиров 226

17.2. Окисление жирных кислот 232

17.3. Кетоновые тела 251

Окисление длинноцепочечных жирных кислот до ацетил-CoA — главный способ получения энергии для многих организмов и тканей. Например, в сердце и печени млекопитающих этот путь обеспечивает примерно 80% энергетических потребностей при любых физиологических условиях. Электроны, забираемые у молекул жирных кислот в процессе окисления, проходят через дыхательную цепь, способствуя синтезу ATP; ацетил-CoA, полученный из жирных кислот, можно полностью окислить до CO_2 в цикле Кребса, что приведет к дальнейшему сохранению энергии. У некоторых видов организмов и тканей есть альтернативные пути превращения ацетил-CoA. В печени ацетил-CoA может превратиться в кетоновые тела — водорастворимые богатые энергией вещества, доставляемые в мозг и другие ткани при отсутствии глюкозы. У высших растений ацетил-CoA в первую очередь служит биосинтетическим предшественником и лишь потом — питательным веществом. Несмотря на то что биологическая роль окисления жирных кислот у разных организмов различна, его механизм практически одинаков. Повторяющийся (циклический) четырехстадийный процесс **β-окисления**, в ходе которого жирные кислоты превращаются в ацетил-CoA, и есть главная тема данной главы.

В гл. 10 были описаны свойства триацилглицеринов (которые также называют триглицеринами или нейтральными жирами), благодаря которым их особенно удобно использовать в качестве запасаемых источников энергии. В состав жирных кислот входят длинные алкильные цепочки углеводородной природы, т. е. сильно восстановленные структуры для полного окисления которых необходима энергия (~38 кДж/г) вдвое больше, чем для окисления белков или углеводов при той же массе. Это преимущество сочетается с исключительной нерастворимостью липидов воде; в клетке триацилглицерины собираются в липидные капли, которые не повышают осмолярность цитозоля и не сольватируются. (В запасных полисахаридах, наоборот, вода, удерживаемая там при сольватации, может составлять примерно две трети общей массы запасаемых молекул.) А благодаря своей относительной химической инертности триацилглицерины могут накапливаться в клетках в больших количествах без риска нежелательных химических реакций с другими веществами клетки.

Однако те свойства, которые делают триацилглицерины хорошими запасными веществами, создают проблемы при использовании их в качестве источников энергии. Поскольку триацилглицерины нерастворимы в воде, их после всасывания сначала надо превратить в эмульсию, прежде чем расщеплять водорастворимыми ферментами в кишечнике, а усвоенные в кишечнике или взятые из запасающих тканей триацилглицерины должны находиться в кровотоке в связанном с белками виде, чтобы устранить проблему нерастворимости. Для пре-

одоления относительной стабильности связей С–С в жирной кислоте, карбоксильная группа в положении С-1 активируется присоединением кофермента А, что способствует окислению ацильной группы жирной кислоты в положении С-3, или β, — отсюда и название β-окисления.

В начале этой главы мы кратко обсудим синтез жирных кислот в организме и пути, которые приводят их к месту окисления, уделив особое внимание процессам у позвоночных. После этого будут описаны химические реакции окисления жирных кислот в митохондриях. Полное окисление жирных кислот до CO_2 и H_2O происходит в три стадии: окисление длинноцепочечных жирных кислот до двухуглеродных фрагментов в виде ацетил-СоА (β-окисление); окисление ацетил-СоА до CO_2 в цикле трикарбоновых кислот (гл. 16); и, наконец, передача электронов с восстановленных переносчиков в дыхательной цепи митохондрий (гл. 19). В этой главе основное внимание уделено первой стадии. Обсуждение β-окисления начнется с наиболее простого случая — полностью насыщенная жирная кислота с четным числом атомов углерода расщепляется до ацетил-СоА. Затем вкратце остановимся на дополнительных превращениях при распаде ненасыщенных жирных кислот или жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. И наконец, обсудим различные пути β-окисления в особых органеллах пероксисомах и глиоксисомах, а также два менее распространенных пути катаболизма жирных кислот — ω- и α-окисление. В конце главы описан совсем другой путь превращения ацетил-СоА, полученного при β-окислении, у позвоночных: образование кетоновых тел в печени.

17.1. Расщепление, активация и транспорт жиров

Клетки способны получать богатые энергией жирные кислоты тремя способами: из жиров, содержащихся в пище, жиров, запасенных в клетке в виде липидных капель, и жиров, синтезированных в одном органе для экспорта в другой. Некоторые виды организмов в различных условиях используют все три способа, остальные — один или два. Например, позвоночные получают жиры с пищей, активируют жиры, запасенные в особых тканях (жировые ткани, состоящие из клеток, которые называются адипоцитами), и превращают в печени избыток углеводов пищи в жиры для экспорта в другие ткани. У населения промышленно развитых стран в среднем более 40% энергетических потребностей организма обеспечивается триацилглицеринами, содержащимися в пище (несмотря на то, что в большинстве диет рекомендуется получать в виде жиров не более 30% ежедневного запаса энергии). Триацилглицерины обеспечивают более половины энергетических потребностей некоторых органов, в частности печени, сердца и скелетных мышц в покое. Запасенные триацилглицерины являются чуть ли не единственным источником энергии у зимующих животных и перелетных птиц. Простейшие получают жиры, поглощая организмы, стоящие ниже их в цепи питания, а некоторые из них запасают жиры в виде липидных капель в цитозоле. Сосудистые растения в период роста активируют жиры, хранящиеся в семенах, однако в других ситуациях у них получение энергии не зависит от жиров.

Жиры пищи всасываются в тонкой кишке

Прежде чем потребленные с пищей триацилглицерины смогут всосаться стенками кишечника позвоночных, их надо перевести из нерастворимых макроскопических жировых капель в мелкодисперсные микроскопические мицеллы. Такую солюбилизацию осуществляют соли желчных кислот, например таурохолевой кислоты (с. 506, т. 1), которые образуются в печени из холестерина, накопленного в желчном пузыре, и выводятся в тонкую кишку после поглощения жирной пищи. Соли желчных кислот имеют амфифильную природу соединения и действуют как биологические детергенты, которые превращают жиры пищи в мицеллы из смеси солей желчных кислот и триацилглицеринов (**рис. 17-1**, стадия ①). При образовании мицелл значительно увеличивается доля липидных молекул, доступных для действия водорастворимых липаз в кишечнике, которые в свою очередь превращают триацилглицерины в моноацилглицерины (моноглицерины) и диацилглицерины (диглицерины), свободные жирные кислоты и глицерин (стадия ②).

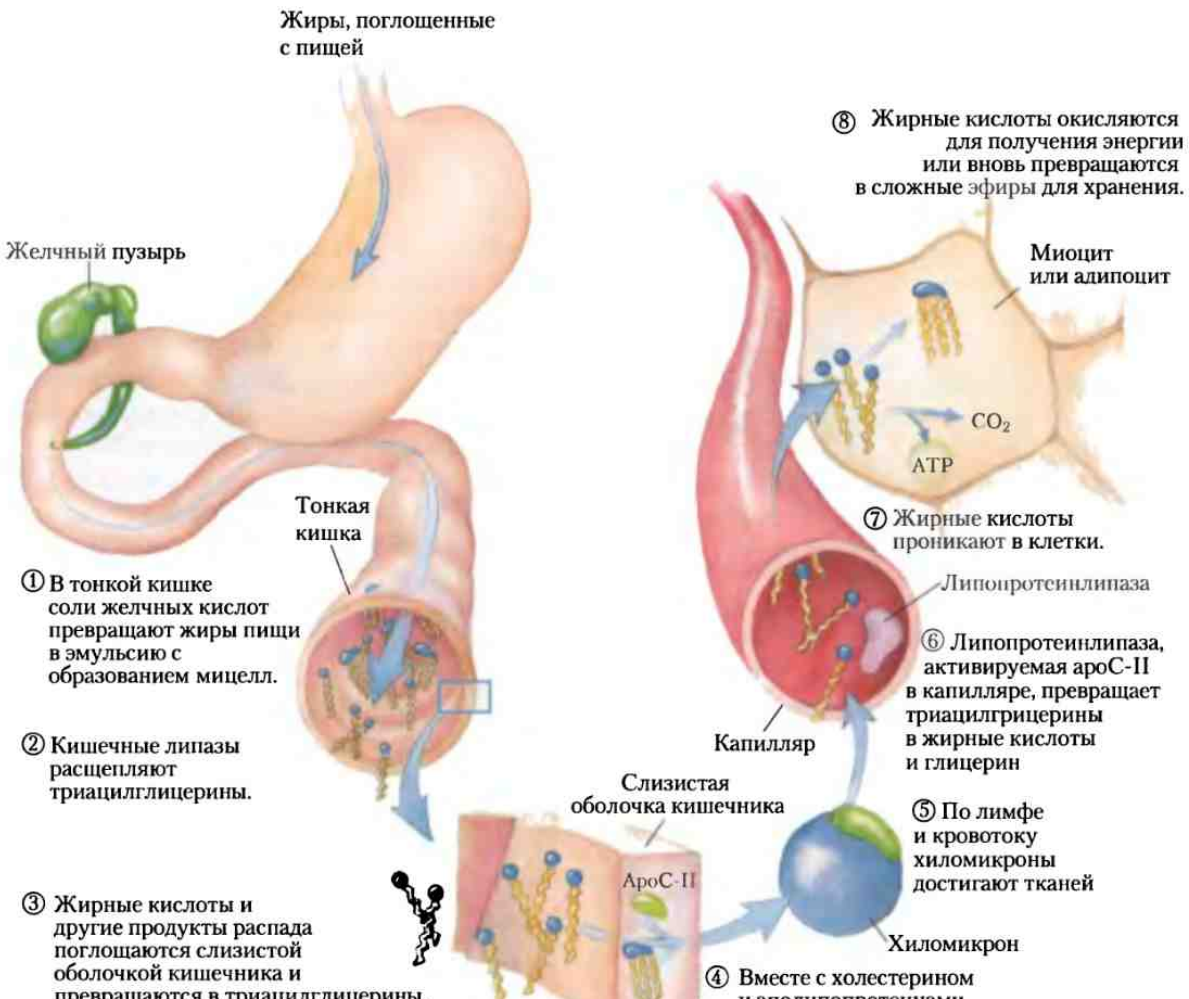


Рис. 17-1. Путь липидов пищи у позвоночных. Расщепление и всасывание липидов пищи происходит в тонкой кишке, а жирные кислоты, полученные из триацилглицеринов, упаковываются и доставляются в мышцы и жировые ткани. Все восемь стадий обсуждаются в тексте.

Эти продукты действия липаз диффундируют в клетки эпителия (слизистая оболочка кишечника), выстилающие кишечник (стадия ③), где они вновь превращаются в триацилглицерины, а соединяясь с холестерином пищи и специфическими белками, образуют липопротеиновые комплексы — **хиломикроны (рис. 17-2**; см. также рис. 17-1, стадия ④).

Аполипопротеины — белки крови, связывающие липиды; они отвечают за транспорт триацилглицеринов, фосфолипидов, холестерина и его эфиров между органами. Аполипопротеины («апо» означает «отделенный» или «изолированный», т. е. белок в его свободной от липидов форме), соединяясь с липидами, могут образовать несколько **липопротеиновых** частиц сферической формы с гидрофобными липидами внутри, а с гидрофильными боковыми цепями белков и липидными «головками» на поверхности. Разнообразные комбинации липидов и

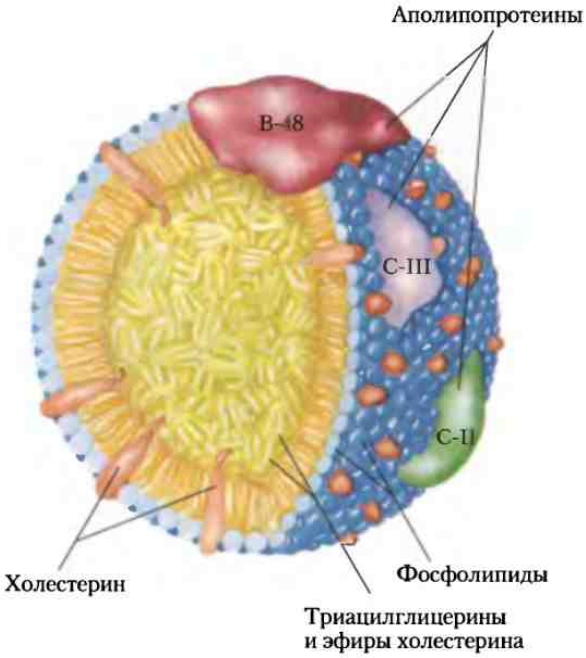


Рис. 17-2. Молекулярная структура хиломикрона. На поверхности слой фосфолипидов с «головками», обращенными к водной фазе. Триацилглицерины (показаны желтым) изолированы и находятся внутри; они составляют более 80% массы частицы. Несколько аполипопротеинов, выступающих на поверхности (B-48, C-III, C-II), — это сигналы при поглощении и метаболизме содержимого хиломикрона. Диаметр хиломикрона составляет от 100 до 500 нм.

белков образуют частицы разной плотности, начиная с хиломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и заканчивая липопротеинами очень высокой плотности (ЛПВП), которые можно разделить ультрацентрифугированием. Структура этих липопротеиновых частиц и их роль в липидном транспорте подробно описываются в гл. 21.

Белковые фрагменты липопротеинов распознаются рецепторами на поверхности клеток. При всасывании липидов из кишечника хиломикроны, содержащие аполипопротеин C-II (apoC-II), направляются в лимфатическую систему, после чего поступают в кровь, которая доставляет их к мышцам и жировым тканям (рис. 17-1, стадия ⑤). В капиллярах этих тканей внеклеточный фермент **липопротеинлипаза**, активируемая apoC-II, гидролизует триацилглицерины до жирных кислот и глицерина (стадия ⑥), которые поглощаются клетками тканей (стадия ⑦). В мышцах для получения энергии жирные кислоты окисляются; в жировых тканях они вновь превращаются в сложные эфиры и хранятся в виде триацилглицеринов (стадия ⑧).

Остатки хиломикронов, лишенные большинства своих триацилглицеринов, но пока содержащие холестерин и аполипопротеины, поступают через кровь в печень, где поглощаются в процессе эндоцитоза при содействии рецепторов аполипопротеинов. Триацилглицерины, попадающие таким путем в печень, могут быть окислены для получения энергии или предоставления исходных молекул для синтеза кетоновых тел, как описано в разд. 17.3. Если в рационе питания жирных кислот содержится больше, чем их требуется в качестве непосредственных источников энергии или предшественников молекул, в печени они превращаются в триацилглицерины, которые со специфическими аполипопротеинами упаковываются в ЛПОНП. По кровотоку ЛПОНП достигают жировых тканей, где в адипоцитах триацилглицерины извлекаются и собираются в липидные (жировые) капли.

Активацию запасенных триацилглицеринов инициируют гормоны

Нейтральные липиды накапливаются в адипоцитах (и в синтезирующих стероиды клетках коры надпочечников, яичников и семенников) в виде липидных капель с триацилглицеринами и стериновыми эфирами в центре и монослоем из фосфолипидов вокруг. Поверхность этих капель покрыта **перилипинами** (семейство белков), ограничивающими доступ к липидным каплям, предотвращая таким образом несвоевременную активацию липидов. Когда гормоны передают сигнал о потребности в энергии для метаболизма, триацилглицерины в жировой ткани активируются (покидают жировые капли) и доставляются к тканям (скелетным мышцам, сердцу и корковому веществу почек), в которых жирные кислоты могут быть окислены для получения энергии. Гормоны адреналин и глюкагон, секретируемые в ответ на низкий уровень глюкозы крови, активируют фермент аденилатциклазу в плазматической мембране клеток жировой ткани

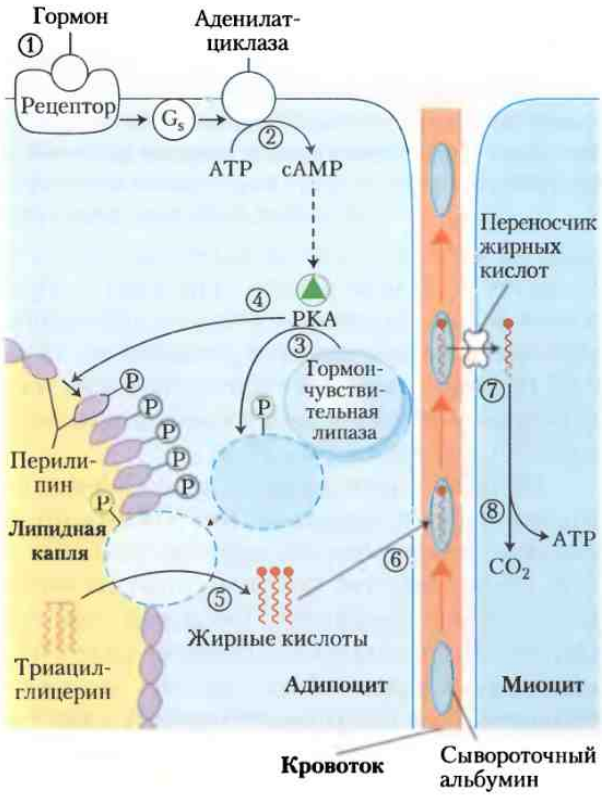


Рис. 17-3. Активация триацилглицеринов, запасенных в жировой ткани. Как только низкий уровень глюкозы в крови вызывает высвобождение глюкагона, ① гормон связывается со своим рецептором на мембране клетки жировой ткани и тем самым посредством G-белка ② стимулирует аденилатциклазу к образованию cAMP. Это активирует PKA, которая фосфорилирует ③ гормон-чувствительную липазу и ④ молекулы перилипина на поверхности липидной капли. Фосфорилирование перилипина позволяет гормон-чувствительной липазе подобраться к поверхности липидной капли, где ⑤ она гидролизует триацилглицерины до свободных жирных кислот. ⑥ Жирные кислоты покидают жировую клетку и переносятся кровотоком, связываясь с сывороточным альбумином; затем они освобождаются от альбумина и ⑦ проникают в миоцит с помощью особого переносчика жирных кислот. ⑧ В миоците жирные кислоты окисляются до CO_2, а выделившаяся энергия сохраняется в форме ATP, который «питает» сокращение мышц и другие процессы метаболизма в клетке, нуждающиеся в энергии.

(рис. 17-3), а она в свою очередь порождает внутриклеточный вторичный мессенджер — циклический AMP (cAMP; см. рис. 12-4). cAMP-зависимая протеинкиназа (PKA) фосфорилирует перилипин A, который после этого заставляет **гормон-чувствительную липазу** в цитозоле переместиться к поверхности липидной капли, где она может начать гидролиз триацилглицеринов до жирных кислот и глицерина. Кроме того, PKA фосфорилирует гормон-чувствительную липазу, удваивая или утраивая ее активность, однако более чем 50-кратный рост активации жиров, инициируемый адреналином, обусловлен в первую очередь фосфорилированием перилипина. Клетки с дефектными генами перилипина практически не реагируют на возрастающий уровень cAMP; их гормон-чувствительная липаза не взаимодействует с липидными каплями.

Как только гормон-чувствительная липаза гидролизует триацилглицерины в адипоцитах, образовавшиеся жирные кислоты (**свободные жирные кислоты, СЖК**) попадают из жировой

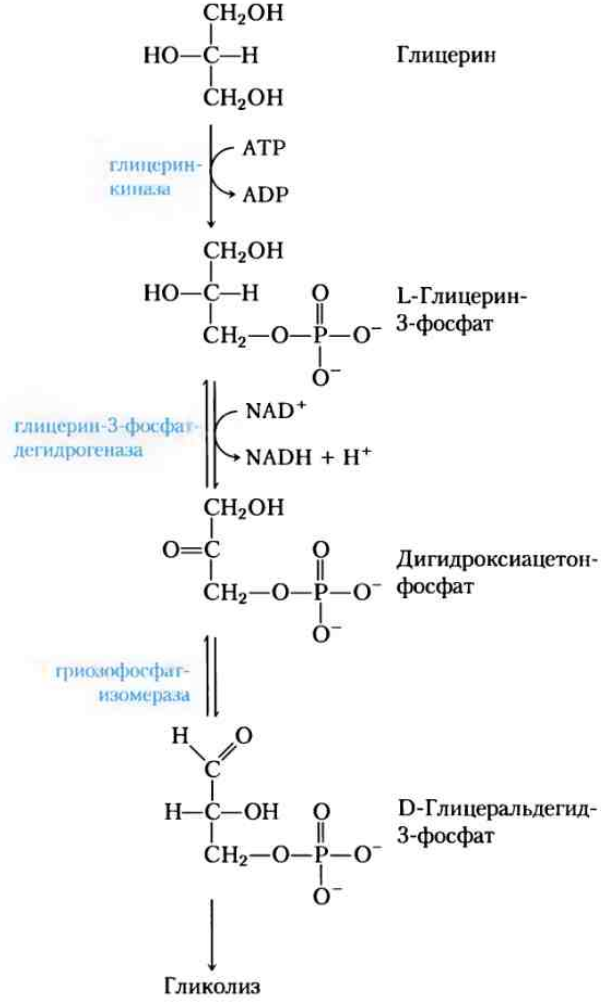


Рис. 17-4. Глицерин в гликолитическом пути.

клетки в кровь, где они связываются с белком **сывороточным альбумином**. Этот белок (M_r 66 000), на который приходится примерно половина общего белка сыворотки, нековалентно связывает 10 жирных кислот на одну мономерную единицу белковой молекулы. Связанные с этим растворимым белком нерастворимые жирные кислоты переносятся к тканям, например к скелетным мышцам, сердцу и корковому веществу почек. В этих тканях жирные кислоты отделяются от альбумина и с помощью переносчиков на плазматической мембране доставляются внутрь клеток для выполнения своих энергетических функций.

Около 95% биологически полезной энергии триацилглицеринов сконцентрировано в их трех длинноцепочечных жирных кислотах; а на глицериновый остаток приходится всего лишь 5%. Глицерин, образующийся при действии липазы, фосфорилируется **глицеринкиназой (рис. 17-4)**, а получающийся в результате глицерин-3-фосфат окисляется до дигидроксиацетонфосфата. Гликолитический фермент триозофосфатизомераза превращает это соединение в глицеральдегид-3-фосфат, который окисляется в процессе гликолиза.

Жирные кислоты активируются и переносятся в митохондрии

В 1948 г. Юджин Кеннеди и Альберт Ленинджер показали, что ферменты окисления жирных кислот в клетках животных находятся в матриксе митохондрий. Жирные кислоты с цепями из 12 и менее атомов углерода попадают в митохондрии без помощи мембранных переносчиков. Состоящие из 14 и более атомов углерода, а это большинство СЖК, получаемых с пищей или из жировой ткани, не способны пройти через митохондриальные мембраны. Вначале они должны пройти через три ферментативные реакции **карнитинового переноса**. Первая реакция катализируется особыми изоферментами (они специфичны к жирным кислотам с короткой, средней или более длинной углеродными цепями), которые находятся на внешней митохондриальной мембране. Это **ацил-СоА-синтетазы**, и они активируют главным образом следующую реакцию:

$$\text{Жирная кислота} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ацил-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

Таким образом, ацил-СоА-синтетазы катализируют образование тиоэфирной связи между карбоксильной группой жирной кислоты и тиоловой группой кофермента А, что дает образование **ацил-СоА-производных жирной кислоты** и сопряжено с распадом ATP до AMP и PP_i. (Чтобы представить себе, как выделение свободной энергии разрыва фосфоангидридных связей в молекуле ATP может быть сопряжено с образованием высокоэнергетического соединения, обратитесь к описанию этой реакции в гл. 13 на с. 37.) Реакция идет в две стадии и включает ациладенилат жирной кислоты в качестве промежуточного соединения **(рис. 17-5)**.

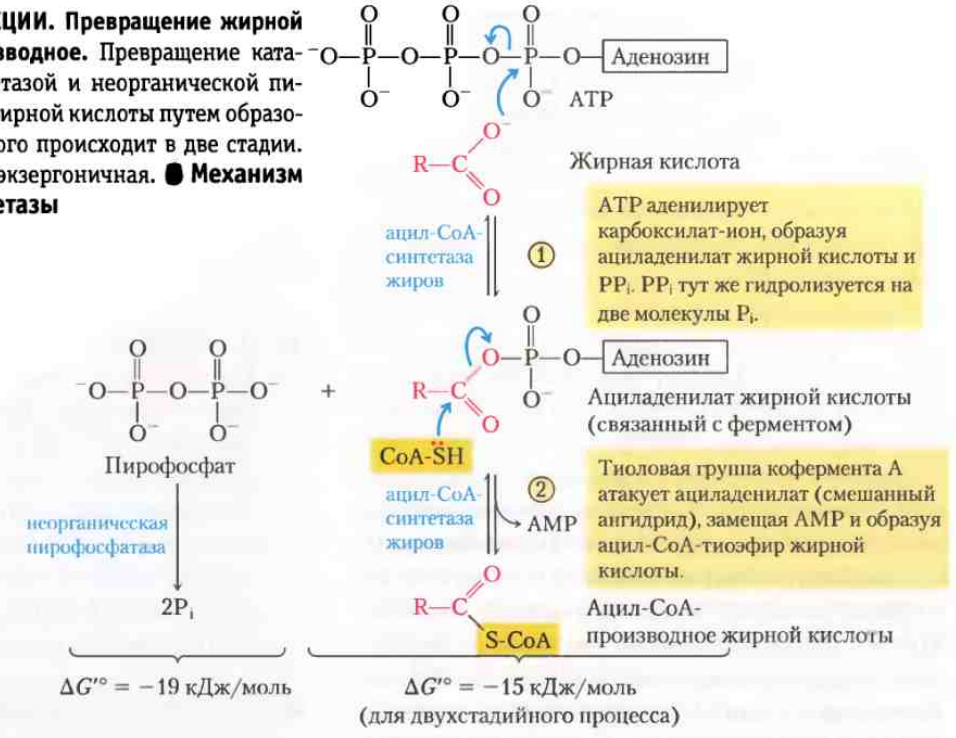
Подобно ацетил-СоА, ацил-СоА-производные жирных кислот — это высокоэнергетические соединения; их гидролиз до СЖК и СоА сопровождается большим отрицательным изменением стандартной свободной энергии ($\Delta G'^\circ \approx -31$ кДж/моль). Образование ацил-СоА-производных гораздо более выгодно благодаря гидролизу *двух* высокоэнергетических связей в ATP; пирофосфат, образующийся в реакции активации, тут же подвергается гидролизу под действием неорганической пирофосфатазы (рис. 17-5, *слева*), которая направляет реакцию активации в сторону образования ацил-СоА-производного жирной кислоты. Суммарная реакция:

$$\text{Жирная кислота} + \text{CoA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{ацил-CoA} + \text{AMP} + 2\text{P}_i \quad (17\text{-}1)$$

$$\Delta G'^\circ = -34 \text{ кДж/моль}$$

Ацил-СоА-эфиры жирных кислот, образующиеся на цитозольной стороне внешней митохондриальной мембраны, могут переноситься в митохондрию и окисляться для образования ATP или же используются в цитозоле для синтеза мембранных липидов. Жирные кислоты, предназначенные для окисления в митохондриях, временно присоединяются к гидроксильной группе **карнитина**, образуя ацилкарнитиновое производное, что и есть вторая стадия трансмембранного транспорта. Эта переэтерификация катализируется **карнитинацилтрансферазой I** (M_r 88 000) на внешней мембране. В настоящее время нет свидетельств того, проникает ли ацил-СоА через внешнюю мембрану и превращается в карнитиновый эфир в межмембранном пространстве **(рис. 17-6)** или же карнитиновый эфир образуется в цитозоле снаружи от внешней мембраны, а затем уже через нее попадает

Рис. 17-5. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Превращение жирной кислоты в ацил-CoA-производное. Превращение катализируется ацил-CoA-синтетазой и неорганической пирофосфатазой. Активация жирной кислоты путем образования ацил-CoA-производного происходит в две стадии. Суммарная реакция сильно экзергоничная. ● **Механизм действия ацил-CoA-синтетазы**



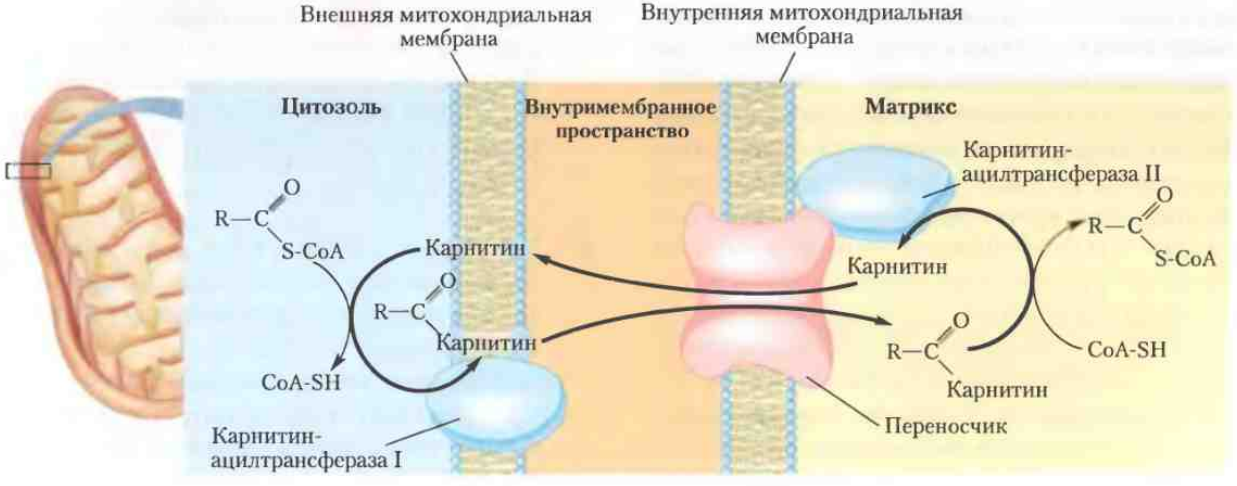
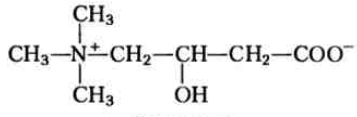


Рис. 17-6. Проникновение жирной кислоты в митохондрию через ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик. После того как ацилкарнитиновое производное жирной кислоты образуется вблизи внешней мембраны или в межмембранном пространстве, оно проникает в матрикс по механизму облегченной диффузии через переносчик на внутренней мембране. В матриксе ацильная группа переносится на митохондриальный кофермент А, освобождая карнитин для последующего возвращения в межмембранное пространство через тот же самый переносчик. Ацилтрансфераза I ингибируется малонил-коферментом А, первым промежуточным соединением в синтезе жирных кислот (см. рис. 21-1). Это ингибирование предотвращает одновременный синтез и распад жирных кислот.

в межмембранное пространство. В любом из этих случаев переход в межмембранное пространство происходит через огромные поры (образованные белком порином) на внешней мембране. После этого ацилкарнитиновый эфир жирной кислоты поступает в матрикс по механизму облегченной диффузии через **ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик** внутренней митохондриальной мембраны (рис. 17-6).



Карнитин

Третья (последняя) стадия карнитинового переноса состоит в том, что ацильная группа жирной кислоты с помощью **карнитинацилтрансферазы II** (т. е. ферментативно) переносится с карнитина на внутримитохондриальный кофермент А. Этот изофермент, расположенный на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, регенерирует ацил-СоА-производное жирной кислоты и высвобождает его вместе со свободным карнитином в матрикс (рис. 17-6). Карнитин вновь проникает в межмембранное пространство через ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик.

Этот трехстадийный процесс переноса жирных кислот в митохондрии, включающий образование сложного эфира с СоА, трансэтерификацию с карнитином, после чего следует перенос и образование нового сложного эфира с СоА, связывает между собой два изолированных друг от друга пула кофермента А и ацил-СоА-производного жирной кислоты, один из которых находится в цитозоле, а другой в митохондриях. Эти пулы выполняют различные функции. Кофермент А в митохондриальном матриксе активно используется в окислительном расщеплении пирувата, жирных кислот и некоторых аминокислот, тогда как кофермент А в цитозоле участвует в биосинтезе жирных кислот (см. рис. 21-10). Ацил-СоА-производное жирной кислоты в цитозольном пуле может использоваться для синтеза мембранных липидов или участвовать в переносе в митохондриальный матрикс для окисления и образования АТР. Превращение в карнитиновый эфир направляет ацильный фрагмент жирной кислоты на путь окисления.

Опосредованное карнитином проникновение лимитирует общую скорость окисления жирных кислот в митохондриях и, как следует из дальнейшего обсуждения, служит точкой регуляции. Как только ацил-СоА-производное жирной кислоты оказывается внутри митохондрии, оно подвергается действию целого ряда ферментов матрикса.

Краткое содержание раздела 17.1 РАСЩЕПЛЕНИЕ, АКТИВАЦИЯ И ТРАНСПОРТ ЖИРОВ

- У животных жирные кислоты триацилглицеринов дают значительную долю окислительной энергии. Триацилглицерины пищи в тонком кишечнике превращаются в эмульсию под действием солей желчных кислот, гидролизуются кишечными липазами, всасываются эпителиальными клетками кишечника, вновь превращаются в триацилглицерины, а затем включаются в состав хиломикронов вместе со специфическими аполипопротеинами.

- Хиломикроны доставляют триацилглицерины к тканям, где липопротеинлипаза высвобождает из них свободные жирные кислоты для проникновения в клетки. Триацилглицерины, хранящиеся в жировой ткани, активируются гормон-чувствительной триацилглицеринлипазой. Образовавшиеся жирные кислоты связываются с сывороточным альбумином и переносятся кровью к сердцу, скелетным мышцам и другим тканям, использующим жирные кислоты в качестве источников энергии.

- Оказавшись внутри клетки, жирные кислоты активируются у внешней митохондриальной мембраны превращением в ацил-СоА-тиоэфиры жирных кислот. Ацил-СоА-производные, которые должны быть окислены, проникают в митохондрию с помощью карнитинового челнока в три стадии.

17.2. Окисление жирных кислот

Как уже отмечалось, митохондриальное окисление жирных кислот происходит в три стадии (**рис. 17-7**). На первой стадии происходит β-окисление, где жирные кислоты подвергаются последовательномуокислительному отщеплению двух-

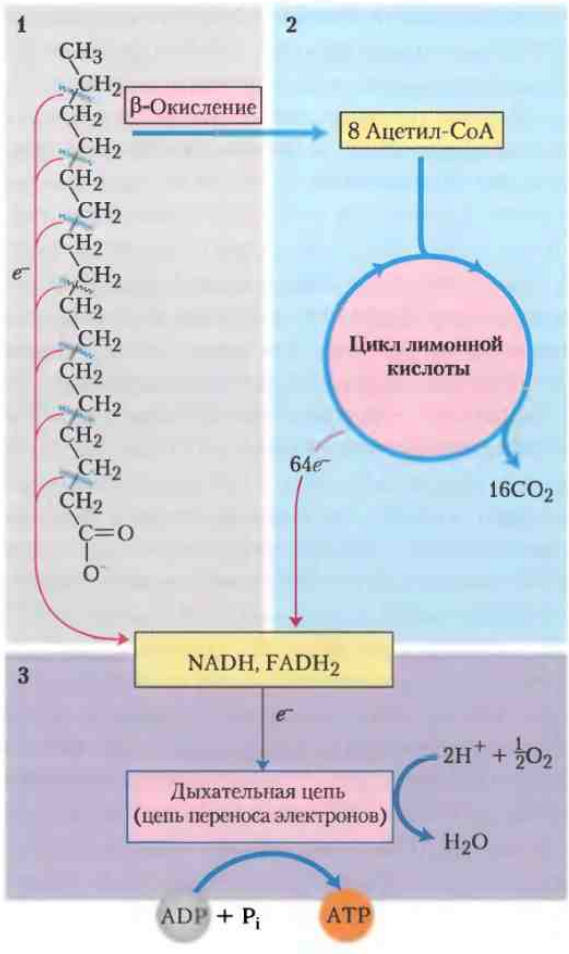


Рис. 17-7. Стадии окисления жирных кислот. 1. Жирная кислота с длинной углеродной цепью окисляется, образуя ацетильные остатки ацетил-CoA. Этот процесс называется β-окислением. 2. В цикле трикарбоновых кислот ацетильные группы окисляются до CO_2. 3. Электроны, полученные при окислении в путях 1 и 2, переходят на O_2 в дыхательной цепи митохондрий, давая энергию для синтеза ATP путем окислительного фосфорилирования.

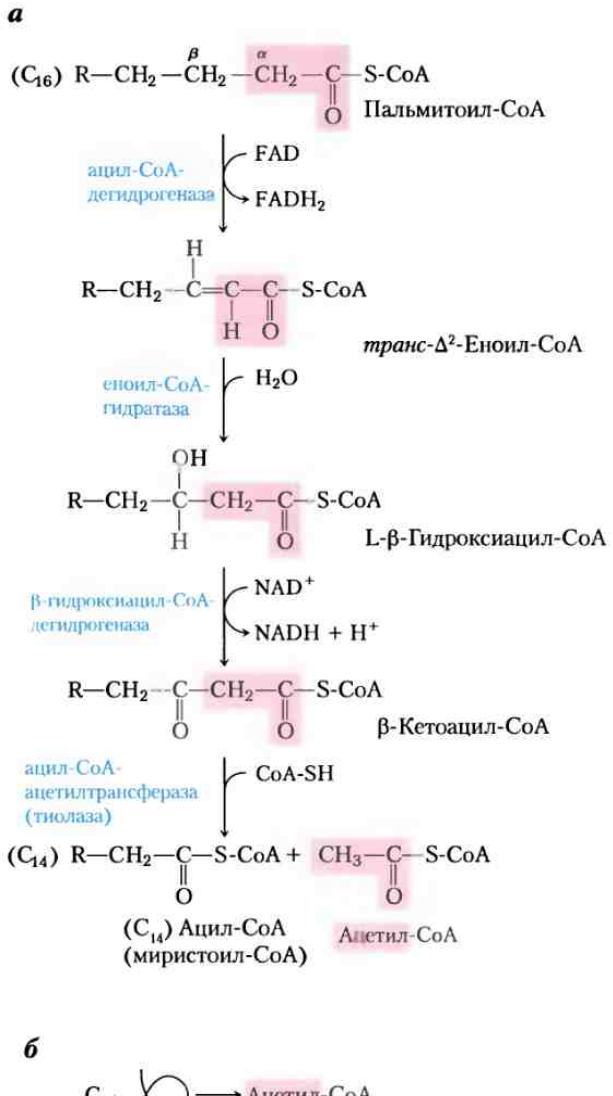
углеродных фрагментов в виде ацетил-CoA, начиная с карбоксильного конца. Например, пальмитиновая кислота (при pH 7 пальмитат-ион), состоящая из 16 атомов углерода, подвергается семи последовательным окислениям, теряя каждый раз по два атома углерода в виде ацетил-CoA. После седьмой реакции последние два углерода от пальмитата (в пальмиате они были C-15 и C-16) остаются в виде ацетил-CoA. Конечным результатом является превращение 16-углеродной цепи пальмитата в восемь двухуглеродных (ацетильных) групп в ацетил-CoA. Для образования каждой молекулы ацетил-CoA необходимо удаление дегидрогеназами четырех атомов водорода (двух пар электронов и четырех H^+) от ацила жирной кислоты.

На второй стадии окисления жирных кислот ацетильные группы ацетил-CoA окисляются до CO_2 в цикле трикарбоновых кислот, который также происходит в матриксе митохондрий. Так, ацетил-CoA, образованный из жирных кислот, попадает на конечный общий путь окисления вместе с ацетил-CoA, полученным из глюкозы в процессе гликолиза и окисления пирувата (см. рис. 16-1). На первых двух стадиях окисления жирных кислот образуются восстановленные переносчики электронов NADH и $FADH_2$, отдающие на третьей стадии свои электроны в дыхательную цепь митохондрий, где электроны попадают на кислород и происходит фосфорилирование ADP до ATP (рис. 17-7). Таким образом, энергия, выделяемая при окислении жирных кислот, запасается в виде ATP.

Теперь вернемся к первой стадии окисления жирных кислот, и начнем с простого случая окисления ацила насыщенной жирной кислоты с четным числом атомов углерода, а затем обратимся к немного более сложному окислению ненасыщенной жирной кислоты и кислоты с нечетным числом атомов. Кроме того, рассмотрим регуляцию окисления жирных кислот, процессы β-окисления, происходящие в других органеллах (не в митохондриях), и наконец, два менее распространенных процесса катаболизма жирных кислот — α- и ω-окисление.

β-Окисление насыщенных жирных кислот проходит в четыре основные стадии

Первая стадия окисления жирных кислот состоит из четырех ферментативных катализируемых реакций (**рис. 17-8, *а***). В первой реакции при дегидрировании ацил-CoA-производного жирной кислоты образуется двойная связь между α- и β-атомами углерода (C-2 и C-3) и получается ***транс*-Δ²-еноил-CoA** (символ Δ^2 означает положение двойной связи при C-2; номенклатуру жирных кислот см. на с. 489, т. 1). Обратите внимание, что новая двойная связь имеет *транс*-конфигурацию, а у природ-



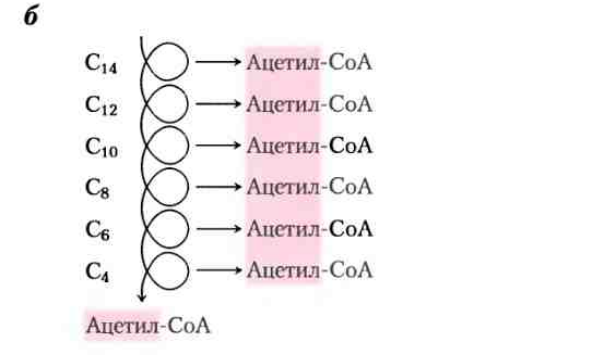


Рис. 17-8. β-Окисление. *а* — в четырех последовательных реакциях от карбоксильного конца кислоты (здесь пальмитат (16С) в виде пальмитоил-СоА) отщепляется по одной ацетильной группе (выделена розовым цветом) в виде ацетил-СоА. *б* — в результате шести реакций образуются семь молекул ацетил-СоА, а седьмая возникает из последних двух атомов углерода 16-углеродной цепи. Всего получается восемь молекул ацетил-СоА.

ных ненасыщенных жирных кислот при двойных связях *цис*-конфигурации. Какую роль играет эта конфигурация, рассмотрено позднее.

Первая реакция катализируется одним из трех изоферментов, которые называются **ацил-СоА-дегидрогеназами**, каждый из этих изоферментов специфичен к ацилу жирной кислоты с определенной длинной углеродной цепи: ацил-СоА-дегидрогеназа очень длинной цепи (VLCAD, от англ. ***very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase***) действует на жирные кислоты с 12–18 атомами углерода; ацил-СоА-дегидрогеназа средней цепи (MCAD, от англ. ***medium-chain acyl-CoA dehydrogenase***) — на жирные кислоты с 4–14 атомами углерода и ацил-СоА-дегидрогеназа короткой цепи (SCAD, от англ. ***short-chain acyl-CoA dehydrogenase***) — на жирные кислоты с 4–8 атомами углерода. Эти три изофермента относятся к флавопротеинам и содержат FAD (см. рис. 13-27) в качестве простетической группы. Электроны от ацил-СоА-производного переносятся на FAD, и восстановленная форма дегидрогеназы тут же отдает их переносчику электронов в дыхательной цепи митохондрий — **электронпереносящему флавопротеину (ETF**, от англ. ***electron-transferring flavoprotein***) (см. рис. 19-8). Катализируемое ацил-СоА-дегидрогеназой окисление аналогично дегидрированию сукцината в цикле трикарбоновых кислот (с. 198); в обеих реакциях фермент прикреплен к внутренней мембране, между α- и β-атомами углерода карбоновой кислоты образуется двойная связь, в роли акцептора электронов выступает FAD и в итоге электроны поступают в дыхательную цепь и попадают на кислород, при этом синтезируется примерно 1,5 молекул ATP на одну пару электронов.

Во второй реакции цикла β-окисления (рис. 17-8, *а*) по двойной связи *транс*-Δ^2-еноил-СоА присоединяется вода с образованием L-стереоизомера **β-нидроксиацил-СоА (3-гидроксиацил-СоА)**. Эта реакция, катализируемая **еноил-СоА-гидратазой**, формально аналогична реакции фумаразы в цикле трикарбоновых кислот, в которой H_2O присоединяется по двойной α–β-связи (с. 198).

В третьей реакции L-β-гидроксиацил-СоА дегидрируется под действием **β-гидроксиацил-СоА-дегидрогеназы**, образуя **β-кетоацил-СоА**; в роли акцептора электронов выступает NAD^+. Этот фермент полностью специфичен к L-сте-

реоизомеру гидроксиацил-CoA. Образующийся в реакции NADH отдает электроны **NADH-дегидрогеназе**, электронному переносчику дыхательной цепи, и как только электроны попадают на O_2, из ADP образуется ATP. Реакция, катализируемая β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназой, очень напоминает реакцию малатдегидрогеназы в цикле трикарбоновых кислот (с. 199).

Четвертая (последняя) реакция цикла β-окисления катализируется **ацил-CoA-ацетилтрансферазой**, которую чаще называют **тиолазой** и которая способствует реакции β-кетоацил-CoA с молекулой свободного кофермента A для отщепления терминального двухуглеродного карбоксильного фрагмента исходной жирной кислоты в виде ацетил-CoA. Другим продуктом является тиоэфир кофермента A и жирной кислоты, теперь уже укороченный на два атома углерода (рис. 17-8, *а*). Эта реакция называется тиолизом (по аналогии с гидролизом), поскольку β-кетоацил-CoA расщепляется в реакции с тиоловой группой кофермента A.

Последние три «шага» этой четырехстадийной последовательности катализируются одним из двух наборов ферментов в зависимости от длины ацильной цепочки жирной кислоты. Что касается цепей, состоящих из 12 и более атомов углерода, такие реакции катализируются мультиферментным комплексом, связанным с внутренней митохондриальной мембраной, **трехфункциональным белком (TFP,** от англ. *trifunctional protein*). TFP представляет собой гетерооктамер из $\alpha_4\beta_4$-субъединиц. Каждая субъединица α выполняет две функции: еноил-CoA-гидратазы и β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназы; субъединицы β обладают тиолазной активностью. Такое тесное взаимодействие трех ферментов способно обеспечить эффективную передачу субстрата от одного активного центра другому, обходясь без диффузии промежуточных соединений с поверхности фермента. Как только TFP укорачивает ацильную цепь жирной кислоты до 12 и менее атомов углерода, дальнейшие процессы окисления в матриксе катализирует набор из четырех растворимых ферментов.

Как уже упоминалось ранее, одинарная связь между метиленовыми группами ($-CH_2-$) жирных кислот достаточно стабильна. β-Окислительный каскад реакций является превосходным механизмом дестабилизации и разрыва этих связей. Первые три реакции β-окисления делают связь C–C гораздо менее прочной, в ней теперь α-углерод (C-2) связан с *двумя* карбонильными углеродами (β-кетоацил-CoA). Влияние кетона на β-углерод (C-3) делает его удачной мишенью для нуклеофильной атаки –SH-группы кофермента A, которую катализирует тиолаза. Кислотность α-водорода и резонансная стабилизация карбаниона, образующегося при отщеплении этого водорода, делает $-CH_2-CO-S-CoA$ хорошей уходящей группой, облегчая тем самым разрыв α–β-связи.

Ацетил-CoA и ATP образуются при повторении четырех реакций β-окисления

При каждом цикле последовательных реакций β-окисления от ацил-CoA-производного длинноцепочечной жирной кислоты отщепляется одна молекула ацетил-CoA, две пары электронов и четыре протона (H^+), укорачивая ацил на два атома углерода. Уравнение одного цикла, начинающегося с эфира кофермента A, в данном случае пальмитата, таково:

$$\text{Пальмитоил-CoA} + \text{CoA} + \text{FAD} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{миристоил-CoA} + \text{ацетил-CoA} + \text{FADH}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (17\text{-}2)$$

После отщепления от пальмитоил-CoA одной молекулы ацетил-CoA остается тиоэфир кофермента A и укороченной на два углерода жирной кислоты (миристат — 14 атомов углерода). Миристоил-CoA теперь может пройти через еще один цикл из четырех реакций β-окисления, который в точности аналогичен первому, образуя вторую молекулу ацетил-CoA и лауроил-CoA — тиоэфир кофермента A и 12-углеродного лаурата. Чтобы окислить одну молекулу пальмитоил-CoA до восьми молекул ацетил-CoA, требуется семь оборотов цикла реакций β-окисления (рис. 17-8, *б*). Общее уравнение имеет вид

$$\text{Пальмитоил-CoA} + 7\text{CoA} + 7\text{FAD} + 7\text{NAD}^+ + 7\text{H}_2\text{O} \longrightarrow 8\ \text{ацетил-CoA} + 7\text{FADH}_2 + 7\text{NADH} + 7\text{H}^+ \quad (17\text{-}3)$$

Каждая молекула $FADH_2$, образующаяся при окислении жирной кислоты, отдает два электрона в дыхательную цепь, а при переносе каждой электронной пары на O_2 образуется примерно

1,5 молекул ATP. Точно так же каждая образующаяся молекула NADH отдает пару электронов митохондриальной NADH-дегидрогеназе, а в последующем переносе каждой пары электронов на O_2 образуется примерно 2,5 молекул ATP. Таким образом, в один оборот цикла при отщеплении двухуглеродного фрагмента образуется 4 молекулы ATP. Обратите внимание, что в этом процессе также образуется вода. Перенос электронов с NADH или $FADH_2$ на O_2 дает одну молекулу H_2O на пару электронов. При восстановлении O_2 также затрачивается один H^+ на молекулу NADH: $NADH + H^+ + 1/2O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$. Окисление жирных кислот обеспечивает животных, впадающих в зимнюю спячку, метаболической энергией, теплом и водой — всем необходимым для выживания животного, которое не ест и не пьет длительное время (доп. 17-1). Верблюды в дополнение к скудным ресурсам их природной среды обитания получают воду при окислении жиров, которые запасают в своем горбу.

Общее уравнение окисления пальмитоил-CoA до восьми молекул ацетил-CoA, включая перенос электронов и окислительное фосфорилирование, таково

$$\text{Пальмитоил-CoA} + 7\text{CoA} + 7O_2 + 28P_i + 28\text{ADP} \longrightarrow 8\text{ ацетил-CoA} + 28\text{ATP} + 7H_2O \quad (17\text{-}4)$$

Дополнение 17–1 У медведей во время зимней спячки происходит β-окисление жиров

Многие животные зависят от запасов жира для получения энергии во время зимней спячки, в периоды миграции и в других ситуациях. Один из наиболее ярких примеров, как может быть приспособлен обмен жиров у животных, встречается у впадающих в зимнюю спячку медведей-гризли. Эти животные пребывают в состоянии спячки в течение семи месяцев. В отличие от большинства спящих в зимний период животных, медведи поддерживают температуру тела в интервале 32–35 °C, т. е. вблизи нормального уровня (вне периода спячки). Хотя медведь и тратит около 25 000 кДж/сут (6000 ккал/сут), он не ест, не пьет и не испражняется несколько месяцев.

Экспериментальные исследования показали, что зимующие медведи-гризли используют жир своего тела в качестве источника энергии. Окисление жиров дает достаточно энергии для поддержания температуры тела, синтеза аминокислот и белков и другой активности, связанной с потреблением энергии, например для трансмембранного транспорта. Как говорилось в основном тексте, при окислении жиров также в больших количествах образуется вода, что восполняет ее потерю в процессе дыхания. Глицерин, выделяющийся при разложении триацилглицеринов, превращается в глюкозу крови в процессе глюконеогенеза. Моча, образующаяся при распаде аминокислот, вновь всасывается в почках и перерабатывается, аминогруппы повторно используются для синтеза аминокислот с целью поддержания баланса белков в теле.

Подготавливаясь к продолжительному периоду спячки, медведи запасают жиры в огромных количествах. Поздней весной и летом взрослому медведю-гризли необходимо около 38 000 кДж/сут, а с приближением зимы он ест 20 часов в сут с тем, чтобы получать энергию до 84 000 кДж в сут. Такое изменение питания происходит в ответ на сезонные изменения в гормональном синтезе. Из-за исключительно интенсивного потребления углеводов в период набора веса в организме животного образуются в огромных количествах триацилглицерины. Другие впадающие в зимнюю спячку виды животных, включая карликовую соню, также накапливают в теле значительное количество жиров.

Гризли в окрестностях р. Макнейл (Канада) готовится к спячке.

Таблица 17-1 Выход ATP при окислении одной молекулы пальмитоил-CoA до CO_2 и H_2O

Фермент, катализирующий стадию окисления	Количество образующихся NADH или $FADH_2$	Количество образующегося ATP*
Ацил-CoA-дегидрогеназа	7 $FADH_2$	10,5
β-Оксиацил-CoA-дегидрогеназа	7 NADH	17,5
Изоцитратдегидрогеназа	8 NADH	20
α-Кетоглутаратдегидрогеназа	8 NADH	20
Сукцинил-CoA-синтетаза		8**
Сукцинатдегидрогеназа	8 $FADH_2$	12
Малатдегидрогеназа	8 NADH	20
Всего		108

* Согласно расчетам, в митохондриях при окислительном фосфорилировании образуется 1,5 ATP на одну окисленную молекулу $FADH_2$ и 2,5 ATP на одну окисленную молекулу NADH.

** GTP, получающийся непосредственно на этой стадии, дает ATP в реакции, катализируемой нуклеозиддифосфаткиназой (с. 41).

В дальнейшем ацетил-CoA может окисляться в цикле трикарбоновых кислот

Ацетил-CoA, образующийся при окислении жирных кислот, может окисляться до CO_2 и H_2O в цикле трикарбоновых кислот. Следующее уравнение отражает сопряжение второй стадии окисления пальмитоил-CoA с фосфорилированием на третьей стадии:

$$8\ \text{Ацетил-CoA} + 16\ O_2 + 80\ P_i + 80\ \text{ADP} \longrightarrow 8\ \text{CoA} + 80\ \text{ATP} + 16\ CO_2 + 16\ H_2O \quad (17\text{-}5)$$

Суммируя уравнения 17-4 и 17-5, получаем уравнение полного окисления пальмитоил-CoA до углекислого газа и воды:

$$\text{Пальмитоил-CoA} + 23\ O_2 + 108\ P_i + 108\ \text{ADP} \longrightarrow \text{CoA} + 108\ \text{ATP} + 16\ CO_2 + 23\ H_2O \quad (17\text{-}6)$$

В табл. 17-1 представлен суммарный выход NADH, $FADH_2$ и ATP на последовательных реакциях окисления пальмитоил-CoA. Обратите внимание, что при активации пальмитата до пальмитоил-CoA разрываются обе фосфоангидридные связи в молекуле ATP (рис. 17-5), значит энергетические затраты на активацию жирной кислоты эквивалентны двум ATP, и поэтому в целом на одну молекулу пальмитата образуется 106 ATP. Изменение стандартной свободной энергии окисления пальмитата до CO_2 и H_2O составляет около 9800 кДж/моль. В стандартных условиях энергия, возвращенная в виде энергии фосфатных связей ATP, равна 106 · 30,5 кДж/моль = 3230 кДж/моль, т. е. около 33% теоретического значения. Однако, если рассчитывать изменения свободной энергии, исходя из действующих концентраций реагентов и продуктов во внутриклеточных условиях (см. доп. 13-1), возврат свободной энергии составит более 60%; таким образом, сохранение энергии чрезвычайно эффективно.

Для окисления ненасыщенных жирных кислот требуются две дополнительные реакции

Описанная выше последовательность окисления жирных кислот свойственна насыщенным кислотам (т. е. имеющим только одинарные связи в углеродной цепи). Однако большинство жирных кислот в триацилглицеринах и фосфолипидах животных и растений ненасыщенны, они содержат одну или несколько двойных связей. Эти связи находятся в *цис*-конфигурации, и поэтому не могут подвергаться действию еноил-CoA-гидратазы, фермента, катализирующего присоединение H_2O по двойной связи в *транс*-конфигурации Δ^2-еноил-CoA, который образуется в процессе β-окисления. Для β-окисления природных ненасыщенных жирных кислот требуются два дополнительных фермента: изомераза и редуктаза. Проиллюстрируем эти вспомогательные реакции на двух примерах.

Олеат — распространенная 18-углеродная мононенасыщенная жирная кислота с *цис*-кон-

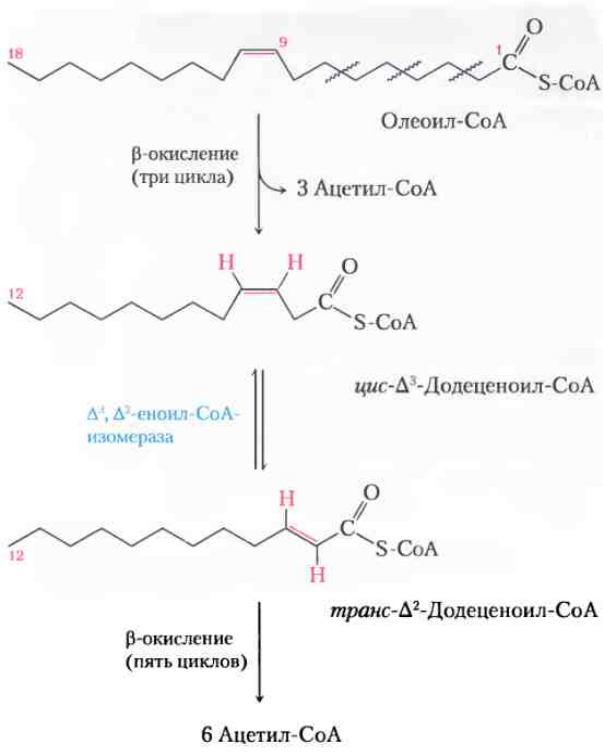


Рис. 17-9. Окисление мононенасыщенной жирной кислоты. Здесь рассмотрена олеиновая кислота в виде олеоил-CoA (Δ^9). Для репозиции двойной связи и успешного окисления требуется дополнительный фермент еноил-CoA-изомераза, которая превращает *цис*-изомер в *транс*-изомер, промежуточный продукт β-окисления.

фигурацией при двойной связи между C-9 и C-10 (обозначается Δ^9). На первой стадии окисления олеат превращается в олеоил-CoA и, как и насыщенные жирные кислоты, с помощью карнитинового переносчика попадает в матрикс митохондрий (рис. 17-6). После этого олеоил-CoA три раза проходит через цикл окисления жирных кислот, образуя три молекулы ацетил-CoA и эфир кофермента A и Δ^3,12-углеродной ненасыщенной жирной кислоты, *цис*-Δ^3-додеценоил-CoA (**рис. 17-9**). Этот продукт не может служить субстратом для еноил-CoA-гидратазы, которая действует только на *транс*-двойные связи. Вспомогательный фермент **Δ^3,Δ^2-еноил-CoA-изомераза** делает из *цис*-Δ^3-еноил-CoA изомерный *транс*-Δ^2-еноил-CoA, который превращается еноил-CoA-гидратазой в соответствующий L-β-гидроксиацил-CoA (*транс*-Δ^2-додеценоил-CoA). Теперь на этот промежуточный продукт действуют остальные ферменты β-окисления, образуя ацетил-CoA и эфир кофермента A и 10-углеродной насыщенной жирной кислоты, деканоил-CoA. Последний еще четыре раза проходит через этот путь с образованием дополнительных пяти молекул ацетил-CoA. В итоге

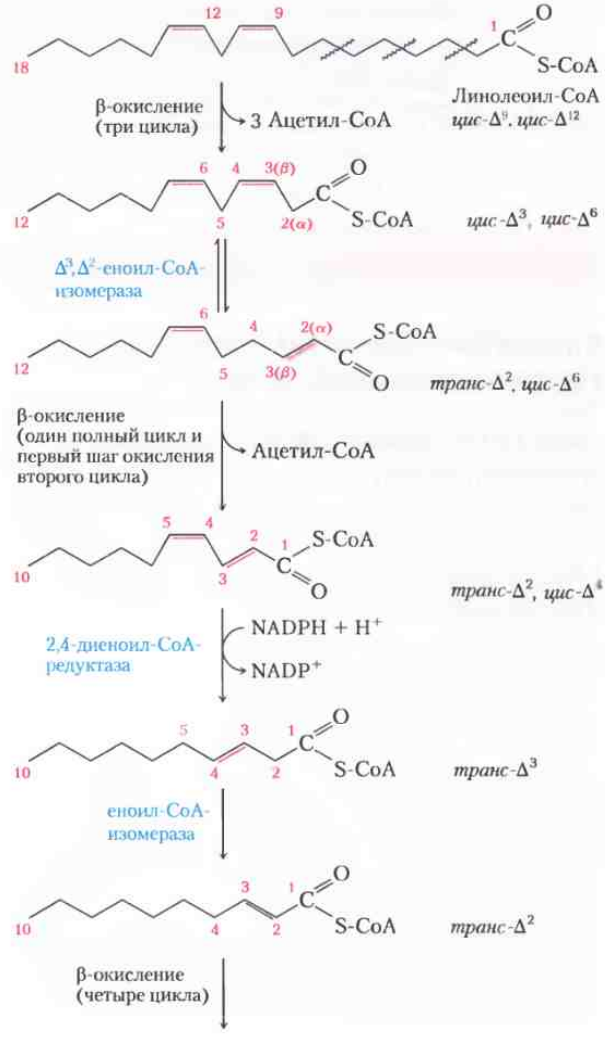


Рис. 17-10. Окисление полиненасыщенной жирной кислоты. Здесь рассмотрена линолевая кислота в виде линолеоил-CoA ($\Delta^{9,12}$). Кроме еноил-CoA-изомеразы для окисления требуется второй фермент NADPH-зависимая 2,4-диеноил-CoA-редуктаза. Благодаря совместному действию этих двух ферментов промежуточное соединение *транс*-Δ^2,*цис*-Δ^4-диеноил-CoA превращается в субстрат *транс*-Δ^2-еноил-CoA, пригодный для β-окисления.

из одной молекулы 18-углеродного олеата образуется 9 молекул ацетил-CoA.

Для окисления полиненасыщенных жирных кислот, например 18-углеродного линолеата, имеющего конфигурацию *цис*-Δ^9,*цис*-Δ^{12}, нужен дополнительный фермент редуктаза (**рис. 17-10**). Линолеоил-CoA проходит три раза через последовательность β-окисления, образуя три молекулы ацетил-CoA и эфир кофермента A и 12-углеродной ненасыщенной жирной кислоты с конфигурацией *цис*-Δ^3,*цис*-Δ^6. Этот промежуточный продукт не подвержен действию ферментов β-окисления; его двойные связи находятся не в том положении и имеют не ту конфигурацию (*цис*-, а не *транс*-). Однако, как показано на рис. 17-10, совместное действие еноил-CoA-изомеразы и **2,4-диеноил-CoA-редуктазы** дает возможность этому интермедиату вновь попасть в цикл β-окисления и при расщеплении дать шесть молекул ацетил-CoA. Общим результатом является превращение линолеата в девять молекул ацетил-CoA.

Для полного окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода требуются три дополнительные реакции

Большинство природных липидов содержат жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода; жирные кислоты с четным числом атомов углерода встречаются в липидах многих растений и некоторых морских организмов. У крупного рогатого скота и других жвачных животных в процессе ферментации углеводов в рубце в огромных количествах образуется трехуглеродный **пропионат** ($CH_3–CH_2–COO^-$); он всасывается в кровь и окисляется в печени и других тканях. Пропионат в небольших количествах добавляют в некоторые хлебопродукты в качестве ингибитора образования плесени.

Жирные кислоты с длинной углеродной цепью и нечетным числом атомов углерода окисляются тем же путем, что и кислоты с четным числом, начиная с карбоксильного конца цепи. Однако субстратом для последнего прохождения через цикл β-окисления является ацил-CoA-производное жирной кислоты с пятью атомами углерода. Из этого вещества при окислении образуются ацетил-CoA и **пропионил-CoA**. Ацетил-CoA, конечно же, можно окислить в цикле трикарбоновых кислот, однако пропионил-CoA поступает в другой цикл, включающий три фермента.

Там пропионил-CoA карбоксилируется с образованием D-стереоизомера **метилмалонил-CoA (рис. 17-11)** под действием **пропионил-CoA-карбоксилазы**, содержащей кофактор

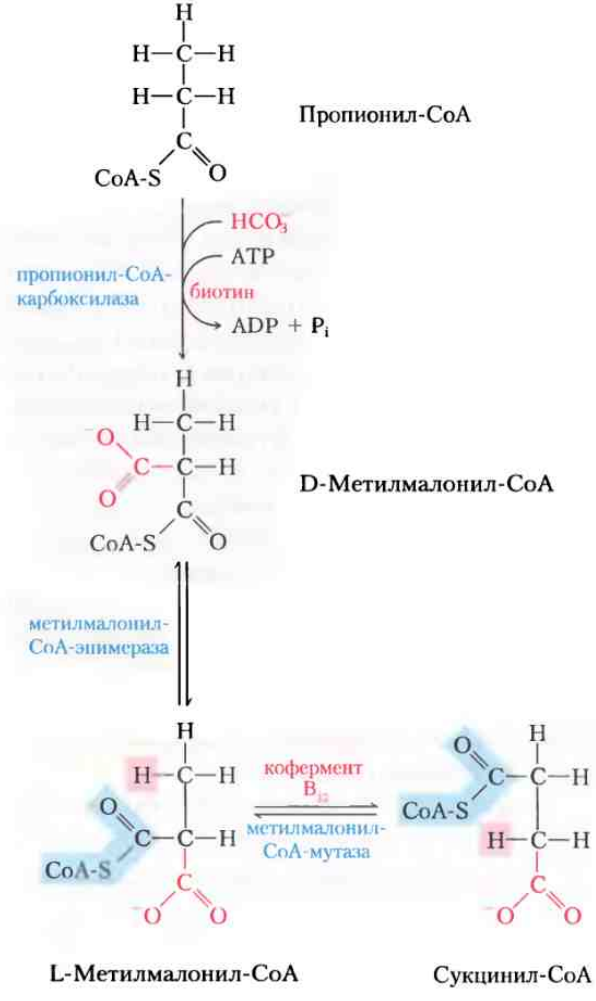


Рис. 17-11. Окисление пропионил-CoA, полученного в цикле β-окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Последовательность реакций включает карбоксилирование пропионил-CoA до D-метилмалонил-CoA и превращение последнего в сукцинил-CoA. Для этого превращения требуется эпимеризация D- в L-метилмалонил-CoA с последующей замечательной реакцией, в которой заместители при соседних атомах углерода меняются своими местами (см. доп. 17-2).

Дополнение 17-2 Кофермент B_{12}: «радикальное» решение сложной задачи

В реакции метилмалонил-CoA-мутазы (см. рис. 17-11) группа –CO–S–CoA в положении C-2 исходного пропионата обменивается на атом водорода в положении C-3 (рис. 1, *а*). Кофермент B_{12} выступает кофактором, как и практически для всех ферментов, которые катализируют реакции главным образом этого типа (рис. 1, *б*). Такие кофермент B_{12}-зависимые процессы относятся к очень редким в биологии ферментативным реакциям, где происходит обмен между алкильной или замещенной алкильной группы (X) и атомом водорода при соседнем углероде, *причем в этом обмене никогда не участвует водород растворителя H_2O*. Как же атом водорода способен передвигаться между двумя атомами углерода, не смешиваясь с водородом растворителя, присутствующего в огромном избытке?

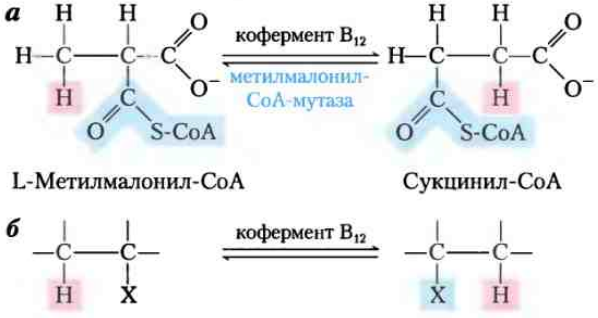


Рис. 1.

Кофермент B_{12} — кофакторная форма витамина B_{12}; среди всех других витаминов он уникален тем, что включает в свой состав не только сложную органическую молекулу, но и микроэлемент кобальт Co. Сложная **корриновая кольцевая система** витамина B_{12} (на рис. 2 окрашена синим), в которой координирован кобальт (Co^{3+}), родственна порфириновой кольцевой системе гема и гемсодержащих белков (см. рис. 5-1). В координационной сфере кобальта пятым лигандом является диметилбензимидазолрибонуклеотид (выделен желтым), ковалентно связанный своей 3′-фосфатной группой с боковой цепью корринового кольца через аминоизопропанол. Образование такого сложного кофактора известно всего лишь для двух реакций, где от ATP отщепляется трифосфат (рис. 3); другая реакция — образование S-аденозилметионина из ATP и метионина (см. рис. 18-18).

Витамин B_{12}, как правило, называют цианокобаламином; он содержит цианогруппу, которая присоединена к кобальту как шестой лиганд в координационной сфере. В **5′-дезоксиаденозилкобаламине,** кофакторе метилмалонил-CoA-мутазы, цианогруппа замещена на **5′-дезоксиаденозильную** группу (на рис. 2 красная), которая ковалентно связана с кобальтом через атом C-5′. Трехмерная структура кофактора впервые была определена Дороти Кроуфут Ходжкин в 1956 г. по данным рентгеноструктурного анализа.

Дороти Кроуфут Ходжкин, 1910–1994

биотин. Как и в реакции пируваткарбоксилазы (см. рис. 16-16), в этом ферментативном процессе CO_2 или ион гидроксикарбоната HCO_3^- активируется, присоединяясь к биотину еще до того, как попасть на субстрат (в данном случае пропионатный остаток). Для образования промежуточного соединения карбоксибиотина требуется энергия, которая поступает от распада ATP до ADP и P_i. Образованный таким образом D-метилмалонил-CoA ферментативно эпимеризуется **метилмалонил-CoA-эпимеразой** в L-стереоизомер (рис. 17-11). После этого L-метилмалонил-CoA подвергается внутримолекулярной перегруппировке с образованием сукцинил-CoA, который теперь может поступить в цикл трикарбоновых кислот. Эта перегруппировка катализируется **метилмалонил-CoA-мутазой**, которой в качестве кофермента требуется **5′-дезоксиаденозилкобаламин**, или **кофермент B_{12}**, получаемый из витамина B_{12} (кобаламина). В доп. 17-2 объясняется роль кофермента B_{12} в этой поразительной реакции обмена.

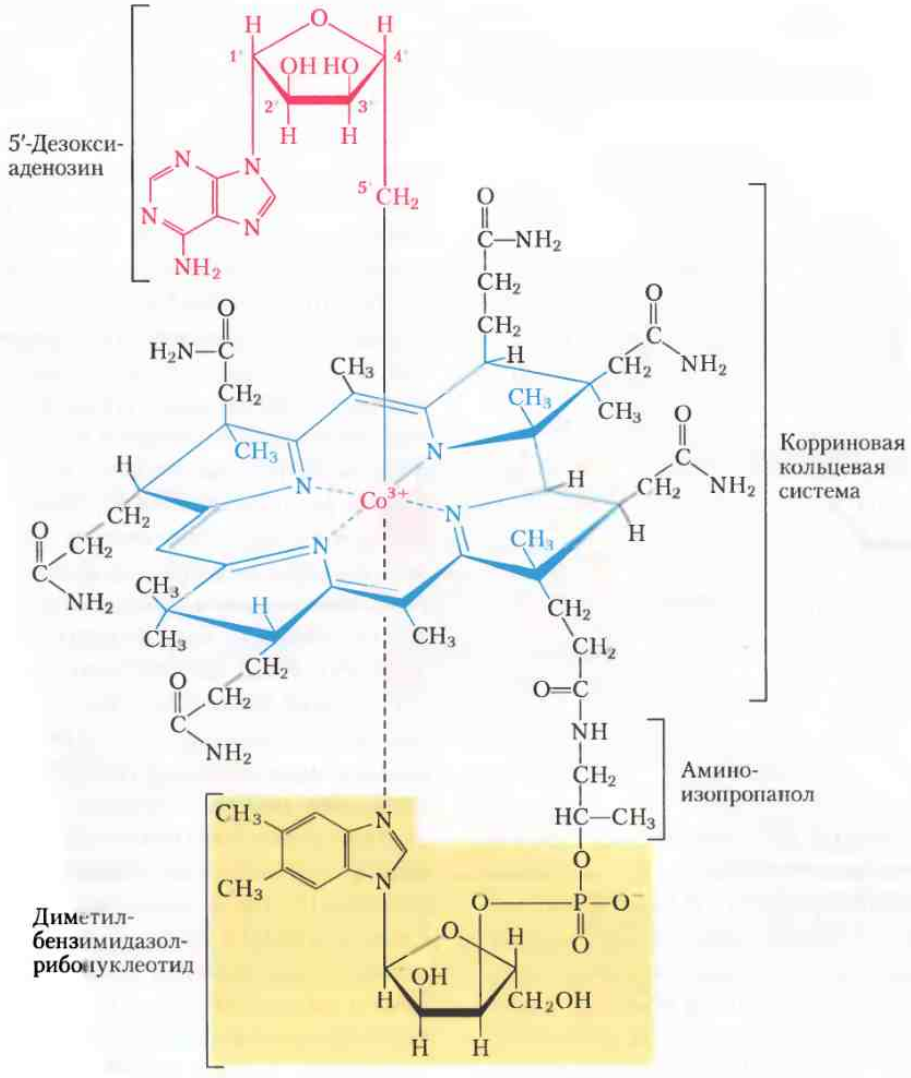


Рис. 2.

Окисление жирных кислот строго регулируется

При окислении жирных кислот расходуется драгоценный для организма источник энергии, и поэтому его регуляция устроена так, что процесс происходит только в случае недостатка энергии. В печени у ацил-CoA-производного жирной кислоты, образованного в цитозоле, есть два возможных пути: (1) β-окисление ферментами в митохондриях или (2) превращение в триацилглицерины и фосфолипиды ферментами цитозоля. Выбор пути зависит от скорости транспорта в митохондрии длинного «хвоста» ацил-CoA-производного жирной кислоты. Трехстадийный процесс (карнитиновый перенос), с помощью которого ацильные группы ацил-CoA-производного переносятся из цитозоля в митохондриальный матрикс (рис. 17-6), является стадией, лимитирующей скорость окисления жирных кислот и важным местом регуляции. Как только ацильные группы жирной кислоты попадают в митохондрии, они окисляются до ацетил-CoA.

Концентрация **малонил-CoA**, первого промежуточного соединения в биосинтезе длинноцепо-

Дополнение 17-2 Кофермент B_{12}: «радикальное» решение сложной задачи *(продолжение)*

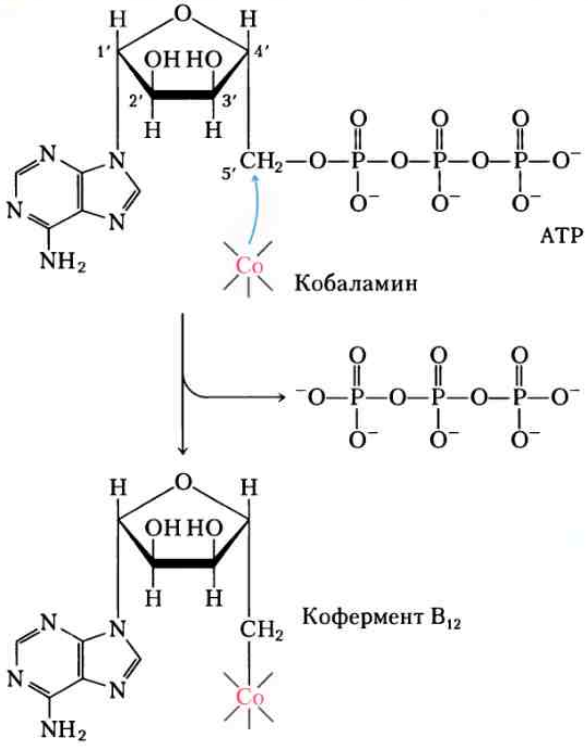
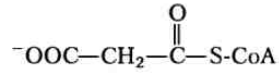


Рис. 3.

Ключ к пониманию того, как кофермент B_{12} катализирует обмен заместителями (алкил–водород), находится в свойствах ковалентной связи между кобальтом и атомом С-5′ дезоксиаденозильной группы (рис. 2). Эта связь довольно слабая; энергия ее диссоциации составляет около 110 кДж/моль по сравнению с 348 кДж/моль для одинарной связи С–С или 414 кДж/моль для связи С–Н. Чтобы разорвать связь Со–С, достаточно просто подвергнуть соединение действию видимого света. (Такая чрезвычайная фотолабильность объясняет отсутствие витамина B_{12} в растениях.) При диссоциации получается 5′-дезоксиаденозильный радикал и Co^{2+}-форма витамина. Химическая функция 5′-дезоксиаденозилкобаламина заключается в образовании свободных радикалов и инициации таким образом множества превращений, например представленного на рис. 4 механизма реакции, катализируемой метилмалонил-CoA-мутазой, и ряда других кофермент B_{12}-зависимых превращений. В предложенном механизме мигрирующий атом водорода нигде не присутствует в свободном виде и поэтому никогда не способен вступить в обмен с водородом окружающих молекул воды.

Недостаток витамина B_{12} приводит к серьезному заболеванию. Этот витамин не образуется ни у растений, ни у животных, он синтезируется всего несколькими видами микроорганизмов. Здоровым людям он необходим лишь в малых количествах, около 3 мкг/сут. Из-за неспособности эффективно всасывать витамин B_{12} из кишечника, где он синтезируется кишечной микрофлорой или образуется при переваривании мяса, возникает редкое заболевание **злокачественная анемия**. У человека с этим заболеванием не образуется в достаточном количестве **внутренний фактор** – гликопротеин, необходимый для всасывания витамина B_{12}. При злокачественной анемии в анализе крови эритроциты ниже нормы, низкий уровень гемоглобина; наблюдаются также симптомы прогрессирующего повреждения центральной нервной системы; в некоторых случаях введение больших доз витамина B_{12} смягчает эти симптомы. ■

чечных жирных кислот из ацетил-CoA в цитозоле (см. рис. 21-1), увеличивается всякий раз, когда животное получает много углеводов; избыток глюкозы, которую организм не может окислить или сохранить в виде гликогена, превращается в цитозоле в жирные кислоты для хранения в виде триацилглицеринов. Ингибированием карнитинацилтрансферазы I малонил-CoA обеспечивает подавление окисления жирных кислот каждый раз, когда в печень поступает слишком много глюкозы – из ее избытка активно синтезируются триацилглицерины.



Малонил-CoA

Два фермента β-окисления тоже регулируются метаболитами, передающими сигнал о том, что количество энергии достаточно. Если соотношение [NADH]/[NAD^+] велико, β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназа ингибируется; кроме того, высокие концентрации ацетил-CoA ингибируют тиолазу **(рис. 17-12)**.

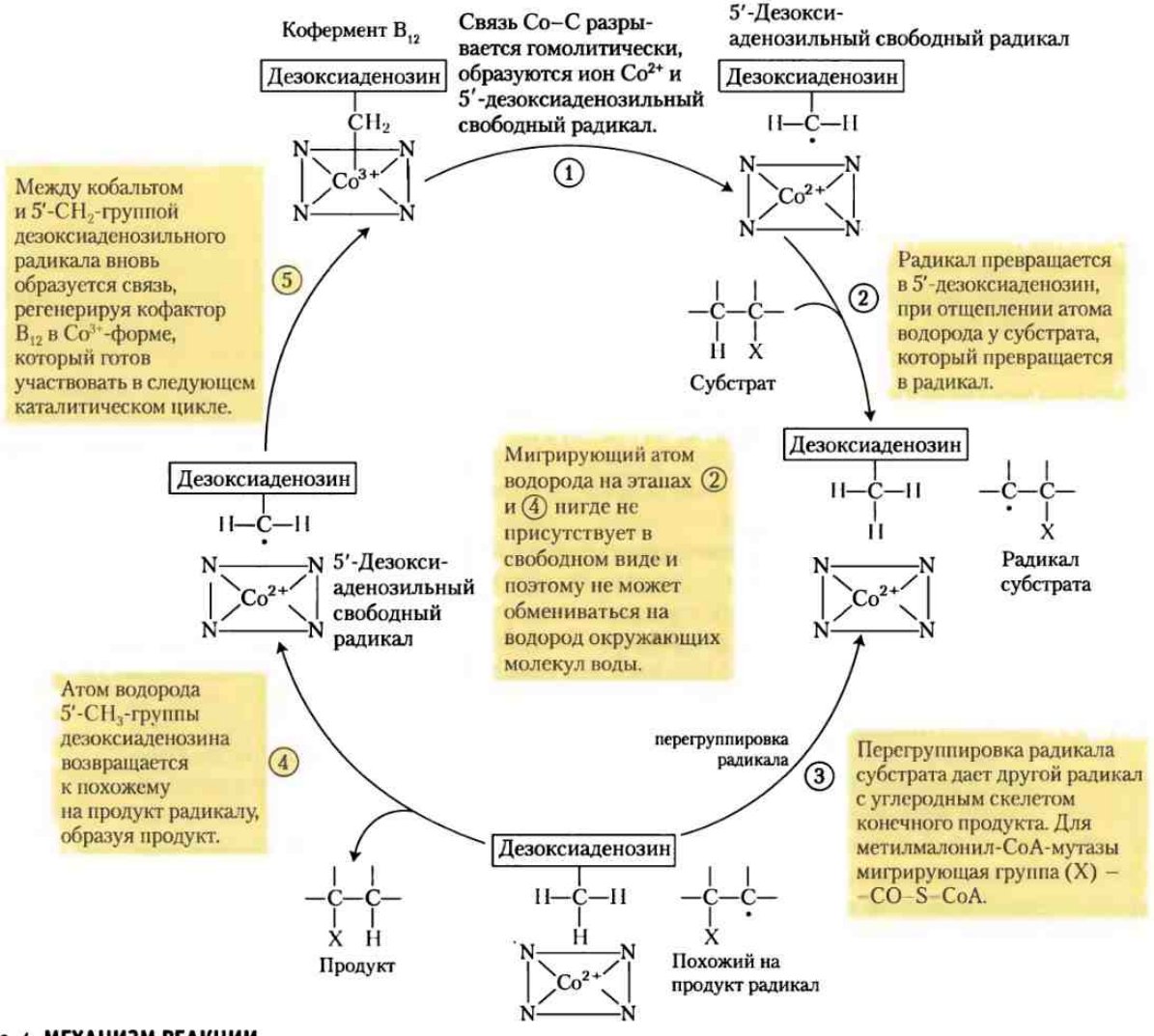


Рис. 4. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ.

Вспомните, в гл. 15 мы говорили о том, что при большой мышечной нагрузке или при голоде падение концентрации ATP и повышение концентрации AMP активируют AMP-зависимую протеинкиназу (AMPK). AMPK фосфорилирует несколько ферментов-мишеней, включая ацетил-CoA-карбоксилазу, катализирующую синтез малонил-CoA. Ингибирование ацетил-CoA-карбоксилазы, вызванное фосфорилированием, приводит к снижению концентрации малонил-CoA, что в свою очередь снимает ингибирование транспорта ацилкарнитина в митохондрии (рис. 17-12) и способствует окислительным процессам, восполняющим запасы ATP.

Синтезу белков, необходимых для катаболизма липидов, способствуют факторы транскрипции

Кроме различных короткодействующих регуляторных механизмов, модулирующих активность уже имеющихся ферментов, существует регуляция транскрипции, изменяющая количество молекул ферментов, участвующих в окислении жирных кислот; причем в данном случае речь идет о

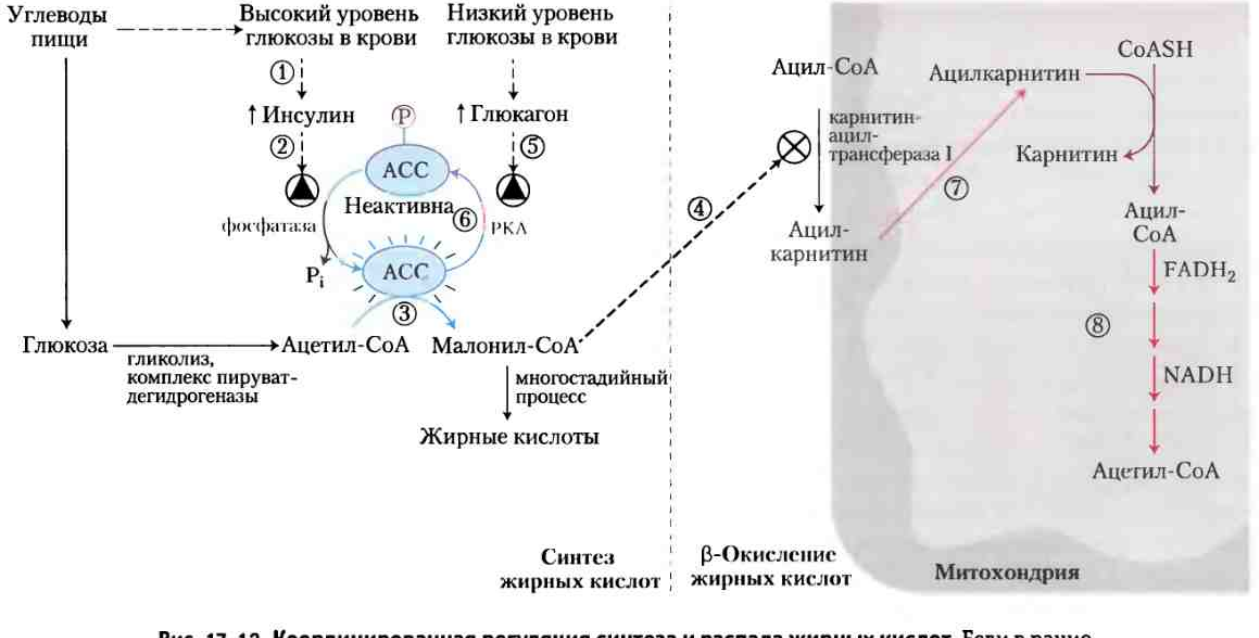


Рис. 17-12. Координированная регуляция синтеза и распада жирных кислот. Если в рационе питания в качестве источника энергии присутствуют углеводы, β-окисление жирных кислот уже не требуется и поэтому тормозится. Ключевую роль в координации метаболизма жирных кислот играют два фермента: ацетил-CoA-карбоксилаза (ACC), первый фермент в синтезе жирных кислот (см. рис. 21-1), и карнитинацилтрансфераза I, которая при β-окислении ограничивает транспорт жирных кислот в митохондриальный матрикс (см. рис. 17-6). Потребление пищи с высоким содержанием углеводов повышает уровень глюкозы крови и поэтому ① инициирует выделение инсулина. ② Инсулин-зависимый белок фосфатаза дефосфорилирует ACC, активируя ее. ③ ACC катализирует образование малонил-CoA (первое промежуточное соединение в синтезе жирных кислот), а ④ малонил-CoA ингибирует карнитинацилтрансферазу I, препятствуя, таким образом, попаданию жирных кислот в митохондриальный матрикс. Когда между приемами пищи уровень глюкозы крови падает, ⑤ выделение глюкагона активирует cAMP-зависимую протеинкиназу (PKA), которая ⑥ фосфорилирует и инактивирует ACC. Концентрация малонил-CoA падает, ингибирование поступления жирных кислот в митохондрию ослабляется, ⑦ они попадают в митохондриальный матрикс и ⑧ становятся основным источником энергии. Поскольку глюкагон ко всему прочему инициирует активацию жирных кислот в жировой ткани, их запасы начинают поступать в кровь.

более протяженных временных интервалах — от нескольких минут до нескольких часов. Семейство ядерных рецепторов **PPAR** представлено факторами транскрипции, участвующими во многих метаболических процессах и реагирующими на сигналы лигандов, таких как жирные кислоты. Ранее эти ядерные рецепторы получили название рецепторов, активированных пролифераторами пероксисомы (***p**eroxisome **p**roliferator-**a**ctivated **r**eceptors*, PPAR), однако позднее выяснилось, что их действие гораздо шире. В мышцах, жировой ткани и печени PPARα приводят в действие гены ферментов, необходимых для окисления жирных кислот, в том числе гены транспортеров жирных кислот — карнитинацилтрансфераз I и II, ацил-CoA-дегидрогеназы жирных кислот с короткой, средней, длинной и очень длинной цепью, а также гены других родственных ферментов. Такой клеточный ответ возникает, когда организму или клетке необходимо большое количество энергии, получаемой от катаболизма жиров, например в промежутке между приемами пищи или при длительном голодании. Высвобождающийся при низком содержании глюкозы в крови глюкагон, дей-

ствуя через cAMP и фактор транскрипции CREB, также включает некоторые гены, связанные с катаболизмом липидов.

Серьезные изменения экспрессии генов ферментов, связанных с окислением жирных кислот, происходят также в сердце при переходе от метаболизма зародыша к метаболизму новорожденного. Основными топливными молекулами в сердце зародыша являются глюкоза и лактат, однако у новорожденного как источник топлива используются жирные кислоты. Во время этого перехода происходит активация рецепторов PPARα, которые в свою очередь активируют гены ферментов, необходимых для метаболизма жирных кислот. Как мы увидим в гл. 23, два других члена семейства факторов транскрипции PPAR тоже играют важную роль в образовании ферментов и, следовательно, в метаболической активности специфических тканей в определенные моменты времени (см. рис. 23-42).

В основном окисление жирных кислот в организме происходит в скелетных мышцах — как в состоянии покоя, так и при физической нагрузке. При постоянных тренировках повышается уровень экспрессии PPARα в мышцах, что ведет к увеличению содержания ферментов, окисляющих жирные кислоты, и повышению окислительной способности мышц.

Генетические нарушения в ацил-CoA-дегидрогеназах — причина серьезных заболеваний

Запасные триацилглицерины обычно являются основным источником энергии для сокращения мышц, и неспособность окислять жирные кислоты из триацилглицеринов имеет серьезные последствия для здоровья. Самое распространенное генетическое нарушение в катаболизме жирных кислот у населения США и Северной Европы обусловлено мутацией в гене, кодирующем **ацил-CoA-дегидрогеназу средней цепи (MCAD)**. Среди северных европейцев носителем такой рецессивной мутации в одной из двух гомологичных хромосом оказывается примерно один человек из 40, а один из 10 000 болеет, т. е. имеет две копии мутантного аллеля MCAD и неспособен окислять жирные кислоты, несущие от 6 до 12 атомов углерода. Для этой болезни характерны периодические проявления: накопление жиров в печени, высокое содержание каприловой кислоты в крови, низкий уровень глюкозы крови (гипогликемия), сонливость, рвота, что может привести к коме. Распределение органических кислот в моче помогает в диагностике этой болезни: как правило, наблюдается высокое содержание дикарбоновых кислот, имеющих от 6 до 10 атомов углерода (образующихся в процессе ω-окисления), и низкий уровень кетоновых тел в моче (ω-окисление рассмотрено ниже, а кетоновые тела — в разд. 17-3). Между отдельными проявлениями болезни может и не быть симптомов, хотя при возникновении эпизодов болезни они очень опасны; в период раннего детства смертность от этой болезни составляет 25–60%. Если генетический дефект обнаружить сразу после рождения, младенцу можно назначить высокоуглеводную диету с низким содержанием жиров. При раннем обнаружении и выполнении тщательно спланированной диеты, включая избегания длительных интервалов между приемами пищи, чтобы не дать телу обратиться к своим собственным запасам жиров ради получения энергии, прогноз для таких пациентов благоприятный.

У человека зафиксировано более 20 других генетических нарушений в транспорте и окислении жирных кислот, которые гораздо менее распространены, чем дефект в MCAD. Причиной одного из наиболее тяжелых нарушений является утрата длинноцепочечной β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназной активности трехфункционального белка (TFP). К другим нарушениям относятся дефекты в α- или β-субъединицах TFP, которые оказывают влияние на все три активности TFP и вызывают тяжелые болезни сердца и аномалии скелетных мышц. ■

Пероксисомы тоже участвуют в β-окислении

Основным местом окисления жирных кислот в клетках животных служит митохондриальный матрикс, однако у некоторых клеток в других компартментах также содержатся ферменты, способные окислять жирные кислоты до ацетил-CoA по пути, который подобен, но не совсем идентичен митохондриальному. В клетках растений β-окисление в основном происходит не в митохондриях, а в пероксисомах.

В **пероксисомах**, заключенных в мембрану органеллах животных и растительных клеток, в роли промежуточных соединений β-окисления жирных кислот выступают производные кофермента А, а сам процесс состоит из четырех стадий, как и в митохондриальном β-окислении (**рис. 17-13**): (1) дегидрирование, (2) присоединение воды к образующейся двойной связи, (3) окисление β-гидроксиацил-CoA до кетона и (4) его тиолитический разрыв коферментом А. (Как увидим в дальнейшем, аналогичные реакции происходят и в глиоксисомах.)

Одно из различий между пероксисомальным и митохондриальным путями заключается в химии первого шага. В пероксисомах флавопротеин ацил-CoA-оксидаза, генерирующая двойную связь, передает электроны непосредственно на O_2, образуя H_2O_2 (рис. 17-13). Этот сильный и потенциально разрушительный окислитель тут же распадается на H_2O и O_2 под действием **каталазы**. Напомним, что в митохондриях электроны, взятые на первом шаге окисления, попадают на O_2 через дыхательную цепь, образуя H_2O, и этот процесс сопровождается синтезом АТР. В пероксисомах энергия, выделяющаяся на первом шаге окислительного распада жирных кислот, не сохраняется в виде АТР, а выделяется в виде теплоты.

Второе важное различие между митохондриальным и пероксисомальным β-окислением у млекопитающих состоит в специфичности к ацил-CoA-производным жирных кислот; пероксисомальная система намного более активна в отношении жирных кислот с очень длинными цепями, например таким, как церотиновая кислота (26:0), и с разветвленными цепями, таким как фитановая и пристановая кислоты (см. рис. 17-17). Эти малораспространенные жирные кислоты содержатся в молочных продуктах, жирах жвачных животных, мясе и рыбе. В их катаболизме участвует несколько вспомогательных ферментов в пероксисомах, которые уникальны для этих органелл. У человека неспособность окислять эти соединения вызывает некоторые тяжелые болезни. Больной с **синдромом Цельвегера** лишен биогенеза пероксисом, и в связи с этим у него организм испытывает недостаток во всем том метаболизме, который уникален для этих органелл. При **сцепленной с Х-хромосомой адренолейкодистрофии (XALD,** от англ. ***X**-linked **a**drenoleuko**d**ystrophy*) пероксисомы не могут окислять жирные кислоты с очень длинными цепями, по-видимому, из-за нехватки в пероксисомальной мембране функциональных переносчиков этих жирных кислот. Оба нарушения приводят к накоплению в крови жирных кислот с очень длинными цепями, особенно 26:0.

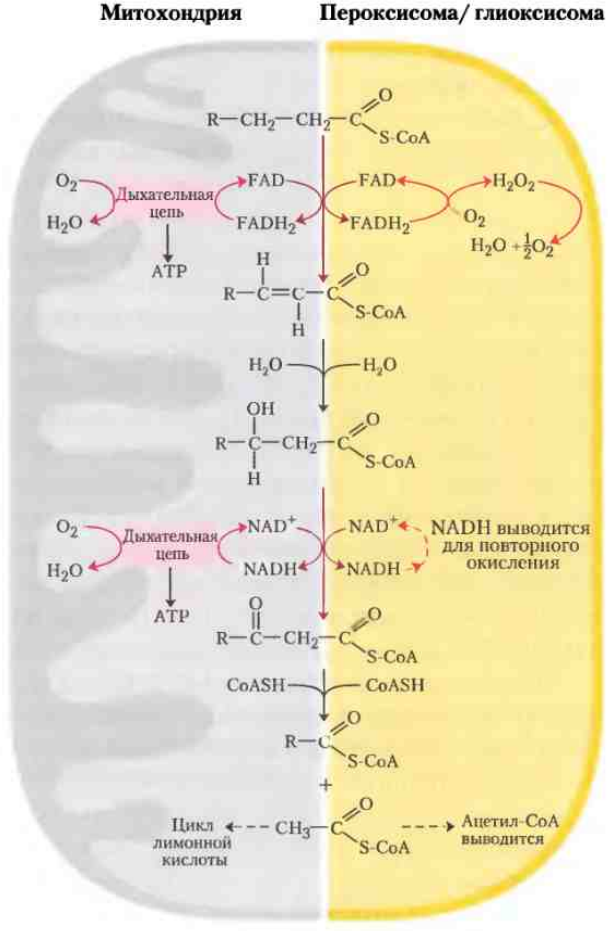


Рис. 17-13. Сравнение β-окисления в митохондриях и в пероксисомах и глиоксисомах. Пероксисомальная/глиоксисомальная система отличается от митохондриальной в двух отношениях: (1) на первом шаге окисления электроны попадают непосредственно на O_2, образуя H_2O_2 и (2) NADH, образованный на втором шаге окисления, не может быть вновь окислен в пероксисоме и глиоксисоме, поэтому восстановительные эквиваленты выводятся в цитозоль, вновь проникая со временем в митохондрии. Ацетил-CoA, образующийся в пероксисомах и глиоксисомах, тоже выводится; ацетат из глиоксисом (органелл, обнаруженных только в прорастающих семенах) служит биосинтетическим предшественником (см. рис. 17-14). Ацетил-CoA, образующийся в митохондриях, в дальнейшем окисляется в цикле трикарбоновых кислот.

XALD проявляется у мальчиков в возрасте до 10 лет, вызывая потерю зрения, поведенческие нарушения и смерть в течение нескольких лет. ■

У млекопитающих высокие концентрации жиров в рационе питания приводят к усиленному синтезу в печени ферментов пероксисомального β-окисления. Пероксисомы печени не содержат ферментов цикла трикарбоновых кислот и поэтому не могут катализировать окисление ацетил-CoA до CO_2. Вместо этого длинноцепочечные или разветвленные жирные кислоты в процессе катаболизма превращаются в короткоцепочечные продукты, например в гексаноил-CoA, которые экспортируются в митохондрии и полностью окисляются там.

Пероксисомы и глиоксисомы растений используют ацетил-CoA, полученный при β-окислении, как предшественник в биосинтезе

У растений окисление жирных кислот происходит в основном не в митохондриях, а в пероксисомах тканей листа и в глиоксисомах прорастающих семян. Пероксисомы и глиоксисомы растений схожи по своей структуре и функциям; глиоксисомы, встречающиеся только в прорастающих семенах, можно считать специализированными пероксисомами. Биологическая роль β-окисления в этих органеллах заключается в использовании запасенных липидов преимущественно для предоставления биосинтетических предшественников, а не энергии.

Рис. 17-14. Триацилглицерины в качестве источника глюкозы в семенах. У прорастающих семян β-окисление — одна из стадий превращения запасенных триацилглицеринов в глюкозу. Подробнее см. на рис. 16-22.

В период роста семян запасенные триацилглицерины превращаются в глюкозу, сахарозу и целый ряд важнейших метаболитов (**рис. 17-14**). Жирные кислоты, высвобождаемые из триацилглицеринов, вначале активируются, превращаясь в производные кофермента А, и окисляются в глиоксисомах в ходе точно такого же четырехстадийного процесса, как и в пероксисомах (рис. 17-13). Образующийся ацетил-CoA превращается в глиоксилатном цикле (см. рис. 16-20) в четырехуглеродные предшественники для глюконеогенеза (рис. 14-19). Глиоксисомы, как и пероксисомы, содержат в высокой концентрации каталазу, которая превращает образующийся в процессе β-окисления H_2O_2 в H_2O и O_2.

Ферменты β-окисления из разных органелл в ходе эволюции приобрели отличия

Хотя реакции β-окисления в митохондриях по существу те же, что и в пероксисомах и глиоксисомах, ферменты (изоферменты) в этих органеллах имеют значительные различия, что, по-видимому, возникло как результат эволюционной дивергенции на ранних этапах вместе с разделением грамположительных и грамотрицательных бактерий (см. рис. 1-6).

В митохондриях четыре фермента β-окисления, действующие на ацил-CoA-производные короткоцепочечных жирных кислот, — это самостоятельные растворимые белки (как уже отмечалось ранее), сходные по структуре с аналогичными ферментами грамположительных бактерий (**рис. 17-15, *а***). Грамотрицательные бактерии обладают четырьмя активностями в трех растворимых субъединицах (рис. 17-15, *б*), а ферментативная система эукариот, трехфункциональный белок TFP, действующий на длинноцепочечные жирные кислоты, обладает тремя ферментативными активностями в двух мембраносвязанных субъединицах (рис. 17-15, *в*). Однако ферменты β-окисления пероксисом и глиоксисом растений формируют комплекс из белков, один из которых

в одной полипептидной цепи несет сразу четыре ферментативные активности (рис. 17-15, *г*). Первый фермент, ацил-CoA-оксидаза, состоит из одной полипептидной цепи; **мультифункциональный белок (MFP**, от англ. ***multifunctional protein***) обладает второй и третьей ферментативными активностями (еноил-CoA-гидратазы и гидроксиацил-CoA-дегидрогеназы), а также двумя дополнительными активностями, необходимыми для окисления ненасыщенных жирных

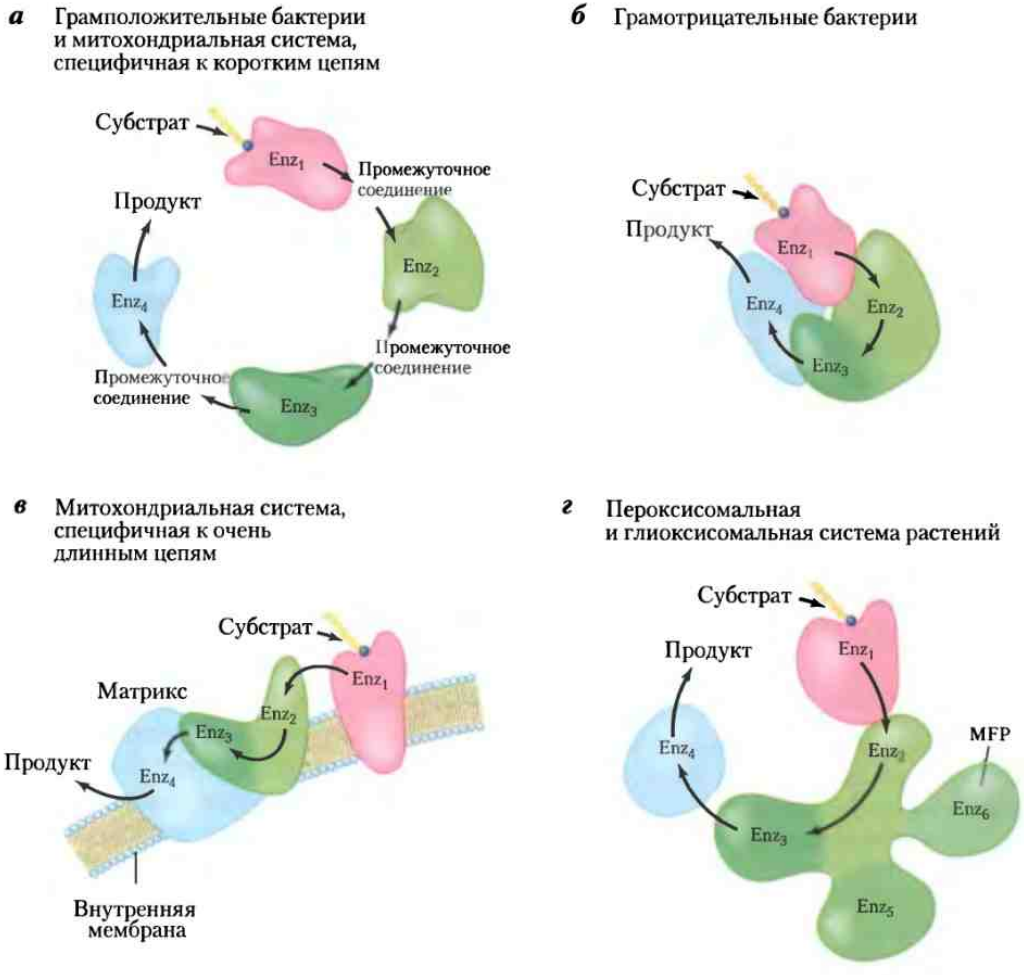


Рис. 17-15. Ферменты β-окисления. Показано различное строение субъединиц ферментов β-окисления в грамположительных и грамотрицательных бактериях, митохондриях, пероксисомах и глиоксисомах растений. Enz_1 — ацил-CoA-дегидрогеназа; Enz_2 — еноил-CoA-гидратаза; Enz_3 — L-β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназа; Enz_4 — тиолаза; Enz_5 — D-3-гидроксиацил-CoA-эпимераза, а Enz_6 — Δ^3,Δ^2-еноил-CoA-изомераза. *а* — четыре фермента β-окисления грамположительных бактерий, как и митохондриальной системы, специфичной к коротким цепям, — самостоятельные растворимые единицы. *б* — у грамотрицательных бактерий четыре ферментативные активности свойственны трем полипептидам; ферменты 2 и 3 являются частью одной полипептидной цепи. *в* — митохондриальная система, специфичная к очень длинным цепям, тоже состоит из трех полипептидов, один из которых включает активность ферментов 2 и 3; в данном случае система связана с внутренней митохондриальной мембраной. *г* — в пероксисомальной и глиоксисомальной системах β-окисления растений ферменты 1 и 4 — это самостоятельные полипептиды, однако ферменты 2 и 3, а также два вспомогательных фермента входят в состав одной полипептидной цепи мультифункционального белка MFP.

кислот (D-3-гидроксиацил-CoA-эпимеразы и Δ^3,Δ^2-еноил-CoA-изомеразы); четвертый фермент, тиолаза, является самостоятельным растворимым полипептидом.

Интересно, что ферменты, в синтезе жирных кислот катализирующие процесс, обратный β-окислению, тоже по-разному организованы у прокариот и эукариот; у бактерий семь ферментов, необходимых для синтеза жирных кислот, — самостоятельные полипептиды, а у млекопитающих все семь ферментативных активностей свойственны одной очень большой полипептидной цепи. Одно из преимуществ клеток, в которых несколько ферментов одного и того же пути кодируются в одну полипептидную цепь, состоит в том, что это решает проблему регуляции синтеза ферментов, позволяя им взаимодействовать функционально; регуляция экспрессии *одного* гена обеспечивает образование одинакового числа активных центров всех ферментов этого пути. Если каждая ферментативная активность относится к отдельному полипептиду, нужен некий механизм, координирующий синтез всех генных продуктов. *Недостатком* обладания несколькими ферментативными активностями у одного полипептида является то, что чем длиннее его полипептидная цепь, тем больше вероятность ошибки в ее синтезе: одна неверная аминокислота в цепи может сделать непригодной ферментативную активность всей цепи. Сравнение структур генов этих белков у нескольких видов может пролить свет на причины выбора той или иной стратегии в эволюции.

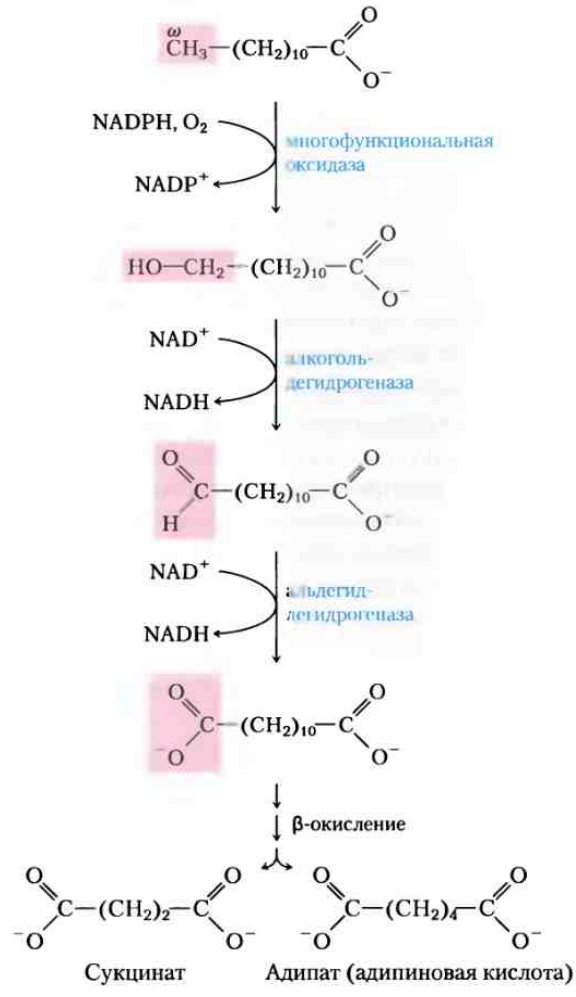


Рис. 17-16. ω-Окисление жирных кислот в эндоплазматическом ретикулуме. Эта альтернатива β-окислению начинается с окисления атома углерода, наиболее удаленного от α-углерода, — ω (омега) углерода. Субстратом обычно выступает жирная кислота со средней длиной цепи; здесь приведена лауриновая кислота (лаурат). Как правило, этот путь не основной при окислительном катаболизме жирных кислот.

ω-Окисление жирных кислот происходит в эндоплазматическом ретикулуме

Хотя митохондриальное β-окисление, в котором ферменты действуют на карбоксильном конце жирной кислоты, и является важнейшим путем катаболиза жирных кислот в клетках животных, у некоторых видов, включая позвоночных, есть другой путь, приводящий к окислению ω (омега) углерода — атома углерода, который наиболее удален от карбоксильной группы. Свойственные **ω-окислению** ферменты находятся (у позвоночных) в эндоплазматическом ретикулуме печени и почек, а в качестве субстратов предпочтение отдаётся жирным кислотам с 10–12 атомами углерода. У млекопитающих ω-окисление — это обычно второстепенный путь распада жирных кислот, однако в случае нарушения β-окисления (например, из-за мутации или из-за нехватки карнитина) оно приобретает намного большее значение.

На первой стадии гидроксильная группа присоединяется к ω-углероду (**рис. 17-16**). Кислород для этой группы приходит от молекулярного кислорода в результате сложной реакции,

включающей цитохром P450 и донор электронов NADPH. Реакции такого типа катализируют **многофункциональные оксидазы**, которые описаны в доп. 21-1. После этого на ω-углерод действуют еще два фермента: **алкогольдегидрогеназа** окисляет гидроксильную группу до альдегида, а **альдегиддегидрогеназа** окисляет альдегидную группу до карбоновой кислоты, образуя жирную кислоту с карбоксильными группами на каждом конце. На этом этапе любой из концов можно присоединить к коферменту А так, чтобы молекула смогла попасть в митохондрию и подвергнуться β-окислению привычным способом. При каждом прохождении по маршруту β-окисления жирные кислоты с «двойными концами» образуют дикарбоновые кислоты, например янтарную кислоту, которая поступает в цикл трикарбоновых кислот, и адипиновую кислоту (рис. 17-16).

Фитановая кислота подвергается α-окислению в пероксисомах

Наличие метильной группы у β-углерода жирной кислоты делает β-окисление невозможным, поэтому катаболизм таких разветвленных жирных кислот происходит в пероксисомах клеток животных путем **α-окисления**. При окислении, например, фитановой кислоты (рис. 17-17) фитаноил-CoA гидроксилируется по α-углероду в реакции, включающей молекулярный кислород; декарбоксилируется с образованием альдегида, который на один атом углерода короче; а затем окисляется до соответствующей карбоновой кислоты, у которой теперь уже нет заместителя на β-углероде и которую в дальнейшем можно окислить в процессе β-окисления. **Болезнь Рефсума**, возникающая из-за генетического дефекта в фитаноил-CoA-гидроксилазе, приводит к очень высокому содержанию фитановой кислоты в крови и серьезным неврологическим проблемам, включая слепоту и глухоту. ■

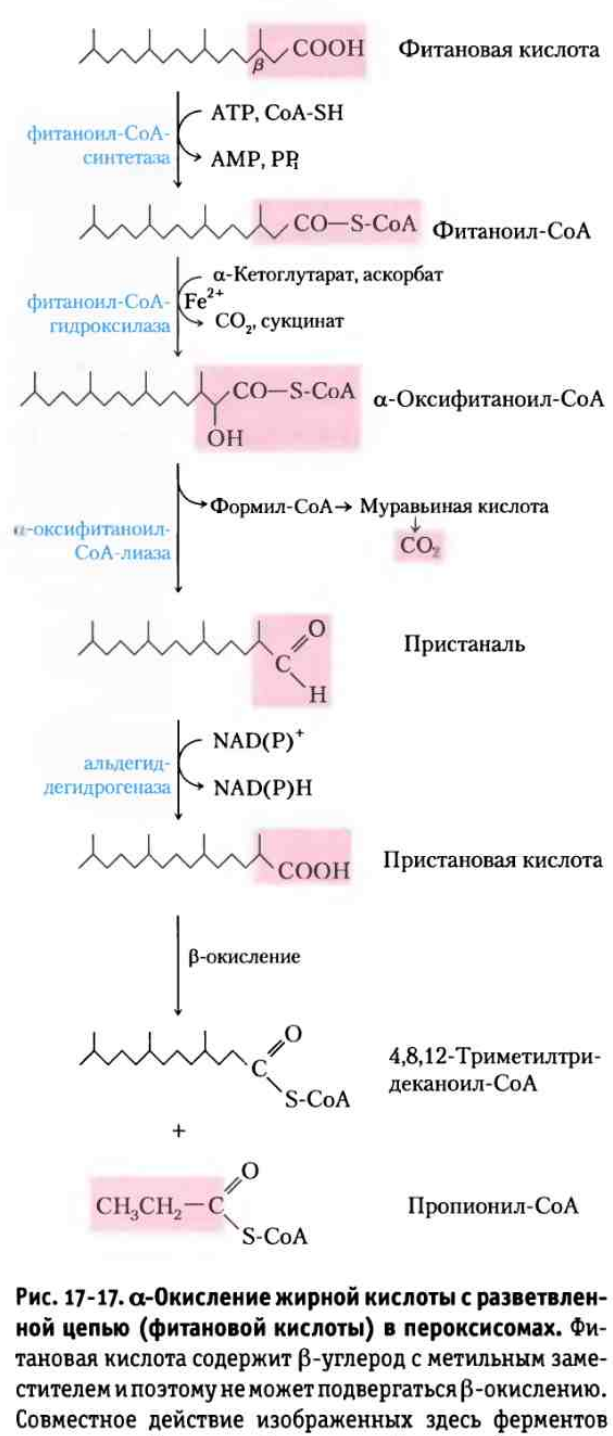


Рис. 17-17. α-Окисление жирной кислоты с разветвленной цепью (фитановой кислоты) в пероксисомах. Фитановая кислота содержит β-углерод с метильным заместителем и поэтому не может подвергаться β-окислению. Совместное действие изображенных здесь ферментов удаляет карбоксильный углерод фитановой кислоты с образованием пристановой кислоты, у которой при β-углероде нет заместителя, что делает возможным β-окисление. Обратите внимание, что при β-окислении пристановой кислоты образуется пропионил-CoA, а не ацетил-CoA. Дальнейший его катаболизм происходит в соответствии с рис. 17-11. (Детали реакции с образованием пристаналя остаются спорными.)

Краткое содержание раздела 17.2 ОКИСЛЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

- На первой стадии β-окисления с карбоксильного конца ацил-CoA-производного насыщенной жирной кислоты каждый раз

удаляется молекула ацетил-CoA в ходе четырех реакций: (1) дегидрирование α- и β-углеродов (C-2 и C-3) связанными с FAD ацил-CoA-дегидрогеназами, (2) гидратация образовавшейся *транс*-Δ^2 двойной связи еноил-CoA-гидратазой, (3) дегидрирование получившегося L-β-оксиацил-CoA связанной с NAD β-оксиацил-CoA-дегидрогеназой и (4) разрыв образовавшегося β-кетоацил-CoA тиолазой при участии CoA с образованием ацетил-CoA и ацил-CoA-производного жирной кислоты, укороченного на два атома углерода. Затем укороченное ацил-CoA-производное вновь проходит через эту последовательность реакций.

- На второй стадии окисления жирных кислот ацетил-CoA окисляется до CO_2 в цикле трикарбоновых кислот. Теоретически рассчитанная свободная энергия окисления жирных кислот в основном превращается в ATP в процессе окислительного фосфорилирования — финальной стадии окислительного пути.

- Малонил-CoA, одно из первых промежуточных соединений синтеза жирных кислот, ингибирует карнитинацилтрансферазу I, препятствуя попаданию жирных кислот в митохондрии. Это блокирует распад жирных кислот, пока идет их синтез.

- Генетические дефекты в ацил-CoA-дегидрогеназе средней цепи приводят к серьезному заболеванию человека, наравне с мутациями в остальных компонентах системы β-окисления.

- Для окисления ненасыщенных жирных кислот необходимы два дополнительных фермента: еноил-CoA-изомераза и 2,4-диеноил-CoA-редуктаза. Жирные кислоты с нечетным числом атомов углерода подвергаются β-окислению с образованием ацетил-CoA и пропионил-CoA. Последний карбоксилируется до метилмалонил-CoA, который изомеризуется до сукцинил-CoA в реакции, катализируемой метилмалонил-CoA-мутазой, ферментом, нуждающимся в коферменте B_{12}.

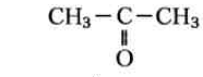
- β-Окисление в пероксисомах растений и животных и глиоксисомах растений состоит из тех же четырех стадий, что и на митохондриальном пути у животных. Однако на первом шаге окисления электроны переносятся непосредственно на O_2, образуя H_2O_2. Пероксисомы тканей животных специализируются на окислении жирных кислот с очень длинными цепями и разветвленных жирных кислот. В глиоксисомах прорастающих семян β-окисление — одна из стадий превращения запасенных липидов во множество промежуточных соединений и продуктов.

- В реакциях ω-окисления, которые происходят в эндоплазматическом ретикулуме, образуются как промежуточные соединения дикарбоновые производные жирных кислот, которые подвергаются β-окислению с любого конца, образуя короткие дикарбоновые кислоты, например сукцинат.

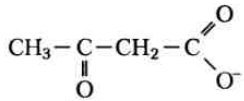
17.3. Кетоновые тела

У людей и большинства других млекопитающих ацетил-CoA, образующийся в печени в процессе окисления жирных кислот, может либо поступить в цикл трикарбоновых кислот (стадия 2 на рис. 17-7), либо превратиться в «кетоновые тела», **ацетон, ацетоацетат** и **D-β-гидроксибутират** для экспорта в другие ткани. (Термин «тела» является историческим; изредка его используют в отношении нерастворимых частиц, однако данные соединения полностью растворимы в крови и моче.) Ацетон, образующийся в меньших количествах, чем остальные кетоновые тела, испаряется. Ацетоацетат и D-β-гидроксибутират переносятся кровью к тканям, везде, кроме печени, и в тканях они превращаются в ацетил-CoA и окисляются в цикле трикарбоновых кислот. Кетоновые тела дают энергию таким тканям, как скелетные и сердечная мышцы, корковое вещество почек. Мозг, который в качестве источника энергии использует преимущественно глюкозу, в условиях голодания может приспособиться к употреблению ацетоацетата или D-β-гидроксибутирата. Образование и экспорт кетоновых тел из печени во внепеченочные ткани позволяет жирным кислотам непрерывно

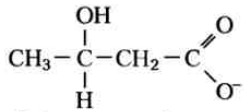
окисляться в печени, если ацетил-CoA не окисляется в цикле трикарбоновых кислот.



Ацетон



Ацетоацетат



D-β-гидроксибутират

Кетоновые тела, образующиеся в печени, экспортируются в другие органы в качестве источников энергии

Первая стадия образования ацетоацетата происходит в печени (**рис. 17-18**) и заключается в ферментативной конденсации двух молекул ацетил-CoA, которую катализирует тиолаза; это просто обращение последнего шага β-окисления. Затем ацетоацетил-CoA конденсируется с ацетил-CoA, образуя **β-гидрокси-β-метилглутарил-CoA (HMG-CoA**, от англ. β-***hydroxy***-β-***methyl*glutaryl-*CoA***), который распадается на свободный ацетоацетат и ацетил-CoA. Ацетоацетат обратимо восстанавливается митохондриальным ферментом D-β-гидроксибутиратдегидрогеназой до D-β-гидроксибутирата. Этот фермент специфичен к D-стереоизомеру; он не действует на L-β-гидроксиацил-CoA, и его не надо путать с L-β-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназой β-окислительного пути.

У здорового человека из ацетоацетата в очень малых количествах образуется ацетон, который легко декарбоксилируется — либо спонтанно, либо под действием **ацетоацетатдекарбоксилазы** (рис. 17-18). Поскольку при нелеченом диабете образуется много ацетоацетата, в крови наблюдается высокое содержание токсичного ацетона. Ацетон летуч и придает дыханию характерный запах, что иногда помогает при диагностике диабета. ■

Во внепеченочных тканях D-β-гидроксибутиратдегидрогеназа окисляет D-β-гидроксибутират до ацетоацетата (**рис. 17-19**). Ацетоацетат активируется в реакции, катализируемой

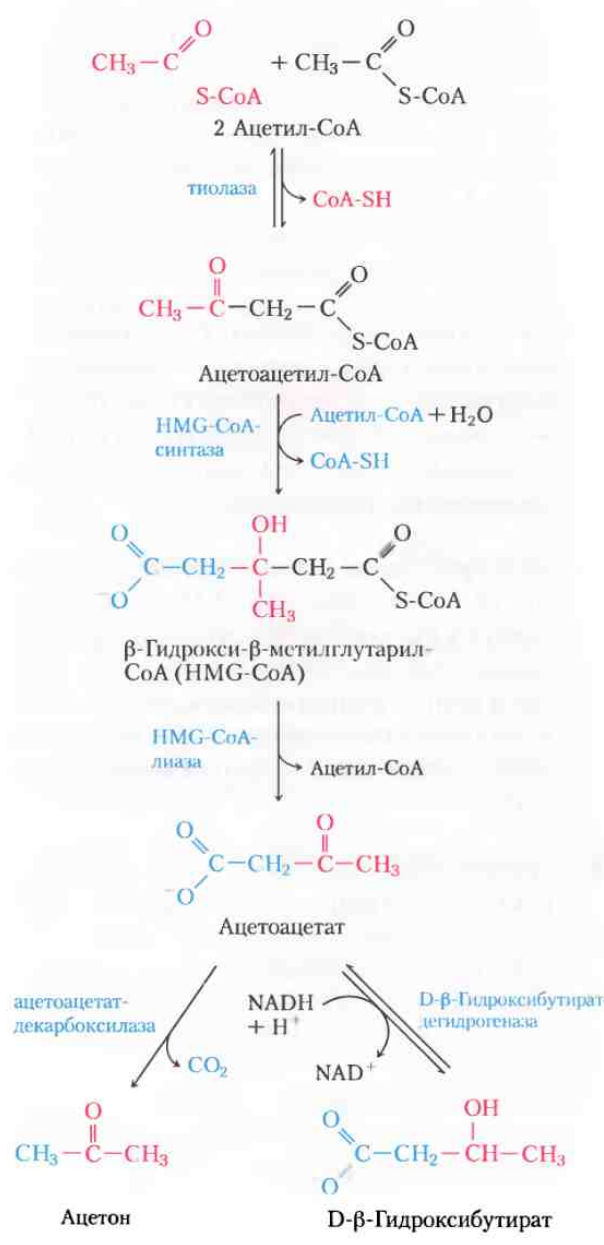


Рис. 17-18. Образование кетоновых тел из ацетил-CoA. У здоровых нормально питающихся людей кетоновые тела образуются в незначительном количестве. При накоплении ацетил-CoA (например, при голодании или нелеченом диабете) тиолаза катализирует конденсацию двух молекул ацетил-CoA в ацетоацетил-CoA, исходное соединение для трех кетоновых тел. Реакции образования кетоновых тел происходят в матриксе митохондрий печени. Шестиуглеродное соединение β-гидрокси-β-метилглутарил-CoA (HMG-CoA) выступает также промежуточным соединением биосинтеза стеринов, однако на том пути фермент, образующий HMG-CoA, находится в цитозоле. HMG-CoA-лиаза есть только в митохондриальном матриксе.

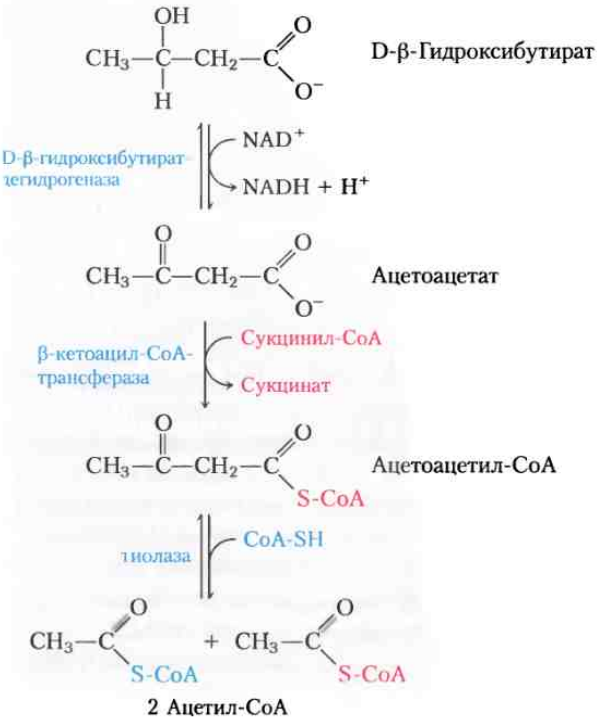


Рис. 17-19. D-β-Гидроксибутират в качестве источника энергии. D-β-Гидроксибутират, синтезируемый в печени, попадает в кровь и, таким образом, в другие ткани, где он превращается в три стадии в ацетил-CoA. Вначале он окисляется до ацетоацетата, который активируется коферментом А, полученным из сукцинил-CoA, а затем расщепляется тиолазой. Образовавшийся таким образом ацетил-CoA используется для получения энергии.

β-кетоацил-CoA-трансферазой. При переносе CoA с сукцинил-CoA, промежуточного соединения цикла трикарбоновых кислот (см. рис. 16-7), образуется сложный эфир кофермента А. Затем ацетоацетил-CoA распадается под действием тиолазы на две молекулы ацетил-CoA, которые поступают в цикл трикарбоновых кислот. Таким образом, кетоновые тела используются в качестве источника энергии во всех тканях, за исключением печени, в которой отсутствует тиолаза. Поэтому печень производит кетоновые тела для других тканей, но сама их не использует.

Образование и экспорт кетоновых тел печенью позволяет жирным кислотам непрерывно окисляться с минимальным окислением ацетил-CoA. Например, если промежуточные соединения цикла трикарбоновых кислот перекачиваются для синтеза глюкозы в процессе глюконеогенеза, окисление интермедиатов цикла притормаживается — а, следовательно, и окисление ацетил-CoA. Более того, печень содержит всего лишь ограниченные количества кофермента А, и если большая часть его связана в ацетил-CoA, β-окисление замедляется из-за нехватки свободного кофермента. Образование и экспорт кетоновых тел высвобождает кофермент А, делая окисление жирных кислот непрерывным.

При диабете и голодании кетоновые тела образуются сверх нужного количества

Голодание и нелеченые диабеты приводят к перепроизводству кетоновых тел, а вместе с этим и к некоторым медицинским проблемам. Во время голодания из-за глюконеогенеза количество промежуточных соединений цикла трикарбоновых кислот резко уменьшается, направляя ацетил-CoA в сторону образования кетоновых тел **(рис. 17-20)**. При нелеченом диа-

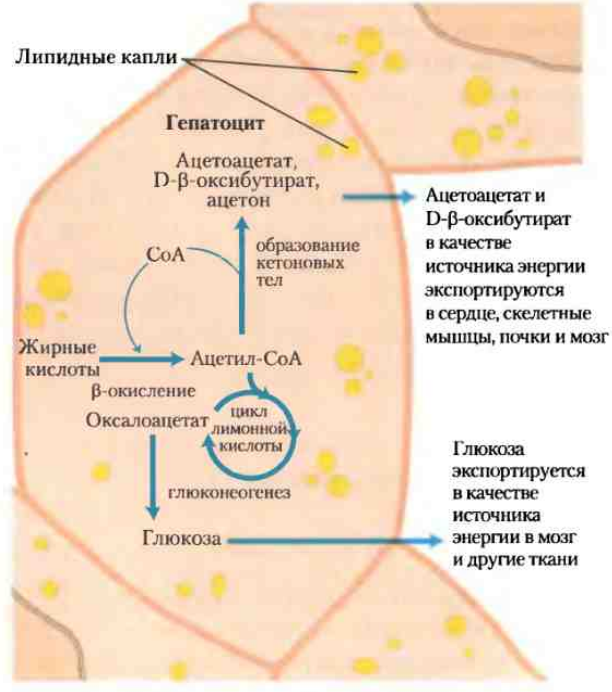


Рис. 17-20. Образование кетоновых тел и их экспорт из печени. Условия, способствующие глюконеогенезу (нелеченый диабет, чрезвычайно низкое потребление пищи) замедляют работу цикла трикарбоновых кислот (благодаря отведению оксалоацетата) и увеличивают превращение ацетил-CoA в ацетоацетат. Высвобождаемый кофермент А благоприятствует непрерывному β-окислению жирных кислот.

бете, когда содержание инсулина недостаточно, внепеченочные ткани не могут эффективно всасывать глюкозу из крови, как для получения энергии, так и для превращения ее в жиры. В этих условиях содержание малонил-CoA (стартовое вещество для синтеза жирных кислот) падает, ингибирование карнитинацилтрансферазы I ослабляется и жирные кислоты проникают в митохондрии для распада до ацетил-CoA, который, однако, не может пройти через цикл трикарбоновых кислот, поскольку промежуточные соединения цикла были переключены на использование в качестве субстратов в глюконеогенезе. В итоге накопление ацетил-CoA ускоряет образование кетоновых тел в таком количестве, которое превышает способность внепеченочных тканей окислить их. Повышенные уровни ацетоацетата и D-β-гидроксибутирата в крови уменьшают ее pH, вызывая состояние, известное как **ацидоз**. В предельных случаях ацидоз может привести к коме, а в некоторых случаях — к смерти. Содержание кетоновых тел в крови и моче диабетиков может быть очень высоким — концентрация в крови 90 мг/100 мл (норма <3 мг/100мл), а в утренней моче 5000 мг/24 ч (норма ≤125 мг/24 ч). Такое состояние называется **кетозом**.

При очень низкокалорийной диете в качестве основного источника энергии используются жиры, запасенные в жировой ткани, у таких людей также повышено содержание кетоновых тел в крови и моче. Чтобы избежать опасности ацидоза и кетоза (кетоацидоза), надо следить за этими показателями. ■

Краткое содержание раздела 17.3 КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

- Кетоновые тела — ацетон, ацетоацетат и D-β-гидроксибутират — образуются в печени. Последние два соединения служат в внепеченочных тканях «топливными» молекулами: они окисляются до ацетил-CoA и входят в цикл трикарбоновых кислот.

- Перепроизводство кетоновых тел при неконтролируемом диабете или чрезвычайно ограниченном потреблении пищи может привести к ацидозу или кетозу.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

α-окисление 250
β-окисление 225
ω-окисление 249
PPAR (рецепторы, активированные пролифераторами пероксисомы) 244
аполипопротеин 227
ацидоз 254
ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик 232
ацил-CoA-дегидрогеназа средней цепи (MCAD) 245
внутренний фактор 242
гормон-чувствительная липаза 229
злокачественная анемия 242
карнитинацилтрансфераза I 230
карнитинацилтрансфераза II 232
карнитиновый перенос 230
кетоз 254
кофермент B_{12} 240
липопротеин 227
малонил-CoA 241
метилмалонил-CoA-мутаза 240
многофункциональные оксидазы 250
мультифункциональный белок (MFP) 248
перилипины 228
свободные жирные кислоты 230
сывороточный альбумин 230
трехфункциональный белок (TFP) 235
хиломикрон 227

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Boyer, P. D. (1983) *The Enzymes*, 3rd edn, Vol. 16: *Lipid Enzymology*, Academic Press, Inc., San Diego, CA.

Ferry, G. (1998) *Dorothy Hodgkin: A Life*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Увлекательное изложение биографии удивительной женщины.

Gurr, M. I., Harwood, J. L., & Frayn, K. N. (2002) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 5th edn, Blackwell Science, Oxford, UK.

Langin, D., Holm, C., & Lafontan, M. (1996) Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 93–109.

Ramsay, T. G. (1996) Fat cells. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **25**, 847–870.

Обзор всех аспектов накопления жиров и их активации в жировых клетках.

Scheffler, I. E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York.

Отличная книга о структуре и работе митохондрий.

Wang, C. S., Hartsuck, J., & McConathy, W. J. (1992) Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 1–17.

Углубленное обсуждение фермента, высвобождающего жирные кислоты из липопротеинов в капиллярах мышечной и жировой ткани.

Wood, P. A. (2006) *How Fat Works*, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Приятный для чтения сборник статей среднего уровня сложности, посвященных генетическим моделям и экспериментам на мышах, позволяющим понять, как происходит метаболизм липидов и возникает ожирение.

β-Окисление в митохондриях

Bannerjee, R. (1997) The yin-yang of cobalamin biochemistry. *Chem. Biol.* **4**, 175–186.

Обзор биохимии реакций кофермента B_{12}, включая реакцию метилмалонил-CoA-мутазы.

Carey, H. V., Andrews, M. T., & Martin, S. L. (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol. Rev.* **83**, 1153–1181.

Desverne, B., Michalik, L., & Wahij, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Обширный обзор регуляции метаболизма факторами транскрипции, включающий метаболизм жиров.

Eaton, S., Bartlett, K., & Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial β-oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345–357.

Обзор энзимологии β-окисления, наследственных дефектов этого пути и регуляции процесса в митохондриях.

Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A.W., & Bartlett, K. (2000) The mitochondrial trifunctional protein: centre of a β-oxidation metabolon? *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 177–182.

Краткий обзор среднего уровня сложности.

Evans, R. M., Barish, G. D., & Wang, Y.-X. (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* **10**, 1–7.

Очень хорошо написанный сборник среднего уровня сложности, посвященный открытию PPAR и их функций.

Harwood, J. L. (1988) Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **39**, 101–138.

Jeukendrup, A. E., Saris, W. H., & Wagenmakers, A. J. (1998) Fat metabolism during exercise: a review. Part III: effects of nutritional interventions. *Int. J. Sports Med.* **19**, 371–379.

Одна из статей серии, в которой рассматриваются факторы, влияющие на активацию и утилизацию жиров во время физической нагрузки.

Kampf, J. P. & Kleinfeld, A. M. (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? *Physiology* **22**, 7–14.

Kerner, J. & Hoppel, C. (1998) Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 179–206.

Kerner, J. & Hoppel, C. (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 1–17.

Kunau, W. H., Dommes, V., & Schulz, H. (1995) β-Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* **34**, 267–342.

Хорошая историческая оценка и полезное сравнение β-окисления в различных системах.

Mandard, S., Muller, M., & Kersten, S. (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 393–416.

Обзор генов под контролем PPARα.

Rinaldo, P., Matern, D., & Bennett, M. J. (2002) Fatty acid oxidation disorders. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 477–502.

Подробный обзор метаболических нарушений в окислении жиров, включая мутации MCAD.

Rufer, A. C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D. W., Mueller, F., Chomienne, O., & Hennig, M. (2006) The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment. *Structure* **14**, 713–723.

Sherratt, H. S. (1994) Introduction: the regulation of fatty acid oxidation in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 421–422.

Предисловие к обзорам (опубликованным в этом выпуске журнала) различных аспектов окисления жирных кислот и его регуляции.

Thorpe, C. & Kim, J. J. (1995) Structure and mechanism of action of the acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J.* **9**, 718–725.

Краткое и внятное описание трехмерной структуры и каталитического действия этих ферментов.

β-Окисление в пероксисомах

Graham, I. A. & Eastmond, P. J. (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res.* **41**, 156–181.

Wanders, R. J. A., van Grunsven, E. G., & Jansen, G. A. (2000) Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α- and β-oxidation systems in humans. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 141–148.

Кетоновые тела

Foster, D. W. & McGarry, J. D. (1983) The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N. Engl. J. Med.* **309**, 159–169.

McGarry, J. D. & Foster, D. W. (1980) Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 395–420.

Robinson, A. M. & Williamson, D. H. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* **60**, 143–187.

Вопросы и задачи

1. Энергия триацилглицеринов. Из расчета на углерод, где в триацилглицеринах находится больше всего биологически полезной энергии: в жирнокислотной или глицериновой части? Покажите, как знание химической структуры триацилглицеринов помогает дать ответ.

2. Энергетические запасы в жировой ткани. Среди основных питательных веществ триацилглицерины со своими углеводородоподобными жирными кислотами содержат больше всего энергии.

а) Если 15% массы тела взрослого человека (массой 70,0 кг) приходится на триацилглицерины, каков суммарный запас энергии в виде триацилглицеринов, как в килоджоулях, так и в килокалориях? 1,00 ккал = 4,18 кДж.

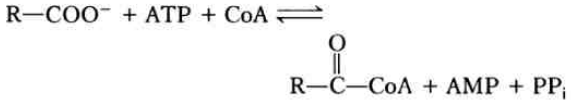
б) Если потребность в энергии составляет примерно 8400 кДж/сут. (2000 ккал/сут), сколько времени смог бы прожить человек, если окисление жирных кислот, запасенных в виде триацилглицеринов, было бы единственным источником энергии?

в) Сколько ежедневно терялось бы массы тела (в фунтах) при таких условиях голодания? 1 фунт = 0,454 кг.

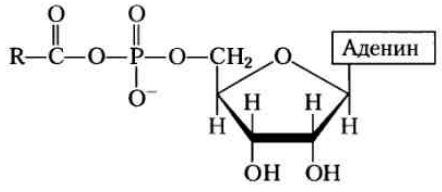
3. Общие реакции в окислении жирных кислот и в цикле трикарбоновых кислот. Клетки часто используют одну и ту же схему ферментативных реакций в аналогичных метаболических превращениях. Например, стадии окисления пирувата до ацетил-CoA и α-кетоглутарата до сукцинил-CoA очень похожи, хотя и катализируются различными ферментами. Последовательность реакций первой стадии окисления жирных кислот напоминает последовательность в цикле трикарбоновых кислот. Используя уравнения, продемонстрируйте последовательности аналогичных реакций двух метаболических путей.

4. β-Окисление: сколько циклов? Сколько циклов β-окисления требуется для полного окисления активированной олеиновой кислоты (18:1 (Δ^9))?

5. Реакции ацил-CoA-синтетазы. Жирные кислоты превращаются в кофермент А-эфиры в обратимой реакции, катализируемой ацил-CoA-синтетазой:



а) Установлено, что связанное с ферментом промежуточное соединение этой реакции представляет собой смешанный ангидрид жирной кислоты и аденозинмонофосфата (AMP), ацил-AMP:



Напишите два уравнения, которые соответствуют двум стадиям реакции, катализируемой ацил-CoA-синтетазой.

б) Реакция ацил-CoA-синтетазы легко обратима, ее константа равновесия близка к 1. Как можно заставить реакцию идти в сторону образования ацил-CoA-производного жирной кислоты?

6. Промежуточные продукты окисления олеиновой кислоты. Каково строение частично окисленной ацильной группы, образующейся после трех циклов окисления олеиновой кислоты, 18:1(Δ^9)? Каковы две следующие стадии окисления этого вещества?

7. β-Окисление жирной кислоты с нечетным числом атомов углерода. Каковы прямые продукты β-окисления полностью насыщенной неразветвленной жирной кислоты, состоящей из 11 атомов углерода?

8. Окисление пальмитата, меченного тритием. Пальмитат, равномерно меченный тритием (^3H) до активности $2{,}48 \cdot 10^8$ имп./мин на микромоль пальмитата, добавлен в препарат митохондрий, где он окисляется до ацетил-CoA. Ацетил-CoA выделяют и гидролизуют до ацетата. Специфическая активность изолированного ацетата составляет $1{,}00 \cdot 10^7$ имп./(мин · моль). Связан ли этот результат с β-окислением? Объясните. Какая конечная судьба удаленного трития?

9. Компартментация в β-окислении. Прежде чем окислиться в митохондриях, свободный пальмитат в цитозоле активируется до производного с коферментом А (пальмитоил-CoA). Если пальмитат и [^{14}C]кофермент А добавить в гомогенат печени, пальмитоил-CoA, выделенный из цитозольной фракции, будет радиоактивным, чего не

случается с пальмитоил-CoA из митохондриальной фракции. Объясните результат.

10. Сравнительная биохимия: энергообразующие пути у птиц. Одним из указаний на относительное значение различных АТР-образующих путей является V_{max} ферментативных путей. Для некоторых ферментов грудных мышц (мышц грудной клетки, которые используются в полете) голубя и фазана ниже приведены значения V_{max}.

	V_{max} (мкмоль субстрата/мин на г ткани)	
Фермент	**Голубь**	**Фазан**
Гексокиназа	3,0	2,3
Гликогенфосфорилаза	18,0	120,0
Фосфофруктокиназа-1	24,0	143,0
Цитратсинтаза	100,0	15,0
Триацилглицеринлипаза	0,07	0,01

а) Сравните роль метаболизма гликогена и жиров при образовании АТР в грудных мышцах этих птиц.

б) Сравните потребление кислорода у двух птиц.

в) На основании данных таблицы сделайте вывод, какая из птиц летит на бóльшие расстояния? Обоснуйте свой ответ.

г) Почему для сравнения были выбраны эти специфические ферменты? Активности триозофосфатизомеразы и малатдегидрогеназы одинаково хороши для сравнения? Объясните.

11. Мутация карнитин-ацилтрансферазы. Какие изменения метаболизма повлечет за собой мутация мышечной карнитин-ацилтрансферазы I, при которой мутантный белок теряет сродство к малонил-CoA, но сохраняет свою каталитическую активность?

12. Эффект дефицита карнитина. У пациента развилось состояние, характеризуемое прогрессирующей слабостью мышц и болезненными мышечными спазмами. Голодание, упражнения и жирная пища усиливали симптомы. Гомогенат пробы из скелетной мышцы пациента окислял добавленный в него олеат медленнее, чем контрольные гомогенаты, состоящие из образцов мышц здоровых людей. При добавлении карнитина в мышечный гомогенат пациента скорость окисления карнитина равна скорости в контрольном гомогенате. Пациенту был поставлен диагноз «дефицит карнитина».

а) Почему добавление карнитина увеличивает скорость окисления олеата в мышечном гомогенате пациента?

б) Почему голодание, упражнения и жирная пища обостряли симптомы пациента?

в) Предположите две возможные причины дефицита карнитина в мышцах такого человека.

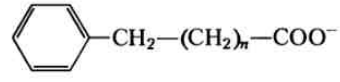
13. Жирные кислоты в качестве источника воды. Вопреки бытующим представлениям, верблюды не хранят воду в своих горбах, на самом деле в горбах находятся большие запасы жира. Каким образом этот жир может служить источником воды? Вычислите количество воды (в литрах), которое может образоваться в организме верблюда из 1,0 кг жира. Примите для простоты, что жир целиком состоит из трипальмитоилглицерина.

14. Нефть как источник пищи для микробов. Некоторые микроорганизмы родов *Nocardia* и *Pseudomonas* способны расти в среде, где углеводороды служат единственным источником пищи. Эти бактерии окисляют алифатические углеводороды нормального строения, например октан, в соответствующие карбоновые кислоты:

$$CH_3(CH_2)_6CH_3 + NAD^+ + O_2 \rightleftharpoons$$
$$\rightleftharpoons CH_3(CH_2)_6COOH + NADH + H^+$$

Как эти бактерии можно использовать для очистки разливов нефти? Какие факторы способны ограничить эффективность этого процесса?

15. Метаболизм жирной кислоты с неразветвленной цепью, соединенной с фенилом. Из мочи кролика, которого кормили жирной кислотой с неразветвленной цепью с фенильной группой на конце, был выделен кристаллический метаболит.



Проба метаболита 302 мг в водном растворе была полностью нейтрализована при добавлении 22,2 мл 0,100 М NaOH.

а) Каковы возможные масса и структура метаболита?

б) Четное или нечетное число метиленовых групп $(-CH_2-)_n$ (n — четное или нечетное) содержит жирная кислота с неразветвленной цепью? Объясните.

16. Окисление жирных кислот и неконтролируемый диабет. Если количество ацетил-CoA, образованного в процессе β-окисления в печени, превышает емкость цикла трикарбоновых кислот, из его избытка образуются кетоновые тела — ацетон, ацетоацетат и D-β-гидроксибутират. Это происходит при голодании и неконтролируемом диабете: поскольку ткани не могут воспользоваться глюкозой, вместо этого окисляются в больших количествах жирные кислоты. Хотя ацетил-CoA и не токсичен, митохондрии должны превращать ацетил-CoA в кетоновые тела. Какая проблема возникла бы, если ацетил-CoA не мог бы превращаться в кетоновые тела? Каким образом превращение в кетоновые тела решает проблему?

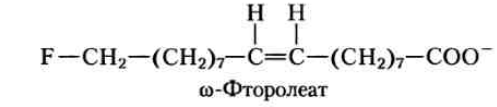
17. Последствия диеты с высоким содержанием жиров и отсутствием углеводов. Допустим, вы вынуждены есть пищу, состоящую из тюленьего и китового жира, с низким содержанием или вообще отсутствием углеводов.

а) Как нехватка углеводов должна сказаться на утилизации жиров для получения энергии?

б) Если в вашем рационе питания вообще отсутствовали бы углеводы, было лучше потреблять жирные кислоты с четным или нечетным числом атомов углерода? Объясните.

18. Пищевая роль жирных кислот с четным и нечетным числом атомов углерода. В лабораторном эксперименте две группы крыс на протяжении месяца получали в качестве единственного источника углерода два разных типа жирных кислот. Первая группа животных получала энантовую (гептановую) кислоту (7:0), а вторая группа — каприловую (октановую) кислоту (8:0). В конце эксперимента обнаружилось удивительное различие в состоянии животных двух групп: животные первой группы были здоровы и прибавили в весе, тогда как животные второй группы были слабыми и похудевшими из-за потери мышечной массы. Какова биохимическая причина подобного различия?

19. Метаболические последствия поглощения ω-фторолеата. Кустарник *Dichapetalum toxicarium*, растущий в Сьерра-Леоне, образует ω-фторолеат, который очень токсичен для теплокровных животных.



ω-Фторолеат

Это вещество использовалось в качестве яда для стрел, а измельченные плоды этого растения иногда используют в качестве яда для крыс. Почему это вещество такое токсичное? (*Подсказка.* См. гл. 16, задачу 22.)

20. Мутантная ацетил-CoA-карбоксилаза. Как изменится метаболизм жиров при мутации ацетил-CoA-карбоксилазы, в результате которой остаток Ser, в норме фосфорилируемый AMPK, заменен остатком Ala? Что произойдет, если тот же остаток Ser заменить остатком Asp? (*Подсказка.* См. рис. 17-12.)

21. Влияние ингибитора ФДЭ на адипоциты. Как изменится реакция адипоцитов на адреналин в присутствии ингибитора cAMP-фосфодиэстеразы (ФДЭ)? (*Подсказка.* См. рис. 12-4.)

22. FAD в качестве акцептора электронов. Ацил-CoA-дегидрогеназа в качестве простетической группы для дегидрирования α- и β-углеродов ацил-CoA-производных жирных кислот использует ферментативно связанный FAD. В чем состоит преимущество использования в качестве акцептора электронов FAD, а не NAD^+? Объясните на основе стандартных восстановительных потенциалов полуреакций Enz-FAD/$FADH_2$ (E'° = −0,219 В) и NAD^+/NADH (E'° = −0,320 В).

23. β-Окисление арахидоновой кислоты. Сколько раз надо пройти через цикл окисления жирных кислот для полного окисления арахидоновой кислоты (см. табл. 10-1) до ацетил-CoA?

24. Путь меченого пропионата. Если [3-^{14}C]пропионат (^{14}C в метильной группе) добавить в гомогенат печени, быстро образуется ^{14}C-меченый оксалоацетат. Нарисуйте схему пути, по которому пропионат превращается в оксалоацетат, а также укажите место локализации изотопа ^{14}C в оксалоацетате.

25. Метаболизм фитановой кислоты. Если кормить мышей фитановой кислотой, равномерно меченной изотопом ^{14}C, через несколько минут радиоактивная метка обнаруживается в малате — промежуточном продукте цикла лимонной кислоты. Изобразите схему данного метаболического пути. Какие атомы углерода в малате будут содержать метку ^{14}C?

26. Источники воды, образующейся при β-окислении. Полное окисление пальмитоил-CoA до углекислого газа и воды описывается общим уравнением

$$\text{Пальмитоил-CoA} + 23\ O_2 + 10\ P_i + 108\ ADP \longrightarrow \longrightarrow CoA + 16\ CO_2 + 108\ ATP + 23\ H_2O$$

Вода также образуется в реакции

$$ADP + P_i \longrightarrow ATP + H_2O$$

однако не входит в качестве продукта в общее уравнение. Почему?

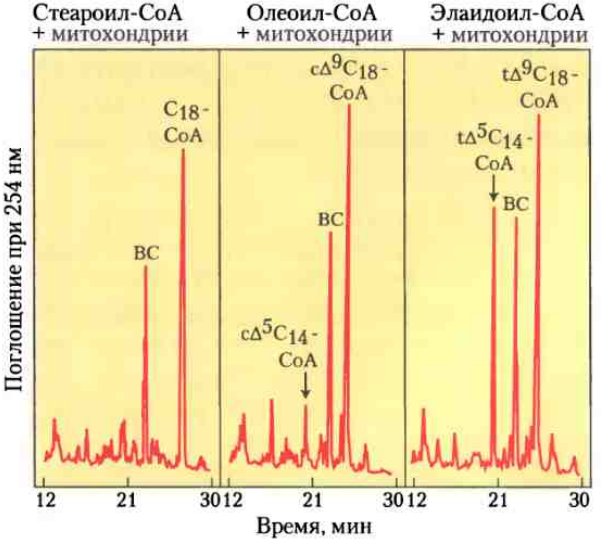
27. Биологическое значение кобальта. В рубце крупного рогатого скота, оленей, овец и других жвачных животных путем бактериальной ферментации поглощенной растительной массы в огромных количествах образуется пропионат. Для этих животных пропионат является основным источником глюкозы, которая образуется по схеме пропионат → оксалоацетат → глюкоза. В некоторых областях Земного шара, особенно в Австралии, у жвачных животных иногда наблюдаются симптомы анемии с сопутствующей потерей аппетита и замедленным ростом, которые возникают из-за неспособности превращать пропионат в оксалоацетат. Такое состояние обусловлено дефицитом кобальта, вызванным очень низким его содержанием в почве, а, следовательно, и в растительном веществе. Объясните.

28. Потеря жира во время зимней спячки. В периоды зимней спячки, которая может длиться семь месяцев, медведи расходуют примерно $25 \cdot 10^6$ Дж/сут. Энергию, необходимую для поддержания жизни, дает окисление жирных кислот. Какой окажется потеря массы тела животного (в килограммах) через семь месяцев? Каким образом можно минимизировать кетоз во время спячки? (Примите, что окисление жиров дает 38 кДж/г.)

Анализ экспериментальных данных

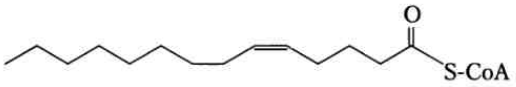
29. β-Окисление *транс*-жирных кислот. Ненасыщенные жиры с *транс*-двойными связями часто кратко называют просто «трансжирами». О влиянии трансжиров из пищи на здоровье человека велись долгие дискуссии. В своей работе, посвященной влиянию метаболизма трансжиров на состояние здоровья, Йу с коллегами (2004) показали, что модельные *транс*- и *цис*-жирные кислоты претерпевают в организме неодинаковые превращения. Исследователи использовали три родственные 18-членные жирные кислоты, чтобы показать различие в реакциях β-окисления *цис*- и *транс*-изомеров жирных кислот одинакового размера.

Исследователи инкубировали CoA-производные каждой кислоты с митохондриями из печени крыс в течение 5 мин, а затем методом ВЭЖХ разделяли оставшиеся производные CoA из каждой смеси. Результаты экспериментов для всех трех случаев представлены ниже.

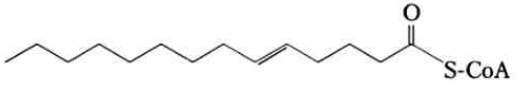


После проведения реакции к смеси добавляли внутренний стандарт (ВС) — пентадеканоил-CoA. Другие сокращения: C_{18}-CoA — стеарил-CoA; *цис*-Δ^5C_{14}-CoA — *цис*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA; *цис*-$\Delta^9C\Delta_{18}$-CoA — олеил-CoA; *транс*-Δ^5C_{14}-CoA — *транс*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA; и элаидоил-CoA, *транс*-Δ^9C_{18}-CoA.

а) Почему Йу с коллегами для своих экспериментов пришлось использовать CoA-производные жирных кислот, а не свободные жирные кислоты?



цис-Δ^5-Тетрадеценоил-CoA



транс-Δ^5-Тетрадеценоил-CoA

б) Почему в реакции со стеарил-CoA не обнаружено низкомолекулярных производных CoA?

в) Сколько циклов β-окисления необходимо для превращения олеил-CoA и элаидоил-CoA в *цис*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA и *транс*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA соответственно?

Существуют две формы фермента ацил-CoA-дегидрогеназы (см. рис. 17-8, *а*): ацил-CoA-дегидрогеназа жирных кислот с длинной цепью (LCAD) и ацил-CoA-дегидрогеназа сверхдлинных кислот (VLCAD). Йу с соавторами определяли кинетические параметры для обоих ферментов. Они использовали CoA-производные трех жирных кислот: тетрадеценоил-CoA (C_{14}-CoA), *цис*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA (*цис*-Δ^5C_{14}-CoA) и *транс*-Δ^5-тетрадеценоил-CoA (*транс*-Δ^5C_{14}-CoA). Результаты экспериментов представлены ниже. (Определения кинетических параметров см. в гл. 6.)

	LCAD			VLCAD		
	C_{14}-CoA	*цис*-Δ^5C_{14}-CoA	*транс*-Δ^5C_{14}-CoA	C_{14}-CoA	*цис*-Δ^5C_{14}-CoA	*транс*-Δ^5C_{14}-CoA
V_{max}	3,3	3,0	2,9	1,4	0,32	0,88
K_M	0,41	0,40	1,6	0,57	0,44	0,97
k_{cat}	9,9	8,9	8,5	2,0	0,42	1,12
k_{cat}/K_M	24	22	5	4	1	1

г) Для LCAD величины K_M сильно различаются в случае *цис*- и *транс*-субстратов. Как можно объяснить это наблюдение, учитывая строение молекулы каждого субстрата. (*Подсказка*. Можно обратиться к рис. 10-2.)

д) Кинетические параметры действия двух ферментов описывают превращения соответствующих жирных кислот только в том случае, если катализируемые LCAD и MCAD (или обоими ферментами) реакции являются скоростьлимитирующими стадиями процесса. Так ли это в данном случае и почему?

е) Как различие в кинетических параметрах объясняет различие в содержании производных CoA, обнаруженных после инкубации митохондрий печени крыс со стеарил-CoA, олеил-CoA и элаидоил-CoA (см. рис.)?

Йу с сотр. определяли субстратную специфичность митохондриальной тиоэстеразы из печени крыс, которая катализирует гидролиз ацил-CoA до CoA и свободной жирной кислоты (см. гл. 21). Этот фермент оказался примерно вдвое более активным к тиоэфирам C_{14}-CoA по сравнению с тиоэфирами C_{18}-CoA.

ж) Другие исследователи предположили, что свободные жирные кислоты способны проникать через мембраны. Йу с сотр. обнаружили *транс*-Δ^5-тетрадеценовую кислоту вне митохондрий (т. е. в реакционной среде), которые инкубировали с элаидоил-CoA. Опишите путь появления этой внемитохондриальной *транс*-Δ^5-тетрадеценовой кислоты. Укажите, в каких частях клетки происходят соответствующие превращения и какие именно ферменты их катализируют.

з) В популярной литературе часто пишут, что «трансжиры не расщепляются клетками организма, а накапливаются в нем». В каком смысле это утверждение справедливо, а в каком оно является слишком сильным упрощением?

Литература

Yu, W., Liang, X., Ensenauer, R., Vockley, J., Sweetman, L., & Schultz, H. (2004) Leaky β-oxidation of a *trans*-fatty acid. *J. Biol. Chem.* **279**, 52,160–52,167.

Я выбрал исследование синтеза мочевины в печени, потому что это казалось мне относительно простой проблемой.

Ханс Кребс, статья из «Perspectives in Biology and Medicine», *1970*

18

Окислительное расщепление аминокислот и образование мочевины

18.1. Метаболические пути аминогрупп 262

18.2. Выделение азота и цикл мочевины 273

18.3. Пути деградации углеродного скелета аминокислот 279

Теперь рассмотрим аминокислоты — последний класс биомолекул, при окислительном расщеплении которых организмы способны получать значительное количество энергии. Энергетический вклад аминокислот, входящих в состав белков пищи или белков тканей организма, сильно различается в зависимости от типа и условий метаболизма. Хищники могут получать (сразу после поступления пищи) до 90% необходимой энергии путем окисления аминокислот, в то время как травоядные используют только небольшое количество энергии, полученной таким способом. Большинство микроорганизмов могут усваивать из питательной среды даже примеси аминокислот и использовать их в качестве топлива при определенных условиях питания. Растения же лишь очень редко окисляют аминокислоты для получения энергии; их главный источник энергии — углеводы, которые образуются из CO_2 и H_2O при фотосинтеза. Концентрация аминокислот в растительных тканях тонко регулируется для обеспечения нужного соотношения скоростей процессов биосинтеза белков, нуклеиновых кислот и других молекул, необходимых для поддержания роста. Таким образом, катаболизм аминокислот происходит в растениях, но с целью образования метаболитов для других биосинтетических путей.

В животных клетках аминокислоты подвергаются окислительному расщеплению в трех случаях:

1. В процессе обычного синтеза и деградации клеточных белков (круговорот белков, гл. 27, т. 3). Если аминокислоты, высвобождающиеся при распаде белков, не требуются для синтеза новых белков, они подвергаются окислительному расщеплению.

2. При потреблении пищи, богатой белками, количество поступающих аминокислот превосходит потребности организма для белкового синтеза и их излишек поступает в катаболические пути. Аминокислоты не могут запасаться.

3. Во время голодания или при сахарном диабете, когда углеводы либо недоступны, либо не усваиваются в качестве топлива, используются белки клетки.

Во всех этих ситуациях аминокислоты теряют свою аминогруппу с образованием α-кетокислот — «углеродного скелета» аминокислот. α-Кетокислоты окисляются до CO_2 и H_2O или, что часто более важно, с образованием трех- или четырехуглеродных единиц, которые в процессе глюконеогенеза могут превращаться в глюкозу для обеспечения энергией мозга, скелетных мышц и других тканей.

Катаболические пути аминокислот довольно похожи у большинства организмов. В центре внимания в этой главе находятся метаболические пути позвоночных, потому что они наиболее

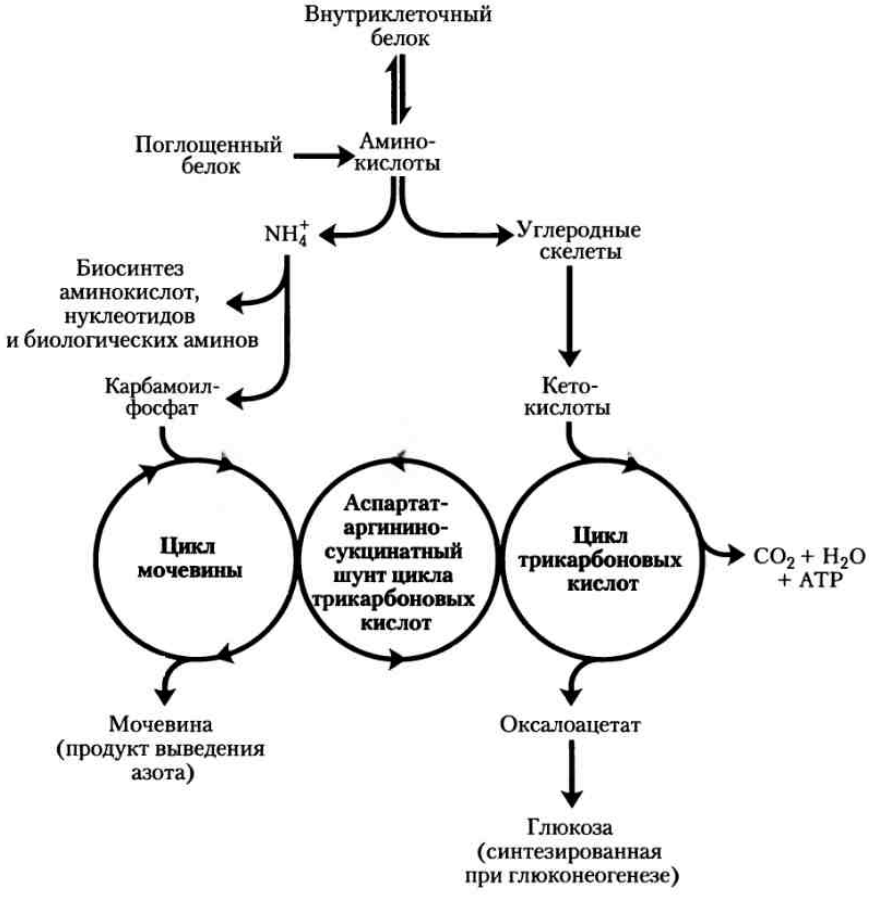


Рис. 18-1. Обзор катаболизма аминокислот у млекопитающих. Аминогруппы и углеродные скелеты метаболизируются в разных, но пересекающихся путях.

изучены. Как и распад углеводов и жирных кислот, процессы деградации аминокислот в конце концов сходятся в центральных катаболических путях, где углеродный скелет большинства аминокислот попадает в цикл трикарбоновых кислот. Некоторые реакции распада аминокислот очень похожи на реакции расщепления жирных кислот (гл. 17).

От других катаболических процессов, описанных до этого момента, распад аминокислот отличает одна важная особенность: каждая аминокислота содержит аминогруппу, и пути распада аминокислот включают поэтому ключевой шаг, в котором α-аминогруппа отделяется от углеродного скелета и попадает в метаболизм аминогрупп (**рис. 18-1**). Сначала мы рассмотрим метаболизм аминогрупп и выведение азота, а затем судьбу углеродного скелета, оставшегося от аминокислоты, и мы увидим, как эти пути пересекаются.

18.1. Метаболические пути аминогрупп

Азот N_2 — самый распространенный в атмосфере газ, но он слишком инертен для того, чтобы участвовать в большинстве биохимических процессов. Так как только немногие микроорганизмы могут превращать N_2 в биологически полезные формы, такие как NH_3 (гл. 22), аминогруппы заботливо сберегаются в биологических системах.

На **рис. 18-2, *а*** изображен обзор катаболических путей аммиака и аминогрупп позвоночных. Источником большей части аминогрупп являются аминокислоты, полученные из белков пищи. Большинство аминокислот метаболизируется в печени. Аммиак, образующийся в этом процессе, перерабатывается и используется в разнообразных путях биосинтеза; избыток аммиака либо просто выводится, либо перед выделением превращается в мочевину или мочевую кислоту, что зависит от

организма (рис. 18-2, *б*). Избыток аммиака, образующегося в других (внепеченочных) тканях, доставляется к печени (в виде аминогрупп, как будет описано ниже) для превращения в форму, которая экскретируется.

Глутамат и глутамин играют особенно важную роль в метаболизме азота, работая в качестве главных «сборщиков» аминогрупп. В цитозоле гепатоцитов аминогруппы большинства аминокислот переносятся на α-кетоглутарат с образованием

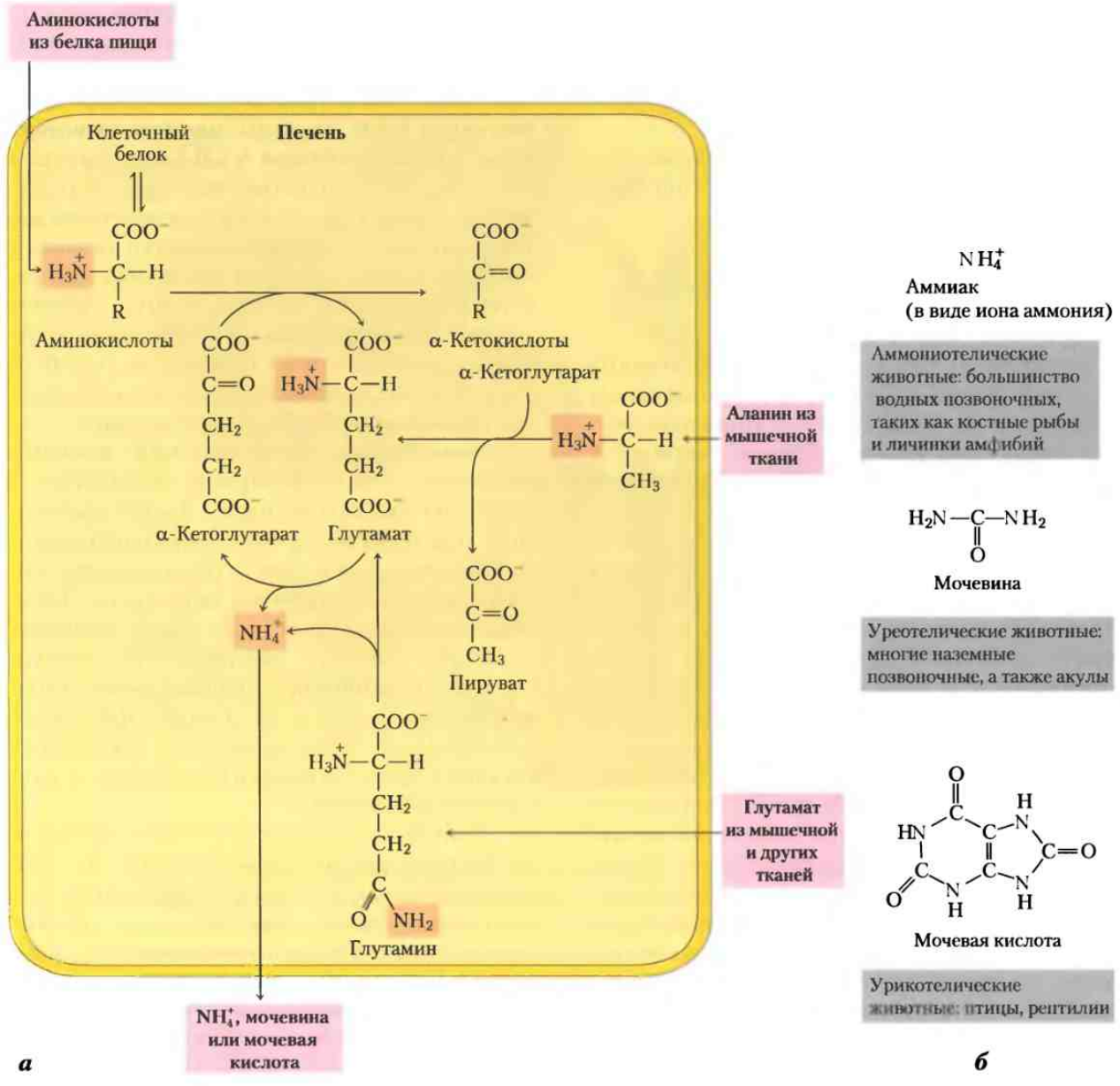


Рис. 18-2. Катаболизм аминогрупп. *а* — обзор катаболизма аминогрупп в печени позвоночных. *б* — экскретируемые формы азота. Избыток NH_4^+ выводится в виде аммония (микробы, костные рыбы), мочевины (большинство наземных позвоночных) или мочевой кислоты (птицы и наземные рептилии). Обратите внимание на то, что углерод в мочевине и мочевой кислоте наиболее окислен; организм выводит углерод только после извлечения максимально возможного количества энергии при его окислении.

глутамата, который попадает в митохондрии. Там от него отщепляются аминогруппы в виде NH_4^+. Избыток аммиака, образованного в большинстве других тканей, превращается в азот амидной группы глутамина, который попадает в печень, а затем в митохондрии печени. Почти во всех тканях концентрация глутамина и/или глутамата выше, чем концентрация других аминокислот.

В скелетных мышцах избыток аминогрупп переносится главным образом на пируват с образованием аланина, который тоже принимает участие в транспорте аминогрупп в печень.

Мы начнем обсуждение с расщепления белков пищи, а затем в общих чертах дадим описание метаболических путей аминогрупп.

Белки пищи подвергаются ферментативному расщеплению до аминокислот

В организме человека расщепление полученных с пищей белков на аминокислоты происходит в желудочно-кишечном тракте. Попадание белков пищи в желудок стимулирует секрецию в слизистой оболочке желудка гормона **гастрина**, который в свою очередь стимулирует секрецию соляной кислоты париетальными клетками и пепсиногена главными клетками желез желудка (**рис. 18-3, *а***). Кислый желудочный сок (pH от 1,0 до 2,5) действует одновременно и как антисептик, убивая большинство бактерий и другие чужеродные клетки, и как денатурирующий агент, разворачивая глобулярные белки, делая их внутренние пептидные связи более доступными ферментативному гидролизу. Неактивный предшественник **пепсиноген** (M_r 40 554), или зимоген (с. 328, т. 1), превращается в активный пепсин (M_r 34 614) путем автокаталитического расщепления (ферментативное действие самого пепсина), которое запускается только при понижении pH. В желудке пепсин гидролизует поглощенные белки по пептидным связям перед остатками ароматических аминокислот Phe, Trp и Tyr (см. табл. 3-7, т. 1), разрывая длинные полипептидные цепочки на смесь более коротких пептидов.

Так как кислое содержимое желудка проходит в тонкий кишечник, низкий pH запускает выделение в кровь гормона **секретина** слизистой оболочкой тонкого кишечника. Секретин стимулирует выделение поджелудочной железой в тонкий кишечник гидрокарбоната для нейтрализации HCl, что приводит к резкому повышению pH примерно до 7. (Все секреты поджелудочной железы попадают в тонкий кишечник через проток поджелудочной железы.) Теперь белки перевариваются с меньшей интенсивностью. Попадание аминокислот в верхнюю часть кишечника (двенадцатиперстную кишку) вызывает высвобождение в кровь гормона **холецистокинина**, который стимулирует секрецию нескольких ферментов поджелудочной железы с оптимум pH ~7–8. **Трипсиноген**, **химотрипсиноген** и **прокарбоксипептидазы А** и **В**, зимогены **трипсина**, **химотрипсина** и **карбоксипептидаз А** и **В** синтезируются и выделяются экзокринными клетками поджелудочной железы (рис. 18-3, *б*). Под действием **энтеропептидазы** — протеолитического фермента, высвобождаемого клетками кишечника, трипсиноген переводится в активную форму — трипсин, который затем катализирует превращение оставшегося трипсиногена в трипсин (см. рис. 6-38, т. 1). Трипсин также активирует химотрипсиноген, прокарбоксипептидазы и проэластазы.

Зачем нужен такой сложный механизм активации пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте? Синтез ферментов в виде неактивных предшественников защищает экзокринные клетки от разрушающего действия их протеолитической активности. Далее, поджелудочная железа не допускает самопереваривания, выделяя специфический ингибитор — белок **ингибитора трипсина поджелудочной железы** (с. 328, т. 1), который эффективно предотвращает преждевременное образование активных протеолитических ферментов в панкреатических клетках.

Трипсин и химотрипсин затем расщепляют пептиды, образованные в желудке под действием пепсина. Эта стадия переваривания белков осуществляется очень эффективно, так как пепсин, трипсин и химотрипсин имеют разную специфичность по аминокислотам (см. табл. 3-7, т. 1). Расщепление коротких пептидов в тонком кишечнике завершается другими пептидазами кишечника, в том числе карбоксипептидазами А и В (цинк-содержащие ферменты), которые последовательно отщепляют аминокислотные остатки с С-конца пептида, и **аминопептидазами**, которые последовательно отщепляют аминокислотные остатки с N-конца пептида. Смесь свободных аминокислот транспортируется в высти-

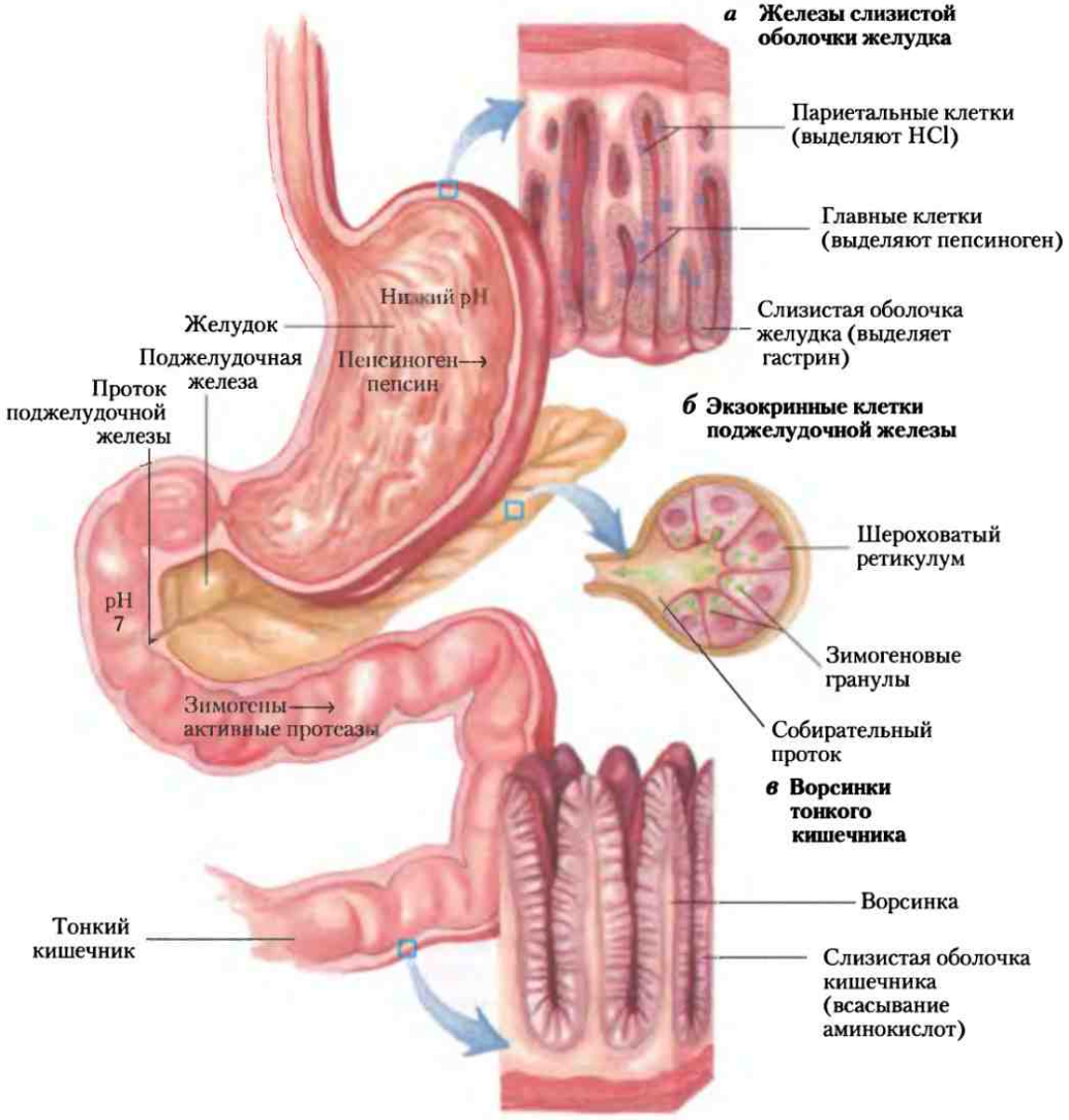


Рис. 18-3. Участок пищеварительного тракта человека. *а* — париетальные клетки и главные клетки желез желудка выделяют продукты в ответ на гормон гастрин. В желудке расщепление белков начинает пепсин. *б* — цитоплазма экзокринных клеток полностью заполнена шероховатым ретикулумом, местом синтеза зимогенов (проферментов) множества пищеварительных ферментов. Зимогены находятся в замкнутых мембранных транспортных везикулах, которые называются зимогеновыми гранулами. При стимуляции экзокринной клетки ее плазматическая мембрана сливается с мембранами зимогеновых гранул, и зимогены в процессе экзоцитоза высвобождаются в просвет собирательных протоков. Собирательные протоки ведут к протоку поджелудочной железы, а оттуда в тонкий кишечник. *в* — аминокислоты абсорбируются эпителиальными клетками (слизистая кишечника) ворсинок и попадают в капилляры. Напомним, что продукты гидролиза липидов в тонком кишечнике после всасывания слизистой оболочкой кишечника попадают в лимфу (см. рис. 17-1).

лающие тонкий кишечник эпителиальные клетки (рис. 18-3, *в*), через которые они попадают в кровеносные капилляры ворсинок и переносятся в печень. У человека глобулярные белки животной пищи практически полностью гидролизуются в желудочно-кишечном тракте до аминокислот, но некоторые фибриллярные белки, такие как кератин, перевариваются только частично. Белковое содержимое клеток некоторых растительных продуктов защищено от расщепления неперевариваемой кожицей из целлюлозы.

При **остром панкреатите** нарушено нормальное пищеварение, а именно нарушено поступление панкреатического секрета в кишечник. Зимогены протеолитических ферментов превращаются в каталитически активные формы преждевременно, *внутри* панкреатических клеток, и атакуют саму поджелудочную железу. Это вызывает мучительную боль и разрушение органа, что может иметь фатальные последствия. ■

Пиридоксальфосфат участвует в переносе α-аминогруппы на α-кетоглутарат

Катаболизм большинства L-аминокислот в печени начинается с удаления α-аминогруппы, осуществляемого ферментами **аминотрансферами** или **трансаминазами**. В этих реакциях **трансаминирования** α-аминогруппа переносится на α-углеродный атом α-кетоглутарата, в итоге получается α-кетокислота, аналог аминокислоты (**рис. 18-4**). Здесь не происходит чистого дезаминирования (потери аминогруппы), потому что α-кетоглутарат приобретает аминогруппу, а α-аминокислота ее теряет. В результате реакций трансаминирования аминогруппы многие разные аминокислоты собираются в форме L-глутамата. Глутамат затем функционирует в качестве донора аминогрупп для путей биосинтеза или для экскреторных путей, которые ведут к удалению азотсодержащих ненужных продуктов.

Клетки содержат различные типы аминотрансфераз. Многие из них специфичны по отношению к α-кетоглутарату как акцептору аминогрупп, но различаются по специфичности к α-аминокислотам. Реакции, катализируемые аминотрансферазами легко обратимы; константа равновесия ~ 1,0 ($\Delta G' \approx 0$ кДж/моль).

Все аминотрансферазы несут одну и ту же простетическую группу и у них одинаковый механизм реакции. Простетическая группа — это **пиридоксальфосфат (PLP** — ***pyridoxal phosphate***) — форма кофермента пиридоксина, или витамина B_6. Мы уже говорили о пиридоксальфосфате в гл. 15, где он выступал в качестве кофермента гликогенфосфорилазы, но роль, которую играет PLP в этой реакции, для него не столь характерна. Его главная функция в клетке — участие в метаболизме молекул, где есть аминогруппы.

Пиридоксальфосфат работает как промежуточный переносчик аминогрупп в активном центре аминотрансфераз. Он обратимо переходит между альдегидной формой — пиридоксальфосфатом, который может присоединять аминогруппы, и аминированной формой — пиридоксаминфосфатом, который может быть донором аминогрупп для α-кетокислоты (**рис. 18-5, *а***). Пиридоксальфосфат обычно ковалентно связан с активным центром фермента, образуя шиффово основание с ε-аминогруппой остатка Lys (рис. 18-5, *б*, *г*).

Пиридоксальфосфат участвует в разнообразных реакциях с α-, β- и γ-углеродами аминокислот (от С-2 до С-4). Наряду с реакциями трансаминирования α-углерод аминокислот (**рис. 18-6**) может участвовать в реакциях рацемизации (взаимопревращение L- и D-аминокислот)

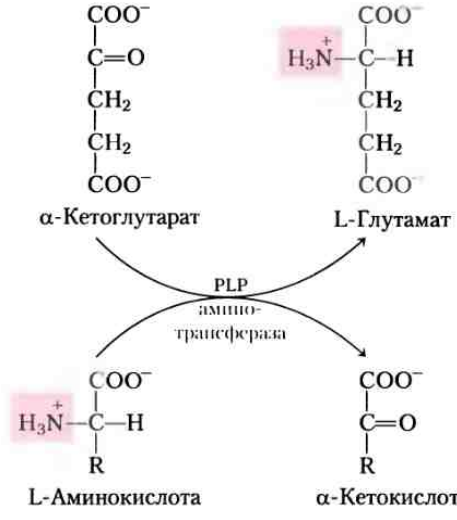


Рис. 18-4. Ферментативное трансаминирование. В большинстве аминотрансферазных реакций акцептором аминогрупп выступает α-кетоглутарат. Все аминотрансферазы в качестве кофактора используют пиридоксальфосфат (PLP). Хотя реакция показана здесь в направлении переноса аминогруппы на α-кетоглутарат, она легко обратима.

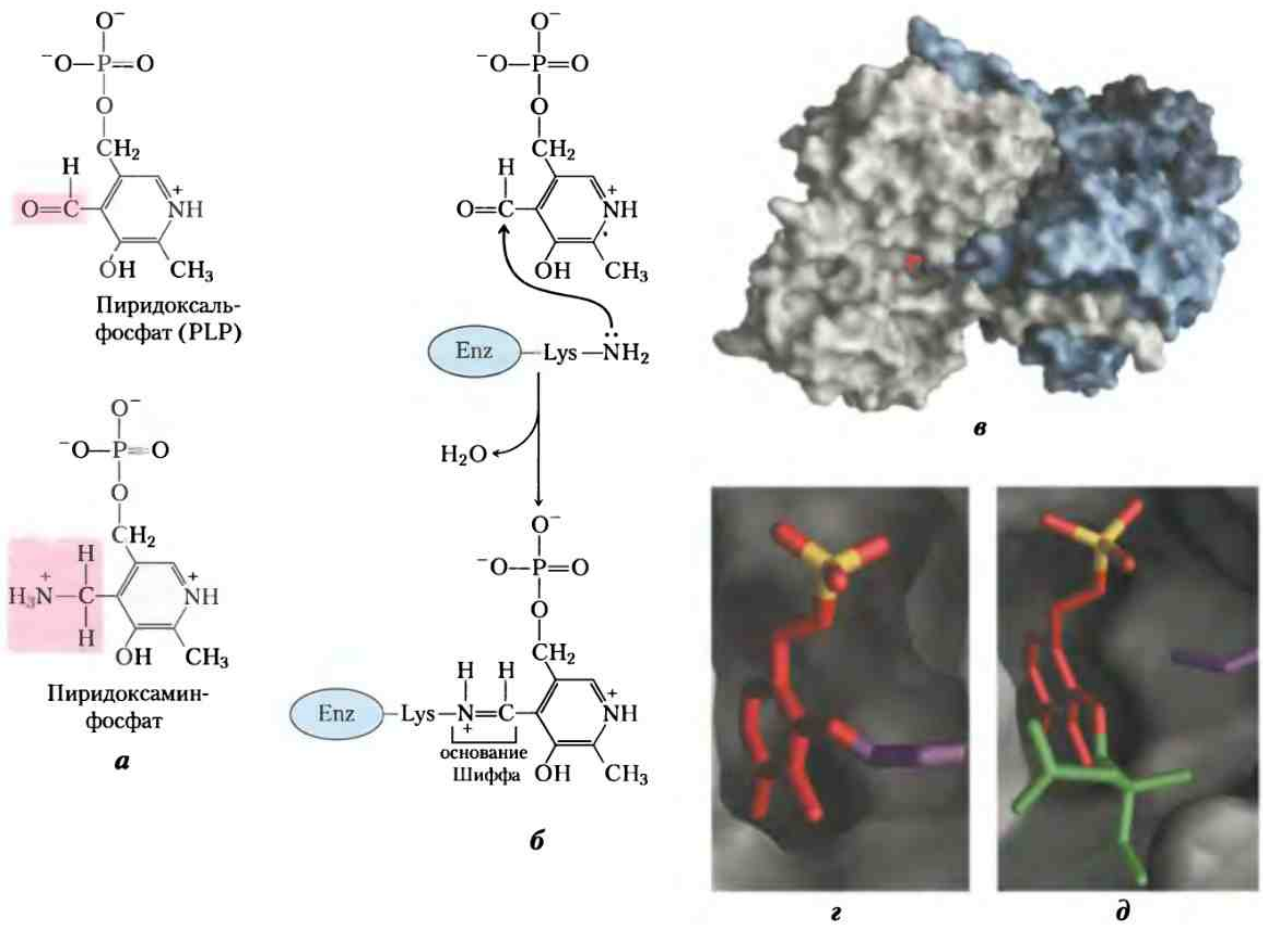


Рис. 18-5. Пиридоксальфосфат — простетическая группа аминотрансфераз. *а* — пиридоксальфосфат (PLP) и его аминопроизводное пиридоксаминфосфат — прочно связанные коферменты аминотрансфераз. Функциональные группы выделены розовым. *б* — пиридоксальфосфат связан с ферментом нековалентными взаимодействиями и образует шиффово основание через остаток Lys в активном центре. Образование основания Шиффа из первичного амина и карбонильной группы детализировано на рис. 14-5. *в* — молекула PLP (красная) связана с одним из двух активных центров димера фермента аспартатаминотрансферазы, типичной аминотрансферазы; *г* — изображение активного центра с PLP (показан красным с желтым фосфатом), образующего альдиминную связь с боковой цепью Lys^{258} (фиолетовый); *д* — активный центр с PLP, который связан с субстратным аналогом 2-метиласпартатом (зеленый) через шиффово основание (PDB 1D 1AJS).

и декарбоксилирования. Пиридоксальфосфат играет одну и ту же роль в каждой из этих химических реакций. Связь α-углерода субстрата либо с протоном, либо с карбоксильной группой разрывается. Из-за оставшейся пары электронов α-углерод становится очень нестабильным карбанионом, но пиридоксальфосфат резонансно стабилизирует этот интермедиат (рис. 18-6, *вставка*). Такая сопряженная структура PLP (акцептора электронов) облегчает делокализацию отрицательного заряда.

Аминотрансферазы (рис. 18-5) — классический пример ферментов, катализирующих бимолекулярные реакции, которые протекают по механизму «пинг-понг» (см. рис. 6-13, *б*). В таких реакциях первый субстрат покидает активный центр перед тем, как с ним свяжется второй субстрат. Таким образом, приходящая аминокислота

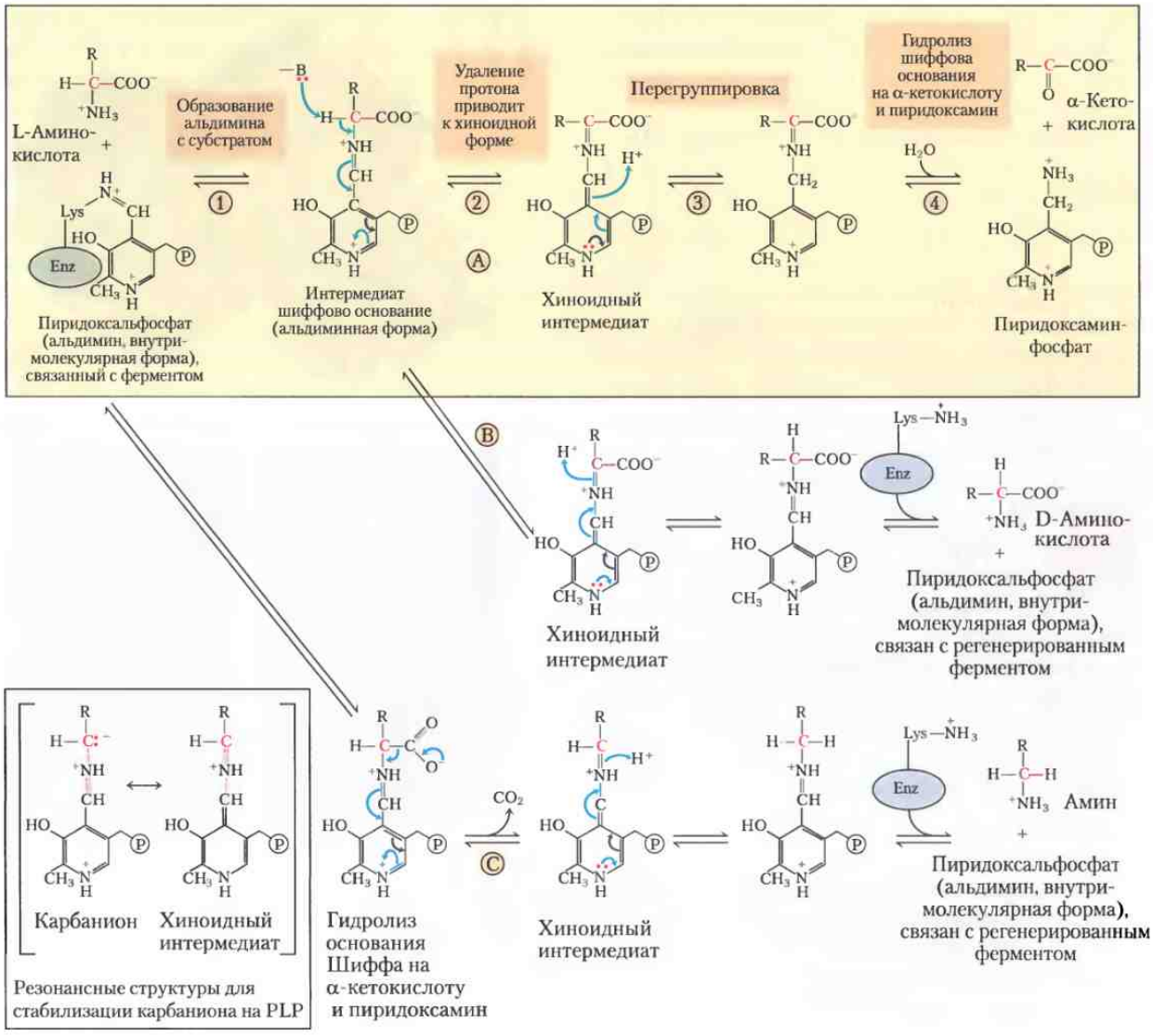


Рис. 18-6. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Некоторые превращения при α-углероде аминокислот, в которых участвует пиридоксальфосфат. Пиридоксальфосфат, как правило, связан с ферментом через шиффово основание, которое еще называют внутримолекулярным альдимином. Эта активированная форма PLP немедленно трансаминируется с образованием нового шиффова основания (обычного альдимина) с α-аминогруппой расщепляемой аминокислоты (см. рис. 18-5, *б*, *г*). Показаны три альтернативные судьбы этого шиффова основания: Ⓐ трансаминирование, Ⓑ рацемизация и Ⓒ декарбоксилирование. Шиффово основание, образованное между PLP и аминокислотой, сопряжено с пиридиновым кольцом, который оттягивает на себя электроны, делокализуя электронную плотность, что предотвращает образование нестабильного карбаниона с зарядом на α-углероде (*вставка*). Хиноидный интермедиат участвует во всех трех реакциях. Реакция трансаминирования (Ⓐ) особенно важна для пути, описанного в этой главе. Этот путь (*слева направо*), выделен на цветной плашке: это только некоторые реакции, катализируемые аминотрансферазами. В полном процессе вторая α-кетокислота замещает аминокислоту, которая отщепляется в обратной реакции (*справа налево*). Пиридоксальфосфат также участвует в реакциях β- и γ-углеродов некоторых аминокислот (не показано). ● **Механизм реакции с пиридоксальфосфатом**

Дополнение 18–1 МЕДИЦИНА Диагностика повреждений различных органов человека

Анализы сыворотки крови на определенные ферментативные активности дают ценную информацию при диагностике ряда заболеваний.

Уровень аланинаминотрансфераза (обычное сокращение – АЛТ или ALT, которую также называют глутамат-пируват–трансаминазой, ГПТ), и уровень аспартатаминотрансфераза (АСТ; которую также называют глутамат-оксалоацетат–трансаминаза, ГОТ) – важные показатели при диагностике повреждений клеток сердца и печени, вызванных инфарктом миокарда, токсичностью лекарств или инфекцией. После инфаркта в кровоток из поврежденных клеток сердца попадают различные ферменты, включая эти аминотрансферазы. Измерения концентраций этих двух аминотрансфераз в сыворотке крови (показатели СГПТ и СГОТ; С – от слова сыворотка), а также фермента **креатинкиназы** (СКК) могут дать информацию о времени, прошедшем после повреждения миокарда. Креатинкиназа опережает другие ферменты, поступающие в кровоток при инфаркте миокарда; но через некоторое время СКК уже не обнаруживается в крови. За СКК в крови появляется ГОТ, а затем ГПТ. Из поврежденных анаэробных клеток сердечной мышцы поступает также лактатдегидрогеназа.

Анализы на СГОТ и СГПТ важны и при медицинских профобследованиях для выявления повреждения печени у людей, работающих с тетрахлоридом углерода, хлороформом или другими растворителями. Отравления этими растворителями сопровождаются «утечкой» различных ферментов из поврежденных гепатоцитов в кровь. У людей, работающих с этими химикатами, контролируют уровень этих аминотрансфераз, а так как в печени эти активности довольно большие, то они обнаруживаются даже при очень малых количествах этих ферментов.

связывается с активным центром, отдает аминогруппу на пиридоксальфосфат и отщепляется в виде α-кетокислоты. Затем связывается следующая α-кетокислота, которая также принимает аминогруппу от пиридоксаминфосфата и вновь отщепляется в виде аминокислоты. Как описано в доп. 18-1, измерение уровня аланин- и аспартатаминотрансфераз в сыворотке крови дает важную информацию для диагностики некоторых заболеваний.

В печени аминогруппа глутамата высвобождается в виде аммиака

Как мы рассмотрели ранее, аминогруппы большинства аминокислот собираются в печени в виде аминогрупп L-глутамата. Для того чтобы вывести аминогруппы из организма, они должны быть удалены с глутамата. В гепатоцитах глутамат транспортируется из цитозоля в митохондрии, где он подвергается **окислительному дезаминированию**, катализируемому **L-глутаматдегидрогеназой** (M_r 330 000). У млекопитающих этот фермент присутствует в матриксе митохондрий. Это единственный фермент, который может использовать в качестве субстратов для образования восстановительных эквивалентов или NAD^+, или $NADP^+$ (**рис. 18-7**).

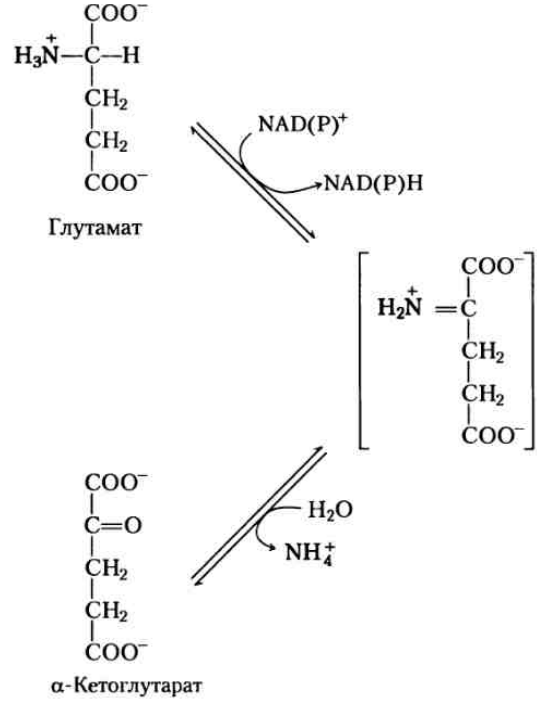


Рис. 18-7. Реакция, катализируемая глутаматдегидрогеназой. Глутаматдегидрогеназа печени млекопитающих обладает необычной способностью использовать в качестве кофактора NAD^+ или $NADP^+$. Глутаматдегидрогеназы растений или микроорганизмов обычно специализируются на каком-то одном кофакторе. Фермент млекопитающих аллостерически регулируется GTP и ATP.

Комбинированное действие аминотрансферазы и глутаматдегидрогеназы названо **трансдезаминированием**. Некоторые аминокислоты минуют реакцию трансаминирования и подвергаются только оксислительному дезаминированию. Судьба NH_4^+, образованного в процессах дезаминирования, подробно обсуждается в разд. 18.2. α-Кетоглутарат, получающийся при дезаминировании глутамата, может быть использован в цикле трикарбоновых кислот или при синтезе глюкозы.

Глутаматдегидрогеназа работает на «перекрестке» путей углеродного и азотного метаболизма. Этот фермент содержит шесть идентичных субъединиц, его активность определяется сложным набором аллостерических модуляторов. Из них наиболее изучены положительный модулятор (активатор) ATP и отрицательный модулятор (ингибитор) GTP. Рациональность такого регулирования метаболизма до конца не ясна. Мутации, изменяющие аллостерический центр связывания GTP или как-либо иначе вызывающие постоянную активацию глутаматдегидрогеназы, приводят к генетической болезни человека — синдрому гиперинсулинизма и гипераммониемии, при которых повышается уровень аммония в крови и развивается гипогликемия.

В кровотоке аммиак транспортируется глутамином

Для тканей животных аммиак довольно токсичен (позже мы обговорим несколько вероятных причин этого), его уровень в крови жестко регулируется. Практически во всех тканях, включая мозг, в результате таких процессов, как распад нуклеотидов, выделяется аммиак. У большинства животных почти весь свободный аммиак превращается в нетоксичное соединение до выведения его из внепеченочных тканей в кровь и дальнейшего транспорта к печени или почкам. Для этой транспортной функции глутамат, который играет ключевую роль во *внутриклеточном* метаболизме аминогрупп, превращается в L-глутамин. Свободный аммиак, выделяемый тканями, соединяется с глутаматом с образованием глутамина под действием **глутаминсинтазы**. Эта реакция происходит в две стадии с затратой энергии ATP (**рис. 18-8**). Сначала глутамат и ATP взаимодействуют с образованием ADP и γ-глутамилфосфатного интермедиата, который затем вступает в реакцию с аммиаком, в результате получаются глутамин и неорганический фосфат. Глутамин — нетоксичная транспортная форма аммиака; в норме он присутствует в крови даже в более высокой концентрации, чем другие аминокислоты. Глутамин также служит источником аминогрупп в разнообразных реакциях биосинтеза. Глутаминсинтаза найдена во всех организмах, и она всегда играет центральную роль в метаболизме. У микроорганизмов этот фермент переводит существенную часть фиксированного азота в биологическую форму. (Роль глутамин- и глутаматсинтаз в метаболизме обсуждается в гл. 22.)

У большинства наземных животных избыток глутамина, который не нужен для биосинтеза, транспортируется кровотоком к кишечнику, печени и почкам для переработки. Там амидный азот высвобождается в виде иона аммония в

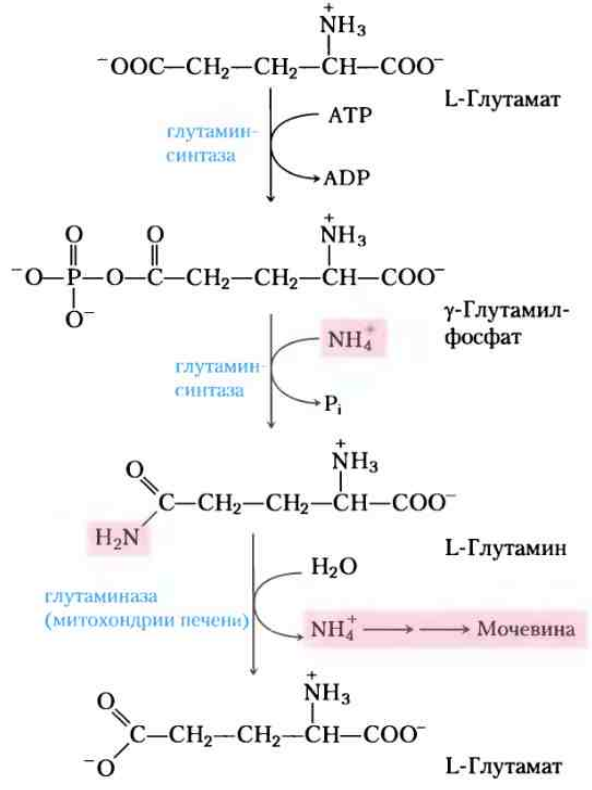


Рис. 18-8. Аммоний транспортируется в форме глутамина. Избыток аммония в тканях присоединяется к глутамату с образованием глутамина в реакции, катализируемой глутаминсинтазой. По кровотоку глутамин попадает в печень, где NH_4^+ высвобождается ферментом глутаминазой.

митохондриях, где фермент **глутаминаза** превращает глутамин в глутамат и NH_4^+ (рис. 18-8). Аммоний из кишечника и почек транспортируется кровотоком в печень. В печени поступивший NH_4^+ участвует в синтезе мочевины. Некоторое количество глутамата, образованного в глутаминазной реакции, в дальнейшем может подвергаться действию глутаматдегидрогеназы в печени с образованием некоторого количества аммония и углеродного скелета для резервных топливных молекул. Однако основные количества глутамата вступают в реакции трансаминирования при биосинтезе аминокислот и в другие реакции (гл. 22).

При метаболическом ацидозе (с. 254) происходит увеличение переработки глутамина в почках. В результате не весь избыток существующего NH_4^+ выделяется в кровь или превращается в мочевину; некоторая часть прямо выделяется в мочу. В почках NH_4^+ образует соли с кислотами, поступающими из метаболических циклов, облегчая их удаление с мочой. В плазме крови роль буфера также могут выполнять гидрокарбонаты, образованные при декарбоксилировании α-кетоглутарата в цикле трикарбоновых кислот. В совокупности эти особенности метаболизма глутамина в почках способны противодействовать ацидозу. ■

Аланин переносит аммиак из скелетных мышц в печень

Аланин также играет важную роль при транспортировке аминогрупп в нетоксичной форме в печень по пути, который называется **глюкозо-аланиновым циклом (рис. 18-9)**. В мышцах и некоторых других тканях, где происходит расщепление аминокислот с целью получения энергии, аминогруппы в результате трансаминирования собираются в форме глутамата (рис. 18-2, *а*). Глутамат может превращаться в глутамин для доставки аминогрупп в печень, как было описано выше, а может при действии **аланинаминотрансферазы** передать свою α-аминогруппу на пируват, легко доступный благодаря происходящему в мышцах гликолизу (рис. 18-9). Образованный таким образом аланин попадает в кровь и переносится в печень. В цитозоле гепатоцитов аминотрансфераза переносит аминогруппу аланина на α-кетоглутарат с образованием пирувата и глутамата. Глутамат может попасть в митохондрии, где

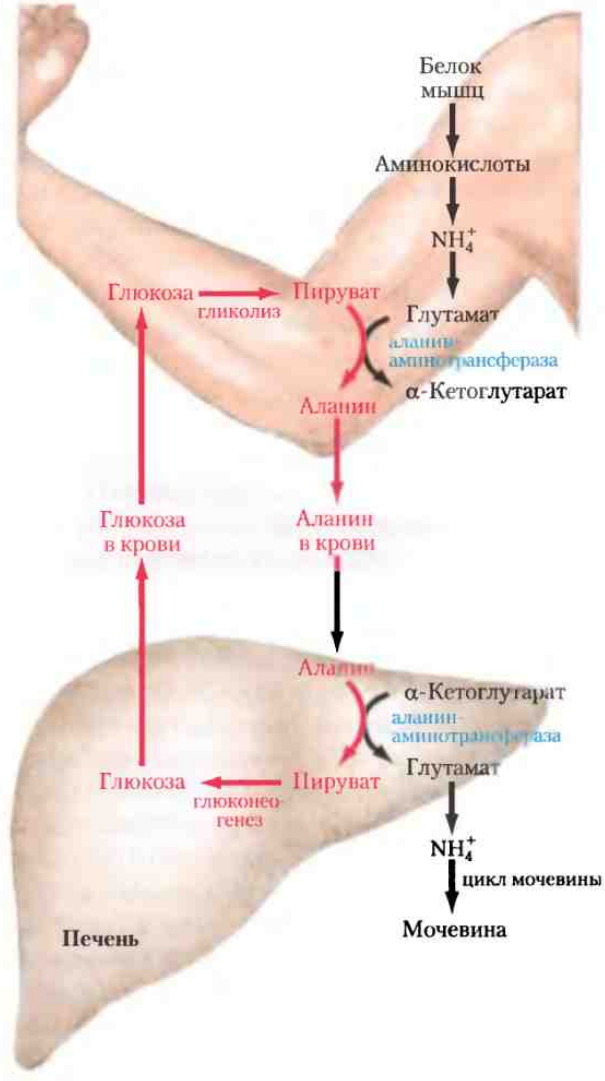


Рис. 18-9. Глюкозо-аланиновый цикл. Аланин служит переносчиком аммония и углеродного скелета пирувата от скелетной мускулатуры к печени. Аммоний выводится, а пируват используется для синтеза глюкозы, которая возвращается в мышечную ткань.

в глутаматдегидрогеназной реакции высвободит NH_4^+ (рис. 18-7), а может участвовать реакции трансаминирования с оксалоацетатом с образованием аспартата — еще одного донора азота при синтезе мочевины, что мы скоро увидим.

Использование аланина для переноса аммония из скелетной мускулатуры к печени — еще один пример экономии, свойственной живым организмам. Энергично сокращающаяся скелетная мышца получает энергию анаэробно, при гликолизе в ней образуются пируват и лактат, а при

расщеплении белков — аммиак. Эти продукты должны попасть в печень, где пируват и лактат превратятся в глюкозу, которая вернется в мышцы, и аммиак превратится в мочевину для выведения. Превращения осуществляются в глюкозо-аланиновом цикле в сочетании с циклом Кори (см. доп. 14-2 и рис. 23-20). Таким образом, энергетические затраты на глюконеогенез в большей степени осуществляются печенью, а не мышцами, и весь доступный мышцам АТР расходуется на их сокращение.

Аммиак токсичен для животных

Образование аммиака в процессах катаболизма представляет собой серьезную биохимическую проблему, потому что аммиак очень токсичен. Молекулярные основы этой токсичности поняты не до конца. У человека конечные стадии интоксикации аммиаком характеризуются развитием коматозного состояния, сопровождаются отеком мозга и увеличением внутричерепного давления, поэтому исследования причины аммиачной токсичности проводятся главным образом на мозговой ткани. По одной из теорий, основной причиной аммиачной токсичности считается сильное истощение клеток мозга по АТР.

Выведение избытка аммиака из цитозоля требует восстановительного аминирования α-кетоглутарата до глутамина под действием глутаматдегидрогеназы (в реакции, обратной описанной ранее, рис. 18-7) или превращения глутамата в глутамин под действием глутаминсинтазы. Оба фермента присутствуют в мозге в высокой концентрации, хотя почти наверняка глутаминсинтазная реакция играет более важную роль при удалении аммиака. Высокий уровень NH_4^+ ведет к увеличению уровня глутамина (осмолит) в растворе, который осмотически активен в астроцитах мозга, звездчатых клетках нервной системы, обеспечивающих питание, поддержку и изоляцию нейронов. Это влечет за собой поглощение воды астроцитами для поддержания осмотического баланса, что приводит к набуханию клеток и отеку мозга, вызывая коматозное состояние.

Недостаток глутамата в глутаминсинтазной реакции может иметь дополнительное влияние на мозг. Глутамат и его производное γ-аминобутират (γ-аминомасляная кислота, ГАМК) — важные нейромедиаторы; чувствительность мозга к аммиаку, как и изменения в осмотическом балансе, может отражать нехватку нейромедиаторов. ■

На этом мы заканчиваем наше изложение о метаболизме аминогрупп. Заметьте, что мы описали несколько процессов, в результате которых избыток аммиака попадает в митохондрии гепатоцитов (рис. 18-2). Далее рассмотрим судьбу этого аммиака.

Краткое содержание раздела 18.1 МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ АМИНОГРУПП

- Человек получает небольшое количество энергии в результате катаболизма аминокислот. Аминокислоты, образующиеся в организме в процессах регулярного расщепления (круговорота) клеточных белков, распада поглощенных белков и деградации белков, используются вместо других источников энергии при голодании или неконтролируемом сахарном диабете.

- Протеазы расщепляют поглощенные белки в желудке и тонком кишечнике. Большинство протеаз изначально синтезируется в виде неактивных зимогенов.

- Первый шаг в катаболизме аминокислот — это отщепление аминогруппы от углеродного скелета. В большинстве случаев аминогруппа переносится на α-кетоглуторат с образование глутамата. Для этой реакции трансаминирования необходим пиридоксальфосфат.

- Глутамат транспортируется в митохондрии печени, где глутаматдегидрогеназа освобождает аминогруппу в виде иона аммония (NH_4^+). Аммиак, образующийся в других тканях, попадает в печень в виде амида глутамина, а при транспорте из скелетных мышц — в виде аминогруппы аланина.

- Пируват, образованный при дезаминировании аланина в печени, превращается в глюкозу, которая транспортируется обратно в мышцы как часть глюкозо-аланинового цикла.

18.2. Выделение азота и цикл мочевины

Если аминогруппы (рис. 18-10) не нужны для синтеза новых аминокислот или других азотсодержащих продуктов, они превращаются в конечный экскретируемый продукт. Большинство водных организмов, таких как костные рыбы, **аммониотелические**, т. е. выводят азот аминогруппы в виде аммиака. Токсичный аммиак просто выводится в окружающую воду. Наземным животным для выведения азота необходимы пути, которые минимизируют токсичность и потерю воды. Наземные животные в основном **уреотелические**, т. е. выделяют азот аминогруппы в виде мочевины; птицы и рептилии **урикотелические**, они выделяют азот аминогруппы в виде мочевой кислоты. (Путь синтеза мочевой кислоты описан на рис. 22-45.) Растения используют фактически все аминогруппы и выделяют азот только в очень редких случаях.

У уреотелических организмов аммиак, попавший в митохондрии гепатоцитов, превращается в мочевину в **цикле мочевины**. Этот путь был открыт в 1932 г. Хансом Кребсом (именно он позже открыл и цикл трикарбоновых кислот) и его коллегой студентом-медиком Куртом Хенселейтом. Образование мочевины происходит главным образом только в печени, и большая часть аммиака в конце концов собирается здесь. Мочевина попадает в кровоток, затем в почки и выводится с мочой. Процесс образования мочевины мы и рассмотрим в этом разделе.

Мочевина образуется из аммиака в пяти ферментативных реакциях

Цикл мочевины начинается в митохондриях печени, но три последующих шага происходят в цитозоле; цикл, таким образом, охватывает два клеточных компартмента (рис. 18-10). Первая аминогруппа, которая попадает в цикл мочевины, образуется в митохондриальном матриксе из аммония, поступающего из путей, описанных ранее. Печень также может получать через воротную вену некоторое количество аммония из кишечника, от окисления аминокислот бактериями. Какой бы ни был у него источник, NH_4^+, образующийся в митохондриях печени, моментально образует с CO_2 (в виде HCO_3^-), выделяющимся в процессе митохондриального дыхания, карбамоилфосфат в матриксе (**рис. 18-11**, *а*; см. также рис. 18-10). Эта АТР-зависимая реакция катализируется регуляторным ферментом **карбамоилфосфатсинтазой I** (см. ниже). Митохондриальная форма этого фермента отличается от цитозольной формы (II), которая выполняет особую функцию в биосинтезе пиримидинов (гл. 22).

Карбамоилфосфат, который функционирует в качестве активированного донора карбамоильной группы, теперь включается в цикл мочевины. Этот цикл состоит из четырех ферментативных стадий. Сначала карбамоилфосфат переносит карбамоил-группу на орнитин с образованием цитруллина и высвобождением P_i (рис. 18-10, стадия ①). Роль орнитина похожа на роль оксалоацетата в цикле трикарбоновых кислот и заключается в связывании поступающих молекул при каждом обороте цикла. Реакция катализируется **орнитинтранскарбамоилазой**, образовавшийся цитруллин выходит из митохондрий в цитозоль.

Вторая аминогруппа теперь отщепляется от аспартата (который был образован в митохондриях при трансаминировании и транспортирован в цитозоль); в реакции конденсации между аминогруппой аспартата и уреидогруппой цитруллина образуется аргининосукцинат (стадия ② на рис. 18-10). В этой цитозольной реакции, катализируемой **аргининосукцинатсинтетазой**, расходуется АТР; она проходит с образованием интермедиата цитруллил-АМР (рис. 18-11, *б*). Аргининосукцинат затем расщепляется **аргининосукциназой** (стадия ③ на рис. 18-10) с образованием свободного аргинина и фумарата, последний направляется в митохондрии и пополняет пул интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Это единственный обратимый шаг в цикле мочевины. В последней реакции цикла мочевины (стадия ④) цитозольный фермент **аргиназа** расщепляет аргинин с образованием **мочевины** и орнитина. Орнитин транспортируется в митохондрии для инициации следующего оборота цикла.

Как мы отмечали в гл. 16, ферменты многих метаболических путей туннелируются (с. 187) для того, чтобы продукт одной ферментативной реакции непосредственно направлялся к следующему ферменту метаболического пути. В цикле мочевины митохондриальные и цитозольные ферменты как раз туннелируются подобным образом. Цитруллин, выходящий из митохондрий, не растворяется в общем пуле метаболитов

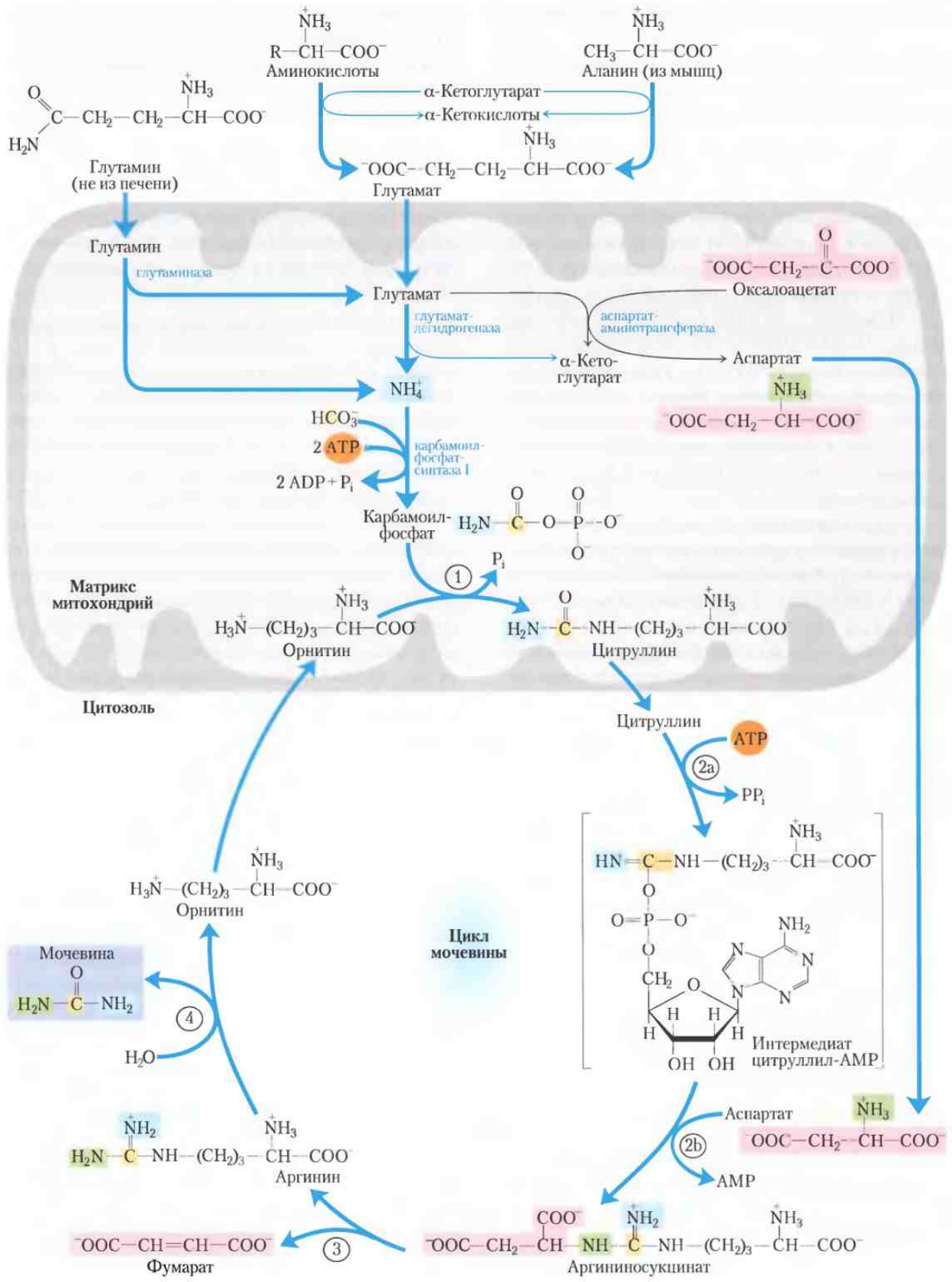

Аминокислоты
Аланин (из мышц)
α-Кетоглутарат
α-Кетокислоты
Глутамат
Глутамин (не из печени)
Глутамин
глутаминаза
Глутамат
Оксалоацетат
глутамат-дегидрогеназа
аспартат-аминотрансфераза
α-Кето-глутарат
Аспартат
NH4+
HCO3−
2 ATP
карбамоил-фосфат-синтаза I
2 ADP + Pi
Карбамоил-фосфат
Pi
Матрикс митохондрий
Орнитин
Цитруллин
Цитозоль
Цитруллин
ATP
2a
PPi
Интермедиат цитруллил-AMP
Цикл мочевины
Орнитин
Мочевина
4
H2O
Аспартат
2b
AMP
Аргинин
Аргининосукцинат
Фумарат
3

Рис. 18-10. Цикл мочевины и реакции, которые предшествуют образованию аминогрупп, попадающих в цикл. Ферменты, катализирующие эти реакции (их названия приведены в тексте), распределены между матриксом митохондрий и цитозолем. Одна аминогруппа попадает в цикл мочевины в виде карбамоилфосфата, образованного в матриксе; другая в виде аспартата, синтезированного в матриксе при трансаминировании оксалоацетата и глутамата, которое катализирует аспартатаминотрансфераза. Цикл мочевины состоит из четырех стадий: ① Образование цитруллина из орнитина и карбамоилфосфата (поступление в цикл первой аминогруппы); цитруллин затем попадает в цитозоль. ② Образование аргининосукцината через интермедиат цитруллил-AMP (поступление в цикл второй аминогруппы). ③ Образование аргинина из аргининосукцината; в этой реакции высвобождается фумарат, который участвует в цикле лимонной кислоты. ④ Образование мочевины; в этой реакции также регенерируется орнитин. Пути, по которым NH_4^+ попадает в матрикс митохондрий гепатоцитов обсуждаются в разд. 18.1.

цитозоля, а попадает строго в активный центр аргининосукцинатсинтетазы. Это туннелирование между ферментами продолжается для аргининосукцината, аргинина и орнитина. Только мочевина высвобождается в общий цитозольный пул метаболитов.

Цикл лимонной кислоты и цикл мочевины могут быть взаимосвязанными

Так как фумарат, образованный в аргининосукциназной реакции, является также интермедиатом в цикле лимонной кислоты, эти циклы связаны между собой в общий процесс, который можно назвать «бициклом Кребса» (**рис. 18-12**). Однако каждый цикл может работать автономно и взаимодействие между ними зависит от транспорта ключевых интермедиатов между митохондриями

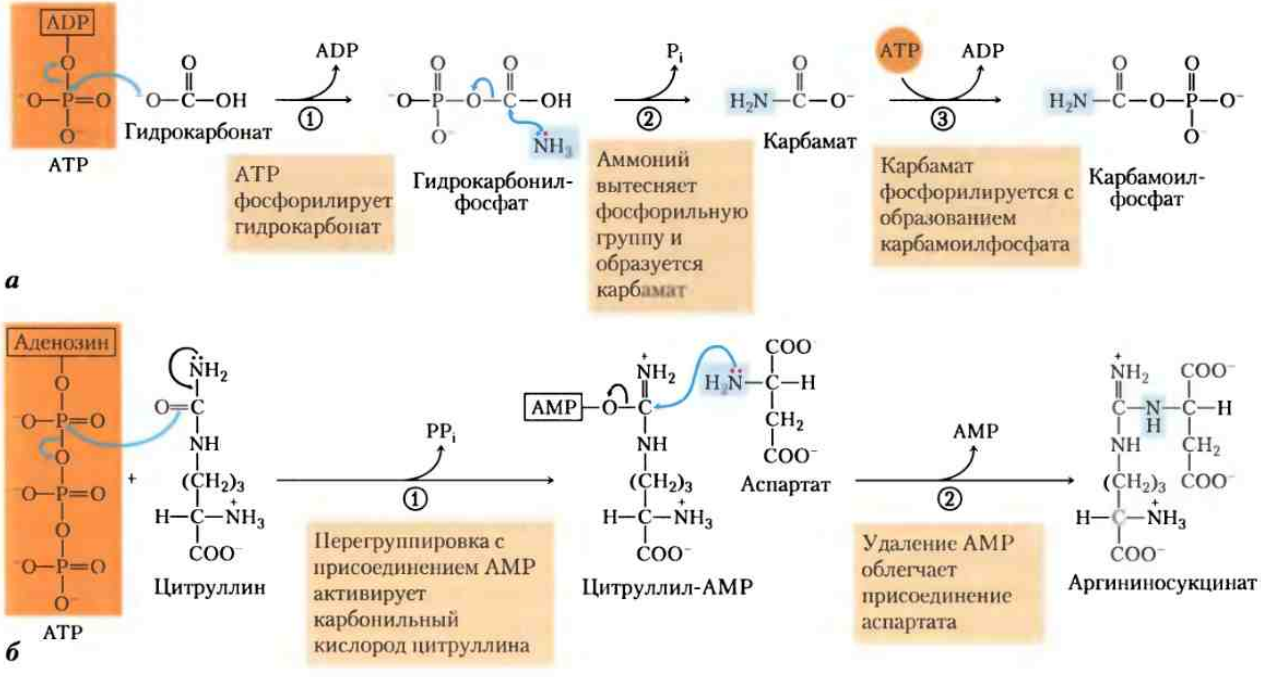


Рис. 18-11. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Реакции поступления азота при синтезе мочевины. Атомы азота мочевины присоединяются в двух реакциях, каждая требует ATP. *а* — в реакции, катализируемой карбамоилфосфатсинтазой I, первый атом азота принадлежит аммонию. Терминальные фосфатные группы двух молекул ATP используются для образования одной молекулы карбамоилфосфата. Другими словами, в этой реакции есть две активационные стадии (① и ③). ● **Механизм работы карбамоилфосфатсинтазы I.** *б* — в реакции, катализируемой аргининосукцинатсинтетазой, второй атом азота поступает от аспартата. Кислород уреидогруппы цитруллина активируется присоединением AMP на стадии ①; это облегчает связывание аспартата на стадии ②. ● **Механизм работы аргининосукцинатсинтетазы**

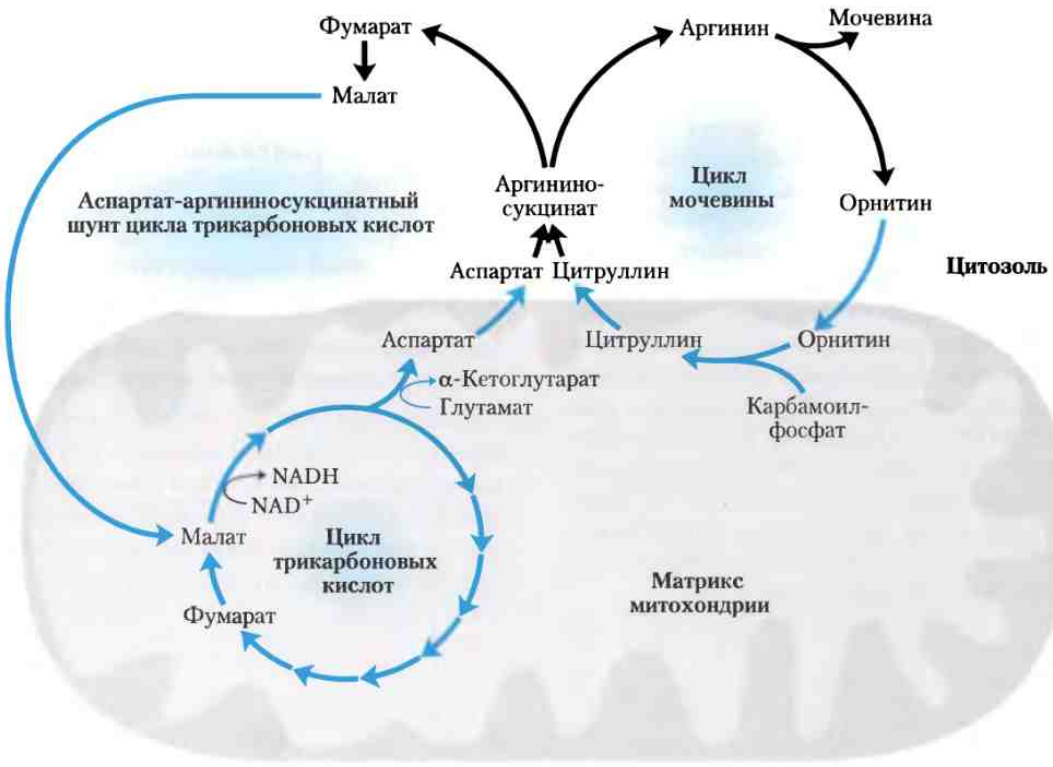


Рис. 18-12. Взаимосвязь между циклом мочевины и циклом лимонной кислоты. Эти пересекающиеся циклы были названы «бициклом Кребса». Путь, связывающий цикл лимонной кислоты и цикл мочевины, называется аспартат-аргининосукцинатным шунтом; он объединяет пути расщепления аминогрупп и углеродных скелетов аминокислот. Связи между циклами даже более тесные, чем показано стрелками. Например, некоторые ферменты цикла лимонной кислоты, такие как фумараза и малатдегидрогеназа, имеют цитозольный и митохондриальный изозимы. Фумарат, образовавшийся в цитозоле — либо в цикле мочевины, либо при синтезе пуринов, либо в любом другом процессе, может быть превращен в малат, который используется в цитозоле или транспортируется в митохондрии (через малат-аспартатный переносчик; см. рис. 19-29) для участия в цикле лимонной кислоты.

и цитозолем. Существуют изозимы нескольких ферментов цикла лимонной кислоты, включая фумаразу (фумаратгидратазу) и малатдегидрогеназу (с. 199), которые присутствуют в цитозоле. Фумарат, образованный при цитозольном синтезе аргинина, может при этом превращаться в малат в цитозоле, и эти интермедиаты в дальнейшем могут метаболизироваться в цитозоле или транспортироваться в митохондрии для использования в цикле лимонной кислоты. Аспартат, образующийся в митохондриях в реакциях трансаминирования между оксалоацетатом и глутаматом, может транспортироваться в цитозоль, где он служит донором азота в реакции цикла мочевины, катализируемой аргининосукцинатсинтетазой. Эти реакции, составляющие **аспартат-аргининосукцинатный шунт**, обеспечивают метаболические связи между этими путями, в которых утилизируются аминогруппы и углеродный скелет аминокислот.

Ферментативные активности в цикле мочевины регулируются на двух уровнях

У животных поток азота через цикл мочевины различается в зависимости от пищи. Когда потребляемая пища богата белками, углеродные скелеты аминокислот используются для получения энергии с образованием большого количества мочевины из остающихся аминогрупп. Образование

мочевины также значительно повышается при длительном голодании, когда для поддержания метаболической энергии организма начинается расщепление мышечных белков.

При изменении потребности в ферментативной активности цикла мочевины скорости синтеза четырех ферментов цикла мочевины и карбамоилфосфатсинтетазы I в печени регулируются медленно. У голодающих животных и у животных с высокобелковой диетой все пять ферментов экспрессируются на более высоком уровне, чем у откормленных животных, которые питаются главным образом углеводами и жирами. У животных, потребляющих бедную белками пищу, синтез ферментов цикла мочевины находится на низком уровне. Изменение в уровне экспрессии соответствующих ферментов обеспечивает медленную регуляцию работы цикла мочевины.

Быстрая аллостерическая регуляция по крайней мере одного ключевого фермента модулирует потоки через цикл мочевины за короткий промежуток времени. Первый фермент этого пути карбамоилфосфатсинтетаза I аллостерически активируется **N-ацетилглутаматом**, который образуется из ацетил-CoA и глутамата под действием **N-ацетилглутаматсинтетазы (рис. 18-13)**. У растений и микроорганизмов этот фермент катализирует первую стадию синтеза *de novo* аргинина из глутамата (см. рис. 22-10), но у млекопитающих N-ацетилглутаматсинтетазная активность имеет чисто регуляторную функцию (у млекопитающих нет других необходимых ферментов для превращения глутамата в аргинин). Уровень N-ацетилглутамата определяется концентрациями глутамата и ацетил-CoA (субстраты для N-ацетилглутаматсинтетазы) и аргинина (активатор N-ацетилглутаматсинтазы и, таким образом, цикла мочевины).

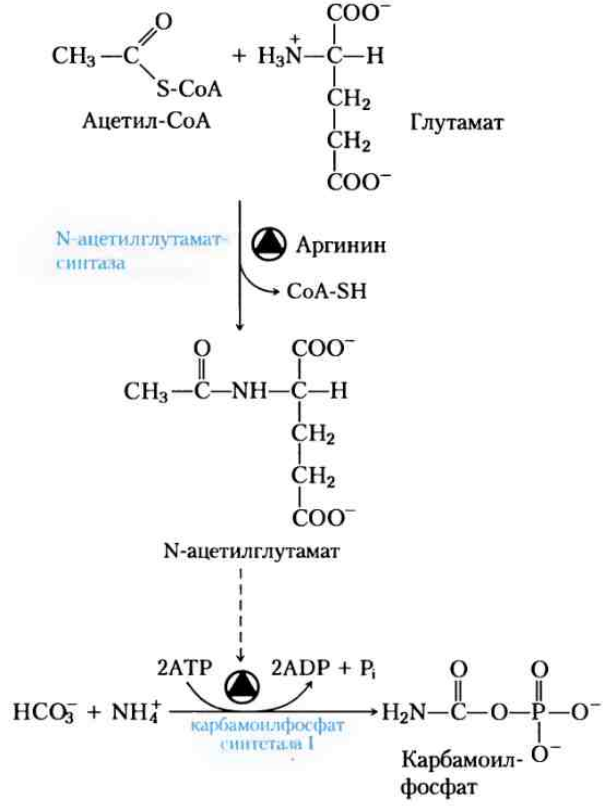


Рис. 18-13. Синтез N-ацетилглутамата и активация им карбамоилфосфатсинтетазы I.

Взаимосвязи путей уменьшают энергетическую цену синтеза мочевины

Если мы рассмотрим изолированный цикл мочевины, мы увидим, что на синтез одной молекулы мочевины тратится четыре высокоэнергетические фосфатные группы (рис. 18-10). Для образования карбамоилфосфата необходимы две молекулы ATP, для аргининосукцината — одна ATP, причем последняя молекула ATP подвергается гидролизу до AMP и PP_i, который диссоциирует с образованием двух P_i. Полное уравнение цикла мочевины выглядит так:

$$2NH_4^+ + HCO_3^- + 3ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow$$
$$\longrightarrow \text{мочевина} + 2ADP^{3-} + 4P_i^{2-} + AMP^{2-} + 2H^+$$

Однако в цикле мочевины также происходит последовательное превращение оксалоацетата до фумарата (через аспартат), а при регенерации оксалоацетата (рис. 18-12) в малатдегидрогеназной реакции образуется NADH. В процессе митохондриального дыхания за счет каждой молекулы NADH может образовываться до 2,5 молекул ATP (гл. 19), что значительно снижает полную энергетическую цену синтеза мочевины.

Генетические дефекты цикла мочевины могут нести угрозу для жизни

Люди с генетическими дефектами в любом ферменте, вовлеченном в образование мочевины, не могут потреблять богатую белками

пищу. Излишек поглощенных аминокислот, превышающий минимальные ежедневные потребности организма для синтеза белков, подвергается дезаминированию в печени с образованием свободного аммиака, который не может превращаться в мочевину и поступает в кровоток, а аммиак, как мы показали, очень токсичен. Отсутствие хотя бы одного фермента цикла мочевины может приводить к гипераммонемии или накоплению одного из интермедиатов цикла мочевины в зависимости от того, какой фермент не функционирует. Зная, что большинство реакций цикла мочевины необратимо, неактивный фермент можно определить по тому, какой интермедиат присутствует в необычно высокой концентрации в крови и/или моче. Хотя для людей с дефектами в цикле мочевины распад аминокислот имеет серьезные последствия, отказ от белковой пищи будет неправильным способом лечения. Люди не способны синтезировать почти половину из 20 протеиногенных аминокислот, и эти **незаменимые аминокислоты** (табл. 18-1) должны поступать с пищей.

При дефектах в цикле мочевины возможны разные способы лечения. Осторожное применение ароматических кислот — бензоата или фенилбутирата — с пищей может уменьшить уровень аммиака в крови. Бензоат превращается в бензоил-CoA, который соединяется с глицином с образованием гиппурата (**рис. 18-14**, *слева*). В этой реакции глицин обязательно восполняется, и аммиак, таким образом, расходуется в глицин-синтетазной реакции. Фенилбутират превраща-

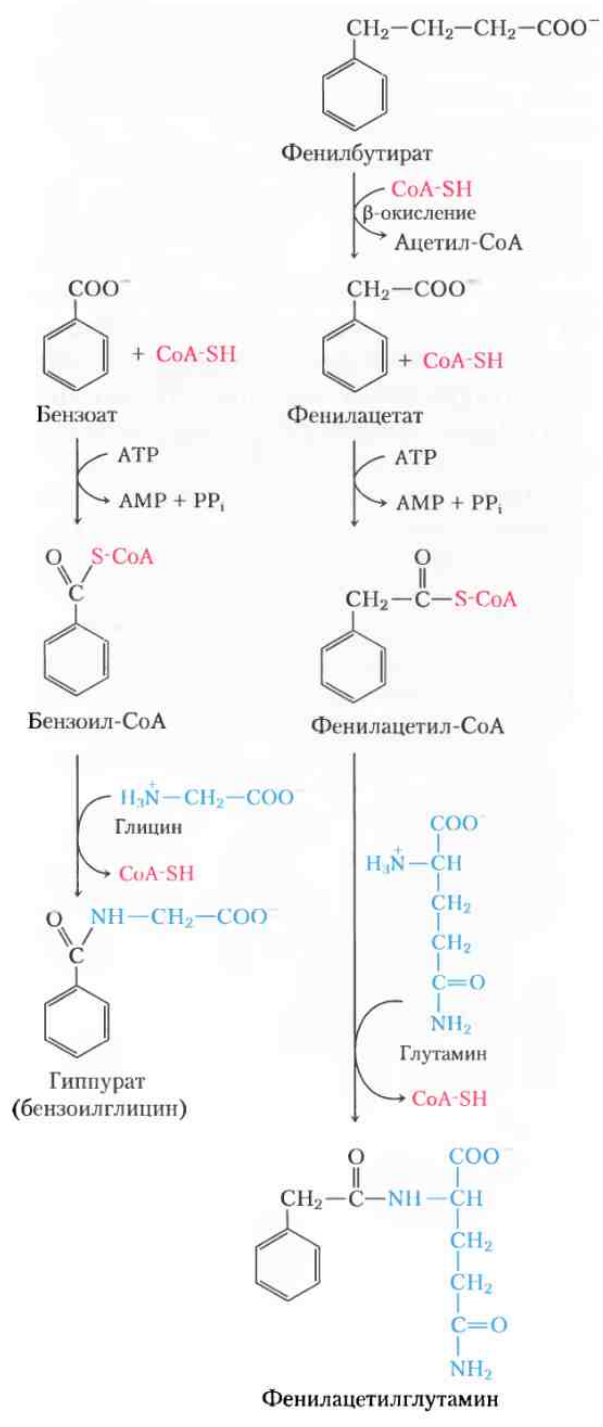


Рис. 18-14. Лечение при дефектах ферментов цикла мочевины. Ароматические кислоты бензоат и фенилбутират употребляются вместе с пищей и соединяются с глицином и глутамином соответственно. Продукты этих реакций выводятся с мочой. Последующий синтез глицина и глутамина с целью пополнить пул этих интермедиатов удаляет аммоний из крови.

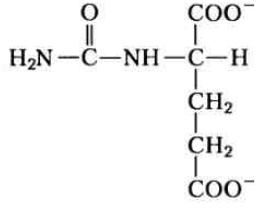
Таблица 18-1 Заменимые и незаменимые аминокислоты для человека и белой крысы

Заменимые	Условно заменимые*	Незаменимые
Аланин	Аргинин	Гистидин
Аспарагин	Цистеин	Изолейцин
Аспартат	Глутамин	Лейцин
Глутамат	Глицин	Лизин
Серин	Пролин	Метионин
	Тирозин	Фенилаланин
		Треонин
		Триптофан
		Валин

* Требуются в небольших количествах в детском возрасте, растущим животным и/или иногда во время болезни.

ется в фенилацетат при β-окислении. Фенилацетат затем превращается в фенилацетил-CoA, который соединяется с глутамином с образованием фенилацетилглутамина (рис. 18-14, *справа*). В итоге удаление глутамина включает его дальнейший синтез глутаминсинтетазой (см. уравнение 22-1) по реакции, в которой расходуется аммиак. И гиппурат, и фенилацетилглутамин — нетоксичные соединения, которые выводятся с мочой. Пути, показанные на рис. 18-14, составляют второстепенную часть нормального метаболизма, но они активируются при поглощении большого количества ароматических кислот.

Другие методы лечения более специфичны к недостаточности конкретного фермента. Дефицит N-ацетилглутаматсинтетазы приводит к недостатку природного активатора карбамоилфосфатсинтетазы I (рис. 18-13). Это состояние можно компенсировать, принимая карбамоилглутамат, аналог N-ацетилглутамата, который эффективно активирует карбамоилфосфатсинтетазу I.



Карбамоилглутамат

Соблюдение диеты с повышенным содержанием аргинина полезно при лечении дефицита орнитинтранскарбамоилазы, аргининсукцинатсинтетазы и аргининосукциназы. Большинство этих методов лечения должно сопровождаться строгим контролем пищевого рациона и незаменимых аминокислот. В редких случаях недостатка аргиназы субстрат этого фермента аргинин должен быть исключен из пищи. ■

Краткое содержание раздела 18.2 ВЫДЕЛЕНИЕ АЗОТА И ЦИКЛ МОЧЕВИНЫ

- Аммиак высокотоксичен для тканей животных. В цикле мочевины орнитин соединяется с аммиаком (в виде карбамоилфосфата) и образует цитруллин. Вторая аминогруппа переносится на цитруллин с аспартата, в итоге образуется аргинин — непосредственный предшественник мочевины. Аргиназа катализирует гидролиз аргинина до мочевины и орнитина; таким образом, орнитин возобновляется в каждом обороте цикла.

- Цикл мочевины осуществляет цепь превращений от оксалоацетата до фумарата: и тот и другой — интермедиаты цикла лимонной кислоты. Таким образом, эти два цикла пересекаются.

- Ферментативные активности в цикле мочевины регулируются на двух уровнях: на уровне синтеза ферментов и на уровне аллостерической регуляции фермента, который катализирует образование карбамоилфосфата.

18.3. Пути деградации углеродного скелета аминокислот

В норме катаболизм всех аминокислот производит всего от 10% до 15% энергии в теле человека; он не такой активный как гликолиз и окисление жирных кислот. Различные потоки этого катаболического пути также сильно варьируют. Они зависят от баланса между требованиями процессов биосинтеза и доступностью определенной аминокислоты. Двадцать путей распада аминокислот сходятся с образованием всего шести главных продуктов, и все они попадают в цикл трикарбоновых кислот (**рис. 18-15**). Отсюда углеродные скелеты поступают в глюконеогенез или кетогенез или полностью окисляются до CO_2 и H_2O.

Весь или часть углеродного скелета семи аминокислот в конечном счете разрушаются до ацетил-CoA. Пять аминокислот превращаются в α-кетоглутарат, четыре — в сукцинил-CoA, две — в фумарат и две — в оксалоацетат. Шесть аминокислот целиком или по частям превращаются в пируват, который преобразуется либо в ацетил-CoA, либо в оксалоацетат. Позднее мы суммируем индивидуальные пути метаболизма 20 аминокислот в виде блок-схем, каждый путь приводит к определенному месту входа в цикл трикарбоновых кислот. На этих диаграммах атомы углерода, которые попадают в цикл трикарбоновых кислот, выделены цветом. Обратите внимание, что некоторые аминокислоты встречаются более одного раза, что отражает разные судьбы участков

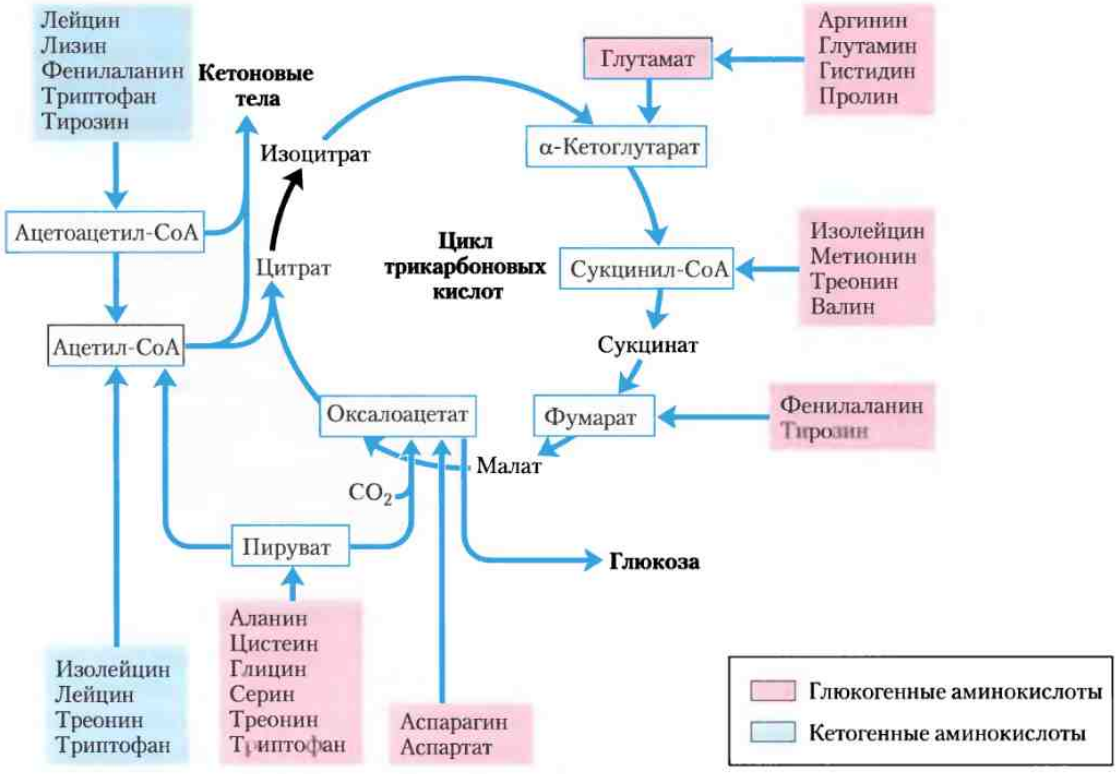


Рис. 18-15. Обзор катаболизма аминокислот. Аминокислоты сгруппированы в соответствии с главным продуктом их деградации. Некоторые аминокислоты встречаются более одного раза, так как участки их углеродных скелетов расщепляются до разных конечных продуктов. Показаны наиболее важные катаболические пути у позвоночных, но и между позвоночными существуют небольшие отличия. Треонин, например, распадается как минимум двумя разными путями (см. рис. 18-19, 18-27), и важность определенного пути для организма может быть различной в зависимости от условий метаболизма. Глюкогенные и кетогенные аминокислоты выделены разными цветами. Обратите внимание на то, что пять аминокислот являются и глюкогенными, и кетогенными. Аминокислоты, разлагающиеся до пирувата, также потенциально кетогенные. Только две аминокислоты, лейцин и лизин, исключительно кетогенные.

углеродного скелета. Вместо того, чтобы рассматривать отдельные стадии каждого пути аминокислотного катаболизма, мы выбрали для подробного обсуждения некоторые ферментативные реакции, которые особенно примечательны либо из-за их механизма, либо из-за их медицинского значения.

Одни аминокислоты превращаются в глюкозу, другие — в кетоновые тела

Семь аминокислот, которые разлагаются целиком или по частям до ацетоацетил-CoA и/или ацетил-CoA, — это фенилаланин, тирозин, изолейцин, лейцин, триптофан, треонин и лизин. Они могут превратиться в кетоновые тела в печени, где ацетоацетил-CoA превращается в ацетоацетат и затем в ацетон и β-гидроксибутират (см. рис. 17-18). Это **кетогенные** аминокислоты (рис. 18-15). Их способность образовывать кетоновые тела часто служит маркером для определения неконтролируемого диабета, при котором в печени образуется огромное количество кетоновых тел и из жирных кислот, и из кетогенных аминокислот.

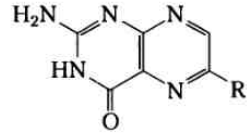
Аминокислоты, которые распадаются с образованием пирувата, α-кетоглутарата, сукцинил-CoA, фумарата и/или оксалоацетата, могут превращаться в глюкозу и гликоген в последовательности реакций, описанных в гл. 14 и 15. Они являются **глюкогенными** аминокислотами. Раз-

деление на кетогенные и глюкогенные аминокислоты не строгое; пять аминокислот триптофан, фенилаланин, тирозин, треонин и изолейцин выполняют и кетогенные, и глюкогенные функции. Катаболизм аминокислот критичен для выживания животных, потребляющих высокобелковую пищу, и для голодающих животных. Лейцин — исключительно кетогенная аминокислота, широко распространенная в белках. В условиях голодания при его деградации усиливается кетоз.

В катаболизме аминокислот важную роль играют несколько коферментов

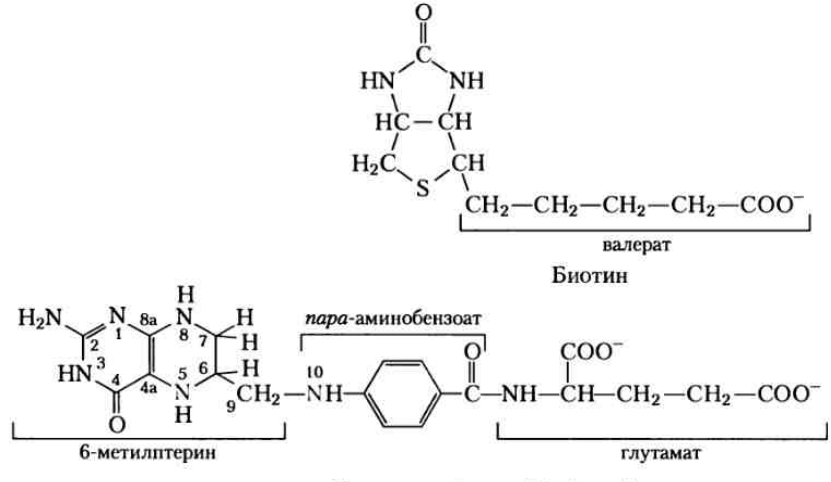
В катаболических путях аминокислот встречается широкое разнообразие реакций группировки. Полезно начать изучение этих путей с разбора однотипных реакций, которые не могут протекать без участия кофакторов. Мы уже рассмотрели один важный класс: для реакций трансаминирования необходим пиридоксальфосфат. Другой общий тип реакций в катаболизме аминокислот — это перенос одноуглеродных фрагментов, где обычно участвует один из трех кофакторов: биотин, тетрагидрофолат или S-аденозилметионин (**рис. 18-16**). Эти кофакторы переносят одноуглеродную группу в различном окисленном состоянии: биотин переносит углерод в его наиболее окисленной форме — как CO_2 (см. рис. 14-18); тетрагидрофолат переносит одноуглеродный фрагмент в промежуточном состоянии окисленности и иногда в виде метильной группы; S-аденозилметионин переносит метильную группу — наиболее восстановленное состояние углерода. Последние два кофактора особенно важны в метаболизме аминокислот и нуклеотидов.

Тетрагидрофолат (H_4-фолат), синтезирующийся бактериями, состоит из замещенного птерина (6-метилптерин), *пара*-аминобензоата и фрагмента глутамата (рис. 18-16).

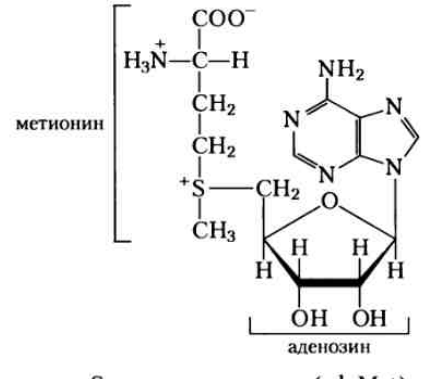


Птерин

Его окисленная форма, фолат, — витамин для млекопитающих; он может быть в две стадии превращен в тетрагидрофолат под действием фермента дигидрофолатредуктазы. Переносимая одноуглеродная группа в любом из трех окисленных состояний связывается с атомами N-5 или N-10, или с обоими этими атомами азота. Наиболее восстановленная форма кофактора переносит метильную группу, более окисленная —



Тетрагидрофолат (H_4-фолат)



S-аденозилметионин (adoMet)

Рис. 18-16. Некоторые кофакторы ферментов, имеющие большое значение в реакциях переноса одноуглеродных фрагментов. Атомы азота тетрагидрофолата, к которым присоединяются одноуглеродные группы, показаны голубым.

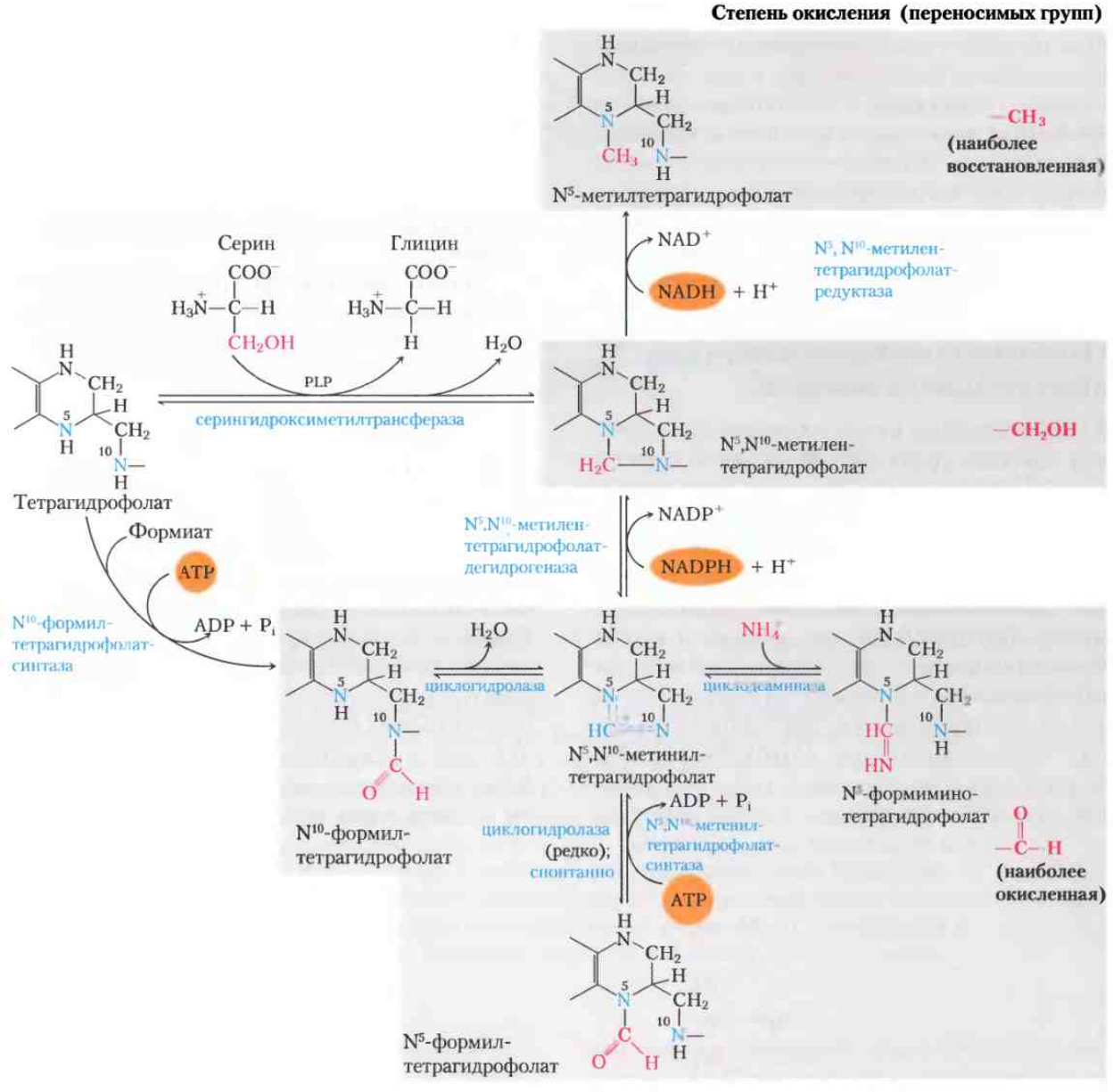


Рис. 18-17. Преобразования одноуглеродного фрагмента на тетрагидрофолате. Разные молекулы сгруппированы в соответствии со степенью окисления, наиболее восстановленная форма изображена вверху, а наиболее окисленная — внизу. Все атомы, расположенные на плашке одного цвета, находятся в одинаковом окисленном состоянии. Превращение N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата в N^5-метилтетрагидрофолат фактически обратимо. При ферментативном переносе формильной группы, как и в пуриновом синтезе (см. рис. 22-33) и образовании формилметионина у бактерий (гл. 27), обычно используется N^{10}-формилтетрагидрофолат вместо N^5-формилтетрагидрофолата. Последний значительно более стабилен и поэтому более слабый донор формиминогруппы. N^5-Формилтетрагидрофолат — минорный побочный продукт циклогидролазной реакции, а также может образовываться спонтанно. Превращение N^5-формилтетрагидрофолата в N^5,N^{10}-метенилтетрагидрофолат требует затраты энергии ATP, потому что иначе равновесие смещено в другую сторону. Обратите внимание на то, что N^5-формиминотетрагидрофолат образуется из гистидина в пути, показанном на рис. 18-26.

метиленовую группу, а самая окисленная — остаток метинильной группы, формила или формимина (рис. 18-17). Большинство форм тетрагидрофолата подвергаются взаимопревращениям и служат донорами одноуглеродной единицы в разнообразных метаболических реакциях. Главный источник одноуглеродных фрагментов для тетрагидрофолата — это углерод, донором которого является серин. В результате образуются глицин и N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат.

Хотя тетрагидрофолат может переносить метильную группу на атоме N-5, для осуществления большинства реакций биосинтеза энергии этой метильной группы недостаточно. В качестве переносчика метильной группы лучше подходит кофактор **S-аденозилметионин (adoMet)**. Он синтезируется из ATP и метионина под действием **метионинаденозилтрансферазы (рис. 18-18**, стадия ①). Эта реакция необычна тем, что нуклеофильный атом серы метионина вместо атомов фосфора атакует 5′-углерод рибозы молекулы ATP. Трифосфат высвобождается и «разрезается» на P_i и PP_i этим же ферментом, а PP_i расщепляется неорганической пирофосфатазой; таким образом, в этой реакции разрушаются три связи, включая две связи высокоэнергетических фосфатных групп. Единственная другая известная реакция, в которой трифосфат отщепляется от ATP, протекает при синтезе кофермента B_{12} (см. доп. 17-2, рис. 3).

S-Аденозилметионин — мощный алкилирующий агент благодаря дестабилизирующим свойствам его сульфониевого иона. Метильная группа S-аденозилметионина служит мишенью для нуклеофильной атаки — она в 1000 раз более реакционноспособна, чем метильная группа N^5-метилтетрагидрофолата.

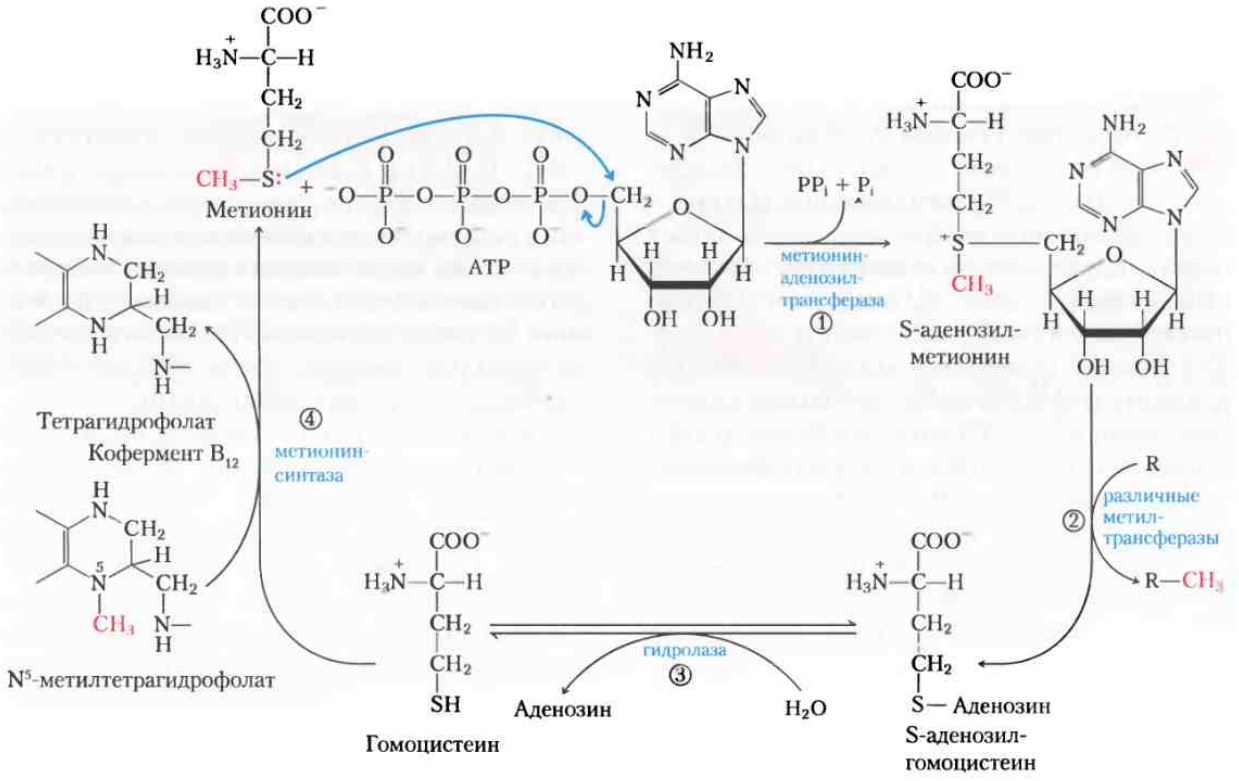


Рис. 18-18. Синтез метионина и S-аденозилметионина в метил-активированном цикле. Стадии описаны в тексте. В реакции, катализируемой метионинсинтазой (стадия ④), метильная группа переносится на кобаламин с образованием метилкобаламина, который в свою очередь выступает донором метила в реакции образования метионина. S-Аденозилметионин, который несет положительно заряженный атом серы (ион сульфония), является мощным метилирующим агентом в ряде реакций биосинтеза. Акцептор метила (стадия ②) обозначен буквой R.

В результате переноса метильной группы с S-аденозилметионина на акцептор образуется **S-аденозилгомоцистеин** (рис. 18-18, стадия ②), который затем расщепляется на гомоцистеин и аденозин (стадия ③). Метионин регенерируется при переносе метильной группы на гомоцистеин в реакции, катализируемой метионинсинтазой (стадия ④); так метионин превращается в S-аденозилметионин, что завершает цикл активации метила.

Одна из форм метионинсинтазы, общая для бактерий, использует в качестве донора метила N^5-метилтетрагидрофолат. Другая форма фермента, присутствующая у некоторых бактерий и млекопитающих, использует N^5-метилтетрагидрофолат, но метильная группа сначала переносится на производное кофермента B_{12} — кобаламин. Образуется метилколабамин, который служит донором метила при образовании метионина. Эта реакция и перегруппировка L-метилмалонил-CoA до сукцинил-CoA (см. доп. 17-2, рис. 1, *а*) — единственные известные у млекопитающих реакции, зависимые от кофермента B_{12}.

В этих метаболических путях витамин B_{12} и фолат тесно связаны между собой. Недостаточность витамина B_{12} (**пернициозная анемия**) — редкое заболевание, которое встречается лишь у людей с нарушением всасывания этого витамина в кишечнике (см. доп. 17-2) или у строгих вегетарианцев (витамина B_{12} нет в растительных клетках). Болезнь развивается медленно, поскольку организму требуются совсем небольшие количества витамина B_{12}, а его запасов в печени хватает на период от трех до пяти лет. Симптомами заболевания являются не только анемия, но и различные неврологические нарушения.

Анемия может быть связана с реакцией, катализируемой метионинсинтазой. Как упоминалось выше, метильная группа метилкобаламина происходит из N^5-метилтетрагидрофолата, и в клетках млекопитающих это единственная реакция, в которой используется N^5-метилтетрагидрофолат. Превращение N^5,N^{10}-метиленовой формы в N^5-метильную форму тетрагидрофолата происходит необратимо (рис. 18-17). Поэтому, если кофермент B_{12} недоступен для синтеза метилкобаламина, происходит захват фолата в N^5-метильной форме. Анемия, связанная с неусвоением витамина B_{12}, называется мегалобластной анемией. Она сопровождается снижением содержания зрелых эритроцитов и появлением в костном мозге незрелых клеток-предшественников, или мегалобластов. В крови эритроциты постепенно замещаются меньшим количеством аномально крупных эритроцитов, называемых **макроцитами**. Дефект развития эритроцитов является прямым следствием исчерпания запаса N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата, необходимого для синтеза тимидиновых нуклеотидов, входящих в состав ДНК (см. гл. 22). Дефицит фолата, при котором исчерпаны запасы всех форм тетрагидрофолата, также приводит к анемии, причины которой приблизительно те же. Симптомы недостаточности витамина B_{12} можно сгладить, принимая либо сам витамин, либо фолат.

Однако лечить пернициозную анемию одними только препаратами фолиевой кислоты опасно, поскольку неврологические симптомы дефицита витамина B_{12} будут прогрессировать. Эти симптомы не связаны с дефектом метионинсинтетазы. В данном случае аномальный фермент метилмалонил-CoA-мутаза вызывает накопление в мембранах нейронов необычной жирной кислоты, в составе которой нечетное число атомов углерода. Поэтому при анемии, связанной с недостаточностью фолата, часто назначают как фолат, так и витамин B_{12}, по крайней мере, в тех случаях, когда точная метаболическая причина болезни не установлена. Ранняя диагностика дефицита витамина B_{12} имеет очень большое значение, поскольку некоторые связанные с этим неврологические нарушения могут быть необратимыми.

Недостаток фолата также сопровождается уменьшением количества N^5-метилтетрагидрофолата, необходимого для реакции метионинсинтетазы. Это приводит к повышению уровня гомосерина в крови, что может спровоцировать развитие инфаркта миокарда, гипертензию и инсульт. По оценкам, высокий уровень гомосерина является причиной 10% случаев инфаркта миокарда. Данное нарушение корректируется приемом фолиевой кислоты. ■

Другой кофактор катаболизма аминокислот **тетрагидробиоптерин** похож на фрагмент птерина тетрагидрофолата, но он не вовлечен в реакции переноса одноуглеродных фрагментов; вместо этого он участвует в оксилительных реакциях. Мы рассмотрим его действие, когда будем обсуждать деградацию фенилаланина (см. рис. 18-24).

Шесть аминокислот расщепляются до пирувата

Углеродные скелеты шести аминокислот целиком или частично превращаются в пируват. Пируват может образовывать либо ацетил-CoA и рано или поздно окисляться в цикле трикарбоновых кислот, либо оксалоацетат и поступать в глюконеогенез. Вот эти шесть аминокислот — аланин, триптофан, цистеин, серин, глицин и треонин (**рис. 18-19**). **Аланин** просто превращается в пируват в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом, а боковая цепь **триптофана** отщепляется в виде аланина, а значит, в итоге пирувата. **Цистеин** перегруппировывается в пируват в две стадии: сначала удаляется атом серы, а затем происходит трансаминирование. **Серин** превращается в пируват под действием сериндегидратазы. В этой пиридоксальфосфатзависимой реакции удаляются и β-гидроксил, и α-аминогруппа серина (**рис. 18-20, *а***).

Глицин расщепляется тремя путями и только один из них ведет к пирувату. Глицин превращается в серин путем ферментативной реакции присоединения гидроксиметильной группы (рис. 18-19 и 18-20, *б*). Для этой реакции, катализируемой **серин-гидроксиметил–трансферазой**, необходимы коферменты тетрагидрофолат и пиридоксальфосфат. Серин переводится в пируват, как было описано выше. По второму пути, который у животных встречается чаще, глицин под-

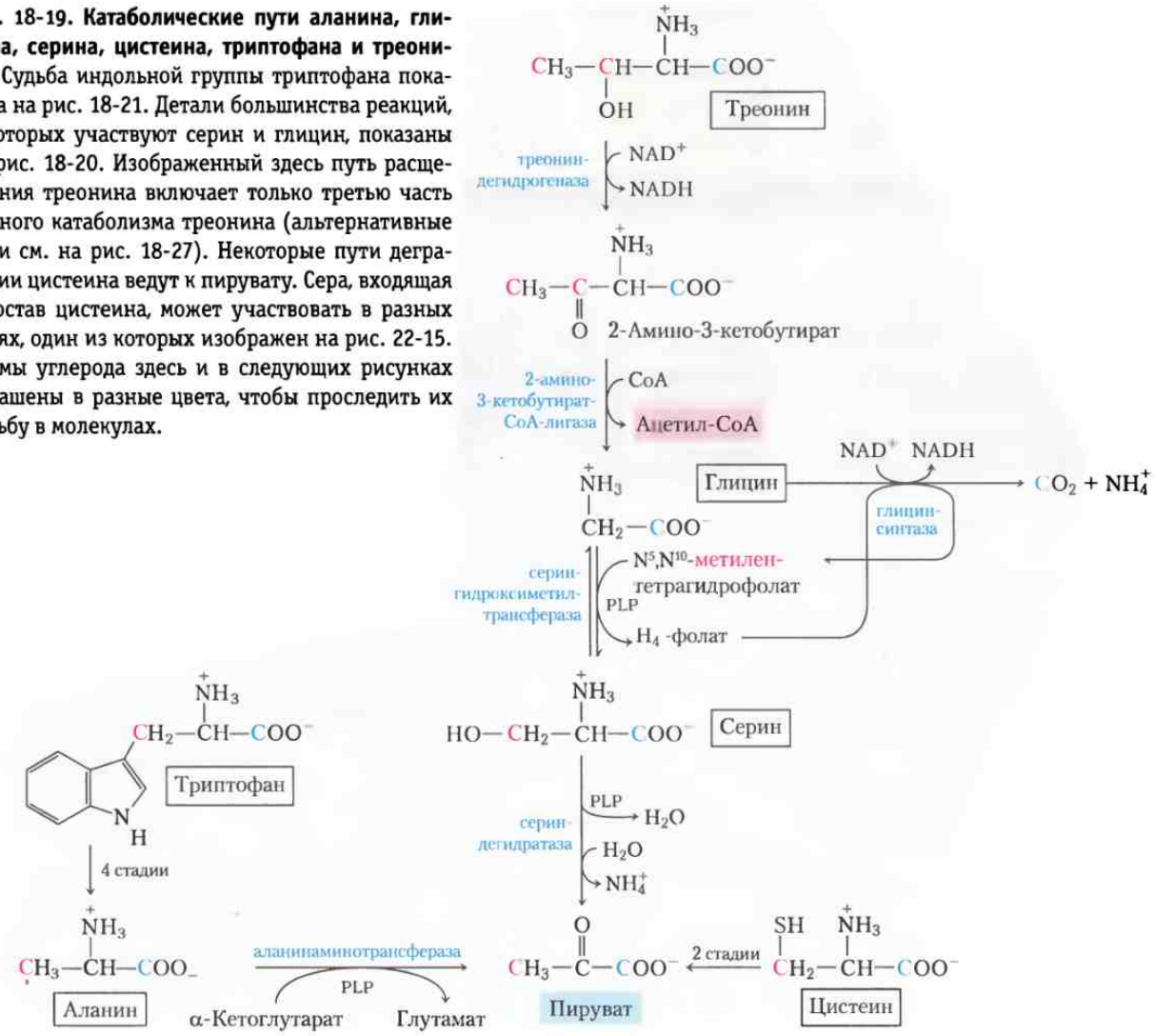


Рис. 18-19. Катаболические пути аланина, глицина, серина, цистеина, триптофана и треонина. Судьба индольной группы триптофана показана на рис. 18-21. Детали большинства реакций, в которых участвуют серин и глицин, показаны на рис. 18-20. Изображенный здесь путь расщепления треонина включает только третью часть полного катаболизма треонина (альтернативные пути см. на рис. 18-27). Некоторые пути деградации цистеина ведут к пирувату. Сера, входящая в состав цистеина, может участвовать в разных путях, один из которых изображен на рис. 22-15. Атомы углерода здесь и в следующих рисунках окрашены в разные цвета, чтобы проследить их судьбу в молекулах.

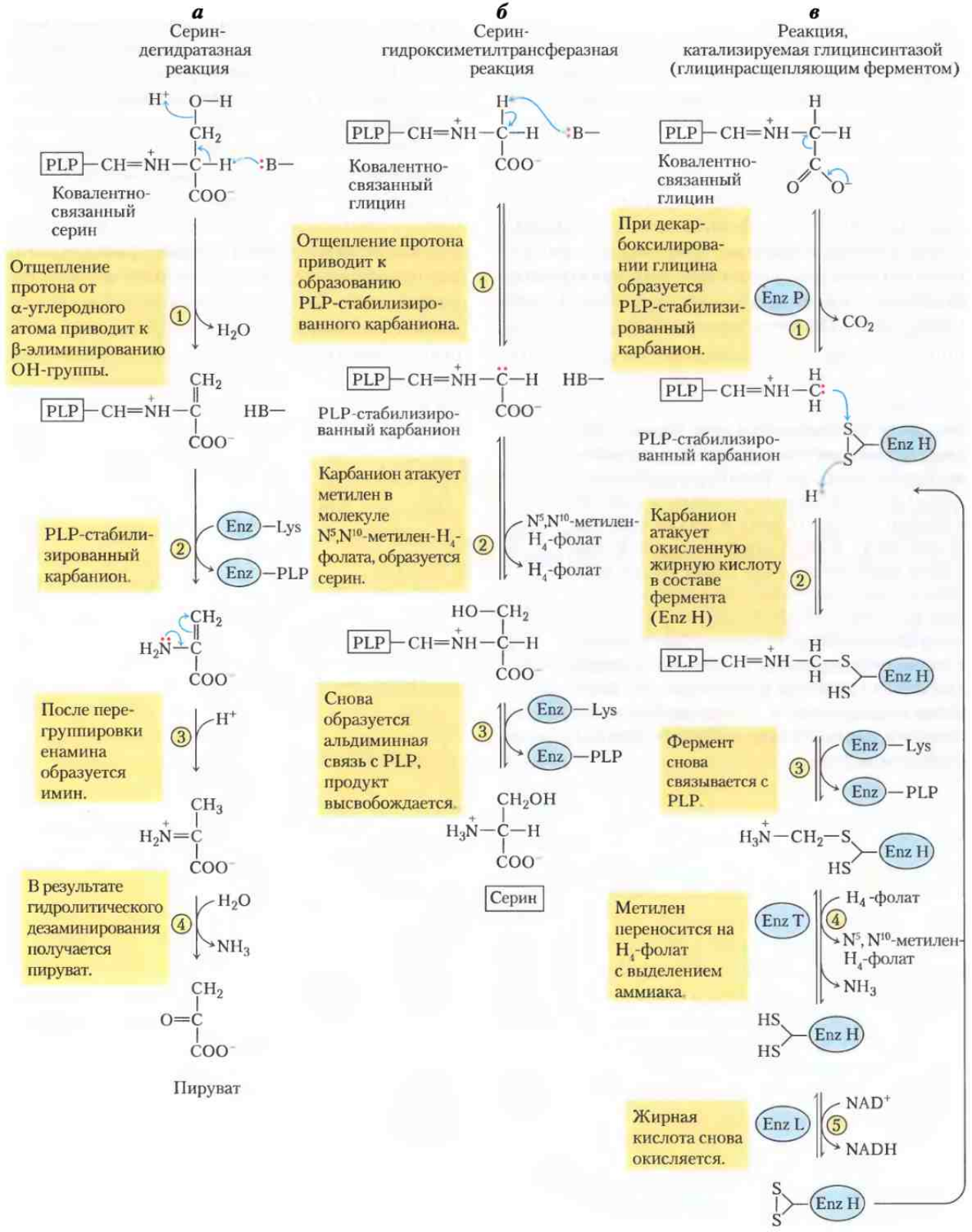

а
Серин-дегидратазная реакция
б
Серин-гидроксиметилтрансферазная реакция
в
Реакция, катализируемая глицинсинтазой (глицинрасщепляющим ферментом)
Ковалентно-связанный серин
Ковалентно-связанный глицин
Ковалентно-связанный глицин
Отщепление протона от α-углеродного атома приводит к β-элиминированию OH-группы.
Отщепление протона приводит к образованию PLP-стабилизированного карбаниона.
При декарбоксилировании глицина образуется PLP-стабилизированный карбанион.
PLP-стабилизированный карбанион
PLP-стабилизированный карбанион
PLP-стабилизированный карбанион.
Карбанион атакует метилен в молекуле N5,N10-метилен-H4-фолата, образуется серин.
Карбанион атакует окисленную жирную кислоту в составе фермента (Enz H)
После перегруппировки енамина образуется имин.
Снова образуется альдиминная связь с PLP, продукт высвобождается.
Фермент снова связывается с PLP.
В результате гидролитического дезаминирования получается пируват.
Серин
Метилен переносится на H4-фолат с выделением аммиака.
Пируват
Жирная кислота снова окисляется.

Рис. 18-20. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Роль кофакторов пиридоксальфосфата и тетрагидрофолата в метаболизме глицина и серина. Первая стадия каждой реакции (не показана) представляет собой образование ковалентной иминной связи между PLP, связанным с ферментом, и субстратом — аминокислотой серином в случае (*а*), глицином в (*б*) и (*в*). *а* — катализируемое PLP отщепление воды в сериндегидрогеназной реакции (стадия ①) ведет к последующему образованию пирувата. *б* — в гидроксиметилтрансферазной реакции стабилизированный PLP-карбанион (продукт стадии ①) является ключевым интермедиатом в переносе метиленовой группы (в как $-CH_2-OH$) с N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата с образованием серина. *в* — глицинрасщепляющий фермент (глицинсинтаза) представляет собой полиферментный комплекс из субъединиц P, H, T и L. В конечном итоге в этой обратимой реакции выделяются CO_2 и NH_4^+, а второй атом углерода глицина присоединяется к тетрагидрофолату с образованием N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата. Пиридоксальфосфат активирует α-углерод аминокислот на критических стадиях всех этих реакций, а тетрагидрофолат переносит одноуглеродные фрагменты в двух из них (см. рис. 18-6, 18-17).

вергается окислительному расщеплению до CO_2, NH_4^+ и метиленовой группы ($-CH_2-$) (рис. 18-19, 18-20, *в*). Для этой легко обратимой реакции, катализируемой **глицинрасщепляющим ферментом** (глицинсинтазой), также необходим тетрагидрофолат, который принимает метиленовую группу. В этом пути окислительного расщепления два атома углерода не попадают в цикл трикарбоновых кислот. Один атом теряется в виде CO_2, а второй превращается в метиленовую группу N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата (рис. 18-17), который в определенных путях биосинтеза выступает как донор одноуглеродного фрагмента.

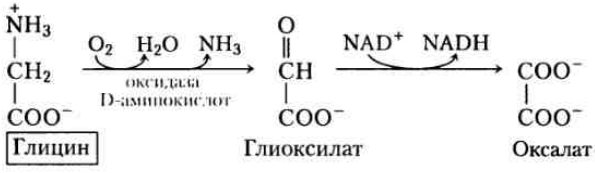
Работа этого второго пути расщепления глицина, вероятно, критична для млекопитающих. Люди с серьезными дефектами в активности глицин-расщепляющего фермента страдают заболеванием, известным как некетотическая гиперглицинемия. Эта болезнь характеризуется повышенным уровнем глицина в сыворотке, что приводит к серьезным нарушениям умственно-

Таблица 18-2 Некоторые генетические болезни, вызванные дефектами в катаболизме аминокислот

Заболевание	Примерная частота встречаемости (на 100 000 новорожденных)	Дефектный процесс	Дефектный фермент	Симптомы и эффекты
Альбинизм	< 3	Синтез меланина из тирозина	Тирозин 3-монооксигеназа (тирозиназа)	Отсутствие пигментации: белые волосы, белая кожа
Алкаптонурия	< 0,4	Деградация тирозина	Гомогентизат-1,2-диоксигеназа	Черный цвет мочи; развивающийся позднее артрит
Аргининемия	< 0,5	Синтез мочевины	Аргиназа	Задержка умственного развития
Аргининосукцинатная ацидемия	< 1,5	Синтез мочевины	Аргининосукциназа	Рвота; конвульсии
Дефицит карбамоилфосфатсинтетазы I	< 0,5	Синтез мочевины	Карбамоилфосфатсинтетаза I	Летаргия; конвульсии; ранняя смерть
Гомоцистинурия	< 0,5	Деградация метионина	Цистатионин-β-синтаза	Дефектное развитие костей; задержка умственного развития
Болезнь кленового сиропа (кетоацидурия)	< 0,4	Распад изолейцина, лейцина и валина	Дегидрогеназный комплекс разветвленных α-кетокислот	Рвота; конвульсии; задержка умственного развития; ранняя смерть
Метилмалоновая ацидемия	< 0,5	Превращение пропионил-CoA в сукцинил-CoA	Метилмалонил-CoA-мутаза	Рвота; конвульсии; задержка умственного развития; ранняя смерть
Фенилкетонурия	< 8	Превращение фенилаланина в тирозин	Фенилаланин-гидроксилаза	Рвота у новорожденных; задержка умственного развития

го развития и смерти в раннем детстве. Высокие концентрации глицина — тормозного нейромедиатора — одно из возможных объяснений неврологических последствий этой болезни. У людей было определено множество разных генетических дефектов в метаболизме аминокислот (табл. 18-2). В этой главе мы встретимся еще с некоторыми из них. ■

В третьем, и последнем, пути деградации глицина ахиральная молекула глицина служит субстратом для фермента оксидазы D-аминокислот. Глицин превращается в глиоксилат — альтернативный субстрат для печеночной лактатдегидрогеназы (с. 91). Глиоксилат окисляется в NAD^+-зависимой реакции до оксалоацетата:



Основная функция оксидазы D-аминокислот, присутствующей в больших количествах в почках, — это детоксикация поглощенных производных D-аминокислот, образующихся из клеточной стенки бактерий и продуктов питания (высокая температура при жарке вызывает спонтанную рацемизацию небольшого количества L-аминокислот в белках). Оксалат, поступающий с пищей или ферментативно образующийся в почках, влияет на здоровье человека. Кристаллы оксалата кальция составляют до 75% всех камней в почках. ■

Существуют два главных пути распада **треонина**. Один путь ведет к образованию пирувата через глицин (рис. 18-19). Превращение до глицина происходит в две стадии, при этом сначала под действием треониндегидрогеназы треонин превращается в 2-амино-3-кетобутират. На этот путь приходится всего лишь от 10% до 30% всего катаболизма треонина у человека, но для других млекопитающих он может иметь большее значение. У человека главный путь ведет к образованию сукцинил-CoA, и он будет описан ниже.

В лабораторных условиях серин-гидроксиметилтрансфераза может катализировать превращение треонина до глицина и ацетальдегида в одну стадию, но у млекопитающих этот путь практически не активен.

Семь аминокислот распадаются до ацетил-CoA

Части углеродных скелетов семи аминокислот **триптофана, лизина, фенилаланина, тирозина, лейцина, изолейцина** и **треонина** образуют ацетил-CoA и/или ацетоацетил-CoA, последний переводится в ацетил-CoA (**рис. 18-21**). Некоторые последние стадии деградации лейцина, лизина и триптофана напоминают стадии окисления жирных кислот. Треонин (не показан на рис. 18-21) превращается в ацетил-CoA во второстепенном пути, изображенном на рис. 18-19.

Катаболитические пути двух из этих семи аминокислот заслуживают особого внимания. Триптофан расщепляется в наиболее сложном из всех путей аминокислотного катаболизма в тканях животных; часть триптофана (четыре из его атомов углерода) превращается в ацетил-CoA через ацетоацетил-CoA. Некоторые интермедиаты катаболизма триптофана являются предшественниками в синтезе других биомолекул (**рис. 18-22**), включая никотинат — предшественник NAD и NADP у животных; серотонин — нейромедиатор позвоночных; и индолацетат — ростовой фактор растений. Некоторые из этих путей биосинтеза описаны более детально в гл. 22 (см. рис. 22-28, 22-29).

Генетические дефекты в ферментах, участвующих в путях распада фенилаланина, ведут к некоторым наследственным заболеваниям человека (**рис. 18-23**); это мы обсудим далее. Фенилаланин и продукт его окисления тирозин (оба содержат по девять атомов углерода) распадаются на два фрагмента, которые могут войти в цикл трикарбоновых кислот: четыре из девяти атомов углерода в составе ацетоацетата, который превращается в ацетоацетил-CoA и затем в ацетил-CoA, а второй четырехуглеродный фрагмент — в фумарат. Итак, восемь из девяти атомов углерода этих двух аминокислот вовлекаются в цикл трикарбоновых кислот, девятый теряется в виде CO_2. После реакции гидроксилирования фенилаланин превращается в тирозин, который является также предшественником нейромедиатора дофамина и гормонов норадреналина и адреналина, секретируемых мозговым веществом надпочечников (см. рис. 22-29). Кроме того, из тирозина образуется меланин, черный пигмент кожи и волос.

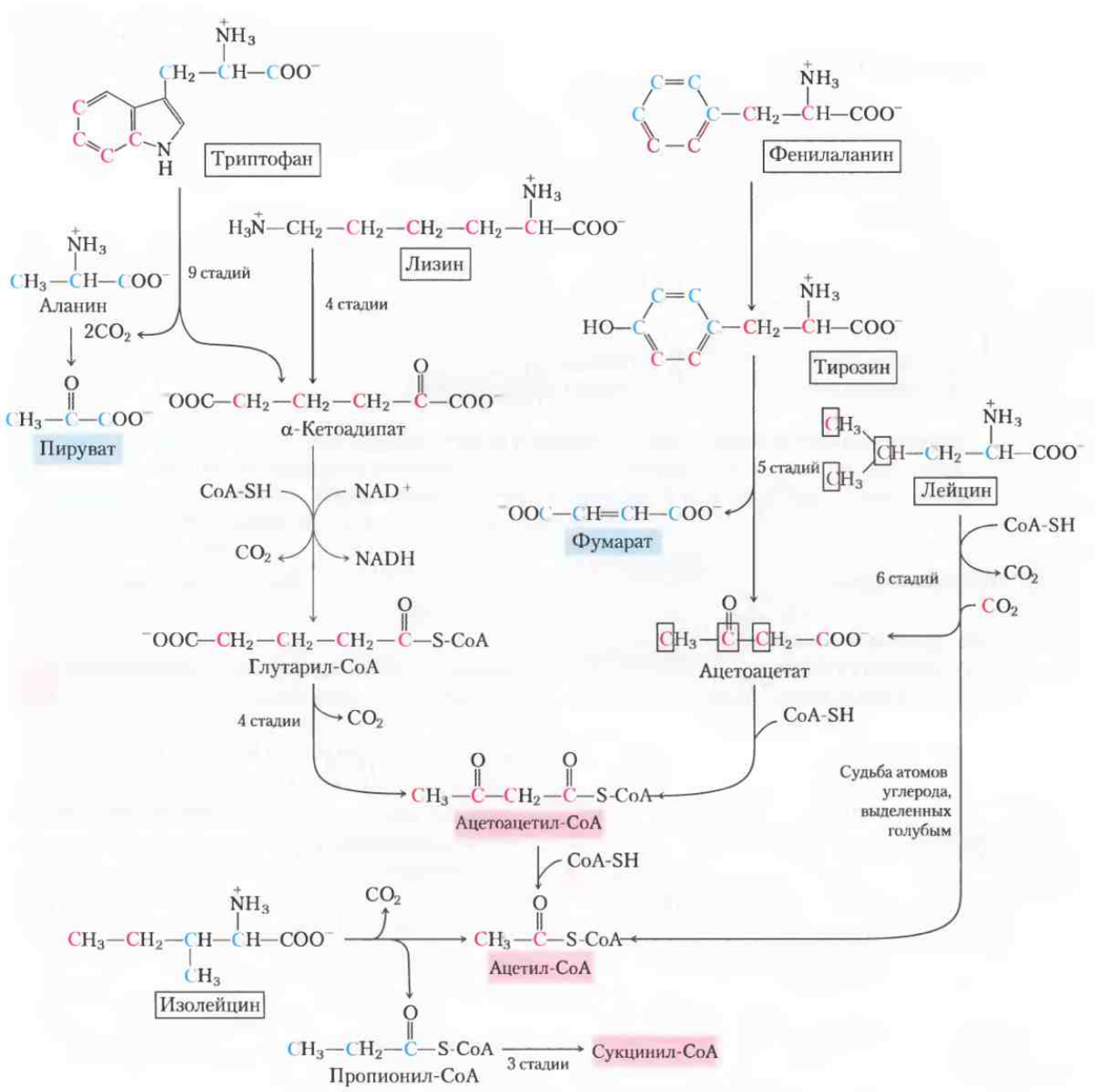


Рис. 18-21. Катаболические пути триптофана, лизина, фенилаланина, тирозина, лейцина и изолейцина. Некоторые атомы углерода этих аминокислот (выделены красным) превращаются в ацетил-CoA. Триптофан, фенилаланин и изолейцин также содержат атомы углерода (показаны синим), которые становятся частью пирувата или другими интермедиатами цикла трикарбоновых кислот. Путь деградации фенилаланина более детально изображен на рис. 18-23. Судьба атомов азота на этой схеме не показана, в большинстве случаев они переносятся на α-кетоглутарат с образованием глутамата.

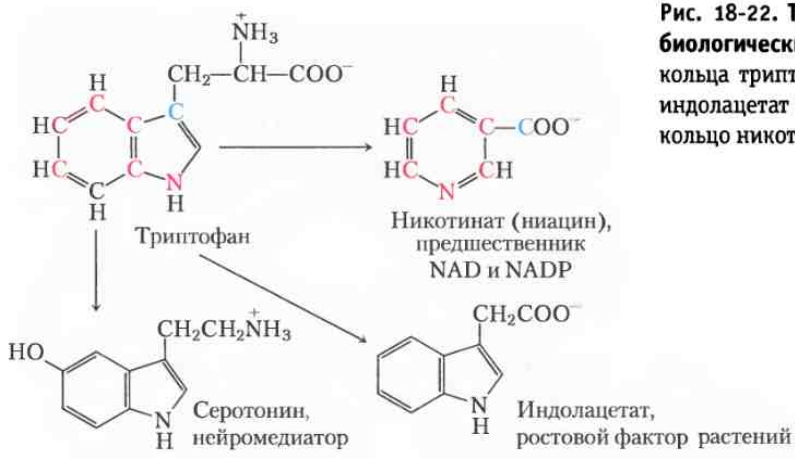


Рис. 18-22. Триптофан — предшественник некоторых биологически важных веществ. Из ароматического кольца триптофана синтезируются никотинат (ниацин), индолацетат и серотонин. Атомы, из которых получается кольцо никотината, выделены цветом.

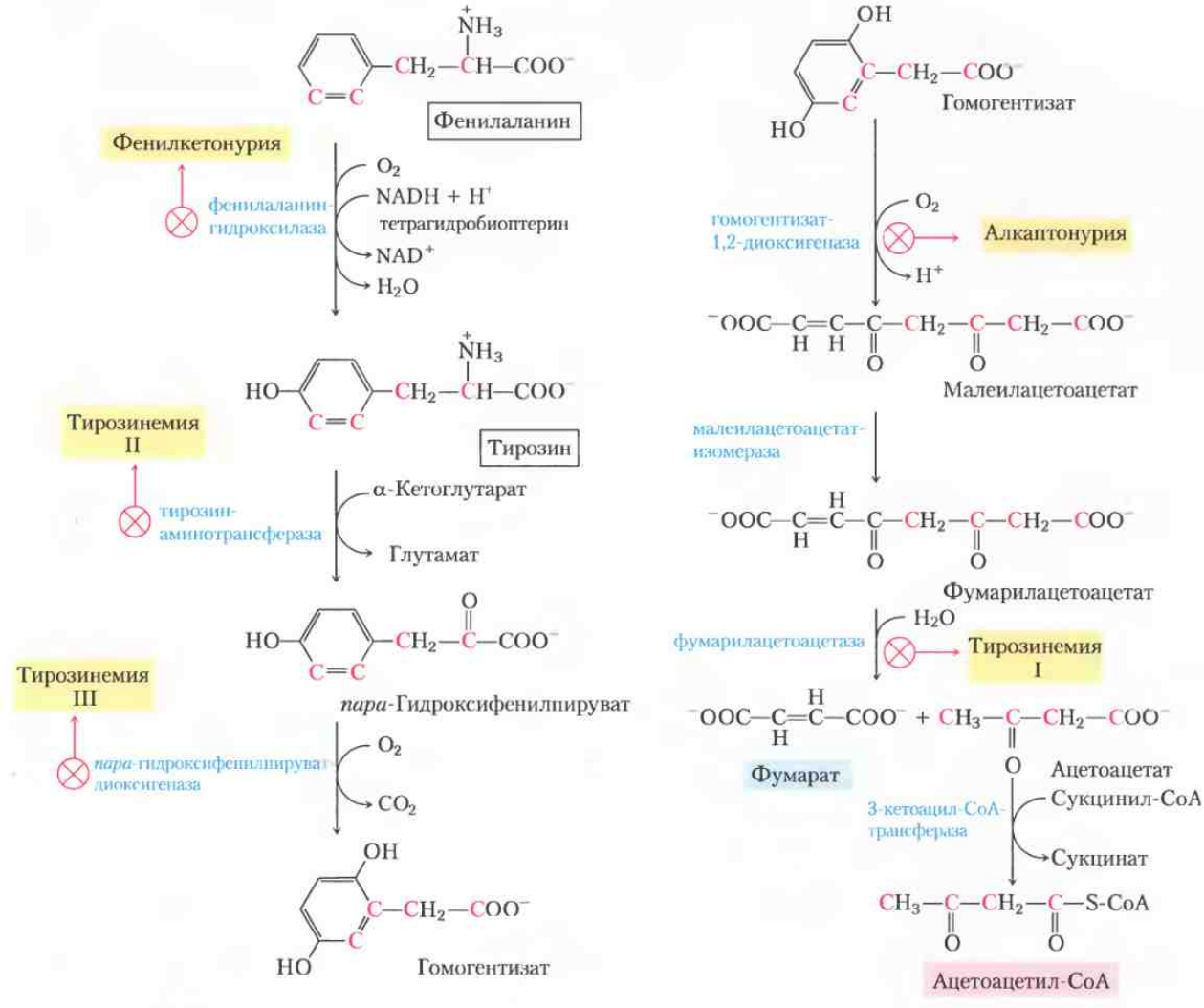


Рис. 18-23. Катаболические пути фенилаланина и тирозина. В норме у человека эти аминокислоты превращаются в ацетоацетил-CoA и фумарат. Генетические дефекты многих ферментов (показаны желтым цветом) вызывают врожденные заболевания.

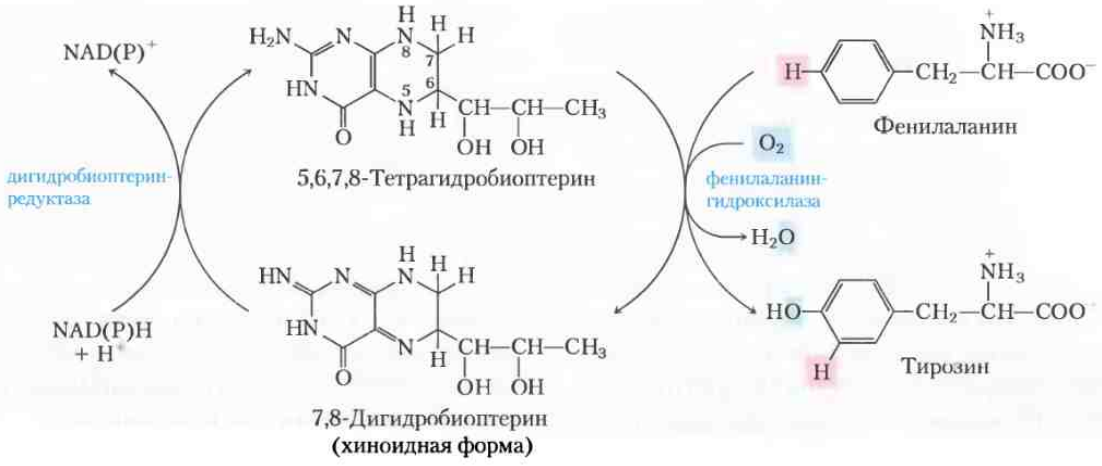


Рис. 18-24. Роль тетрагидробиоптерина в реакции, катализируемой фенилаланингидроксилазой. Атом водорода, выделенный розовым, переносится прямо с С-4 на С-3. Эта особенность, открытая в Национальных институтах здравоохранения США (*National Institutes of Health*, сокращенно NIH), была названа NIH-сдвигом.

Катаболизм фенилаланина у некоторых людей может быть нарушен

Многие аминокислоты являются нейромедиаторами, предшественниками медиаторов или антагонистами нейромедиаторов, поэтому генетические дефекты метаболизма аминокислот могут вызывать нервные расстройства и задержку умственного развития. При большинстве таких заболеваний накапливается специфический интермедиат. Например, дефекты в гене **фенилаланингидролазы**, первого фермента в катаболизме фенилаланина (рис. 18-23), вызывают болезнь **фенилкетонурию**, наиболее распространенную причину повышенного уровня фенилаланина (гиперфенилаланинемия).

Фенилаланингидроксилаза (фенилаланин-4-монооксигеназа) принадлежит к одному из основных классов ферментов, которые называются **оксидазами со смешанными функциями** (см. доп. 21-1). Они катализируют спонтанное гидроксилирование субстрата одним атомом кислорода молекулы O_2 с восстановлением другого атома до H_2O. Фенилаланингидроксилаза использует в качестве кофактора тетрагидробиоптерин, который переносит электроны с NADH на O_2 и окисляется в этом процессе до дигидробиоптерина (**рис. 18-24**). Впоследствии он восстанавливается ферментом **дигидробиоптеринредуктазой** в реакции, для которой необходим NADH.

При фенилкетонурии активируется вторичный малоиспользуемый в норме путь метаболизма фенилаланина. В этом пути фенилаланин подвергается трансаминированию с пируватом с образованием **фенилпирувата (рис. 18-25)**.

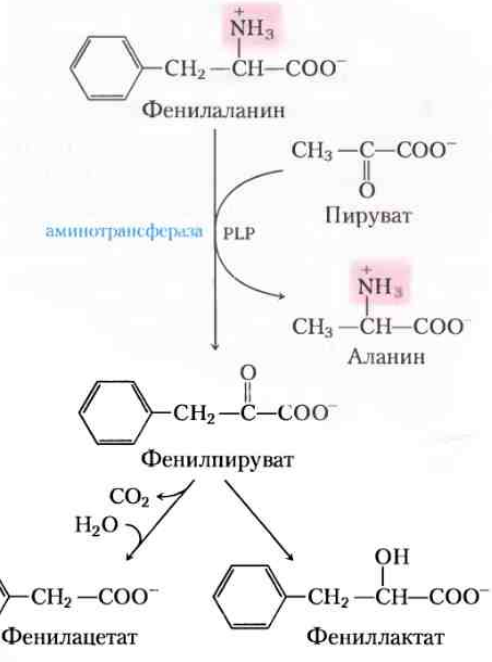


Рис. 18-25. Альтернативные пути катаболизма фенилаланина при фенилкетонурии. При фенилкетонурии в тканях, крови и моче накапливается фенилпируват. Моча может также содержать фенилацетат и фениллактат.

Фенилаланин и фенилпируват накапливаются в крови и тканях и выделяются с мочой — отсюда и название «фенилкетонурия». Большая часть фенилпирувата вместо того, чтобы выводиться, либо декарбоксилируется до фенилацетата, либо восстанавливается до фениллактата. Фенилацетат придает характерный запах моче, по которому обычно и определяют фенилкетонурию у новорожденных. Накопление фенилаланина или его метаболитов в раннем возрасте ухудшает нормальное развитие мозга, вызывая серьезную задержку в умственном развитии. Это может быть вызвано избытком фенилаланина, который конкурирует с другими аминокислотами за переносчик этой аминокислоты из крови в клетки мозга, что в итоге приводит к дефициту необходимых метаболитов.

Фенилкетонурия — одно из первых наследственных нарушений метаболизма, обнаруженных у людей. Если эту проблему распознать в раннем детстве, развитие умственной отсталости можно предотвратить строго контролируемой диетой. В пище должно содержаться только необходимое для синтеза белков количество фенилаланина и тирозина. Потребление пищи, богатой белками, надо ограничить. Такие природные белки, как казеин молока, сначала должны быть гидролизированы, а основные количества фенилаланина удалены для того, чтобы обеспечить необходимую диету, хотя бы в детстве. Искусственный подсластитель аспартам представляет собой дипептид аспартата и метилового эфира фенилаланина (см. рис. 1-23, *б*), поэтому пища, подслащенная аспартамом, опасна для человека, вынужденного соблюдать диету по фенилаланину.

Фенилкетонурия может быть вызвана также дефектом фермента, который катализирует регенерацию тетрагидробиоптерина (рис. 18-24). Лечение в этом случае более сложное, чем ограничение потребления фенилаланина и тирозина. Тетрагидробиоптерин требуется и для образования L-3,4-дигидроксифенилаланина (L-дофа) и 5-гидрокситриптофана — предшественников нейромедиаторов норадреналина и серотонина. При этой форме фенилкетонурии эти предшественники необходимо включать в диету. Добавление самого тетрагидробиоптерина в пищу неэффективно, потому что он нестабилен и не проходит гемато-энцефалический барьер, а значит, не включается в фермент.

Диагностика генетических болезней у новорожденных может быть довольно эффективной, особенно в случае фенилкетонурии. Проводимые тесты (не просто запах мочи!) не слишком дорогие, а определение и раннее лечение фенилкетонурии в младенческом возрасте (выявляется от восьми до десяти случаев на 100 000 новорожденных) ежегодно сохраняют миллионные суммы, которые требуются при запаздалом лечение заболевания. И, что более важно, ранее обнаружение заболевания с помощью этих несложных тестов дает возможность избежать эмоциональной травмы, а это уже трудно оценить деньгами.

Другое наследственное нарушение катаболизма фенилаланина — **алкаптонурия**, при которой дефектен фермент **гомогентизатдиоксигеназа** (рис. 18-23). Это заболевание считается менее серьезным, чем фенилкетонурия, оно вызывает менее трагические последствия, но надо знать, что из-за выделения большого количества гомогентизата, который окисляется, моча больного становится черной. У больных алкаптонурией также вероятно развитие некоторых форм артрита. Алкаптонурия представляет исторический интерес. В начале 1900-х гг. Арчибальд Гаррод открыл, что это заболевание наследственное. Он выяснил, что причиной является отсутствие одного фермента. Гаррод был первым, кто выявил связи между наследственным заболеванием и ферментом, что было большим прорывом на пути развития науки и неизбежно вело к современному пониманию генов и информационных путей, описанных в части III. ■

Пять аминокислот превращаются в α-кетоглутарат

Углеродный скелет пяти аминокислот (пролин, глутамат, глутамин, аргинин и гистидин) попадают в цикл трикарбоновых кислот в виде α-кетоглутората (**рис. 18-26**). **Пролин, глутамат** и **глутамин** содержат по пять атомов углерода. Циклическая структура пролина раскрывается при окислении наиболее удаленного от карбоксильной группы углерода с образованием шиффова основания, после гидролиза которого из исходного пролина получается линейный глутамат-γ-полуальдегид. Этот интермедиат далее окисляется на том же атоме углерода с образованием глутамата. При действии глутаминазы или в любой из нескольких ферментативных реакций, в которых глу-

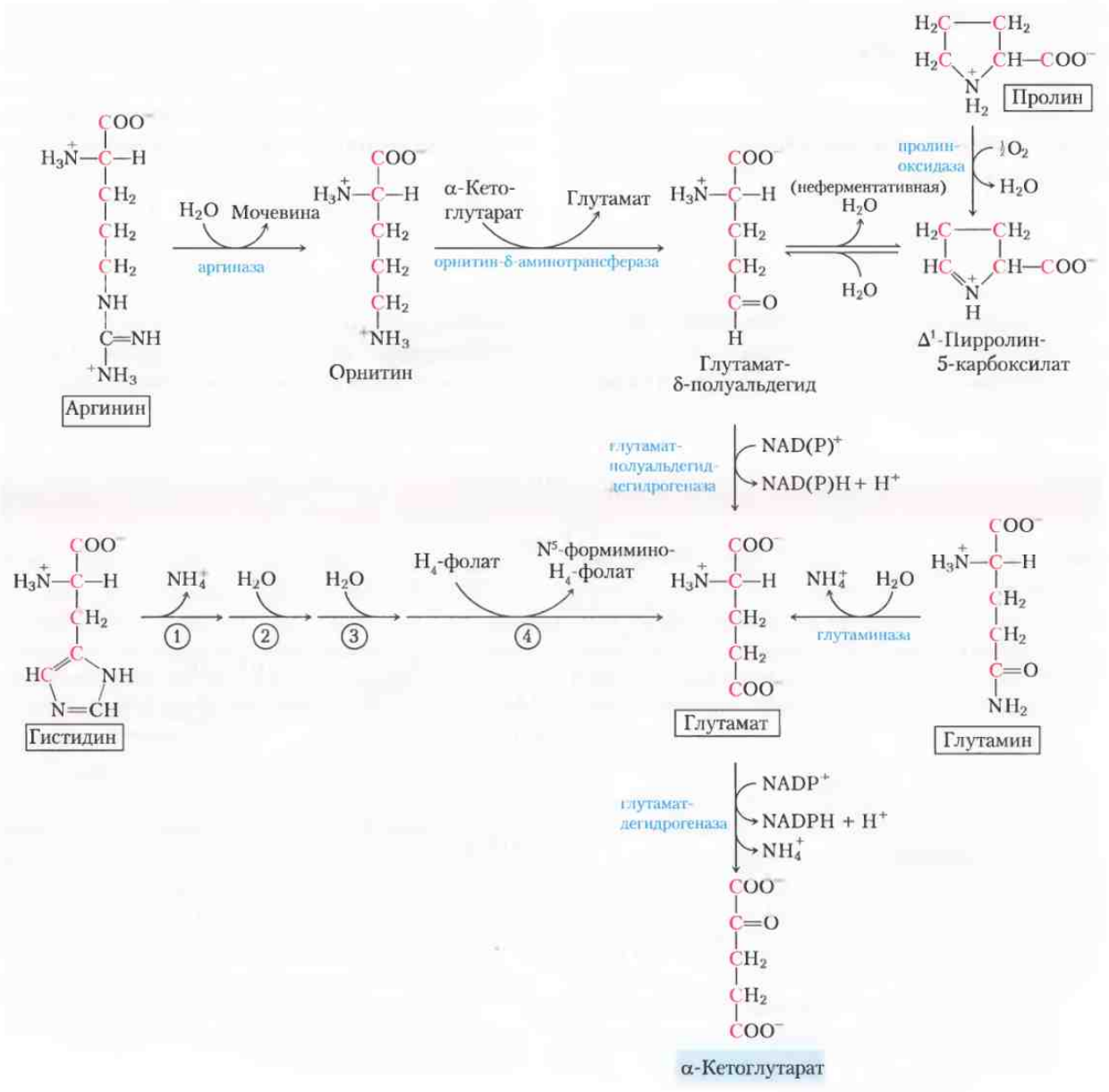


Рис. 18-26. Катаболические пути аргинина, гистидина, глутамата, глутамина и пролина. Эти аминокислоты превращаются в α-кетоглутарат. Пронумерованные стадии гистидиного пути катализируются ① гистидин-аммиак-лиазой, ② уроканазой, ③ имидазолонпропионазой и ④ глутамат-формиминотрансферазой.

тамин отдает амидный азот на акцептор, глутамин превращается в глутамат. Трансаминирование или дезаминирование глутамата дает α-кетоглутарат.

Аргинин и **гистидин** содержат цепочку из пяти углеродов, к которой шестой углерод присоединен через атом азота. Поэтому катаболические превращения этих аминокислот в глутамат более сложные, чем путь от пролина до глутамина (рис. 18-26). Аргинин превращается в пятиуглеродный скелет орнитина в цикле мочевины (рис. 18-10), и далее орнитин трансаминируется до глутамат-γ-полуальдегида. Превращение гистидина в пятиуглеродный глутамат многостадийное; лишний углерод удаляется в реакции, где в качестве кофактора используется тетрагидрофолат.

Превращение четырех аминокислот происходит до сукцинил-CoA

Углеродные скелеты метионина, изолейцина, треонина и валина расщепляются по пути, который приводит к сукцинил-CoA (**рис. 18-27**) — интермедиату цикла трикарбоновых кислот. **Метионин** отдает свою метильную группу одному из нескольких возможных акцепторов через S-аденозилметионин, а три из четырех оставшихся атомов углерода попадают в пропионат пропионил-CoA — предшественник сукцинил-CoA. **Изолейцин** подвергается трансаминированию и последующему окислительному декарбоксилированию образующейся α-кетокислоты.

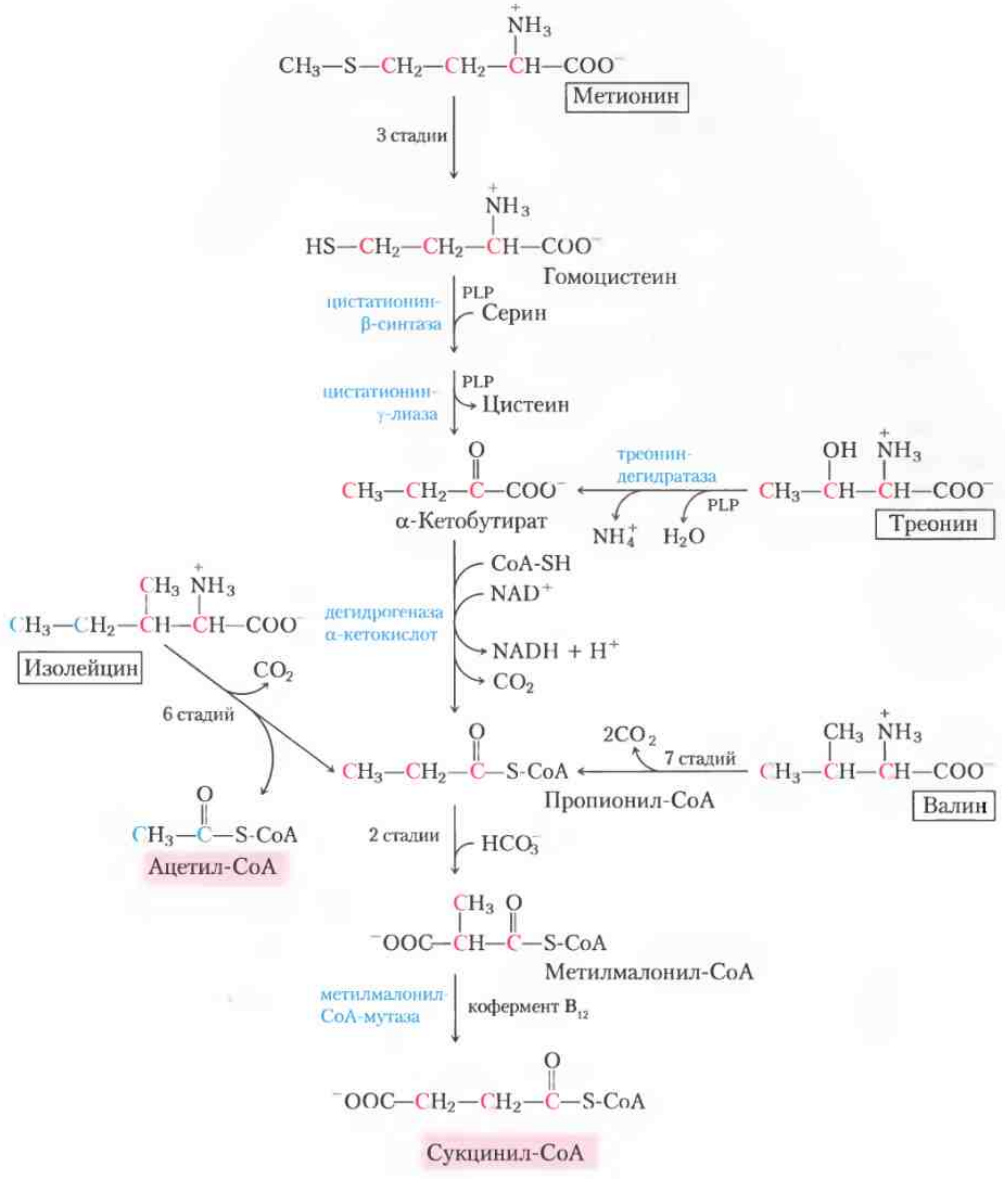


Рис. 18-27. Катаболические пути метионина, изолейцина, треонина и валина. Превращение этих аминокислот идет до сукцинил-CoA; кроме того, из двух атомов углерода изолейцина образуется ацетил-CoA (см. рис. 18-21). Путь деградации треонина, показанный здесь, присутствует у людей; путь, обнаруженный у других организмов, показан на рис. 18-19. Цепочка превращений метионина в гомоцистеин более детально описана на рис. 18-18; гомоцистеина в α-кетобутират — на рис. 22-14; а пропионил-CoA в сукцинил-CoA — на рис. 17-11.

Оставшийся пятиуглеродный скелет в дальнейшем окисляется до ацетил-CoA и пропионил-CoA. **Валин** претерпевает трансаминирование и декарбоксилирование, затем серию окислительных реакций, которые переводят оставшиеся четыре атома углерода в пропионил-CoA. Некоторые участки путей распада валина и изолейцина похожи на стадии деградации жирных кислот (см. рис. 17-8, *а*). В тканях человека **треонин** также в две стадии преобразуется в пропионил-CoA. Это главный путь деградации треонина у людей (альтернативный путь см. на рис. 18-19). Механизм первой реакции аналогичен механизму реакции, катализируемой сериндегидратазой; в действительности же может оказаться, что сериндегидратаза и треониндегидратаза — один фермент.

Пропионил-CoA, образующийся из этих трех аминокислот, превращается в сукцинил-CoA по пути, описанному в гл. 17: карбоксилирование до метилмалонил-CoA, эпимеризация метилмалонил-CoA и превращение в сукцинил-CoA зависимым от B_{12} ферментом метилмалонил-CoA-мутазой (см. рис. 17-11). При редкой генетической болезни, известной как метилмалоновая ацидемия, метилмалонил-CoA-мутаза отсутствует, что имеет серьезные последствия для обмена веществ (табл. 18-2, доп. 18-2).

Дополнение 18-2 **МЕДИЦИНА** **Ученые нашли объяснение загадочного убийства**

Порой правда бывает более странной, чем выдумка, и больше подходит для сюжета кинофильма. Вот к примеру случай Патрисии Сталлингс. Она была приговорена к пожизненному заключению за убийство своего новорожденного сына, но позднее, благодаря медицинской экспертизе трех упорных ученых, была оправдана.

История началась летом 1989 г., когда Сталлингс доставила своего трехмесячного сына Райна в реанимацию детской больницы им. кардинала Гленнона в Сент-Луисе. У ребенка было затруднено дыхание, неконтролируемая рвота и расстройство желудка. По симптомам лечащий врач-токсиколог поставил диагноз «отравление этиленгликолем» (это компонент антифриза). Это заключение в дальнейшем было подтверждено результатом анализа в коммерческой лаборатории.

Когда ребенок пришел в себя, его отдали в дом малютки, а Сталлингс и ее мужу Дэвиду разрешили навещать мальчика. Но ребенок заболел, а затем умер после того, как Сталлингс побыла с ним наедине короткое время, ее обвинили в преднамеренном убийстве и арестовали без возможности внесения залога. Результаты анализов, полученных в коммерческой лаборатории и в лаборатории больницы, невозможно было оспорить: обе лаборатории обнаружили большие количества этиленгликоля в крови мальчика и следовые количества этого вещества в бутылке молока, которым Сталлингс кормила своего сына во время визита.

Но как ни удивительно, сама того не зная, Сталлингс поставила блестящий эксперимент. Находясь в заключении, она забеременела и в феврале 1990 г. родила другого сына Дэвида Сталлингса мл. Его немедленно передали в дом малютки, но через две недели у него начали появляться симптомы, похожие на симптомы у Райна. Дэвиду сразу же поставили диагноз редкого метаболического расстройства — метилмалоновой ацидемии (ММА). Это рецессивное генетическое нарушение метаболизма аминокислот случается примерно у одного из 48 000 новорожденных, причем симптомы этой болезни практически идентичны симптомам, вызванным отравлением этиленгликолем.

Сталлингс не имела возможности отравить своего второго сына, но прокурорам шт. Миссури сложно было принять к рассмотрению новые технологии исследований, поэтому они настаивали на проведении суда над ней в любом случае. Суд не позволил использовать в качестве доказательства диагноз ММА у второго ребенка, и в январе 1991 г. Патрисии Сталлингс было предъявлено обвинение в преднамеренном убийстве, она была приговорена к пожизненному заключению.

К счастью для Сталлингс, Уильям Слай, заведующий кафедрой биохимии и молекулярной биологии Университета Сент-Луиса, и Джеймс Шумейкер, руководитель лаборатории скрининга метаболитов в этом университете, заинтересовались этим случаем, узнав о нем из телепередачи. Шумейкер сам переделал анализ крови Райна и не обнаружил там этиленгликоля. Ученые связались с Пьеро Ринальдо, экспертом по метаболическим болезням в Медицинской школе Йельского университета — он имел лабораторию, оборудованную для диагностики ММА по пробам крови.

Продолжение на стр. 296

Дополнение 18-2 **МЕДИЦИНА** **Ученые нашли объяснение загадочного убийства *(продолжение)***

Сделав анализ крови Райна, Ринальдо нашел высокие концентрации метилмалоновой кислоты, продукта распада разветвленных аминокислот изолейцина и валина; метилмалоновая кислота накапливается у больных ММА из-за дефекта в ферменте, который должен превращать ее в следующий продукт метаболического пути. И особенно примечательно, как он сказал, что кровь и моча ребенка содержали огромное количество кетонов — других метаболических свидетельств этой болезни. Как и Шумейкер, он не нашел этиленгликоля в образцах жидкостей организма ребенка. Молоко для вскармливания из бутылочки протестировать не удалось, потому что бутылочка исчезла таинственным образом. Анализ, проведенный Ринальдо, убедил его, что Райн умер от ММА. Но как же результаты двух лабораторий, показавших наличие этиленгликоля в его крови? Неужели в обоих случаях была допущена ошибка?

Ринальдо изучил документацию лабораторий и увидел, по его словам, «ужасающее». Первая лаборатория показала, что образец крови Райна Сталлингса содержал этиленгликоль, даже при том, что анализ крови не соответствовал анализу контрольной пробы, содержащей этиленгликоль. «Это не просто вопрос сомнительной интерпретации результатов анализа. Качество их анализа просто неприемлемо», — сказал Ринальдо. А что со второй лабораторией? Как и Ринальдо, эта лаборатория обнаружила аномальные вещества в крови Райна и просто «приняла, что это этиленгликоль». «Хотя в образцах из бутылочки не было обнаружено ничего необычного, — возмущался Ринальдо, — все же лаборатория заявила о присутствии этиленгликоля там тоже».

Ринальдо представил свои результаты обвинителю Джоржу МакЭлрою, который на следующий день на пресс-конференции заявил: «Я больше не верю экспертизам этих лабораторий». Рассмотрев заключение о том, что Райн Сталлингс умер от ММА, 20 сентября 1991 г. МакЭлрой снял все обвинения с Патрисии Сталлингс.

По материалам Мишель Хофман (1991). *Science* **253**, 931.
© American Association for the Advancement of Science, 1991

Разветвленные аминокислоты не деградируют в печени

Катаболизм большинства аминокислот происходит в печени, три аминокислоты с боковыми цепями (лейцин, изолейцин и валин) окисляются для получения энергии главным образом в мышцах, жировой ткани, почках и в мозге. Эти внепеченочные ткани содержат аминотрансферазу, которая отсутствует в печени. Этот фермент превращает все три разветвленных аминокислоты в соответствующую α-кетокислоту (**рис. 18-28**). Затем **дегидрогеназный комплекс разветвленных α-кетокислот** катализирует окислительное декарбоксилирование всех трех α-кетокислот, в каждом случае высвобождая карбоксильную группу в виде CO_2 и образуя ацил-CoA-производное. Эта реакция формально аналогична двум другим процессам окислительного декарбоксилирования, с которыми мы встречались в гл. 16: окислению пирувата до ацетил-CoA пируватдегидрогеназным комплексом (см. рис. 16-6) и окислению α-кетоглутарата до сукцинил-CoA α-кетоглутаратдегидрогеназным комплексом (с. 194). Все три ферментных комплекса похожи по структуре и осуществляют в сущности один и тот же реакционный механизм. В нем участвуют пять кофакторов (тиаминпирофосфат, FAD, NAD, липоат и кофермент A), а три белка каждого комплекса катализируют гомологичные реакции. Здесь мы имеем случай, когда ферментативные схемы, которые «создавались» для того, чтобы катализировать одну реакцию, были «заимствованы» при дупликации генов, и в дальнейшем адаптировались для осуществления похожих реакций в других путях.

Эксперименты на крысах показали, что дегидрогеназный комплекс разветвленных α-кетокислот регулируется ковалентной модификацией в ответ на содержание разветвленных аминокислот в пище. При низком или неизбыточном содержании разветвленных аминокислот в поглощаемой пище ферментный комплекс фосфорилируется протеинкиназой и таким образом инактивируется. Добавление излишка разветвленных аминокислот в еду вызывает

дефосфорилирование и последующую активацию фермента. Обратите внимание, что пируватдегидрогеназный комплекс регулируется похожим образом с помощью фосфорилирования и дефосфорилирования (с. 208).

Есть относительно редкая генетическая болезнь, при которой три разветвленные α-кетокислоты (как и предшествующие им аминокислоты, особенно лейцин) накапливаются в крови и появляются в избытке в моче. Это расстройство названо **болезнью кленового сиропа** из-за характерного запаха, который придают моче α-кетокислоты, образующиеся дефектным дегидрогеназным комплексом α-кетокислот. Если болезнь не лечить, нарушается развитие мозга, происходит задержка умственного развития и смерть в раннем детстве. Лечение представляет собой жесткий контроль питания, сведение к минимуму, необходимому для нормального роста, потребления валина, изолейцина и лейцина. ■

Аспарагин и аспартат расщепляются до оксалоацетата

Углеродные скелеты **аспарагина** и **аспартата** в конце концов попадают в цикл трикарбоновых кислот в виде оксалоацетата. Фермент **аспарагиназа** катализирует гидролиз аспарагина до аспартата, который вступает в реакцию трансаминирования с α-кетоглутаратом с образованием глутамата и оксалоацетата (рис. 18-29).

Итак, мы рассмотрели, каким образом 20 протеиногенных аминокислот после потери атомов азота распадаются в реакциях дегидрогенизации, декарбоксилирования и в других реакци-

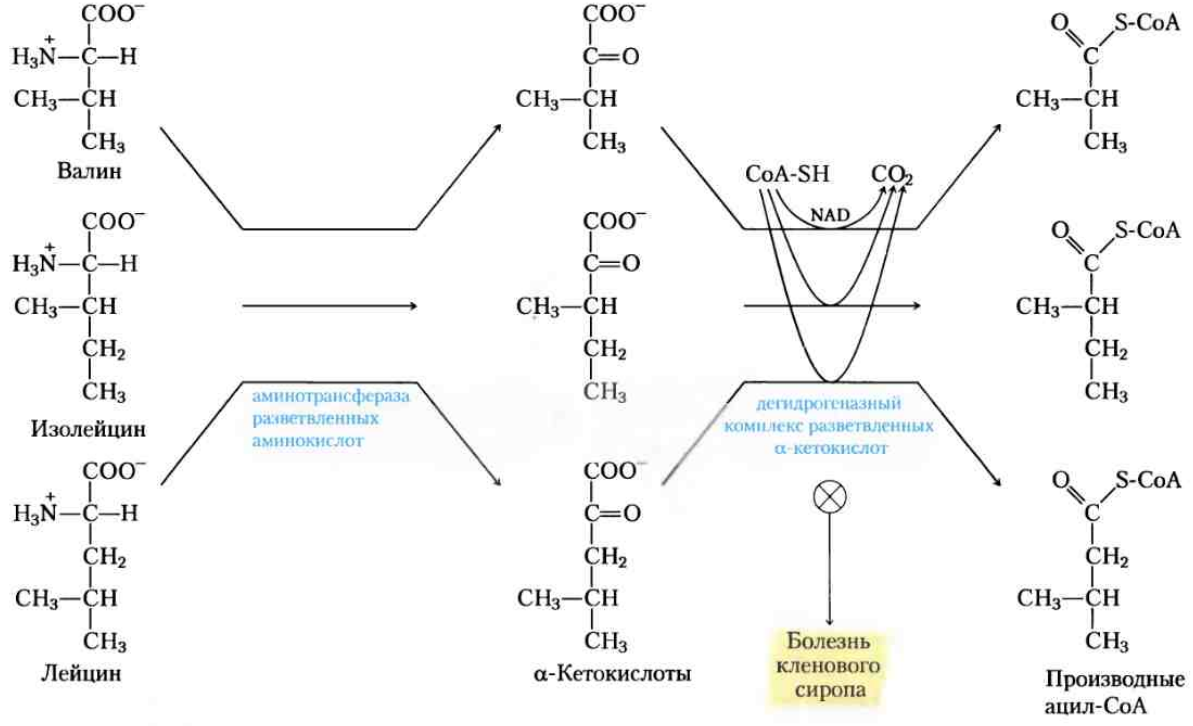


Рис. 18-28. Катаболические пути трех разветвленных аминокислот валина, изолейцина и лейцина. В трех путях, которые существуют во внепеченочных тканях, два первых фермента, как показано здесь, общие. Дегидрогеназный комплекс разветвленных α-кетокислот аналогичен пируватному и α-кетоглутаратному дегидрогеназным комплексам и использует те же пять кофакторов (некоторые здесь не показаны). Дефектный фермент вызывает у людей болезнь кленового сиропа.

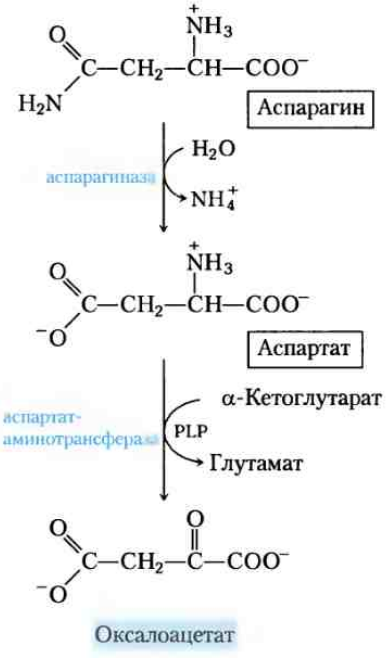


Рис. 18-29. Катаболический путь аспарагина и аспартата. Обе аминокислоты превращаются в оксалоацетат.

ях до фрагментов углеродных скелетов шести центральных метаболитов, которые способны поступать в цикл трикарбоновых кислот. Эти компоненты, расщепленные до ацетил-CoA, полностью окисляются до углекислого газа и воды с образованием ATP при окислительном фосфорилировании.

Как и в случае углеводородов и липидов, распад аминокислот в цикле трикарбоновых кислот приводит в итоге к образованию восстановительных эквивалентов (NADH и $FADH_2$). Наш обзор катаболических процессов заканчивается в следующей главе обсуждением клеточного дыхания, в котором эти восстановительные эквиваленты снабжают «топливом» окислительные и энергообразующие процессы в аэробных организмах.

Краткое содержание раздела 18.3 ПУТИ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕРОДНОГО СКЕЛЕТА АМИНОКИСЛОТ

- После удаления аминогрупп углеродные скелеты аминокислот подвергаются окислению, и далее полученные интермедиаты могут участвовать в цикле трикарбоновых кислот, окисляясь до CO_2 и H_2O. В реакциях этих путей участвует ряд кофакторов: тетрагидрофолат и S-аденозилметионин в реакциях переноса одноуглеродных групп и тетрагидробиоптерин в окислении фенилаланина фенилаланиндегидроксилазой.

- В зависимости от конечного продукта деградации некоторые аминокислоты могут быть превращены в кетоновые тела, некоторые — в глюкозу, а некоторые — и в то, и в другое. Таким образом, расщепление аминокислот интегрируется в промежуточный метаболизм и может быть определяющим для выживания при условиях, в которых аминокислоты служат значительным источником метаболической энергии.

- Углеродные скелеты аминокислот попадают в цикл трикарбоновых кислот в виде пяти интермедиатов: ацетил-CoA, α-кетоглутарата, сукцинил-CoA, фумарата и оксалоацетата. Некоторые также преобразуются в пируват, который может быть превращен либо в ацетил-CoA, либо в оксалоацетат.

- Аминокислоты, преобразующиеся в пируват, — это аланин, цистеин, глицин, серин, треонин и триптофан. Лейцин, лизин, фенилаланин и триптофан превращаются в ацетил-CoA через ацетоацетил-CoA. Изолейцин, лейцин, треонин и триптофан могут непосредственно превращаться в ацетил-CoA.

- Аргинин, глутамат, глутамин, гистидин и пролин дают α-кетоглутарат; изолейцин, метионин, треонин и валин образуют сукцинил-CoA; четыре атома фенилаланина и тирозина участвуют в образовании фумарата; аспарагин и аспартат превращаются в оксалоацетат.

- Разветвленные аминокислоты (изолейцин, лейцин и валин), в отличие от других аминокислот, претерпевают распад только во внепеченочных тканях.

- Ряд серьезных заболеваний человека может быть вызван генетическими дефектами ферментов катаболизма аминокислот.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

S-аденозилметионин (adoMet) 283
алкаптонурия 292
аминотрансферазы 266
аммониотелический 273
болезнь кленового сиропа 297
L-глутаматдегидрогеназа 269
глутаминаза 270
глутаминсинтаза 270
глюкогенный 281
глюкокозо-аланиновый цикл 271
кетогенный 280
креатинкиназа 269
мочевина 273
незаменимые аминокислоты 278
окислительное дезаминирование 269
оксидазы со смешанными функциями 291
пиридоксальфосфат (PLP) 266
тетрагидробиоптерин 284
тетрагидрофолат 281
трансаминазы 266
трансаминирование 266
уреотелический 273
урикотелический 273
фенилкетонурия 291
цикл мочевины 273

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Arias, I. M., Boyer, J. L., Chisari, F. V., Fausto, N., Schachter, D., & Shafritz, D. A. (2001) *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th edn, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Bender, D. A. (1985) *Amino Acid Metabolism*, 2nd edn, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Brosnan, J. T. (2001) Amino acids, then and now — a reflection on Sir Hans Krebs' contribution to nitrogen metabolism. *IUBMB Life* **52**, 265–270.

Увлекательное изложение биографии замечательного биохимика.

Campbell, J. W. (1991) Excretory nitrogen metabolism. In *Environmental and Metabolic Animal Physiology*, 4th edn (Prosser, C. L., ed.), pp. 277–324, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Coomes, M. W. (1997) Amino acid metabolism. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 5th edn (Devlin, T. M., ed.), pp. 779–823, Wiley-Liss, New York.

Frey, P. A. & Hegeman, A. D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Хорошее содержательное обсуждение ферментативных реакций, описанных в данной главе.

Hayashi, H. (1995) Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J. Biochem.* **118**, 463–473.

Mazelis, M. (1980) Amino acid catabolism. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise* (Stumpf, P. K. & Conn, E. E., eds), Vol. 5: *Amino Acids and Derivatives* (Miflin, B. J., ed.), pp. 541–567, Academic Press, Inc., New York.

Обсуждение различных путей метаболизма аминокислот у растений.

Метаболизм аминокислот

Christen, P. & Metzler, D. E. (1985) *Transaminases*, Wiley-Interscience, Inc., New York.

Curthoys, N. P. & Watford, M. (1995) Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 133–159.

Fitzpatrick, P. F. (1999) Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 355–382.

Eliot, A. C. & Kirsch, J. F. (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 383–415.

Pencharz, P. B. & Ball, R. O. (2003) Different approaches to define individual amino acid requirements. *Annu. Rev. Nutr.* **23**, 101–116.

В этом обзоре показано, что не совсем верно утверждать, что аминокислоты являются самым важным компонентом пищи.

Цикл мочевины

Brusilow, S. W. & Horwich, A. L. (2001) Urea cycle enzymes. In *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C. R., Beaudet, A. C., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K., & Vogelstein, B., eds), pp. 1909–1963, McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Авторитетная работа по этому метаболическому пути.

Holmes, F. L. (1980) Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.* **39**, 216–225.

Исследование по истории медицины, в котором прослеживаются события, приведшие к открытию цикла мочевины.

Kirsch, J. F., Eichele, G., Ford, G. C., Vincent, M. G., Jansonius, J. N., Gehring, H., & Christen, P. (1984) Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. *J. Mol. Biol.* **174**, 497–525.

Morris, S. M. (2002) Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 87–105.

В этом обзоре детально описано, что известно о некоторых уровнях регуляции, не рассмотренных в данной главе, например о гормональной регуляции и изменении рациона питания.

Нарушения процесса деградации аминокислот

Ledley, F. D., Levy, H. L., & Woo, S. L. C. (1986) Molecular analysis of the inheritance of phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia in families with both disorders. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1276–1280.

Nyhan, W. L. (1984) *Abnormalities in Amino Acid Metabolism in Clinical Medicine*, Appleton-Century-Crofts, Norwalk, CT.

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, A. W., & Vogelstein, B. (eds) (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, Part 5: *Amino Acids*, McGraw-Hill, Inc., New York.

Scriver, C. R., Kaufman, S., & Woo, S. L. C. (1988) Mendelian hyperphenylalaninemia. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 301–321.

Вопросы и задачи

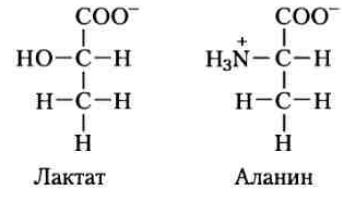
1. Продукты трансаминирования аминокислот. Назовите и изобразите структуру α-кетокислоты, которая получится при трансаминировании α-кетоглутаратом следующих аминокислот: (а) аспартат, (б) глутамат, (в) аланин, (г) фенилаланин.

2. Измерение активности аланинаминотрансферазы. Для измерения активности аланинаминотрансферазы (скорости реакции) обычно в реакционную смесь добавляют избыток лактатдегидрогеназы и NADH. Скорость исчезновения аланина равна скорости расходования NADH, который определяют спектрофотометрическими методами. Объясните, принцип этого метода анализа.

3. Аланин и глутамин в крови. В норме в плазме крови человека содержатся все аминокислоты, необходимые для синтеза белков в организме, но не в различных концентрациях. Содержание аланина и глутамина гораздо выше, чем всех остальных. Как вы думаете, почему?

4. Распределение азота аминных групп. Если в вашей пище большой збыток аланина, но недостаток аспартата, будут ли у вас признаки аспартатной недостаточности? Объясните.

5. Лактат вместо аланина в качестве метаболического топлива: цена удаления азота. Три углерода лактата и аланина находятся в одинаковых степенях окисления, и животные могут использовать их углеродные скелеты в качестве метаболического топлива. Сравните выход ATP (моль ATP на моль субстрата) при полном окислении (до CO_2 и H_2O) лактата и аланина, учитывая «затраты» на удаление азота.



6. Токсичность аммония, вызванная недостатком аргинина в пище. В исследовании, проведенном несколько лет назад, кошек не кормили всю ночь, затем давали им пищу, содержащую все аминокислоты, кроме аргинина. Через два часа уровень аммония в крови кошки увеличился от нормы 18 мкг/л до 140 мкг/л, причем наблюдались выраженные симптомы интоксикации аммиаком. В контрольной группе, которой давали пищу, содержащую весь набор аминокислот или весь набор аминокислот без аргинина, но с орнитином, необычных симптомов не наблюдалось.

а) Какова была роль голодания в эксперименте?

б) Что вызвало повышение уровня аммония в экспериментальной группе? Почему отсутствие аргинина ведет к интоксикации аммиаком? Является ли аргинин незаменимой кислотой для кошки? Почему?

в) Почему орнитин может заменить аргинин?

7. Окисление глутамата. Напишите последовательность уравнений (с коэффициентами) и полное уравнение реакции, описывающей окисление 2 моль глутамата до 2 моль α-кетоглутарата и 1 моль мочевины.

8. Трансаминирование и цикл мочевины. Активность аспартатаминотрансферазы выше всех других аминотрансфераз в печени млекопитающих. Почему?

9. Довод против жидкой белковой диеты. Диета для похудения, которую интенсивно пропагандировали несколько лет назад, состояла в ежедневном питании «жидким белком» («варево» из гидролизированного желатина), водой и набором витаминов. Любая другая пища и питье были исключены. При такой диете человек обычно терял за первую неделю 4,5–6 кг.

а) Оппоненты аргументировали свои сомнения в эффективности тем, что потеря веса обусловливается в основном потерей воды, и поэтому быстро восстановится, если начать нормально питаться. Какова биохимическая основа для данного аргумента?

б) Несколько людей, использующих эту диету, умерли. Что опасного в такой диете и как она может привести к смерти?

10. Кетогенные аминокислоты. Какие аминокислоты являются исключительно кетогенными?

11. Генетические дефекты метаболизма аминокислот: пример из истории. Двухлетний ребенок был доставлен в больницу. Его мама сказала, что у ребенка бы частая рвота, особенно после кормления. Вес и физическое развитие ребенка отставало нормы. В его волосах были белые пряди, хотя в основном волосы были темными. Проба мочи, обработанная хлоридом железа ($FeCl_3$), в присутствии фенилпирувата окрашивалась в зеленый цвет. Результаты анализов мочи приведены в таблице.

	Концентрация (мМ)	
Вещество	**Моча пациента**	**Нормальная моча**
Фенилаланин	7,0	0,01
Фенилпируват	4,8	0
Фениллактат	10,3	0

а) Предположите, какой фермент может быть дефектен у этого ребенка. Предложите лечение.

б) Почему фенилаланин появляется в моче в больших количествах?

в) Что является источником фенилпирувата и фениллактата? Почему этот путь (в норме не функционирующий) активируется при увеличении концентрации фенилаланина?

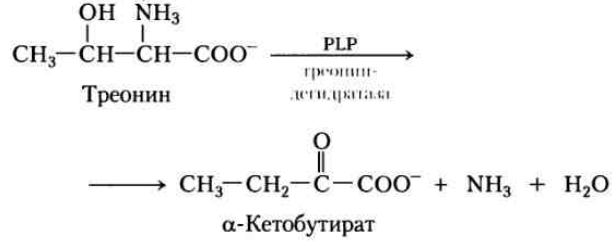
г) Почему в волосах ребенка есть пряди белого цвета?

12. Роль кобаламина в катаболизме аминокислот. Пернициозная анемия вызывается снижением абсорбции витамина B_{12}. Какое влияние это оказывает на катаболизм аминокислот? На все ли аминокислоты влияние одинаково? (*Подсказка.* См. доп. 17-2.)

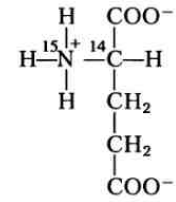
13. Вегетарианство. Вегетарианская диета обеспечивает высокий уровень антиоксидантов в организме человека, а также такой липидный профиль, который помогает предотвратить появление сердечно-сосудистых заболеваний. Однако при этом возникают другие проблемы. Для исследований брали образцы крови у большой группы добровольцев, состоящей из веганов, придерживающихся строгой вегетарианской диеты, полностью лишенной продуктов животного происхождения, лактовегетарианцев (вегетарианцев, употребляющих молочные продукты) и обычных людей, в рацион питания которых входят различные продукты, включая мясо. Представители каждой группы придерживались своей диеты несколько лет. В крови у веганов был обнаружен повышенный уровень гомоцистеина и метилмалоната, чуть ниже он был у лактовегетарианцев и значительно ниже — у людей с обычным рационом питания. Объясните это наблюдение.

14. Пернициозная анемия. Недостаточность витамина B_{12} может наблюдаться при нескольких редких генетических заболеваниях, в результате которых уровень витамина снижается, несмотря на его нормальное содержание в рационе питания, куда входили мясные и молочные продукты. Данное состояние нельзя вылечить путем употребления в пищу добавок витамина B_{12}. Объясните, почему.

15. Механизм реакций с участием пиридоксальфосфата. Треонин расщепляется треониндегидратазой, катализирующей превращение треонина в α-кетобутират и аммиак. Этот фермент использует в качестве кофактора пиридоксальфосфат. Изучив механизма, изображенный на рис. 18-6, предложите механизм данной реакции. Обратите внимание, что в данной реакции происходит удаление из молекулы треонина β-атома углерода.

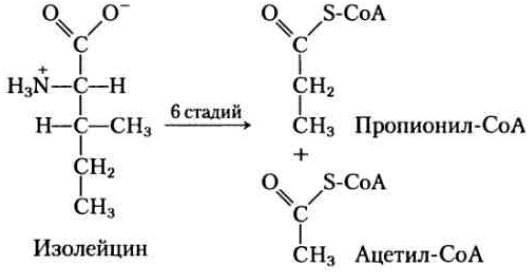


16. Судьба углерода и азота в метаболизме глутамина. Когда [2-^{14}C,^{15}N]глутамат подвергается окислительному расщеплению в печени крысы, в каких метаболитах будет найден каждый их изотопов: (а) мочевина, (б) сукцинат, (в) аргинин, (г) цитруллин, (д) орнитин, (е) аспартат?



Меченый глутамат

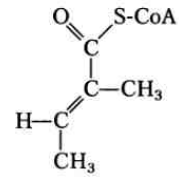
17. Химическая стратегия катаболизма изолейцина. Изолейцин разрушается в шесть стадий до пропионил-CoA и ацетил-CoA:



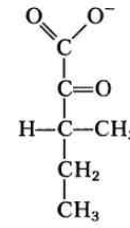
Изолейцин

а) Химия деградации изолейцина включает стратегии, аналогичные используемым в цикле трикарбоновых кислот и β-окислении жирных кислот. Интермедиаты деградации изолейцина (от I до V) показаны ниже не по порядку. Используя знание и понимание цикла трикарбоновых кислот и пути β-окисления, расположите эти интермедиаты в метаболической последовательности, соответствующей разрушению изолейцина.

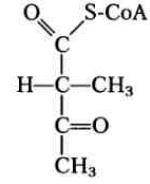
б) Для каждой предложенной вами стадии опишите химический процесс, проведите аналогичный пример из цикла трикарбоновых кислот или β-окисления жирных кислот (где это возможно), и обозначьте необходимые кофакторы.



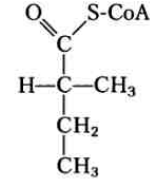
I



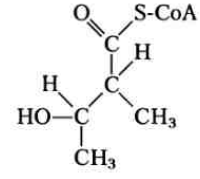
II



III



IV

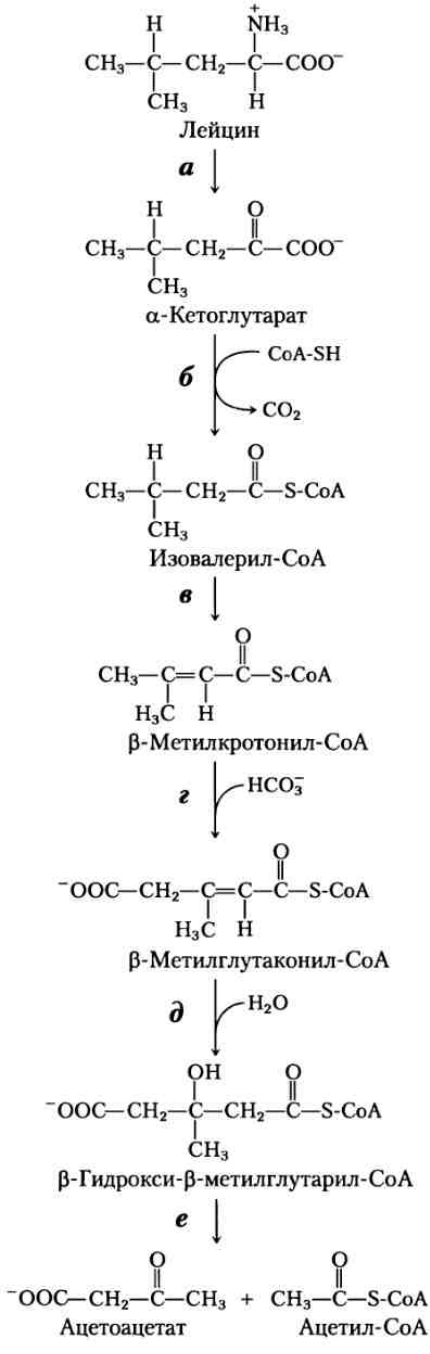


V

18. Роль пиридоксальфосфата в метаболизме глицина. Фермент серин-гидроксиметилтрансфераза использует в качестве кофактора пиридоксальфосфат. Предположите механизм катализируемой этим ферментом реакции в направлении деградации серина (образовании глицина). (*Подсказка.* См. рис. 18-19 и 18-20, *б*.)

19. Параллельные пути распада аминокислот и жирных кислот. Углеродный скелет лейцина расщепляется в серии реакций, аналогичных некоторым в цикле трикарбоновых кислот и β-окислении. Для каждой реакции от (а) до (е) укажите тип, приведите похожую реакцию из цикла трикарбоновых кислот и пути β-окисления (где это возможно), и обозначьте необходимые кофакторы.

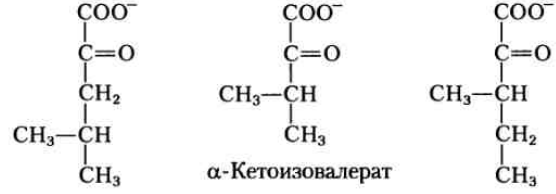
Анализ экспериментальных данных



20. Болезнь кленового сиропа. На рис. 18-28 изображен путь расщепления аминокислот с боковой цепью, а также показан участок биохимического нарушения, приводящего к развитию болезни кленового сиропа. Первые наблюдения, которые в итоге привели к выяснению сути этого заболевания, были опубликованы в трех статьях, появившихся в конце 1950-х и начале 1960-х гг. Данная задача составлена на основе истории открытия биохимического механизма заболевания, начиная с самых первых исследований.

Менкес, Харст и Крейг (1954) сообщали о случаях смерти в одной и той же семье четырех новорожденных детей, причем у всех детей наблюдались одинаковые симптомы неизвестного тогда заболевания. Во всех случаях беременность и роды протекали нормально. В первые 3–5 дней жизни новорожденных также не было выявлено каких-либо проблем. Однако вскоре у детей начинались конвульсии, и младенцы умирали в возрасте от 11 дней до 3 месяцев. При аутопсии выявлялся сильный отек мозга. Начиная с третьего дня жизни, моча этих детей имела сильный и необычный запах «кленового сиропа».

Менкес (1959) сообщал о других шести детях, у которых наблюдались такие же симптомы, какие были описаны в первой статье. Все дети умерли в возрасте от 15 дней до 20 месяцев. Менкесу удалось получить образец мочи одного из детей на последнем месяце жизни. При обработке мочи 2,4-динитрофенилгидразином, образующим с кетосоединениями окрашенные осадки, было обнаружено, что три α-кетокислоты присутствуют в очень больших количествах:

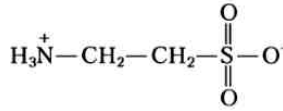


а) Эти α-кетокислоты образуются в результате дезаминирования аминокислот. Укажите, из какой аминокислоты получена каждая изображенная выше α-кетокислота.

	Моча (мг/24 ч)			Плазма крови (мг/мл)	
	Норма	У пациента		Норма	У пациента
Аминокислоты		Март 1956	Январь 1957		Январь 1957
Аланин	5–15	0,2	0,4	3,0–4,8	0,6
Аргинин	1,5–3	0,3	0,7	0,8–1,4	0,8
Аспарагин и глутамин	5–15	0,4	0	3,0–5,0	2,0
Аспарагиновая кислота	1–2	0,2	1,5	0,1–0,2	0,04
Валин	2–4	1,6	15,4	2,0–3,0	3,1
Гистидин	8–15	0,3	4,7	1,0–1,7	0,7
Глицин	20–40	4,6	20,7	1,0–2,0	1,5
Глутаминовая кислота	1,5–3	0,7	1,6	1,0–1,5	0,9
Изолейцин	2–5	2,0	13,5	0,8–1,5	2,2
Лейцин	3–8	2,7	39,4	1,7–2,4	14,5
Лизин	2–12	1,6	4,3	1,5–2,7	1,1
Метионин	2–5	1,4	1,4	0,3–0,6	2,7
Орнитин	1–2	0	1,3	0,6–0,8	0,5
Пролин	2–4	0,5	0,3	1,5–3,0	0,9
Серин	5–15	1,2	0	1,3–2,2	0,9
Таурин	1–10	0,2	18,7	0,9–1,8	0,4
Тирозин	4–8	0,3	3,7	1,5–2,3	0,7
Треонин	5–10	0,6	0	1,2–1,6	0,3
Триптофан	3–8	0,9	2,3	не измеряется	0
Фенилаланин	2–4	0,4	2,6	1,0–1,7	0,8
Цистеин	2–4	0,5	0,3	1,0–1,5	0

Дансиз, Левиц и Вестолл (1960), рассмотрев дополнительные данные, предложили биохимический механизм данного нарушения (см. рис. 18-28). Они наблюдали за развитием болезни у ребенка, у которого запах кленового сиропа в моче впервые появился в возрасте 4 месяцев. В возрасте 10 месяцев (март 1956 г.) ребенок попал в больницу с высокой температурой; у него было зафиксировано сильное отставание моторного развития. В возрасте 20 месяцев (январь 1957 г.) он опять был госпитализирован с неврологическими симптомами, которые наблюдались ранее у детей с болезнью кленового сиропа; вскоре ребенок умер. Результаты анализа его мочи и крови представлены в таблице.

б) В таблице вы видите таурин — аминокислоту, которая обычно не содержится в белках. Таурин часто является побочным продуктом при повреждении клеток. Вот его формула:



На основании строения молекулы таурина и информации, изложенной в данной главе, предположите, какая аминокислота, наиболее вероятно, является его предшественником. Объясните свой ответ.

в) Какие аминокислоты присутствовали в крови пациента в особенно большой концентрации в январе 1957 г. (по сравнению с нормой)? Какие аминокислоты присутствовали в моче в особенно высокой концентрации?

На основании полученных результатов и знания метаболического пути, отраженного на рис. 18-28, Дансиз с соавт. заключили: «Авторы считают наиболее вероятным, что первая преграда возникает в метаболическом пути при распаде разветвленных аминокислот, однако пока это не может считаться окончательно доказанным».

г) Как представленные здесь данные подтверждают это заключение?

д) Какие из представленных здесь результатов *не* согласуются с предложенной моделью заболевания кленового сиропа? Как можно объяснить это кажущееся противоречие?

е) Какие еще данные могли бы дополнительно подтвердить сделанное заключение?

Литература

Dancis, J., Levitz, M., & Westall, R. (1960) Maple syrup urine disease: branched-chain keto-aciduria. *Pediatrics* **25**, 72–79.

Menkes, J. H. (1959) Maple syrup disease: isolation and identification of organic acids in the urine. *Pediatrics* **23**, 348–353.

Menkes, J. H., Hurst, P. L., & Craig J. M. (1954) A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* **14**, 462-466.

Если вас посещает какая-то идея, ее не следует отвергать только потому, что она не укладывается в рамки господствующей теории.

Клод Бернар, An Introduction of the Study of Experimental Medicine (Введение в экспериментальную медицину), *1813*

Наиболее важной и замечательной особенностью принятия хемиосмотической гипотезы, с моей точки зрения, является альтруизм и великодушие, с которым бывшие оппоненты этой гипотезы не только согласились с ней, но и единогласно возвели ее в ранг теории.

Питер Митчелл, Нобелевская речь, *1978*

19

Окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

19.1. Реакции переноса электронов в митохондриях 306

19.2. Синтез ATP 327

19.3. Регуляция окислительного фосфорилирования 343

19.4. Роль митохондрий в термогенезе, синтезе стероидов и апоптозе 347

19.5. Митохондриальные гены: происхождение и мутации 351

ФОТОСИНТЕЗ: ПОГЛОЩЕНИЕ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

19.6. Основные особенности фотофосфорилирования 357

19.7. Поглощение света 359

19.8. Основной фотохимический процесс — это индуцированный светом перенос электронов 367

19.9. Синтез ATP в процессе фотофосфорилирования 381

19.10. Эволюция оксигенного фотосинтеза 385

Окислительное фосфорилирование — кульминация энергозапасающего метаболизма у аэробных организмов. Все процессы окисления при деградации углеводов, жирных кислот и аминокислот сводятся к финальной стадии клеточного дыхания, где высвобождающаяся при окислении энергия расходуется на синтез ATP. Фотофосфорилирование — процесс, в котором фотосинтезирующие организмы улавливают солнечную энергию, главный источник энергии для биосферы Земли, и направляют ее на синтез ATP. Большинство организмов синтезируют необходимый им ATP в основном именно в процессах окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования.

В эукариотических клетках окислительное фосфорилирование протекает в митохонд-риях, фотофосфорилирование — в хлоропластах. В процессе окислительного фосфорилирования как на свету, так и в темноте происходит *восстановление* O_2 до H_2O за счет переноса электронов от коферментов NADH и $FADH_2$. При фотофосфорилировании *окисление* H_2O до O_2 осуществляется с участием конечного акцептора электронов $NADP^+$ только под действием энергии света. Несмотря на различия, эти два высокоэффективных процесса преобразования энергии протекают по весьма сходным молекулярным механизмам.

Современные представления о механизме синтеза ATP в митохондриях и хлоропластах основаны на гипотезах, выдвинутых Питером Митчеллом в 1961 г. Митчелл предположил, что разница в концентрациях протонов по обе стороны мембраны, создаваемая реакциями окисления, играет роль резервуара энергии. Эта **хемиосмотическая теория** была принята в качестве основополагающей в биологии XX в. Хемиосмотическая теория позволяет объяснить процессы окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования и такие разные пути преобразования энергии, как активный перенос через мембрану и движение бактериальных жгутиков.

Окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование по механизму близки в трех аспектах. Во-первых, оба процесса связаны с переносом электронов по цепи переносчиков, находящихся в мембране. Во-вторых, процесс высвобождения свободной энергии при переносе электронов «вниз», т. е. экзергонический процесс, сопряжен с транспортом протонов «вверх» через непроницаемую для протонов мембрану, что приводит к накоплению свободной энергии электронов в виде трансмембранного электрохимического потенциала (с. 551, т. 1). В-третьих, поток протонов из внутримитохондриального пространства через особые белковые каналы по градиенту концентрации предоставляет свободную энергию для синтеза ATP. Его катализирует мембранный белковый комплекс ATP-синтаза, сопрягающая поток протонов с фосфорилированием ADP.

Мы начнем эту главу с окислительного фосфорилирования. Прежде всего рассмотрим цепь переносчиков электронов, их организацию в большие функциональные комплексы, встроенные в структуру внутренней мембраны митохондрий, а также уделим внимание путям переноса электронов по этой цепи и сопровождающему этот перенос транспорту протонов. Затем мы остановимся на работе замечательного ферментного комплекса в ферментативной реакции, протекающий по механизму «вращательного катализа», в результате этой реакции происходит запасание энергии протонов в форме ATP; далее рассмотрены регуляторные механизмы, координирующие окислительное фосфорилирование с различными катаболическими процессами окисления топливных молекул.

Вслед за окислительным фосфорилированием в митохондриях обсудим некоторые аспекты фотофосфорилирования и прежде всего поглощение света фотосинтезирующими пигментами, механизмы переноса электронов от H_2O к $NADP^+$ под действием света и молекулярные основы сопряжения процессов переноса электронов и протонов. Мы покажем также сходство механизмов синтеза ATP в хлоропластах и митохондриях, эволюционные основы сохранения и воспроизведения этих механизмов.

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

19.1. Реакции переноса электронов в митохондриях

В 1948 г. Кеннеди и Ленинджер впервые показали, что процессы окислительного фосфорилирования в эукариотических клетках происходят в митохондриях. С этого важного открытия начался современный период изучения процессов биологического преобразования энергии. Митохондрии, подобно грамотрицательным бактериям, имеют две мембраны (**рис. 19-1**). Внешняя мембрана митохондрии сравнительно хорошо проницаема для низкомолекулярных соединений ($M_r < 5000$) и ионов, которые свободно проходят через мембрану по каналам, образованным интегральными белками поринами. Внутренняя мембрана непроницаема для большинства небольших молекул и ионов, включая протоны H^+, и только некоторые вещества с помощью специальных переносчиков могут пройти через мембрану. Внутренняя мембрана содержит компоненты дыхательной цепи и ATP-синтазу.

Альберт Л. Ленинджер, 1917–1986

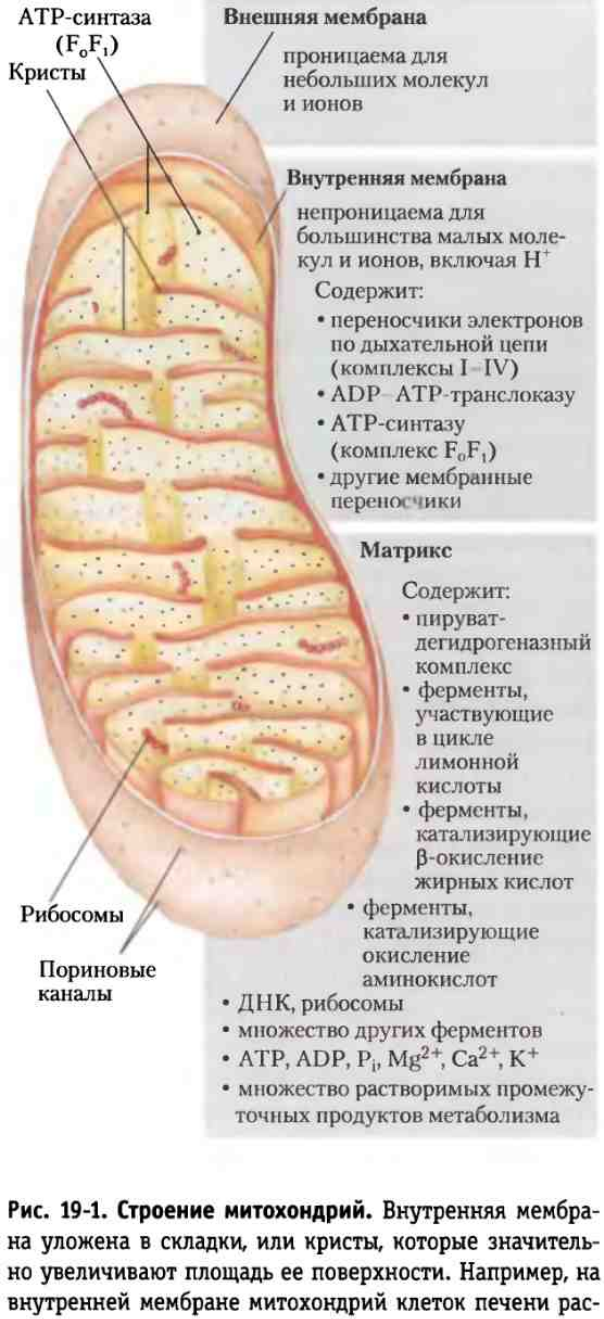


Рис. 19-1. Строение митохондрий. Внутренняя мембрана уложена в складки, или кристы, которые значительно увеличивают площадь ее поверхности. Например, на внутренней мембране митохондрий клеток печени располагается 10 000 систем переноса электронов и молекул АТР-синтазы, а на внутренней мембране митохондрий клеток сердца за счет большего числа крист — в три раза больше. Внутримитохондриальный пул коферментов и промежуточных продуктов биохимических реакций отделен от цитозольного пула физически и функционально. Митохондрии клеток беспозвоночных, растений и простейших имеют идентичную структуру, но сильно различаются по форме, размерам и степени складчатости внутренних мембран.

Митохондриальный матрикс, окруженный внутренней мембраной, содержит пируватдегидрогеназный комплекс и ферменты, участвующие в цикле лимонной кислоты, процессах β-окисления жирных кислот и окисления аминокислот, т. е. во всех путях окисления «топливных» молекул за исключением гликолиза, протекающего в цитозоле. Благодаря избирательной проницаемости внутренняя мембрана отделяет промежуточные соединения и ферменты, участвующие в метаболических превращениях в цитозоле, от метаболических процессов в матриксе. Внутренняя мембрана содержит и специальные переносчики, осуществляющие транспорт пирувата, жирных кислот и аминокислот или их α-кетопроизводных в матрикс, где они вовлекаются в цикл лимонной кислоты. В частности, специфические переносчики транспортируют в матрикс ADP и фосфат по мере того, как синтезированный АТР выводится из матрикса.

Электроны переносят универсальные акцепторы электронов

Окислительное фосфорилирование начинается с поступления электронов в дыхательную цепь. Большинство этих электронов возникает в результате действия дегидрогеназ, «собирающих» электроны на различных катаболических путях и доставляющих их к универсальным акцепторам электронов — никотинамиднуклеотидам (NAD^+ или $NADP^+$) или флавиннуклеотидам (FMN или FAD).

Дегидрогеназы, содержащие в качестве кофермента никотинамиднуклеотид, катализируют обратимые реакции, которые в общем виде можно записать следующим образом:

$$\text{Восстановленный субстрат} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{окисленный субстрат} + NADH + H^+$$

$$\text{Восстановленный субстрат} + NADP^+ \rightleftharpoons \text{окисленный субстрат} + NADPH + H^+$$

Большинство дегидрогеназ, участвующих в процессах катаболизма, содержат кофермент NAD^+ в качестве акцептора электронов. Некоторые из них локализованы в цитозоле, другие — в матриксе митохондрий, а третьи имеют как цитозольные, так и митохондриальные изоферментные формы (табл. 19-1).

Таблица 19-1 Некоторые важные реакции, катализируемые NAD(P)H-зависимыми дегидрогеназами

Реакция*	Локализация**
NAD-зависимые дегидрогеназы	
α-Кетоглутарат + CoA + NAD^+ ⟹ сукцинил-CoA + CO_2 + NADH + H^+	М
L-Малат + NAD^+ ⟹ оксалоацетат + NADH + H^+	М и Ц
Пируват + CoA + NAD^+ ⟹ ацетил-CoA + CO_2 + NADH + H^+	М
Глицеральдегид-3-фосфат + P_i + NAD^+ ⟹ 1,3-бисфосфоглицерат + NADH + H^+	Ц
Лактат + NAD^+ ⟹ пируват + NADH + H^+	Ц
β-Гидроксиацил-CoA + NAD^+ ⟹ β-кетоацил-CoA + NADH + H^+	М
NADP-зависимые дегидрогеназы	
Глюкозо-6-фосфат + $NADP^+$ ⟹ 6-фосфоглюконат + NADPH + H^+	Ц
NAD- или NADP-зависимые дегидрогеназы	
L-Глутамат + H_2O + $NAD(P)^+$ ⟹ α-кетоглутарат + NH_4^+ + NAD(P)H	М
Изоцитрат + $NAD(P)^+$ ⟹ α-кетоглутарат + CO_2 + NAD(P)H + H^+	М и Ц

* Эти реакции и соответствующие ферменты подробно обсуждаются в гл. 14–18.

** М — митохондрии, Ц — цитозоль.

NAD-зависимые дегидрогеназы отщепляют от окисляемых субстратов два атома водорода. Один из атомов водорода в форме гидрид-иона ($:H^-$) присоединяется к NAD^+, второй в виде иона H^+ переходит в среду (см. рис. 13-24). NADH и NADPH — водорастворимые переносчики электронов и могут в ходе реакции *обратимо* диссоциировать из комплекса с дегидрогеназами. NADH переносит полученные в ходе катаболических реакций электроны к началу дыхательной цепи — NADH-дегидрогеназному комплексу, описанному ниже. NADPH поставляет электроны главным образом для анаболических процессов. В клетках пулы NADH и NADPH с различными окислительно-восстановительными потенциалами строго разделены. Это достигается поддержанием отношения восстановленной формы к окисленной относительно высоким для NADPH и относительно низким для NADH. Ни NADH, ни NADPH не могут пройти через внутреннюю мембрану митохондрий, а переносимые ими электроны свободно пересекают мембрану в обоих направлениях.

Флавопротеины содержат флавиннуклеотиды FMN или FAD, связанные с белком прочными иногда ковалентными связями (см. рис. 13-27). Окисленные формы флавиннуклеотидов могут принимать от субстрата либо один электрон, переходя в форму семихинона, или два электрона — с образованием $FADH_2$ или $FMNH_2$. Передача электронов происходит вследствие того, что потенциал восстановления флавопротеина более положителен по сравнению с потенциалом восстановления окисляемого соединения. В отличие от коферментов NAD или NADP, стандартный потенциал восстановления флавиннуклеотидов зависит от связанного с ними белка. При взаимодействии с функциональными группами белка электронные орбитали флавинового кольца искажаются, изменяя относительную стабильность окисленной и восстановленной форм. Поэтому стандартный потенциал восстановления соответствует флавопротеину, участвующему именно в этой реакции, а не изолированным FAD или FMN. Флавиннуклеотид правильнее рассматривать как часть активного центра флавопротеина, чем как субстрат или продукт реакции переноса электронов.

Поскольку при окислительно-восстановительных реакциях флавопротеины участвуют в одно- или двухэлектронных переносах, они, по-видимому, играют роль переносчиков в реакциях с отщеплением двух электронов (как при дегидрировании) и в реакциях, где присоединяется только один электрон (как при восстановлении хинона до гидрохинона), что подробно обсуждается ниже.

Электроны проходят через цепь встроенных в мембрану переносчиков

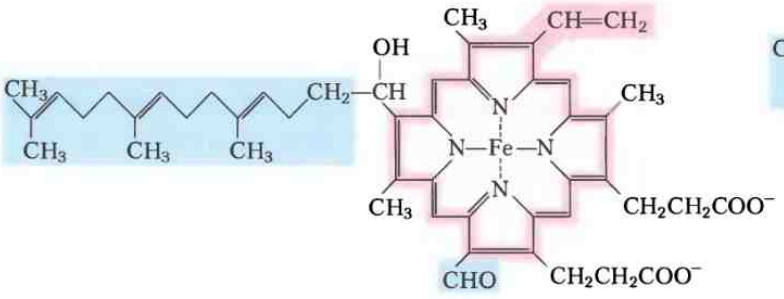
Дыхательная цепь митохондрий состоит из ряда последовательно действующих переносчиков электронов, многие из них — интегральные белки с простетическими группами, способными присоединять или отдавать один или два электрона. В процессе окислительного фосфорилирования перенос электронов может осуществляться тремя способами. Во-первых, путем прямого переноса, как, например, при восстановлении Fe^{3+} до Fe^{2+}. Во-вторых, путем переноса атома водорода ($H^+ + e^-$) и, в-третьих, путем переноса гидрид-иона ($:H^-$), несущего пару электронов. В окислительно-восстановительных реакциях заряд, эквивалентный одному электрону, называют **восстановительным эквивалентом**.

В переносе электронов в дыхательной цепи наряду с NAD и флавопротеинами участвуют гидрофобный хинон (убихинон) и железосодержащие белки двух типов — цитохромы и железосерные белки. **Убихинон (кофермент Q**, или просто **Q)** представляет собой жирорастворимый бензохинон с длинной боковой изопреноидной цепью **(рис. 19-2)**. Аналогами митохондриального переносчика электронов кофермента Q являются пластохинон в хлоропластах растений и менахинон у бактерий. Убихинон может присоединять как один электрон, переходя в радикал семихинона ($^{\bullet}QH$), так и два электрона, восстанавливаясь до убихинола QH_2 (см. рис. 19-2). Подобно флавопротеинам, убихинон функционирует между донором двух электронов и акцептором одного электрона. Небольшая гидрофобная молекула убихинона способна свободно диффундировать через двойной липидный слой внутренней мембраны митохондрии и осуществлять челночный перенос восстановительных эквивалентов между другими малоподвижными переносчиками электронов, встроенными в мембрану. Убихинон переносит как электроны, так и протоны, поэтому он играет центральную роль в сопряжении переноса электронов в дыхательной цепи и транспорта протонов из матрикса митохондрий в межмембранное пространство через внутреннюю мембрану.

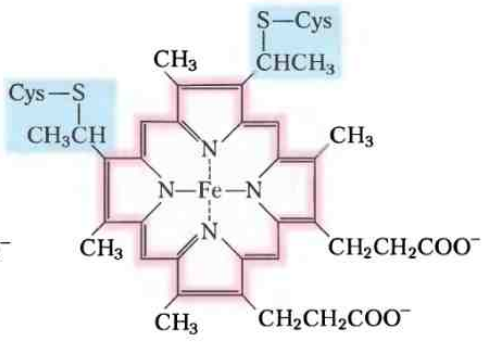
Рис. 19-2. Убихинон (Q, или кофермент Q). Для полного восстановления убихинона требуется два электрона и два протона. Процесс протекает в две стадии с промежуточным образованием радикала семихинона.

Цитохромы — это белки, имеющие характерные полосы поглощения в видимой области спектра благодаря наличию железосодержащих (гемовых) простетических групп **(рис. 19-3)**. Митохондрии содержат цитохромы трех классов *a*, *b* и *c*, различающихся спектрами поглощения. Восстановленная форма всех цитохромов содержит Fe^{2+} и имеет по три полосы поглощения в видимой области спектра **(рис. 19-4)**. Полоса поглощения цитохрома *a* сдвинута в длинноволновую область — около 600 нм, цитохрома *b* — около 560 нм, цитохрома *c* — около 550 нм. Для цитохромов одного класса часто указывают в нижнем индексе длину волны максимума поглощения, например b_{562}.

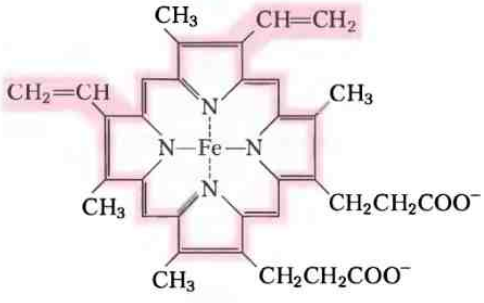
В цитохромах *a* и *b* гемовая группа связана с белком прочно, но не ковалентно. Напротив, в цитохромах *c* гем присоединяется к белку при помощи ковалентных связей, образованных с двумя остатками цистеина в белке (рис. 19-3). Аналогично флавопротеинам, стандартные восстановительные потенциалы гемового железа в цитохроме зависят от взаимодействия атома железа с боковыми цепями белка и вследствие этого для цитохромов различаются. Цитохромы *a* и *b* и некоторые цитохромы *c* представлены интегральными белками внутренней мембраны



Гем A
(содержится в цитохромах *a*)



Гем C
(содержится в цитохромах *c*)



Железопротопорфирин IX
(содержится в цитохромах *b*)

Рис. 19-3. Простетические группы цитохромов. Простетическая группа всех цитохромов состоит из четырех пятичленных азотсодержащих колец, образующих цикл порфирина. Четыре атома азота связаны координационными связями с центральным ионом железа в восстановленном (Fe^{2+}) или окисленном (Fe^{3+}) состоянии. Железопротопорфирин IX найден в цитохроме *b*, в гемоглобине и миоглобине (см. рис. 4-16, т. 1). Гем C в цитохроме *c* ковалентно связан с белком через тиоэфирные связи с двумя остатками цистеина. Гем A в цитохроме *a* содержит длинную изопреноидную боковую цепь у одного из пятичленных колец. Характерное сильное поглощение гемов в видимой области спектра обусловлено системой сопряженных двойных связей (выделены розовым).

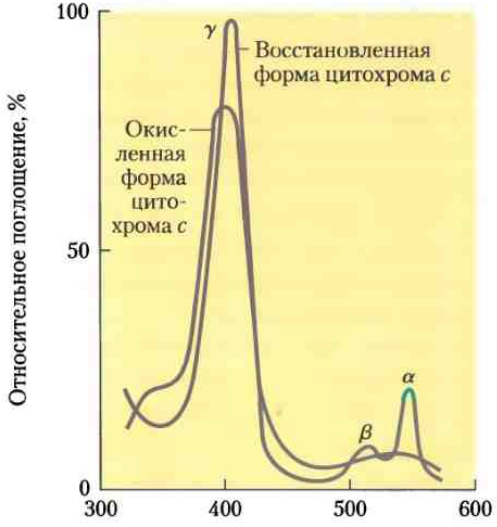


Рис. 19-4. Спектры поглощения окисленной (красная кривая) и восстановленной (синяя кривая) форм цитохрома *c*. α, β, γ — полосы поглощения восстановленной формы.

митохондрий. Исключение составляет митохондриальный цитохром *c*; это водорастворимый белок, удерживаемый силами электростатического притяжения на внешней стороне внутренней мембраны.

В **железо-серных белках** атомы железа не включены в гем, а связаны либо с атомами неорганической серы, либо с атомами серы, принадлежащими остаткам цистеина в полипептидной цепи фермента, либо с атомами серы обоих типов. Строение железо-серного центра может быть достаточно простым, когда там один атом Fe связан с четырьмя SH-группами цистеина, или более сложным — два или четыре атома железа (**рис. 19-5**). В **железо-серных белках Риске** (открыты Джоном С. Риске) один атом железа координирует два остатка гистидина, а не цистеина. Все железо-серные белки участвуют в одноэлектронных переносах, при которых в железо-серном кластере окисляется или восстанавливается один атом железа. В переносе электронов в митохондриях участвуют как ми-

нимум восемь железо-серных белков. Восстановительные потенциалы этих белков зависят от их микроокружения и лежат в интервале от −0,65 до +0,45 В.

Перенос электронов в дыхательной цепи митохондрий можно представить следующим образом. Электроны от NADH, сукцината или некоторых других первичных доноров попадают на флавопротеины, убихинон и далее по цепи железо-серных белков и цитохромов на молекулярный кислород. Рассмотрим методы изучения переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий и хлоропластов.

Один из методов основан на экспериментальном измерении стандартных восстановительных потенциалов переносчиков электронов, т. е. окислительно-восстановительной системы (см. табл. 19-2). Поскольку электроны самопроизвольно переходят от систем с более низким (более отрицательным) значением E'° к системам с более высоким значением E'°, перенос электронов от окисляемых субстратов к кислороду происходит по цепочке промежуточных переносчиков в направлении увеличения восстановительного потенциала этих переносчиков. Направление потока электронов в дыхательной цепи митохондрий было установлено на основе экспериментальных значений стандартных восстановительных потенциалов для цепочки переносчиков электронов: NADH → Q → цитохром b → цитохром c_1 → цитохром c → цитохром a → цитохром a_3 → O_2. Следует отметить, что значения стандартных восстановительных потенциалов биологических редокс-систем в условиях клетки зависят от концентрации их восстановленных и окисленных форм и *не обязательно равны* значениям, измеренным в стандартных условиях (см. уравнение 13-5 на с. 47).

Второй экспериментальный метод определения цепи переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий основан на укорачивании этой цепи. Для этого в отсутствие кислорода (акцептор электронов) в митохондрию вводят донор электронов. Затем в систему вводят кислород O_2 и определяют скорость окисления переносчиков спектрофотометрически. Переносчик, ближайший к концу дыхательной цепи, т. е. к O_2, окисляется в первую очередь, затем второй от конца цепочки переносчиков и т. д. Установленная таким образом

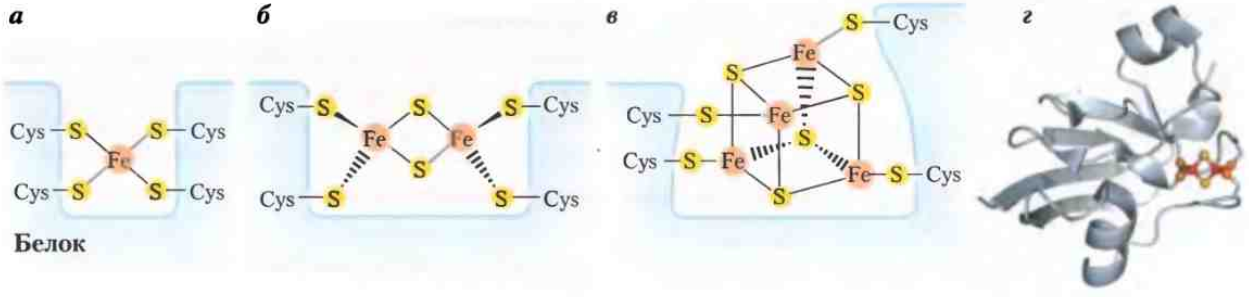


Рис. 19-5. Строение железо-серных центров. *а* — железо-серный центр простого строения. Один ион железа окружен атомами серы, принадлежащими четырем остаткам цистеина в полипептидной цепи фермента. *б* и *в* — железо-серные центры более сложного строения. Каждый атом железа связан как с атомами неорганической серы, так и с атомами серы, принадлежащими остаткам цистеина в белковой части фермента. *г* — расположение атомов железа (красные кружочки), неорганической серы (желтые кружочки) и серы в остатках цистеина (оранжевые кружочки) в железо-серном центре Fe_2S_2 ферредоксина, выделенного из клеток цианобактерии *Anabaena* 7120 (PDB ID 1FRD). Следует отметить, что в формульных обозначениях железо-серных центров указывается только число атомов неорганической серы. Например, Fe_2S_2 — два атома серы. На самом же деле в этом центре атом железа окружен четырьмя атомами серы — двумя атомами неорганической серы и двумя атомами серы, принадлежащими остаткам цистеина. Стандартный потенциал восстановления железа в железо-серных центрах зависит от строения центра и природы его взаимодействий с белковой частью фермента.

Таблица 19-2 Стандартные восстановительные потенциалы некоторых сопряженных окислительно-восстановительных пар, играющих важную роль в окислительном метаболизме

Окислительно-восстановительные реакции (полуреакция)	E'°, В
$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$	−0,414
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADH$	−0,320
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightarrow NADPH$	−0,324
NADH-дегидрогеназа (FMN) + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ NADH-дегидрогеназа ($FMNH_2$)	−0,30
Убихинон + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ убихинол	0,045
Цитохром *b* (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ цитохром *b* (Fe^{2+})	0.077
Цитохром c_1 (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ цитохром c_1 (Fe^{2+})	0,22
Цитохром *c* (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ цитохром *c* (Fe^{2+})	0,254
Цитохром *a* (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ цитохром *a* (Fe^{2+})	0,29
Цитохром a_3 (Fe^{3+}) + $e^- \rightarrow$ цитохром a_3 (Fe^{2+})	0,55
$\frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	0,8166

последовательность переносчиков электронов в митохондриальной дыхательной цепи хорошо совпадает с результатами, полученными при измерении стандартных восстановительных потенциалов.

Третий метод основан на исследовании действия специфических ингибиторов, блокирующих перенос электронов на определенных участках дыхательной цепи. При введении ингибитора в цепь переноса электронов в ней возникает участок, где изменяется окислительно-восстановительное состояние переносчиков. В присутствии O_2 и донора электронов переносчики электронов перед заблокированным участком восстанавливаются, а сразу после этого участка — окисляются, что и регистрируют спектрофотометрически **(рис. 19-6)**. Установленная таким образом цепь переносчиков электронов хорошо согласуется с результатами предыдущих двух методов.

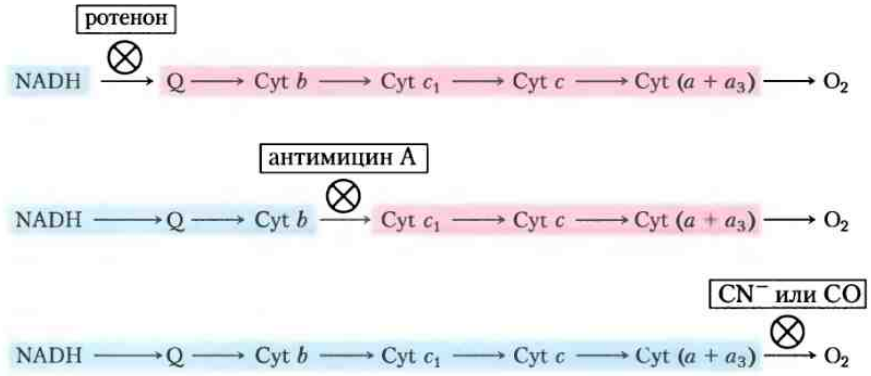


Рис 19-6. Определение последовательности переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий. Метод основан на изучении воздействия ингибиторов переноса электронов на степень окисления каждого переносчика. В присутствии донора электронов и кислорода O_2 в качестве акцептора электронов ингибитор подавляет перенос электронов на определенных участках дыхательной цепи, изменяя окислительно-восстановительное состояние переносчиков. Переносчики, расположенные до блокированного участка, восстанавливаются (окрашены в голубой цвет), а после блокированного участка — окисляются (показаны розовым).

Таблица 19-3 Белки, участвующие в переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий

Комплекс фермента с белком	Масса, кДа	Число субъединиц*	Простетические группы
NADH-дегидрогеназа (комплекс I)	850	43 (14)	FMN, FeS
Сукцинатдегидрогеназа (комплекс II)	140	4	FAD, FeS
Убихинон–цитохром *c*–оксиредуктаза (комплекс III)	250	11	гемы, FeS
Цитохром *c***	13	1	гем
Цитохромоксидаза (комплекс IV)	160	13 (3–4)	гемы, Cu_A, Cu_B

* В скобках указано число субъединиц в аналогичном комплексе, выделенном из клеток бактерий.

** Цитохром *c* не входит в состав ферментного комплекса; это водорастворимый мембранный белок, свободно передвигающийся между комплексами III и IV.

Переносчики электронов в дыхательной цепи митохондрий образуют полиферментные комплексы

Переносчики электронов организованы в полиферментные комплексы — структурно обособленные надмолекулярные ансамбли белковых молекул, встроенные во внутреннюю мембрану. Из внутренней мембраны митохондрий путем обработки мягким детергентом удалось выделить четыре комплекса функционально связанных между собой переносчиков электронов. Каждый из них катализирует перенос электронов на определенном участке дыхательной цепи (табл. 19-3; **рис. 19-7**). Комплексы I и II катализируют перенос электронов на убихинон от NADH и сукцината соответственно. Комплекс III переносит электроны от восстановленной формы убихинона на цитохром *c*, а комплекс IV завершает передачу электронов по дыхательной цепи, передавая их от цитохрома *c* непосредственно на кислород.

Далее обсуждаются структурные особенности и функции белковых комплексов, участвующих в переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий.

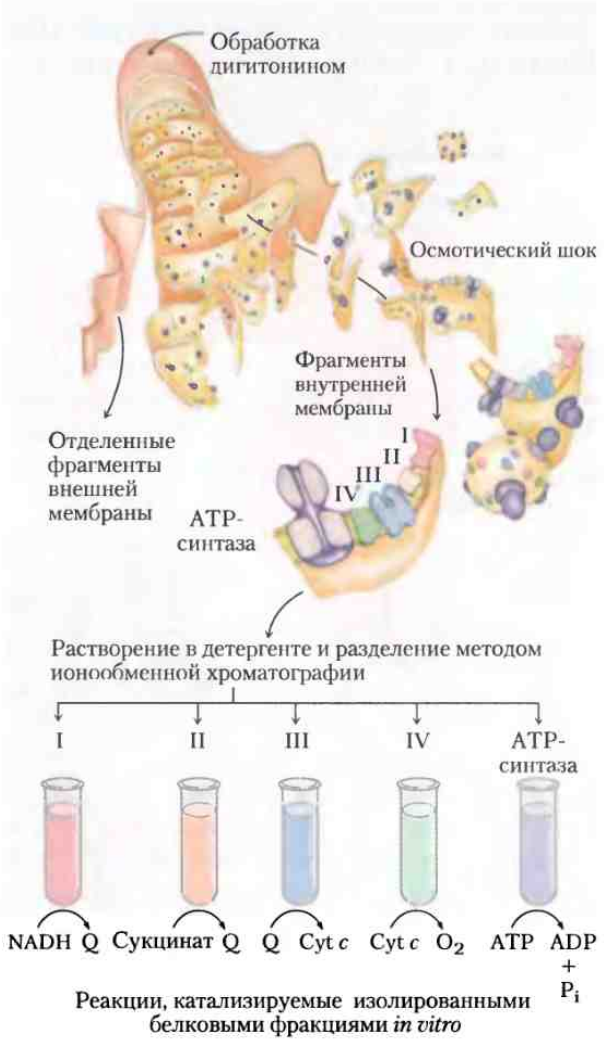


Рис. 19-7. Выделение из митохондрий ферментных комплексов, участвующих в переносе электронов в дыхательной цепи. Внешнюю мембрану митохондрий отделяют, обрабатывая митохондрии детергентом дигитонином. Внутреннюю мембрану отделяют от митохондриального матрикса методом осмотического шока. Фрагменты внутренней мембраны осторожно растворяют во втором детергенте и из этого раствора выделяют методом ионообменной хроматографии белковые комплексы I–IV, участвующие в процессах митохондриального переноса электронов, и АТР-синтазу, которую иногда называют комплексом V (см. табл. 19-3). Комплексы I–IV в изолированном состоянии катализируют передачу электронов от NADH или сукцината к промежуточным переносчикам (Q и цитохрому *c*), а затем к молекулярному кислороду. Изолированная АТР-синтаза обладает *in vitro* только АТР-гидролизующей (АТРазной) активностью, но не может катализировать синтез АТР.

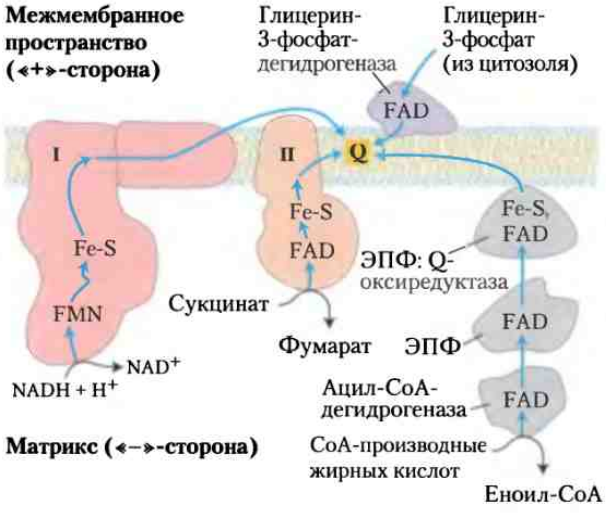


Рис. 19-8. Перенос электронов от NADH, сукцината, CoA-производных жирных кислот и глицерин-3-фосфата к убихинону. От NADH электроны попадают на флавопротеин, затем на ряд железо-серных белков в комплексе I, с которого переносятся на кофермент Q. От сукцината электроны передаются через флавопротеин на железо-серные центры в комплексе II и затем на кофермент Q. Глицерин-3-фосфат отдает электроны флавопротеину глицерин-3-фосфатдегидрогеназе, расположенной на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий, откуда электроны также попадают на кофермент Q. Ацил-CoA-дегидрогеназа (первый фермент в цикле β-окисления жирных кислот) отдает электроны электронпереносящему флавопротеину (ЭПФ), с которого они попадают на кофермент Q через ЭПФ-убихинон-оксиредуктазу.

Комплекс I осуществляет перенос электронов от NADH к убихинону. Схема взаимодействия комплекса I с комплексом II и убихиноном в процессе передачи электронов представлена на **рис. 19-8**. **Комплекс I (NADH-убихинонредуктаза**, или **NADH-дегидрогеназа)** состоит из 42 различных полипептидных цепей и включает в качестве простетической группы FMN и не менее шести железо-серных центров. Методом электронной спектроскопии высокого разрешения установле-

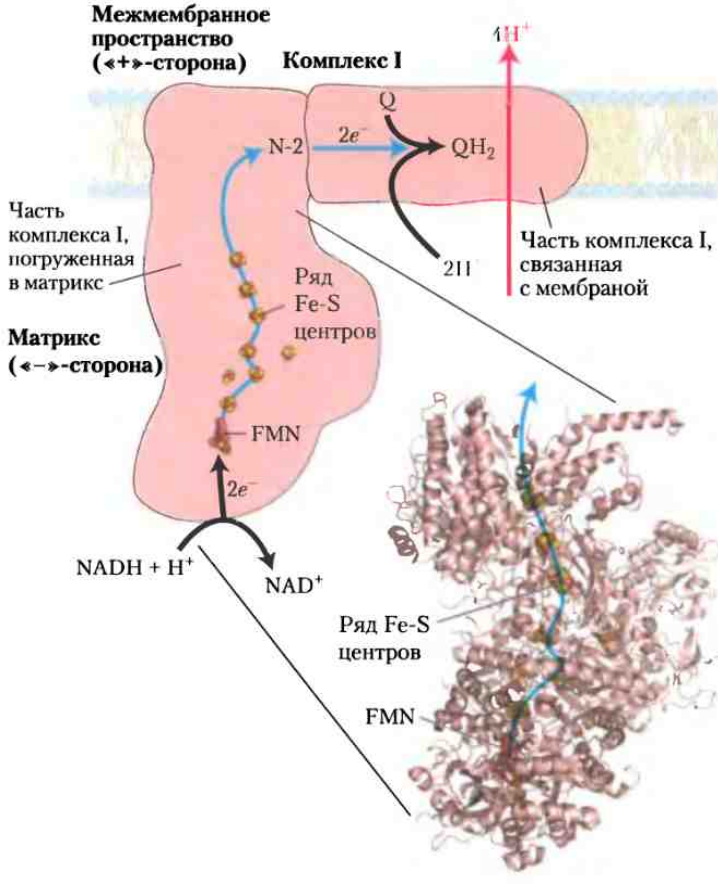


Рис. 19-9. Строение NADH-убихинон-оксидоредуктазы (комплекса I). Комплекс I осуществляет перенос иона водорода от NADH на FMN, от которого два электрона переносятся через ряд FeS-центров на железо-серный белок N-2, локализованный в погруженной в матрикс части комплекса I. Выступающий в матрикс домен удалось кристаллизовать и изучить методом рентгеноструктурного анализа (PDB ID 2FUG); структура мембранного домена комплекса I пока неизвестна. От группы белков N-2 электроны переносятся в прикрепленную к мембране часть комплекса, где они восстанавливают убихинон до убихинола QH_2, диффундирующего затем в двойной липидный слой мембраны. Перенос каждой пары электронов сопровождается выкачиванием из матрикса четырех протонов. Механизм сопряжения переноса электронов и протонов в комплексе I недостаточно ясен. Предположительно, в комплексе I, как и в комплексе III, электроны и протоны переносятся коферментом Q, совершающим особые циклические превращения, называемые Q-циклами (рис. 19-12). Молекула QH_2 участвует в переносе пары электронов дважды. На поверхности внутренней мембраны в результате выкачивания протонов создается электрохимический потенциал. Внутренняя сторона внутренней мембраны заряжается отрицательно «–», внешняя — положительно «+». Некоторое количество свободной энергии, выделяющейся при переносе электронов и расходуемой на синтез ATP, запасается в виде электрохимического потенциала.

Таблица 19-4 Химические соединения, нарушающие процесс окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования

Тип нарушения	Химическое соединение	Специфическое действие
Подавление переноса электронов	Цианид-ион Монооксид углерода	Блокируют цитохромоксидазу
	Антимицин А	Блокирует перенос электронов от цитохрома *b* к цитохрому c_1
	Миксотиазол Ротенон Амитал Пирицидин А	Блокируют перенос электронов от FeS-центра на убихинон
	3-(3,4-Дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина	Конкурирует с Q_B за связывание с активным центром ФС II
Ингибирование АТР-синтазы	Ауровертин	Блокирует комплекс F_1
	Олигомицин Вентурицидин	Блокируют комплексы F_o и CF_o
	Дициклогексилкарбодиимид	Блокирует перенос протонов через комплексы F_o и CF_o
Разобщение дыхания и фосфорилирования	Цианид-*пара*-трифторметоксидифенилгидразин 2,4-Динитрофенол	Гидрофобные переносчики протонов
	Валиномицин	K^+-ионофор
	Термогенин	Разобщающий белок; содержится в буром жире; образует поры для переноса H^+ во внутренней мембране митохондрий
Ингибирование обмена ATP–ADP	Атрактилозид	Ингибирует адениннуклеотидтранслоказу

но, что комплекс I имеет форму латинской буквы L, один конец которой погружен в матрикс, а другой прикреплен к мембране (**рис. 19-9**). Комплекс I катализирует два протекающих одновременно и связанных между собой процесса. Во-первых, экзергонический процесс передачи гидрид-иона от NADH на убихинон и поглощение протона из матрикса, что можно представить в виде следующего уравнения:

$$NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2 \quad (19\text{-}1)$$

Во-вторых, эндергонический процесс выкачивания четырех протонов из матрикса и перенос их через внутреннюю мембрану в межмембранное пространство, т. е. только в одну сторону (**векторно**). На это затрачивается часть энергии переносимых по цепи электронов. Поскольку каждый протон несет положительный заряд, теряющий протоны матрикс заряжается отрицательно, а приобретающее протоны межмембранное пространство положительно. Чтобы подчеркнуть векторный транспорт протонов, суммарное уравнение часто записывают с соответствующими нижними индексами, указывающими местонахождение протона: «+» для положительно заряженной стороны внутренней мембраны, обращенной в межмембранное пространство, «–» для отрицательно заряженной стороны, прилегающей к матриксу.

$$NADH + 5H^+_{(-)} + Q \rightarrow \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{(+)} \quad (19\text{-}2)$$

Некоторые химические соединения блокируют перенос электронов от железо-серных центров комплекса I на убихинон, останавливая весь процесс окислительного фосфорилирования. Например, амитал — лекарственный препарат из группы барбитуратов, ротенон — содержащийся в растениях и используемый в качестве инсектицида, антибиотик пирицидин А (см. табл. 19-4).

Во внутренней митохондриальной мембране полностью восстановленная форма убихинона убихинол QH_2 (рис. 19-2) диффундирует от комплекса I к комплексу III. В комплексе III при переносе протона из матрикса в межмембранное пространство QH_2 окисляется до Q.

Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа), описанный в гл. 16, **переносит электроны от сукцината на убихинон Q** и является единственным ферментом цикла лимонной кислоты, прочно связанным с митохондриальной мембраной (с. 198). Комплекс II имеет меньший размер, чем комплекс I, и менее сложное строение. Он включает пять простетических групп двух типов и четыре субъединицы (**рис. 19-10**). Субъединицы C и D комплекса II — трансмембранные интегральные белки, спирали которых трижды пересекают мембрану. В эти субъединицы включены гемовые группы типа *b* и центр связывания с убихиноном — конечным акцептором электронов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых комплексом II. Субъединицы A и B комплекса II простираются в митохондриальный матрикс (в бактериальных клетках — в цитозоль) и несут три железо-серных центра типа Fe_2S_2, а также прочносвязанный с апоферментом кофермент FAD и центр связывания с сукцинатом — субстратом сукцинатдегидрогеназы. Общая длина пути электронов от центра связывания с сукцинатом до FAD и затем через FeS-центры к центру связывания убихинона составляет не более 40 Å. Расстояние между отдельными переносчиками электронов в этой цепи не превышает 11 Å, что оптимально для быстрого переноса электронов (рис. 19-10).

Гем *b* в комплексе II, по-видимому, не переносит электроны, а лишь уменьшает вероятность неполного восстановления молекулярного кислорода до H_2O, что происходит в результате неферментативного переноса («утечки») электронов на пути от сукцината к O_2. «Утечка» электронов приводит к образованию токсичных для клеток **активных форм кислорода (АФК)**: пероксида водорода и **супероксидного радикала** $^{\bullet}O_2^-$, что подробно обсуждается ниже. Причиной образования большого количества АФК в процессе окисления сукцината могут быть точечные мутации полипептидных цепей в комплексе II на участках около гема *b* или центра связывания с хиноном. У людей с такими мутациями развивается наследственная болезнь параганглиома — доброкачественные опухоли головы и шеи, обычно в области сонной артерии — органа, наиболее чувствительного к уровню кислорода в крови. ■

В дыхательной цепи на убихинон, минуя комплекс II, поступают электроны от всех, кроме сук-

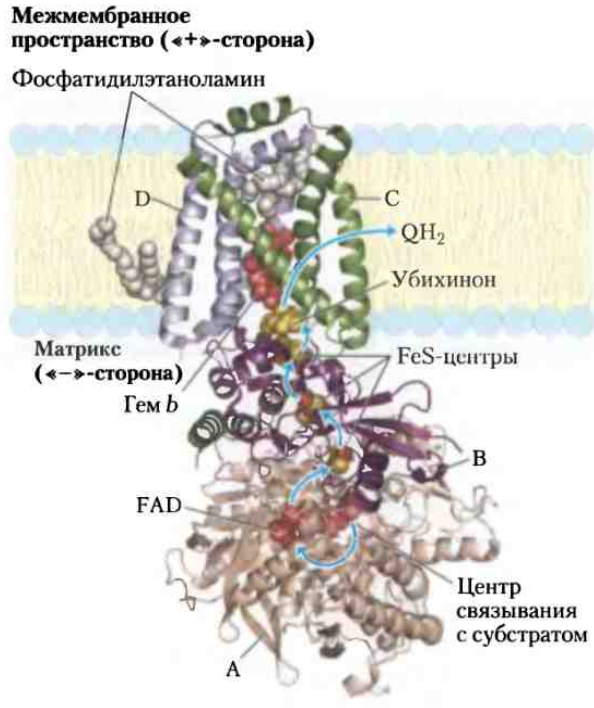


Рис. 19-10. Строение комплекса II (сукцинатдегидрогеназы) (PDB ID 1NEK). Этот комплекс (показан фермент, изолированный из сердца свиньи) состоит из двух субъединиц C и одной D, пронизывающих мембрану насквозь. В цитоплазме находятся субъединицы B и A. В полипептидной цепи A после простетической группы FAD расположен центр связывания с сукцинатом. Субъединица B включает три FeS-центра. Убихинон связан с субъединицей C. Гем *b* расположен между субъединицами C и D. Две молекулы фосфатидил-этаноламина так прочно связаны с субъединицей D, что кристаллизуются вместе с белком. Электроны, путь которых обозначен голубыми стрелками, движутся от сукцината к FAD и далее через три железо-серных центра к убихинону. Гем *b* не участвует в переносе электронов, но препятствует образованию активных форм кислорода (АФК) в случае «утечки» электронов.

цината, субстратов, окисленных митохондриальными мембранными дегидрогеназами. На первой стадии β-окисления ацил-CoA-производных жирных кислот под действием флавопротеина **ацил-CoA-дегидрогеназы** электроны от субстрата переносятся на FAD — простетическую группу ацил-CoA-дегидрогеназы (см. рис. 17-8). Восстановленная форма ацил-CoA-дегидрогеназы передает затем электроны специфическому переносчику электронов ЭПФ, который, в свою

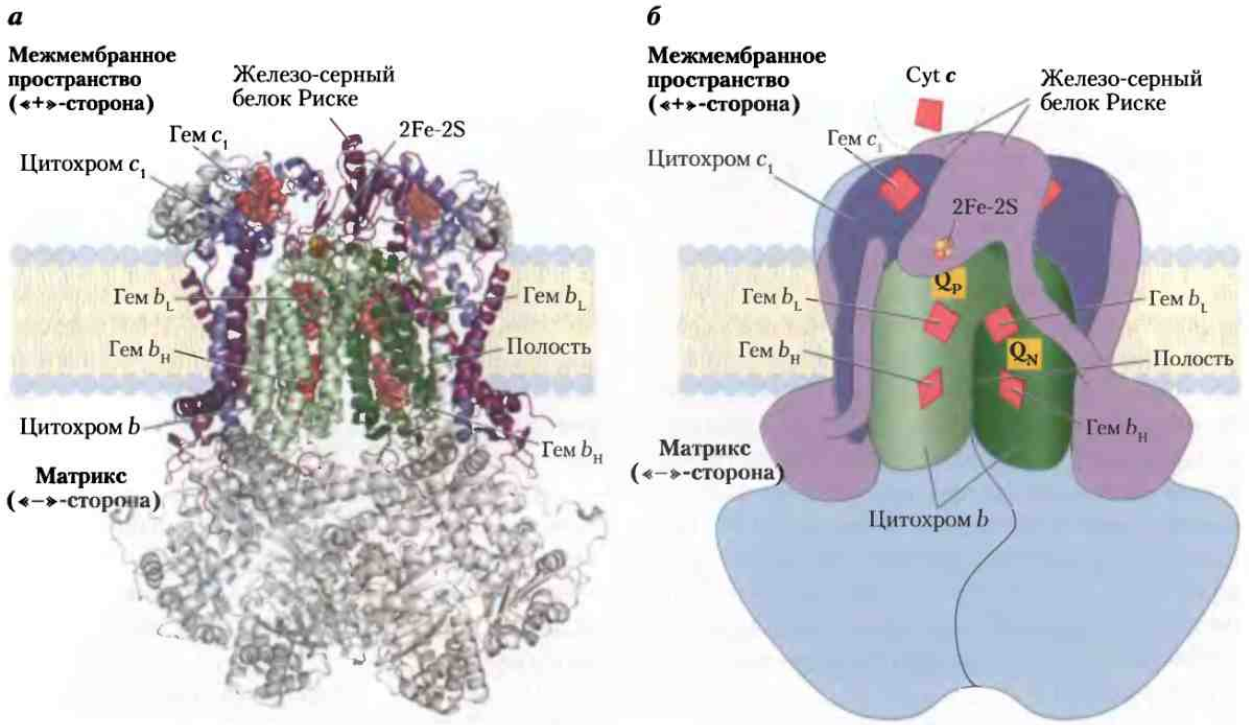


Рис. 19-11. Цитохром bc_1 (комплекс III). Комплекс III включает два идентичных мономера, объединенных в функциональный ансамбль. Каждый из мономеров содержит 11 различных субъединиц. *а* — в функциональное ядро каждого мономера входят три субъединицы: цитохром b, (зеленая спираль), включающий гемы b_H и b_L, железо-серный белок Риске (фиолетовые шарики) с двумя железо-серными центрами Fe_2S_2 и цитохром *c* (синяя спираль), имеющий один гем (PDB ID 1BGY). *б* — видно, как цитохром c_1 и железо-серный белок Риске выступают над положительно заряженной поверхностью внутренней мембраны, что позволяет им взаимодействовать с цитохромом c, который расположен в межмембранном пространстве и не входит в состав комплекса III. Два центра связывания с убихиноном $Q_{«-»}$ и $Q_{«+»}$ могут присоединять два разных ингибитора, блокирующих окислительное фосфорилирование. Антибиотик антимицин А, блокирующий перенос электронов от гема b_H на убихинон, присоединяется к центру $Q_{«-»}$, расположенному близко от гема b_H на отрицательно заряженной (матриксной) стороне внутренней мембраны. Миксотиазол, блокирующий перенос электронов от убихинола QH_2 на железо-серный белок Риске, присоединяется к центру $Q_{«+»}$, расположенному около Fe_2S_2-центра и гема b_L на положительно заряженной стороне внутренней мембраны. Димерная структура комплекса III важна для его каталитической активности. На границе соприкосновения двух мономеров находятся углубления, в каждом из которых расположен $Q_{«+»}$-центр одного мономера и $Q_{«-»}$-центр другого мономера. Промежуточные продукты окислительно-восстановительных превращений убихинона движутся внутри этих углублений.

Комплекс III может существовать в виде двух конформаций (не показано). В одной из них FeS-центр белка Риске повернут в сторону гема цитохрома c_1, являющегося акцептором электронов этого белка, и удален от цитохрома *b* и центра связывания убихинола QH_2, от которых электроны переносятся на железо-серный центр белка Риске. В другой конформации FeS-центр белка Риске повернут от цитохрома c_1 в сторону цитохрома *b*. Поскольку локализация белка Риске в комплексе III зависит от степени окисления его железо-серного центра, при окислительно-востановительных реакциях в дыхательной цепи митохондрий комплекс III переходит из одной конформации в другую.

очередь, через **ЭПФ-убихинон-оксиредуктазу** переносит электроны на убихинон (рис. 19-8). Глицерин-3-фосфат, образующийся либо в ходе гликолиза при восстановлении дигидроксиацетонфосфата, либо из глицерина, выделяющегося при расщеплении триацилглицерина, окисляется **глицерин-3-фосфатдегидрогеназой** — ферментом из класса флавопротеинов (см. рис. 17-4). Глицерин-3-фосфатдегидрогеназа локализована на внешней стороне внутренней мембраны митохондрий и, подобно сукцинатдегидрогеназе и ацил-CoA-дегидрогеназе, передает электроны на убихинон (рис. 19-8). Роль глицерин-3-фосфатдегидрогеназы в так называемой глицеринфосфатной челночной системе переноса восстановительных эквивалентов от цитозольного NADH в митохондриальный матрикс обсуждается в разд. 19.2 (см. рис. 19-30). Действие всех этих ферментов направлено на восстановление убихинона до убихинола QH_2, который затем вновь окисляется комплесом III.

Комплекс III (комплекс цитохромов bc_1, или убихинон-цитохром-*c*-оксиредуктаза) — следующее после комплекса II звено в дыхательной цепи; он переносит электроны от убихинона на цитохром *c*. Комплекс III также осуществляет связь между переносом электронов от убихинола QH_2 на цитохром *c* и транспортом протонов из матрикса в межмембранное пространство. Полная расшифровка структуры огромного белкового комплекса III **(рис. 19-11)** и комплекса IV, свойства которого обсуждаются далее, была осуществлена по результатам рентгеноструктурного анализа в 1985–1998 гг. Это был важный этап в изучении процессов переноса электронов по митохондриальной дыхательной цепи и биохимических функций дыхательных комплексов.

Функциональной единицей комплекса III является димер, в котором две мономерные единицы цитохрома *b* окружают полость в середине мембраны, где убихинон может свободно перемещаться со стороны матрикса (участок $Q_{\leftarrow}$ в одном мономере) в межмембранное пространство (участок $Q_{\rightarrow}$ в другом мономере) для переноса электронов и протонов через внутреннюю мембрану митохондрий (рис. 19-11, *б*).

На основе данных о строении комплекса III и результатов биохимических исследований был предложен механизм переноса электронов и протонов через комплекс III (**Q-цикл**). Общее уравнение окислительно-восстановительных реакций в Q-цикле **(рис. 19-12)** можно представить так:

$$QH_2 + 2\ \text{Cyt}\ c_1\,(\text{окисл.}) + 2H^+_{\leftarrow} \rightarrow$$
$$\rightarrow Q + 2\ \text{Cyt}\ c_1\,(\text{восст.}) + 4H^+_{\rightarrow} \qquad (19\text{-}3)$$

В процессе циклических превращений переносчик двух электронов убихинон (QH_2) передает электроны на одноэлектронные переносчики — цитохромы b_{562}, b_{566}, c_1 и цитохром *c*, а также переносит протоны из матрикса в межмембранное пространство.

При прохождении каждой пары электронов через комплекс III из матрикса выкачивается четыре протона. Сложный путь электронов через комплекс III заканчивается окислением убихинола QH_2 до Q и восстановлением двух молекул цитохрома c_1.

Цитохром *c* — водорастворимый межмембранный белок с единственной гемовой группой. После поступления электронов от комплекса III на гем цитохрома *c* происходит передвижение цитохрома *c* к комплексу IV, и цитохром *c* передает свои электроны на активный центр комплекса IV из двух атомов меди.

Комплекс IV (цитохромоксидаза) переносит электроны от цитохрома *c* на O_2, восстанавливая его до H_2O и тем самым завершая перенос электронов в митохондриальной дыхательной цепи. Комплекс IV — большая белковая молекула (13 субъединиц; M_r = 204 000), локализованная во внутренней мембране митохондрий. Этот комплекс, выделенный из бактериальных клеток, состоит не менее чем из 3–4 субъединиц (при меньшем количестве нарушается его работа) **(рис. 19-13)**.

Митохондриальная субъединица II комплекса IV содержит два иона Cu, связанных через –SH-группы с двумя остатками цистеина и образующих двухъядерный центр Cu_A (см. рис. 19-13, *б*), аналогичный Fe_2S_2-центрам железо-серных белков. Субъединица I содержит два гема (*a* и a_3) и ион меди Cu_B, которые образуют второй двухъядерный центр, присоединяющий электроны от гема *a* и передающий их затем на молекулярный кислород, находящийся в центре связывания гема a_3.

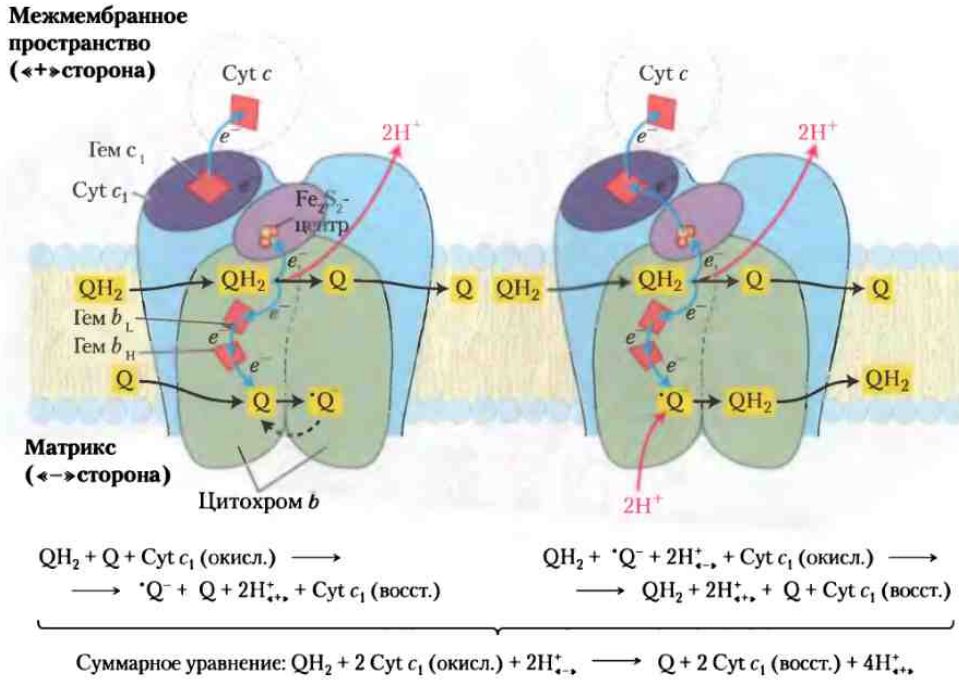


Рис. 19-12. Две стадии Q-цикла. Направление движения протонов через комплекс III показано голубыми стрелками. На первой стадии (*слева*) Q на отрицательно заряженной стороне восстанавливается, образуя радикал семихинона, который на второй стадии (*справа*) превращается в QH_2. Две молекулы QH_2 окисляются до Q на положительно заряженной стороне мембраны, высвобождая в межмембранное пространство по два протона от каждой молекулы QH_2 (всего высвобождаются четыре протона). Каждая молекула QH_2 передает через FeS-центр белка Риске один электрон цитохрому c_1, а через цитохром *b* — второй протон молекуле Q, расположенной ближе к отрицательно заряженной стороне мембраны. В этих двух стадиях молекула Q восстанавливается до QH_2. На восстановление одной молекулы Q расходуется два перенесенных из матрикса протона.

Электроны, поступившие в комплекс IV от цитохрома *c*, движутся от Cu_A-центра к гему *a*, затем, попав в центр a_3–Cu_B гема, к молекулярному кислороду (**рис. 19-14**). Каждый раз, когда в комплекс IV поступает четыре электрона, он получает из матрикса через отрицательно заряженную поверхность мембраны также четыре протона H^+, которые отщепляются от субстратов и необходимы для превращения O_2 в две молекулы H_2O. Энергия, выделяемая в этом окислительно-восстановительном процессе, используется для высвобождения протонов в межмембранное пространство (один протон на один электрон, перенесенный через комплекс IV). При этом увеличивается электрохимический потенциал, возникший в результате окислительно-восстановительных процессов и транспорта протонов в комплексах I и III. В общем виде реакции, протекающие в комплексе IV, можно записать следующим образом.

$$4\ \text{Cyt}\ c\ (\text{восст.}) + 8H^+_{-\cdot} + O_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow 4\ \text{Cyt}\ c\ (\text{окисл.}) + 4H^+_{+\cdot} + 2H_2O \qquad (19\text{-}4)$$

Полное восстановление молекулярного кислорода O_2 происходит в окислительно-восстановительных центрах в несколько стадий, в результате одноэлектронных переносов, без высвобождения неполностью восстановленных интермедиатов, таких как пероксид водорода или гидроксильный свободный радикал, т. е. высокореакционных частиц, способных повредить клетку. Эти агрессивные частицы остаются свя-

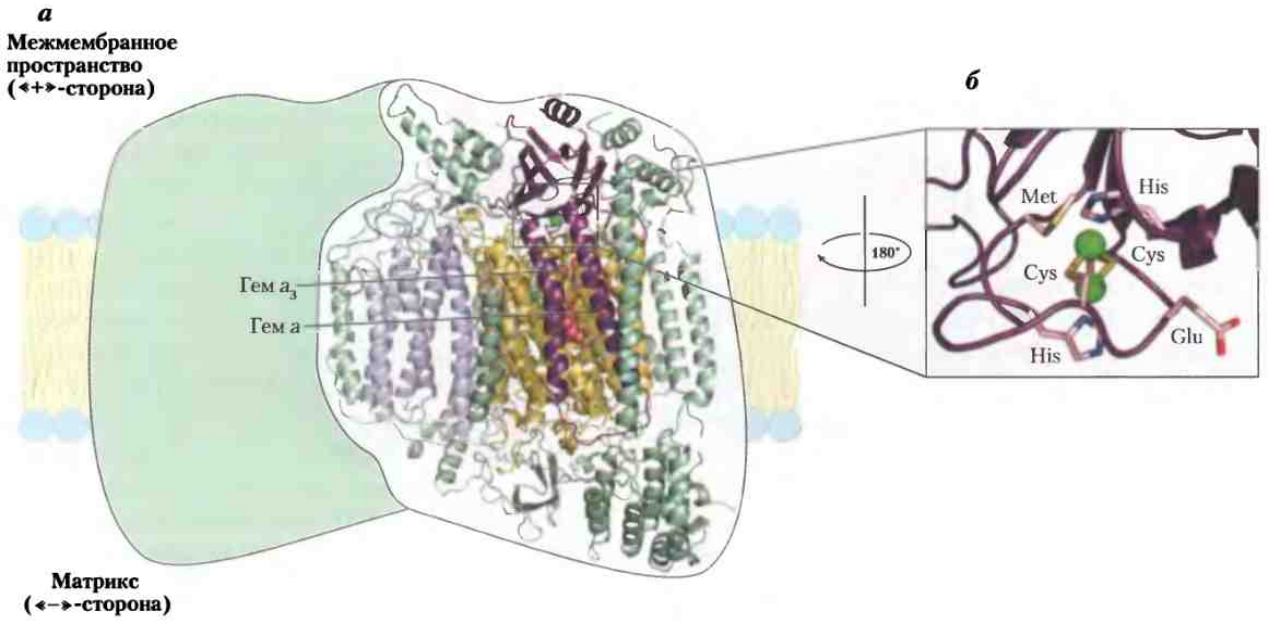


Рис. 19-13. Строение цитохромоксидазы (комплекса IV). Этот комплекс из митохондрий клеток быка состоит из 13 субъединиц, но здесь показаны только четыре центральные субъединицы (PDB ID 1OCC). *а* — в комплексе IV четыре субъединицы, каждая — димер из двух одинаковых частей. Субъединица I (желтая спираль) содержит гемы *а* и a_3 и ион меди Cu_B (зеленый шарик). Гем a_3 и Cu_B образуют двухъядерный активный Fe-Cu-центр. В субъединице II (фиолетовая спираль) два иона меди соединены с белковой частью комплекса через –SH-группы остатков цистеина и образуют двухъядерный центр Cu_A, аналогичный Fe_2S_2-центрам в железо-серных белках. Двухъядерный центр Cu_A и центр связывания с цитохромом *с* расположены в субъединице II на участке, выступающем в межмембранное пространство на положительно заряженной стороне внутренней мембраны. Субъединица III (сиреневая) нужна для быстрого переноса протонов через субъединицу II. Функция субъединицы IV (зеленая) пока неясна. *б* — двухъядерный центр Cu_A. Ионы меди равнозначны. При восстановлении образуется центр $Cu^{1+}Cu^{1+}$; при окислении — $Cu^{1,5+}Cu^{1,5+}$. Ионы меди окружены шестью аминокислотными остатками: два His, два Cys, Glu и Met.

занными с комплексом слабыми связями до тех пор, пока полностью не завершится образование молекулы воды.

Митохондриальные комплексы могут образовывать ассоциаты — «респирасомы»

Получено много данных, подтверждающих, что в неповрежденных митохондриях комплексы дыхательной цепи прочно связаны на внутренней мембране, образуя **«респирасомы»** — функциональные комбинации двух или большего числа электронтранспортных комплексов. Например, при экстракции в мягких условиях мембран митохондрий комплекс III выделяется вместе с комплексом I и остается связанным с ним даже при электрофорезе в мягких условиях. Аналогично удалось выделить вместе комплексы III и IV, причем по данным электронографического исследования размеры и форма этих комплексов соответствуют распределению электронной плотности **(рис. 19-15)**. Кинетика электронного транспорта через несколько комплексов при их тесном контакте и полном отсутствии контакта (два предельных механиз-

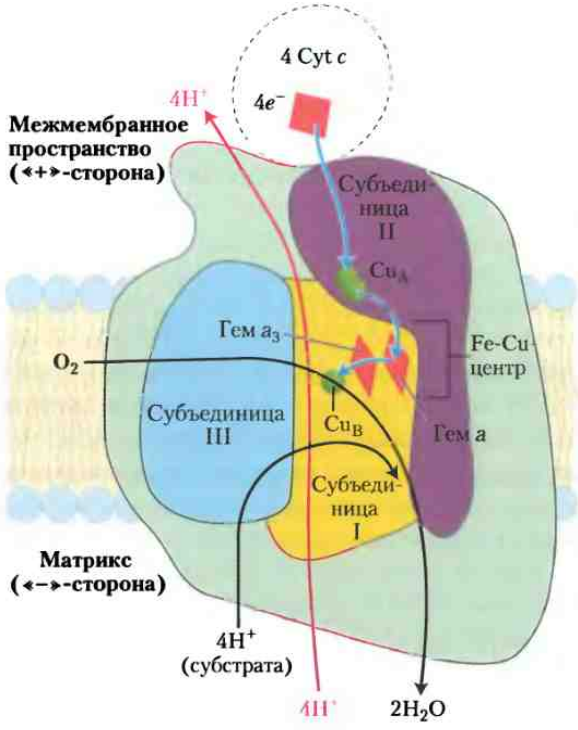
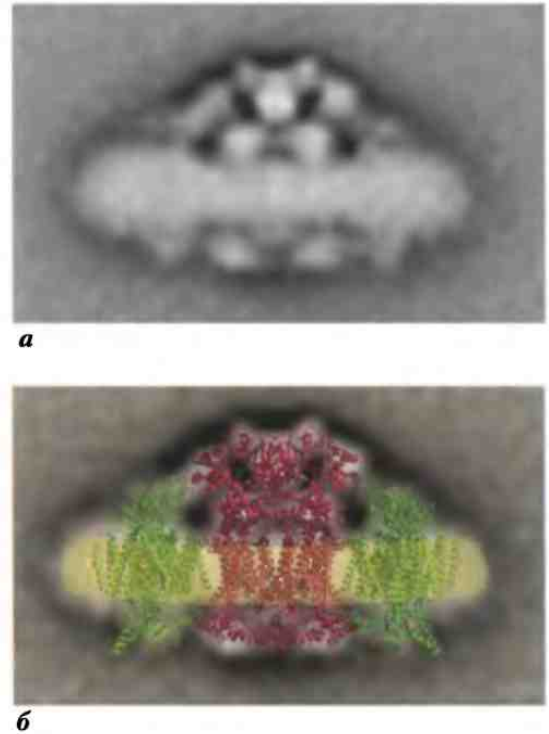


Рис. 19-14. Движение электронов через комплекс IV. Субъединицы I, II и III — структурные элементы комплекса IV, обеспечивающие перенос электронов. Кроме этих полипептидов в состав комплекса IV входят 10 других (изображены зеленым цветом). Путь электронов через комплекс IV начинается с поступления электронов от каждой из двух восстановленных молекул цитохрома *c* (*вверху*) на двухъядерный центр Cu_A. От Cu_A-центра электроны передаются через гем *a* к Fe-Cu-центру, в который входят гем цитохрома a_3 и ион Cu_B. Молекулярный кислород, связываясь с гемом a_3, восстанавливается двумя электронами, образуя супер-оксид-радикал O_2^{2-}. Еще два электрона от цитохрома *c* (всего для образования H_2O требуется четыре электрона) превращают O_2^{2-} в две молекулы воды. Четыре необходимых протона H^+ отщепляются от субстратов в матрикса, откуда они перекачиваются по неизвестному пока механизму.

ма) должна быть совершенно различной. Для первого случая, когда комплексы контактируют, перенос электронов осуществляется через твердую среду. Для второго случая комплексы функционируют независимо друг от друга и электроны переносятся убихиноном и цитохромом *c*. Согласно полученным кинетическим данным, передача электронов происходит через твердую среду, что подтверждает модель респирасомы.

Липид кардиолипин, присутствующий в большом количестве во внутренней мембране митохондрий (см. рис. 10-9 и 11-2), возможно, играет очень важную роль в образовании респирасом. Его удаление с помощью детергентов или его отсутствие в некоторых мутантных дрожжевых клетках приводит к нарушению митохондриального транспорта электронов и потере сродства к ферментам дыхательной цепи.



а

б

Рис. 19-15. Модель респирасомы, состоящей из комплексов III и IV. *а* — очищенные суперкомплексы из дрожжей, содержащие комплексы III и IV; изображение получено с помощью электронного микроскопа после окрашивания уранилацетатом. Данная электронная микрофотография получена наложением сотен электронных изображений. *б* — на структуру одной молекулы комплекса III (красный цвет; из дрожжей) наложена картинка электронной плотности двух молекул комплекса IV (зеленый цвет; из сердца быка), чтобы продемонстрировать возможный способ взаимодействия этих комплексов в респирасоме. Микрофотография перпендикулярно плоскости наложения структур.

Энергия, высвобождаемая при переносе электронов в дыхательной цепи, запасается в виде протонного градиента (электрохимического потенциала)

Перенос в дыхательной цепи двух электронов от восстановленного кофермента NADH на молекулярный кислород можно записать следующим образом:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2}\,O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O \qquad (19\text{-}5)$$

Этот процесс высокоэкзергонический. Стандартный восстановительный потенциал для окислительно-восстановительной пары $NAD^+/NADH$ $E'^\circ = -0{,}320$ В, для пары O_2/H_2O $E'^\circ = 0{,}816$ В. Разность стандартных потенциалов этих двух систем $\Delta E'^\circ = +0{,}816 - (-0{,}320) = 1{,}14$ В.

Изменение стандартной свободной энергии при переносе двух электронов от окислительно-восстановительной пары $NAD^+/NADH$ к паре O_2/H_2O можно рассчитать, пользуясь табл. 13-7 (с. 48):

$$\begin{aligned}\Delta G'^\circ &= -nF\,\Delta E'^\circ \qquad (19\text{-}6)\\ &= -2\ (96{,}5\ \text{кДж/В·моль}) \cdot (1{,}14\ \text{В})\\ &= -220\ \text{кДж/моль (NADH)}\end{aligned}$$

При этом предполагается, что концентрации NADH и NAD равны 1 М. Однако в активно дышащей митохондрии в результате действия многих дегидрогеназ реальное отношение кон-

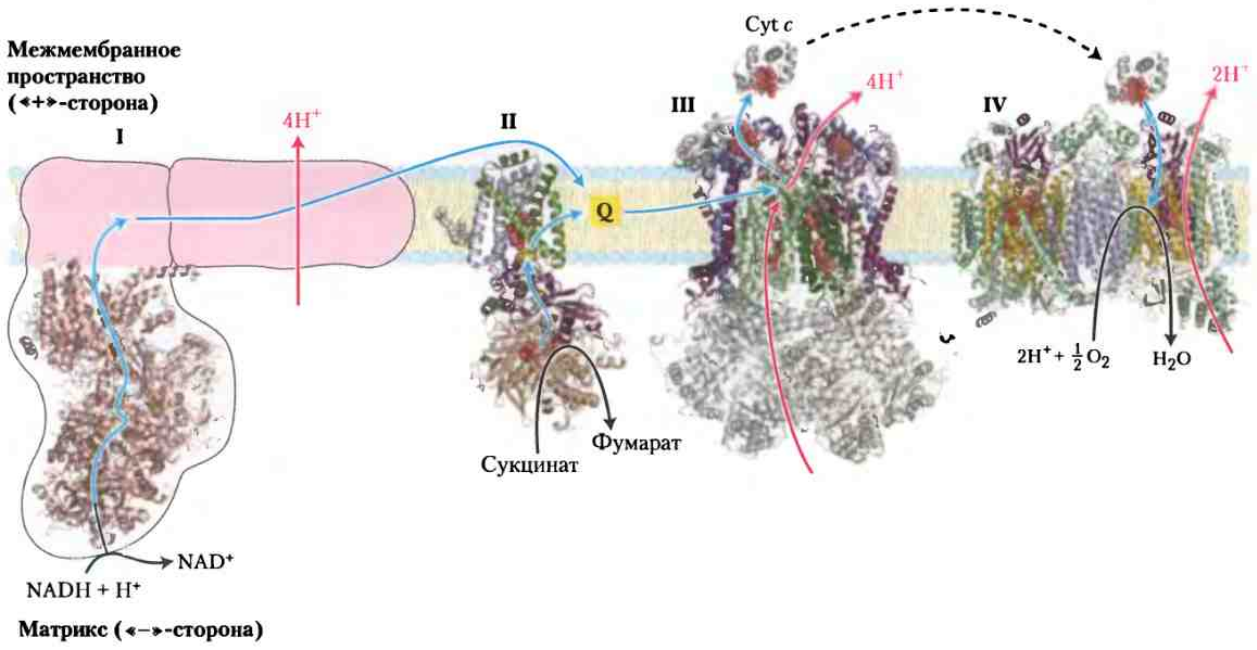


Рис. 19-16. Потоки электронов и протонов через четыре комплекса в дыхательной цепи митохондрий. Электроны от NADH через комплексы I и II поступают на кофермент Q. Восстановленный убихинол QH_2 — подвижный переносчик электронов и протонов. Он передает электроны комплексу III, который в свою очередь переносит их на другое подвижное звено дыхательной цепи — цитохром *c*. Затем комплекс IV передает электроны от восстановленного цитохрома *c* на молекулярный кислород O_2. Перенос электронов через комплексы I, III и IV сопровождается переносом протонов из матрикса в межмембранное пространство. Через кофермент Q в дыхательную цепь поступают электроны, отщепляемые при β-окислении жирных кислот (см. рис. 19-8). Представленные здесь структуры имеют разные источники: комплекс I — из *Thermus thermophilus* (PDB ID 2FUG); комплекс II — из сердца свиньи (PDB ID 1ZOY); комплекс III — из сердца быка (PDB ID 1BGY); цитохром *c* — из сердца лошади (PDB ID1HRC); комплекс IV — из сердца быка (PDB ID 1OCC).

центраций [NADH] / [NAD^+] оказывается значительно больше единицы, и, следовательно, изменение свободной энергии в реакции 19-5 должно быть намного больше по абсолютной величине, чем −220 кДж/моль. Аналогичные расчеты для реакции окисления сукцината показывают, что при переносе электронов от пары фумарат / сукцинат (E'° = 0,031 В) на кислород изменение стандартной свободной энергии несколько меньше, чем в случае переноса электронов от NADH на кислород, но это также большая отрицательная величина, приблизительно равная −150 кДж/моль.

Большая часть энергии, высвобождающейся при переносе электронов от NADH на кислород, расходуется на выкачивание протонов из матрикса. При поступлении на кислород пары электронов комплекс I выкачивает из матрикса четыре протона, комплекс III — четыре H^+ и комплекс IV — два H^+ **(рис. 19-16)**. Сопряжение процессов *направленного* (векторного) переноса электронов и протонов может быть описано следующим уравнением

$$NADH + 11\ H^+_{\text{м}} + \tfrac{1}{2}\ O_2 \rightarrow \rightarrow NAD^+ + 10H^+_{\text{п}} + H_2O \quad (19\text{-}7)$$

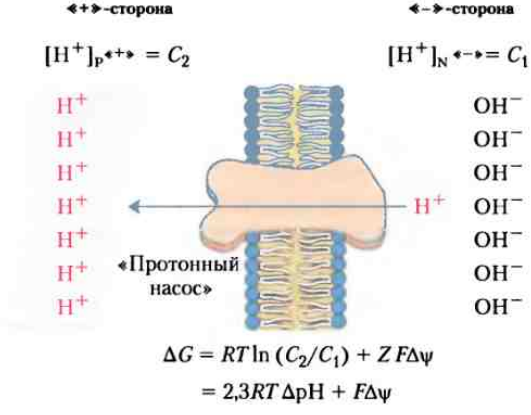


Рис. 19-17. Возникновение протон-движущей силы. В двух компартментах митохондриального пространства, отделенных друг от друга внутренней мембраной, за счет энергии переноса электронов создается разность концентраций протонов [H^+], т. е. возникает градиент pH (ΔpH) и межмембранный потенциал ($\Delta\psi$). Результирующий эффект — протон-движущую силу (ΔG) — можно рассчитать по приведенной формуле. Подробные объяснения в тексте.

Электрохимический потенциал, возникающий из-за разности концентраций протонов по обе стороны митохондриальной мембраны и противоположных зарядов на сторонах мембраны, является временным хранилищем большей части энергии, высвобождающейся при переносе электронов в дыхательной цепи.

Энергия (электрохимический потенциал) мембранного градиента, так называемая **протон-движущая сила**, включает две составляющие. Во-первых, это *химическая (потенциальная) энергия*, возникшая из-за разности концентраций ионов H^+ в митохондриальном матриксе и в межмембранном пространстве. Во-вторых, *электрический потенциал*, обусловленный электрическим зарядом на внутренней мембране митохондрий вследствие выхода ионов H^+ из матрикса. Матрикс несет таким образом отрицательный заряд относительно межмембранного пространства **(рис. 19-17)**.

Как было показано в гл. 11, изменение свободной энергии реакции переноса электронов в дыхательной цепи, когда электрохимический потенциал создается путем перехода ионов H^+ из митохондриального матрикса во внешнее пространство, можно рассчитать по следующему общему уравнению

$$\Delta G = RT \ln(C_2/C_1) + ZF\,\Delta\psi \quad (19\text{-}8)$$

где C_2 и C_1 — концентрации ионов в двух компартментах, причем $C_2 > C_1$; Z – заряд иона (для протона $Z = 1$); $\Delta\psi$ — мембранный электрический потенциал (в вольтах).

Если принять, что переход протонов через мембрану происходит при 25 °C, то, подставляя в уравнение 19-8 соответствующие значения переменных, получаем следующее выражение

$$\ln(C_2/C_1) = 2{,}3\,(\lg [H^+]_{\text{п}} - \lg[H^+]_{\text{м}}) = 2{,}3\,(\text{pH}_{\text{м}} - \text{pH}_{\text{п}}) = 2{,}3\,\Delta\text{pH}$$

$$\Delta G = 2{,}3\,RT\,\Delta\text{pH} + F\Delta\psi \quad (19\text{-}9)$$
$$= (5{,}70\ \text{кДж/моль})\,\Delta\text{pH} + (96{,}5\ \text{кДж/В}\cdot\text{моль})\,\Delta\psi$$

В активно дышащей митохондрии экспериментально полученное значение мембранного потенциала составляет от 0,15 до 0,20 В, а pH матрикса примерно на 0,75 выше, чем в межмембранном пространстве.

Пример 19-1 ЭНЕРГЕТИКА ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА

Рассчитайте, сколько энергии превращается в протонный градиент на внутренней митохондриальной мембране при переносе пары электронов в дыхательной цепи от NADH к кислороду. Примите, что $\Delta\psi = 0{,}15$ В, $\Delta pH = 0{,}75$.

Решение. По уравнению 19-9 можно рассчитать изменение свободной энергии при переносе через внутреннюю мембрану митохондрий *1 моль* протонов. Подставляя в это уравнение $\Delta pH = 0{,}75$ и $\Delta\psi = 0{,}15$ В, получаем $\Delta G = 19$ кДж/моль (протонов). Согласно уравнению 19-7, перенос электронов от NADH на O_2 сопровождается переходом 10 H^+. Следовательно, из 220 кДж, создаваемых при окислении 1 моль NADH, почти 200 кДж «консервируется» в виде электрохимического протонного градиента.

При спонтанном переходе протонов в матрикс *«вниз» по* электрохимическому градиенту выделяется свободная энергия, которая может быть использована для совершения работы. В митохондриях, хлоропластах и аэробных бактериях электрохимическая энергия протонного градиента используется для синтеза ATP из ADP и неорганического фосфата. Энергетика и стехиометрия этого процесса обсуждаются в разд. 19.2.

При окислительном фосфорилировании образуются активные формы кислорода (АФК)

На некоторых стадиях восстановления кислорода в митохондриях возможно образование реакционноспособных свободных радикалов кислорода, которые могут повреждать клетку. При передаче электронов от QH_2 на комплекс III, а также от комплекса I на QH_2 в качестве промежуточного продукта образуется ион-радикал $^{\bullet}Q^-$. Вполне вероятно, что $^{\bullet}Q^-$ может передавать электрон кислороду O_2

$$O_2 + e^- \rightarrow {}^{\bullet}O_2^-$$

Супероксидный ион-радикал $^{\bullet}O_2^-$ — очень активная частица, которая может вступать в дальнейшие реакции с образованием других свободных радикалов, в частности еще более активного гидроксильного радикала $^{\bullet}OH$ (**рис. 19-18**).

Эти активные формы кислорода могут нанести значительный вред клетке, реагируя с ферментами, мембранными липидами и нуклеиновыми кислотами, и повреждая их. В активно

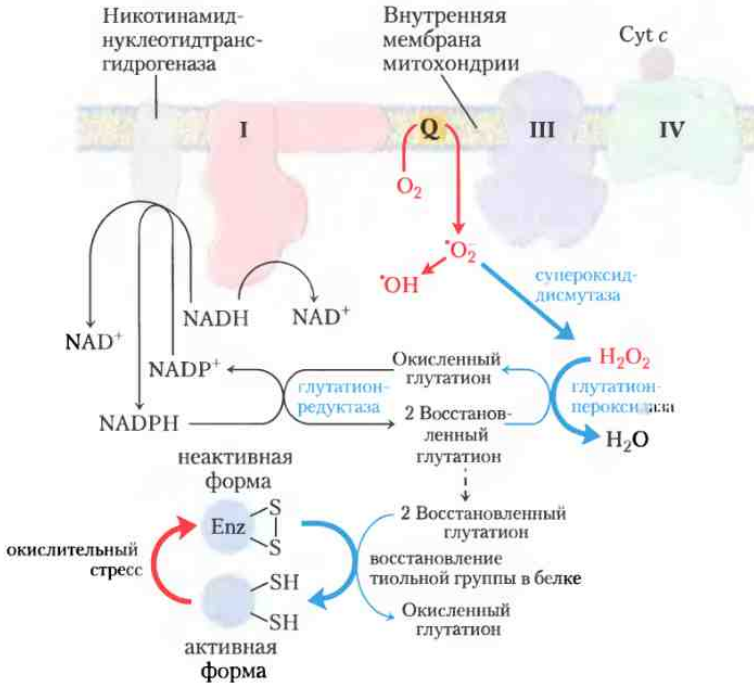


Рис. 19-18. Образование АФК в митохондриях и защита митохондрий. При нарушении скорости поступления электронов в дыхательную цепь и скорости их переноса в цепи происходит активное образование супероксидного ион-радикала $^{\bullet}O_2^-$ в комплексах I и III, когда при неполном восстановлении радикала убихинона $^{\bullet}Q^-$ передает электрон молекуле O_2. Супероксидный радикал действует на аконитазу, содержащую железо-серный кластер 4Fe-4S, что приводит к высвобождению Fe^{2+}. В присутствии Fe^{2+} происходит реакция Фентона, приводящая к образованию активного гидроксильного радикала $^{\bullet}OH$. Изображенные синим цветом реакции защищают клетки от повреждения супероксидными радикалами. Восстановленный глутатион GSH (см. рис. 22-27) дает электроны для восстановления H_2O_2 и окисленных остатков Cys (–S–S–) в ферментах и других белках; восстановленная форма глутатиона регенерируется из окисленной формы GSSG в результате восстановления при участии NADPH.

Дополнение 19-1 Горячие растения с отвратительным запахом и альтернативные пути переноса электронов

Многие цветущие растения привлекают насекомых-опылителей, распространяя пахучие вещества, которые имитируют естественный запах пищи насекомых или мест для откладывания яиц. Растения, опыляемые навозными мухами или жуками, используют для привлечения этих насекомых соединения, имитирующие запах навоза и падали.

Одно из семейств отвратительно пахнущих растений — ароидные, к ним принадлежат, например, филодендроны, аронниковые лилии и различные виды скунсовой капусты. У этих растений обычно крошечные цветки, собранные в вертикальные початки и окруженные видоизмененным листом — обверткой. Початки издают запах гниющего мяса или навоза. Кроме того, в период опыления температура початков поднимается, у некоторых видов на 20–40 °C выше температуры окружающей среды. Выделение тепла (термогенез) способствует лучшему испарению и распространению пахучих веществ и само по себе привлекает насекомых (ведь при гниении мяса или разложении навоза из-за активных метаболических процессов, вызванных гнилостными бактериями, их температура повышается). Благодаря способности к термогенезу, у восточной скунсовой капусты цветки появляются ранней весной прямо из-под снега (рис. 1).

Рис. 1. Восточная скунсовая капуста.

Каким же образом продуцируют тепло растения? Дело в том, что митохондрии растений, грибов и одноклеточных эукариотических организмов имеют, кроме характерных для животных цепей переноса электронов, еще альтернативную дыхательную систему, в которой энергия переноса электронов используется не для синтеза АТР, а для выработки тепла. Эта альтернативная дыхательная система имеет следующее строение. Во-первых, в ней имеется цианидрезистентная QH_2-оксидаза, которая катализирует перенос электронов от убихинона прямо на молекулярный кислород, минуя комплексы III и IV (рис. 2). Во-вторых, митохондрии растений содержат ротенон-нечувствительную NADH-дегидрогеназу (см. табл. 19-4), локализованную на наружной стороне внутренней мембраны митохондрий и катализирующую перенос электронов от матриксного NADH прямо на убихинон, минуя комплекс I с его протонным насосом. В-третьих, митохондрии растений имеют еще одну NADH-дегидрогеназу на внутренней стороне внутренней митохондриальной мембраны, которая переносит электроны от цитозольного NADPH или NADH на убихинон, также минуя комплекс I. Свободная энергия, выделяемая при прохождении электронов по альтернативной дыхательной цепи, не направляется на синтез АТР, а рассеивается в виде тепла и используется растениями для выполнения различных биологических функций, например у скунсовой капусты для растапливания снега при появлении всходов и распространения зловонных запахов для привлечения насекомых-опылителей во время цветения.

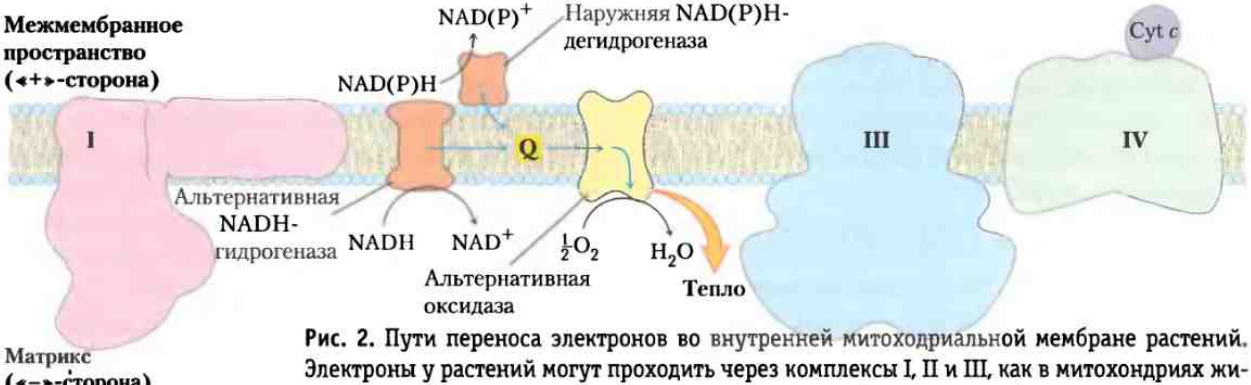


Рис. 2. Пути переноса электронов во внутренней митохондриальной мембране растений. Электроны у растений могут проходить через комплексы I, II и III, как в митохондриях животных, или по альтернативной дыхательной цепи (обозначена голубыми стрелками).

дышащих митохондриях от 0,1 до 4% кислорода образуют ион-радикалы $^{\bullet}O_2^-$, что достаточно, чтобы привести клетки к гибели, если быстро не обезвредить эти радикалы. Факторы, замедляющие поток электронов в дыхательной цепи, способствуют усилению образования супероксидного ион-радикала, возможно, из-за увеличения времени жизни $^{\bullet}O_2^-$ в Q-цикле.

Для предотвращения окислительного повреждения под действием $^{\bullet}O_2^-$ клетка использует несколько форм фермента **супероксиддисмутазы**, катализирующего следующую реакцию

$$2\ ^{\bullet}O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Образующийся пероксид водорода (H_2O_2) обезвреживается при участии **глутатионпероксидазы** (рис. 19-18). Глутатионредуктаза переводит окисленный глутатион в восстановленную форму, забирая электроны от NADPH, образованного NADP-трансгидрогеназой (в митохондриях) или в пентозофосфатном пути (в цитозоле, см. рис. 14-20). Восстановленный глутатион также помогает сохранить сульфгидрильные группы белка в восстановленном состоянии, предотвращая некоторые разрушительные последствия окислительного стресса (рис. 19-18). NADP-трансгидрогеназа играет в этом процессе очень важную роль: она приводит к образованию NADPH, необходимого для действия глутатионредуктазы.

В митохондриях растений окисление NADH протекает по другим механизмам

В периоды слабой освещенности или в темноте синтез ATP в митохондриях растений протекает по механизмам, совершенно аналогичным механизмам синтеза ATP у нефотосинтезирующих организмов. Однако на свету в митохондриях растений NADH возникает главным образом в результате превращения образовавшегося в процессе фотодыхания глицина в серин (см. рис. 20-21), что можно записать следующим образом

$$2\ \text{Глицина} + NAD^+ \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{серин} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Как показано в гл. 20, у растений накопление NADH происходит даже в том случае, если он не нужен для синтеза ATP. Из «ненужного» NADH в растениях происходит образование NAD^+ в результате переноса электронов от NADH непосредственно на убихинон и затем на молекулярный кислород, минуя комплексы III и IV с их протонными «насосами». Свободная энергия переноса электронов от NADH рассеивается в виде тепла, что для некоторых растений имеет важное значение (см. доп. 19-1). Особенность переноса электронов в митохондриях растений состоит в том, что QH_2-оксидаза растений, в отличие от цитохромоксидазы (комплекс IV), не ингибируется цианидами.

Краткое содержание раздела 19.1 РЕАКЦИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В МИТОХОНДРИЯХ

- Для объяснения многих процессов, связанных с преобразованием энергии в биологических системах, включая окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование, предложена хемиосмотическая теория. Механизм использования энергии переноса электронов для синтеза ATP одинаков в обоих случаях. Энергия, высвобождаемая при переносе электронов, сохраняется как электрохимический градиент, возникающий в результате сопряженного с транспортом электронов «выкачивания» протонов H^+ из матрикса. Возникающая при этом протондвижущая сила используется для дальнейшего переноса протонов.

- В митохондриях гидрид-ионы, отщепленные от субстратов NAD-зависимыми дегидрогеназами, отдают электроны в дыхательную цепь, по которой они переносятся на молекулярный кислород O_2, восстанавливая его до H_2O.

- Челночные системы доставляют восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH к митохондриальному NADH. Во всех NAD-зависимых реакциях дегидрирования восстановительные эквиваленты переходят к митохондриальной NADH-дегидрогеназе (комплексу I).

- Восстановительные эквиваленты переносятся через ряд железо-серных центров на убихинон, который передает электроны цитохрому *b* — первому переносчику электронов

в комплексе III. В комплексе III электроны по двум разделенным путям через два цитохрома *b* и цитохром c_1 попадают на железо-серный центр. Железо-серный центр посылает по одному электрону через цитохром *c* на цитохромоксидазу (комплекс IV); в этом медь-содержащем ферменте присутствуют также цитохромы *a* и a_3. Аккумулированные комплексом IV электроны передаются на молекулярный кислород O_2, восстанавливая его до H_2O.

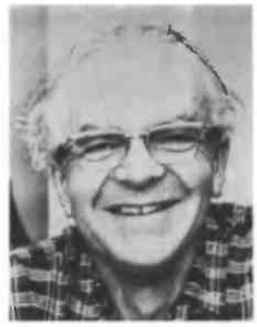
- Электроны от различных субстратов попадают в митохондриальную цепь переносчиков электронов разными путями. Например, при окислении сукцината сукцинатдегидрогеназой (комплексом II) флавопротеин этого комплекса переносит электроны на убихинон через ряд железо-серных центров. Электроны, полученные при окислении жирных кислот, переносятся на убихинон через ЭПФ.

- Потенциально опасные активные формы кислорода (АФК), образующиеся в митохондриях, инактивируются под действием нескольких защитных ферментов, в числе которых супероксиддисмутаза и глутатионпероксидаза.

- У растений, грибов и одноклеточных эукариотических организмов наряду с обычным чувствительным к цианиду пути переноса электронов реализуется альтернативный нечувствительный к цианиду окислительный путь с участием NADPH.

19.2. Синтез АТР

Важно рассмотреть два аспекта механизма использования энергии градиента H^+, который возникает из-за переноса электронов при синтезе АТР в митохондриях. Во-первых, это энергетический баланс процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях. Как показано в примере 13-2, для образования 1 моль АТР требуется 50 кДж (с. 31); энергия же, высвобождаемая при переносе электронов в дыхательной цепи и запасаемая как трансмембранный электрохимический потенциал, составляет ~ 200 кДж на 1 моль пере-



Питер Митчелл,
1920–1992

несенных электронов — и вот эта энергия может быть направлена на синтез АТР. Следовательно, энергетика процесса митохондриального окислительного фосфорилирования не укладывается в законы термодинамики. Во-вторых, интересен молекулярный механизм сопряжения транспорта протонов с синтезом АТР в митохондриях — наиболее обоснованный ответ дает хемиосмотическая теория Митчелла.

Согласно **хемиосмотической теории** Митчелла **(рис. 19-19)**, за счет энергии переноса электронов между двумя сторонами внутренней митохондриальной мембраны создается разность концентраций ионов H^+ и трансмембранный электрический потенциал. Именно такой электрохимический градиент, так называемая протондвижущая сила, служит источником энергии для синтеза АТР, когда ионы H^+ спонтанно возвращаются по градиенту концентрации из цитозоля в матрикс, проходя через специальные поры для ионов H^+ в **АТР-синтазе**. Чтобы подчеркнуть важную роль протон-движущей силы, уравнение синтеза АТР в митохондриях иногда записывается в следующем виде:

$$ADP + P_i + n\,H^+_{\text{++}} \rightarrow \rightarrow ATP + H_2O + n\,H^+_{\text{--}} \qquad (19\text{-}10)$$

Ферментативные реакции, в которых одновременно протекают химические превращения и транспорт частиц, Митчелл назвал хемиосмосом. Схема экспериментального изучения сопряжения дыхания и фосфорилирования, т. е. «хемиосмоса», представлена на **рис. 19-20**. При добавлении суспензии митохондрий в буферном растворе к смеси ADP, P_i и окисляемого субстрата, например сукцината, наблюдается (1) окисление сукцината до фумарата, (2) поглощение кислорода и (3) синтез

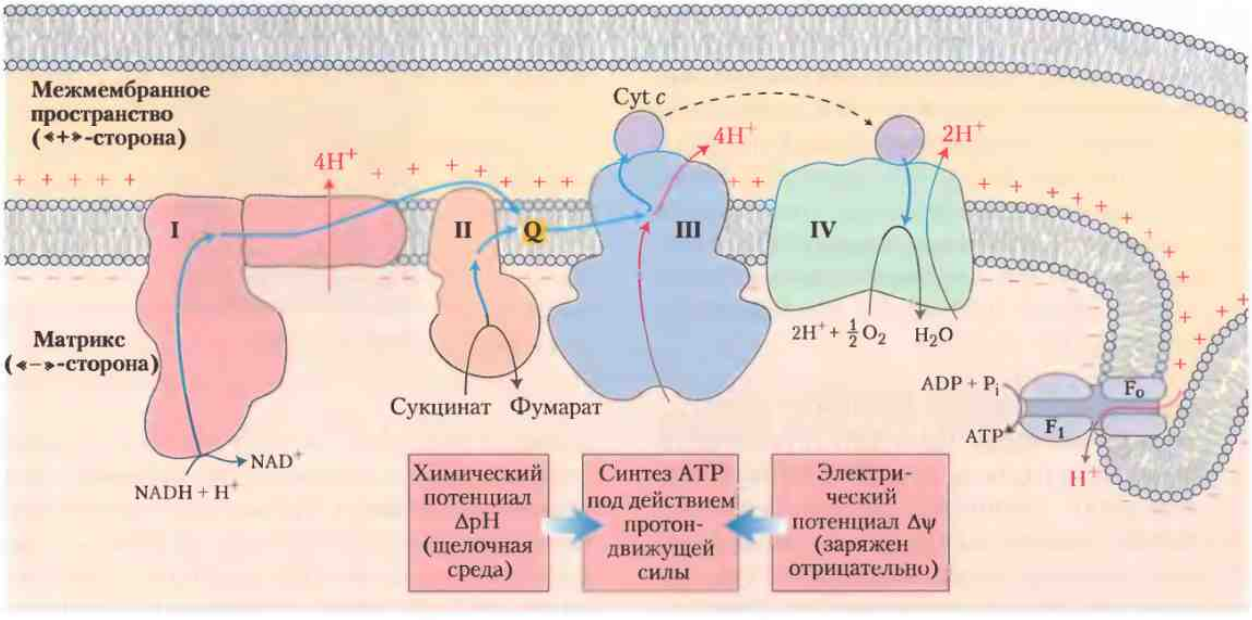


Рис. 19-19. Хемиосмотическая теория. Согласно хемиосмотичекой теории, электроны от NADH и других окисляемых субстратов проходят через цепь переносчиков электронов, асимметрично расположенных во внутренней мембране митохондрий. Перенос электронов сопровождается переносом (откачиванием) через мембрану протонов из матрикса в межмембранное пространство, что приводит к возникновению химического градиента (ΔpH) и электрического градиента ($\Delta\psi$). Внутренняя мембрана непроницаема для протонов. Протоны могут вернуться в матрикс только через специальные каналы в белковом комплексе F_o. Переход ионов H^+ из зоны с более высокой концентрацией в зону с более низкой концентрацией сопровождается высвобождением свободной энергии, за счет которой происходит синтез ATP, катализируемый связанными между собой белковыми комплексами F_o и F_1.

ATP. Поглощение кислорода и синтез ATP зависят от наличия окисляемого субстрата (в данном случае, сукцината), а также от ADP и P_i.

Поскольку энергия, высвобождаемая при окислении субстрата, направляется на синтез ATP, то, как и следовало ожидать, ингибиторы переноса электронов к O_2, такие как цианид-ион, монооксид углерода и антимицин A, должны блокировать синтез ATP (рис. 19-20, *а*). Совсем неожиданно то, что в интактных митохондриях при ингибировании синтеза ATP останавливается и перенос электронов. Такая взаимосвязь наблюдается, если к смеси изолированных митохондрий и окисляемых субстратов, не содержащих ATP, добавляют кислород (рис. 19-20, *б*). В этом случае не происходит *ни* синтеза ATP, *ни* переноса электронов к молекулярному кислороду. Сопряжение процессов окисления и фосфорилирования можно продемонстрировать на смесях, к которым добавлен олигомицин или вентурицидин — токсичные вещества (антибиотики), присоединяющиеся к активному центру ATP-синтазы в митохондриях. Эти два антибиотика — мощные ингибиторы как синтеза ATP, так и переноса электронов по цепи переносчиков к молекулярному кислороду (рис. 19-18, *б*). Олигомицин непосредственно не взаимодействует с переносчиками электронов, он присоединяется к ATP-синтазе. То, что при этом блокируются процессы окисления и фосфорилирования, подтверждает взаимосвязь этих процессов — они не могут протекать изолированно друг от друга.

Хемиосмотическая теория успешно объясняет зависимость переноса электронов от синтеза ATP в митохондриях. Если блокируется, например, олигомицином перенос электронов в митохондриальный матрикс через протонные каналы ATP-синтазы, т. е. закрывается путь для возвращения протонов в матрикс, то продолжающееся

за счет энергии переноса электронов «выталкивание» протонов значительно увеличивает градиент концентрации протонов на двух сторонах внутренней мембраны. При этом протон-движущая сила будет возрастать до тех пор, пока свободная энергия, необходимая для выкачивания протонов из матрикса против градиента концентрации, не станет равной или больше энергии, высвобождающейся при переносе электронов от NADH к O_2. В этот момент перенос электронов прекращается, свободная энергия всего процесса переноса электронов, сопряженного с откачиванием протонов, становится равной нулю — система приходит в состояние равновесия.

При определенных условиях или воздействии некоторых веществ может произойти разобщение переноса электронов и синтеза АТР. Например, если целостность интактных митохондрий нарушается в результате обработки детергентом или физического воздействия, в оставшихся фрагментах мембраны хотя и продолжается перенос электронов от сукцината или NADH к кислороду, но способность к синтезу АТР теряется, т. е. необходимые взаимосвязи между двумя этими процессами нарушаются. Некоторые химические соединения разобщают процессы дыхания и фосфорилирования, не нарушая целостности митохондрий. Разобщающими химическими агентами являются, например, 2,4-динитрофенол (DNP) и карбонилцианид-*пара*-трифторметоксифенилгидразон (FCCP) (см. табл. 9-4 и **рис. 19-21**). Эти соединения представляют собой слабые кислоты с гидрофобными свойствами. В протонированной форме они легко проходят через внутреннюю мембрану в матрикс, перенося туда протон, в результате чего протонный градиент уменьшается и прекращается синтез АТР. Ионофоры, например валиомицин (см. рис. 11-45), способны связывать неорганические ионы и переносить их в матрикс, минуя протонные каналы АТР-синтазы, в результате чего исчезает электрическая составляющая электрохимического потенциала, и синтез АТР прекращается.

Согласно хемиосмотической теории, в митохондриях при синтезе АТР перенос электронов выполняет очень простую функцию, обеспечивая

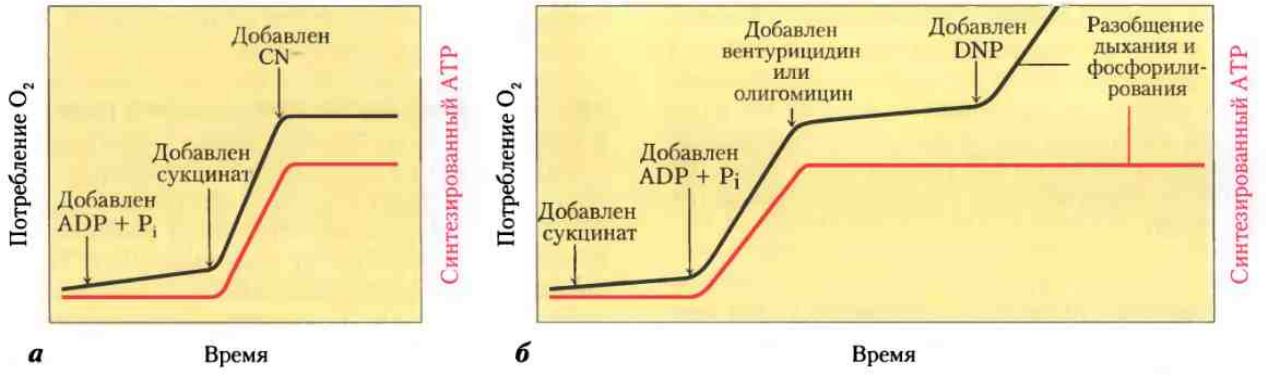


Рис. 19-20. Изучение сопряжения переноса электронов и синтеза АТР в митохондриях. Экспериментальное определение точек сопряжения дыхания и синтеза АТР проводится в суспензии митохондрий в буферном растворе. Поглощение кислорода (черная линия) контролируется кислородным электродом. Через определенные интервалы времени берутся пробы раствора для определения содержания АТР (красная линия). *а* — если к раствору суспензии митохондрий добавляют только ADP и неорганический фосфат, дыхание не усиливается и АТР практически не синтезируется. При добавлении сукцината резко интенсифицируются процессы дыхания и синтеза АТР. Добавление цианида (CN^-), ингибирующего перенос электронов между цитохромоксидазой и O_2, блокирует процесс дыхания и синтеза АТР. *б* — в смеси митохондрий и сукцината дыхание и синтез АТР возникают только при добавлении ADP и P_i. При добавлении к такой смеси вентуридицина или олигомицина, ингибирующих АТР-синтазу, процессы дыхания и синтеза АТР прекращаются. В присутствии разобщающего агента 2,4-динитрофенола (DNP) митохондриальное дыхание продолжается, а синтез АТР прекращается.

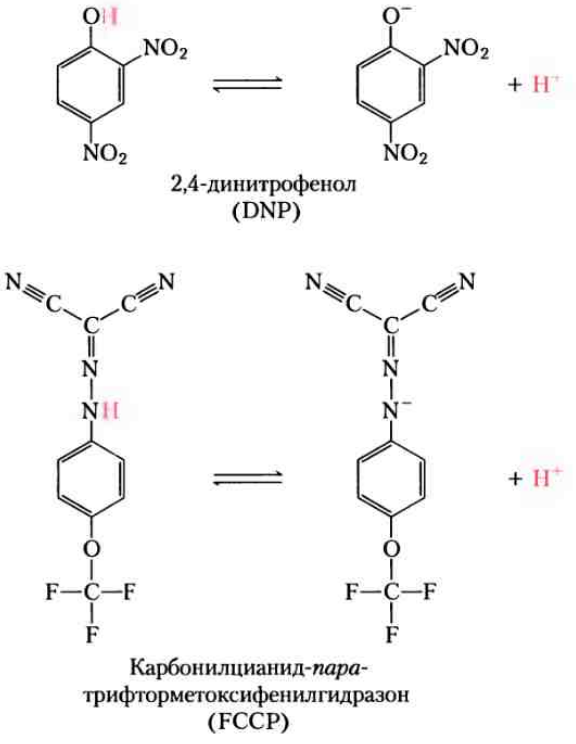


Рис. 19-21. Два химических разобщителя процесса окислительного фосфорилирования. DNP и FCCP легко теряют протон, переходя в ионизированную форму, и обладают выраженными гидрофобными свойствами. В протонированной форме они свободно диффундируют через внутреннюю мембрану в матрикс, перенося туда протон, в результате чего исчезает протонный градиент и прекращается синтез ATP. Аналогичным образом DNP и FCCP разобщают процессы фотофосфорилирования (см. рис. 19-63).

откачивание ионов H^+ из матрикса в межмембранное пространство с тем, чтобы на сторонах внутренней мембраны возникал электрический потенциал — «протон-движущая сила». В свете этой теории логично предположить, что искусственно созданный протонный градиент может выполнять функцию переносимых по дыхательной цепи электронов. Это предположение получило подтверждение в следующем эксперименте (**рис. 19-22**). В митохондриях, обработанных так, что по обе стороны внутренней мембраны была создана разность концентраций протонов, т. е. разность электрических зарядов, происходил синтез ATP *даже в отсутствие окисляемого субстрата*, т. е. только за счет искусственно созданной протон-движущей силы.

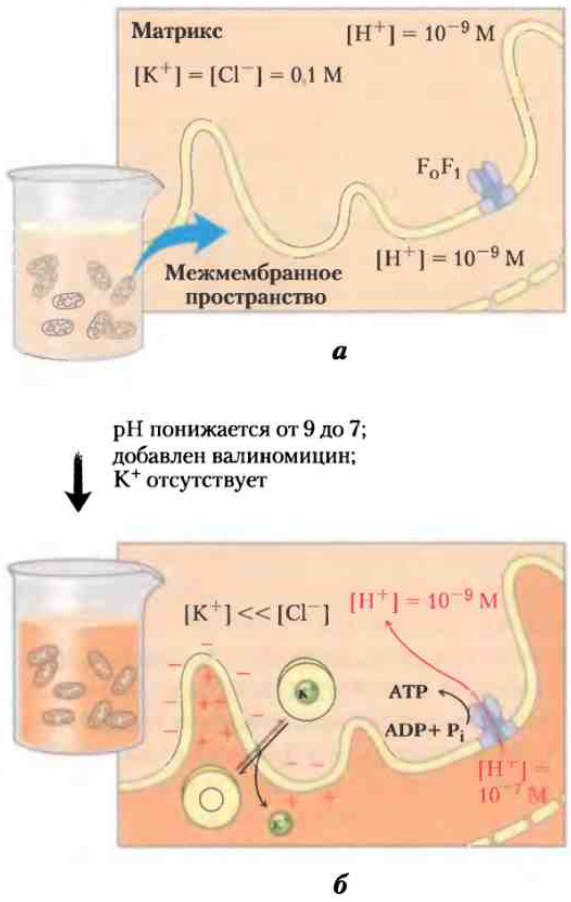


Рис. 19-22. Доказательство роли протонного градиента в синтезе ATP. Искусственно созданный электрохимический градиент в митохондриях в отсутствие окисляемого субстрата может поставлять энергию для синтеза ATP. *а* — Изолированные митохондрии выдерживают в буферном растворе (pH 9), содержащем 0,1 M KCl. В результате медленного просачивания в митохондрии буферного раствора и KCl в митохондриальном матриксе устанавливается равновесие с окружающей средой. Должны отсутствовать вещества, способные окисляться. *б* — митохондрии отделяют от буферного раствора с pH 9 и помещают в буферный раствор с pH 7, содержащем вместо KCl валиномицин. Замена буферного раствора позволяет создать на сторонах внутренней митохондриальной мембраны градиент pH. Валиномицин переносит ионы K^+ через мембрану по градиенту концентрации, создавая электрический заряд на внутренней митохондриальной мембране (матрикс заряжается отрицательно). В результате сумма химического потенциала, создаваемого градиентом pH, и электрического потенциала, возникшего из-за разности зарядов на сторонах внутренней мембраны, дает протон-движущую силу, достаточную для поддержания синтеза ATP в отсутствие окисляемого субстрата.

Фермент ATP-синтаза состоит из двух главных компонентов — F_1 и F_o

Митохондриальная ATP-синтаза (комплекс V) является ATPазой F-типа (см. рис. 11-39, т. 1). Строение и механизм действия ATP-синтазы в митохондриях такие же, как в хлоропластах и аэробных бактериях. Этот большой внутримембранный ферментный комплекс катализирует синтез ATP из ADP и фосфата (P_i) в ходе перемещения протонов через мембрану с ее положительно заряженной стороны на отрицательно заряженную (см. уравнение 19-10). ATP-синтаза состоит из двух главных компонентов — F_1 и F_o. F_1 — периферический мембранный белок, F_o — интегральный белок, пронизывающий митохондриальную мембрану насквозь (индекс «о» указывает на способность комплекса связывать антибиотик олигомицин). Белковый комплекс F_1 — исключительно важный фактор окислительного фосфорилирования. Он был впервые выделен в очищенном виде группой ученых во главе с Эфраимом Рэкером в начале 1960-х гг., что положило начало плодотворному изучению структуры и функций мембран.

Из внутренней митохондриальной мембраны удалось выделить маленькие мембранные пузырьки, способные осуществлять перенос электронов и синтез ATP. Если затем из этих мембранных пузырьков осторожно экстрагировать комплекс F_1, то оказывается, что дыхательные цепи в этих пузырьках ненарушены, так как в них содержится F_o-компонент ATP-синтазы, благодаря которому сохраняется способность к переносу электронов от NADH на молекулярный кислород. Однако пузырьки, лишенные F_1-компонента, не способны синтезировать ATP, ведь в компартментах митохондрии, разделенных внутренней мембраной, не создается протонного градиента. Происходит это потому, что в отсутствие компонента F_1 ионы H^+ свободно переходят через протонный канал F_o в матрикс со скоростью, равной скорости откачивания их из матрикса. Если к лишенным F_1-компонента пузырькам добавить изолированный комплекс F_1, то молекулы F_1 снова соединятся с F_o-компонентом и закроют его протонный канал. В «починенных» митохондриальных пузырьках восстанавливается энергетическое сопряжение между переносом электронов и синтезом ATP. В изолированном виде компонент F_1 не способен катализировать синтез ATP, но может расщеплять ATP на ADP и фосфат — именно поэтому F_1 называют **F_1-ATPазой**.

Эфраим Рэкер, 1913–1991

Молекулы ATP связаны с поверхностью ферментного комплекса F_1 прочнее, чем молекулы ADP

Изучение механизма каталитического действия очищенного фермента F_1 методом изотопного обмена показало, что протекающая на его поверхности реакция синтеза ATP из ADP и фосфата $ADP + P_i \rightleftharpoons ATP + H_2O$ обратима, т. е. изменение свободной энергии в этом процессе близко к нулю. Гидролиз ATP, катализируемый ферментом F_1, проводился *in vitro* в присутствии воды, меченной изотопом ^{18}O. Метка была обнаружена в образовавшемся фосфате. Более тщательные измерения показали, что образовавшийся фосфат содержал не один, а три или четыре атома ^{18}O **(рис. 19-23)**. Это позволило сделать вывод, что концевая пирофосфатная связь в молекуле ATP претерпевает непрерывное обновление в ходе реакции, т. е. многократно разрывается и вновь образуется, пока с поверхности фермента F_1 не произойдет отщепления конечного продукта P_i. На любой стадии гидролиза фосфат, находящийся в активном центре фермента F_1, может включать метку ^{18}O случайным образом в одно из четырех возможных положений. Такая реакция обмена протекает без изменения протонного градиента. Изолированный фермент F_1 также осуществляет гидролиз ATP без энергетических затрат.

Кинетические исследования реакций синтеза и гидролиза ATP на поверхности фермента F_1 показали, что изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}$ реакции синтеза ATP близко к нулю. Если константа скорости гидролиза ATP на поверхности комплекса F_1 $k_1 = 10\,с^{-1}$, а константа реакции синтеза $k_{-1} = 24\,с^{-1}$, то константу равновесия обратимой реакции с участием фермент-субстратных комплексов можно рассчитать по следующему уравнению:

$$\text{Фермент-ATP} \rightleftharpoons \text{фермент-(ADP + } P_i\text{)}$$

$$K'_{равн.} = k_{-1} / k_1 = 24\ с^{-1} / 10\ с^{-1} = 2{,}4$$

Кажущееся значение $\Delta G'^{\circ}$, вычисленное с учетом этой величины $K'_{равн.}$, близко к нулю. Однако для реакции гидролиза свободного ATP в растворе в отсутствие фермента $K'_{равн.} \approx 10^5$, тогда $\Delta G'^{\circ} = -30{,}5$ кДж/моль.

Причина такой существенной разницы в значениях констант скорости и изменения свободной энергии обеих реакций объясняется тем, что на поверхности ATP-синтазы молекулы ATP более стабильны, чем (ADP+ P_i). Ферментный комплекс ATP-синтаза образует с молекулами ATP прочные связи, высвобождая при этом энергию, достаточную для образования ATP. Тщательное измерение констант связывания показало, что сродство фермента F_oF_1 больше к ATP ($K_d \leq 10^{-12}$ M), чем к ADP ($K_d \approx 10^{-5}$ M). Разница в K_d в энергетическом выражении составляет примерно 40 кДж/моль и служит движущей силой, которая смещает равновесие в сторону образования ATP.

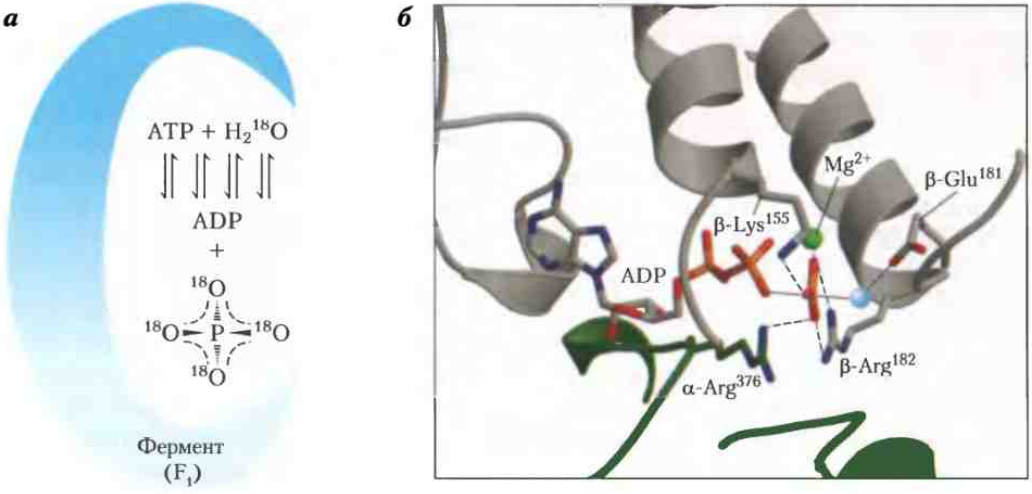


Рис. 19-23. Механизм каталитического действия фермента F_1. *а* — изучение методом изотопного обмена. Выделенный из митохондриальных мембран фермент F_1 выдерживают вместе с ATP в воде, меченной изотопом ^{18}O. После этого через короткие промежутки времени отбирают пробы и определяют содержание ^{18}O в образовавшемся фосфате. Очень быстро в фосфате обнаруживаются три или четыре атома ^{18}O, что свидетельствует о многократном повторении процессов синтеза и гидролиза ATP. *б* — наиболее вероятная структура фермента F_1 в переходном состоянии обратимой реакции гидролиза $\rightleftharpoons$ синтеза ATP. α-Субъединица изображена в виде зеленой спирали, β-субъединица — в виде серой спирали. Положительно заряженные остатки β-Arg^{182} и α-Arg^{376} соединены координационными связями с двумя атомами кислорода в пятивалентном фосфате. β-Lys^{155} связан с третьим атомом кислорода, а ион Mg^{2+} (зеленый шарик) образует с ферментом комплексное соединение. Голубым шариком обозначена оставшаяся в комплексе молекула H_2O. Взаимодействия в активных центрах фермента F_1 обеспечивают баланс между ATP и (ADP + P_i).

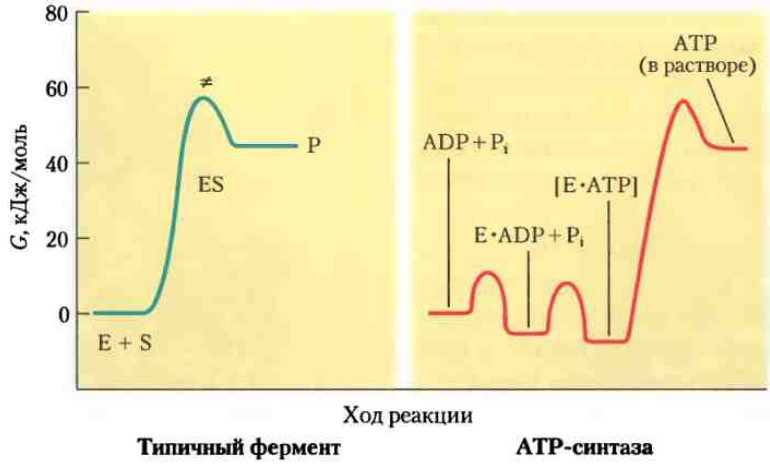


Рис. 19-24. Энергетическая схема каталитического действия ATP-синтазы и другого типичного фермента. В большинстве ферментативных реакций (*слева*) вершине активационного барьера соответствует переходное состояние (≠) реакции взаимодействия субстрата и продукта реакции. В реакции, катализируемой ATP-синтазой (*справа*), максимальному активационному барьеру соответствует отщепление (высвобождение, а не синтез!) ATP с поверхности фермента. Изменение свободной энергии в ходе реакции образования ATP из ADP и P_i в водном растворе — большая положительная величина. Если эта реакция катализируется ферментом ATP-синтазой, ATP образует прочную связь с поверхностью фермента, высвобождая энергию, достаточную для расщепления ATP до ADP и P_i, в результате чего реакция становится обратимой (константа равновесия равна 1). Освобождение ATP с поверхности фермента, т. е. регенерация фермента, происходит за счет энергии протон-движущей силы.

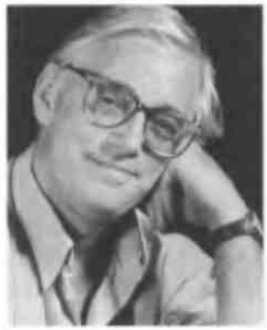
Протонный градиент выступает движущей силой для высвобождения ATP с поверхности фермента

Для поддержания определенного соотношения концентраций ATP и (ADP + P_i) на поверхности фермента ATP-синтазы не используется энергия протонного градиента. Однако освобождение синтезированного ATP с поверхности этого фермента происходит только за счет энергии протонного градиента. На **рис. 19-24** представлены энергетические диаграммы процессов синтеза ATP под действием ATP-синтазы и других эндергонических реакций.

Фермент ATP-синтаза в процессе непрерывного синтеза ATP должен претерпевать циклические конформационные изменения, переходя из формы, способной прочно связывать ATP, в форму, обеспечивающую освобождение ATP. Как показали химические и кристаллографические исследования, структурные особенности ATP-синтазы позволяют совершать эти альтернативные превращения.

Каждая β-субъединица ATP-синтазы может существовать в трех различных конформациях

Молекулы митохондриального белкового комплекса F_1 состоят из девяти субъединиц пяти различных типов (3α, 3β, γ, δ, ε). Каждая β-субъединица содержит один каталитический центр, в котором происходит синтез ATP. Кристаллографические данные, полученные груп-



Джон Э. Уокер

пой исследователей под руководством Джона Уокера, позволили выявить структурные особенности АТР-синтазы, объясняющие механизм ее каталитического действия. Грибовидная часть комплекса F_1 («головка») представляет собой уплощенную сферу высотой 8 нм и диаметром 10 нм. Субъединицы α и β уложены в ней попарно наподобие долек апельсина (**рис. 19-25, *а*–*в***). Полипептидные цепи γ-субъединицы, образующей «ножку» гриба кристаллической структуры F_1, расположены асимметрично. Один из доменов γ-субъединицы образует стержень, пронизывающий «головку» комплекса F_1. Другой домен γ-субъединицы связан главным образом с одной из трех β-субъединиц, имеющей β-пустую конформацию (рис. 19-25, *в*).

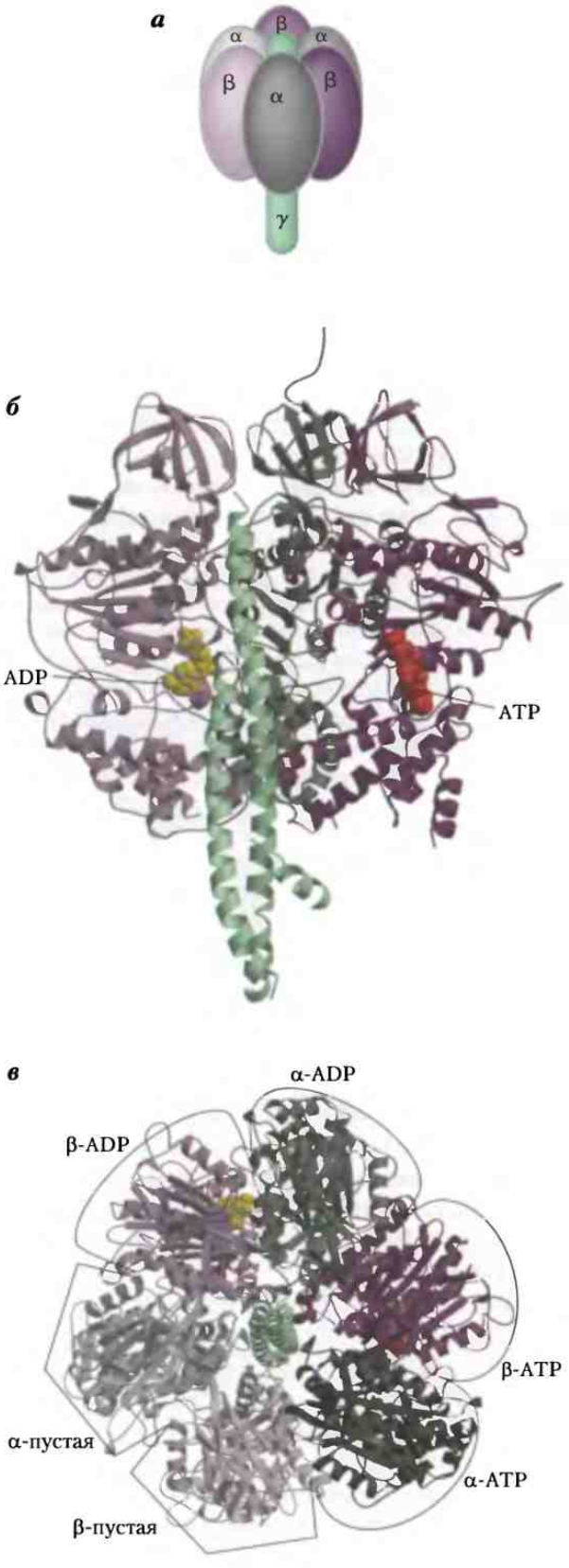
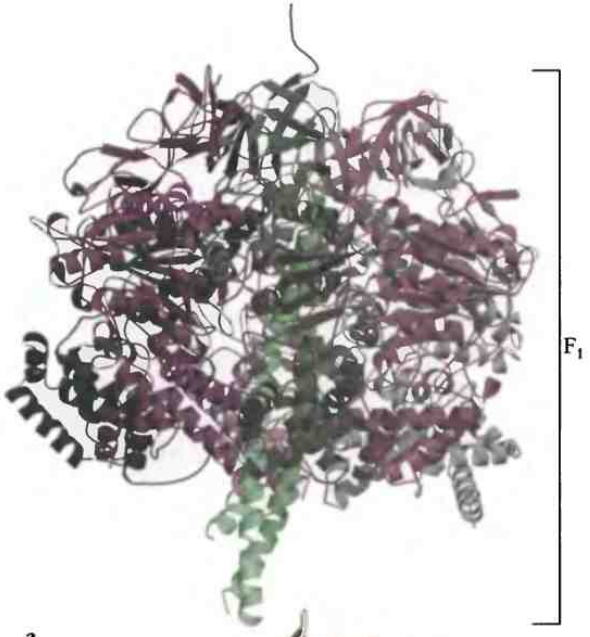
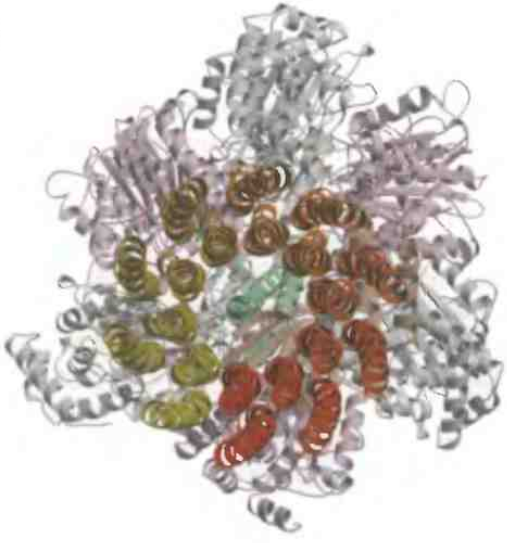


Рис. 19-25. Строение митохондриальной АТР-синтазы. *а* — модель структуры комплекса F_1 по результатам кристаллографических и биохимических исследований. Три α- и три β-субъединицы (серого и фиолетового цвета соответственно) попарно располагаются наподобие долек апельсина вокруг центрального стержня, образованного γ-субъединицей (зеленый цвет). *б* — кристаллическая структура комплекса F_1, выделенного из митохондрий быка (PDB ID 1 BMF), *вид сбоку*. Центральный стержень состоит из γ-субъединицы (зеленая спираль). На β-субъединицах участки связывания АТР изображены красными шариками, ADP — желтыми шариками. Чтобы не закрывать эти структурные элементы, не изображены две α- и одна β-субъединицы, а также δ- и ε-субъединицы. *в* — строение комплекса F_1, *вид сверху*, со стороны отрицательно заряженной поверхности митохондриальной мембраны. Три α- и три β-субъединицы располагаются вокруг центрального стержня, образованного γ-субъединицей (зеленая спираль). Между соседними α- и β-субъединицами располагаются центры связывания нуклеотидов, играющие важную роль в каталитической активности фермента. Единственная γ-субъединица связана в основном только с одной из трех пар αβ-субъединиц, что служит причиной конформационных различий трех β-субъединиц и их активных центров. Одна из β-субъединиц, конформация которой названа β-ADP, несет в своем активном центре молекулу ADP (желтый шарик). Другая β-субъединица, конформация которой обозначена как β-ATP, связывает в своем активном центре молекулы АТР (красные шарики). Конформация третьей β-субъединицы, не образующей связей с нуклеотидами, названа β-пустой.

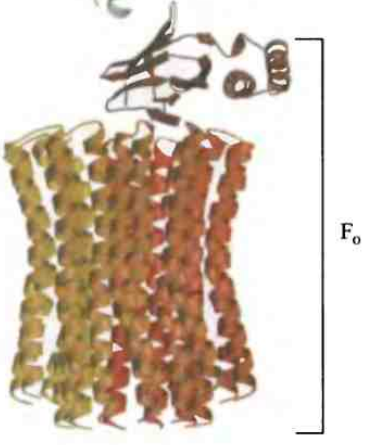
(продолжение рисунка см. на с. 335)



д



г



е

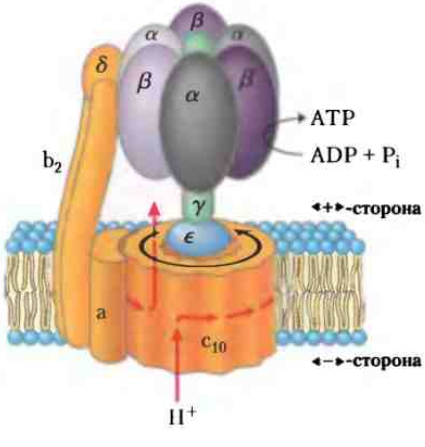
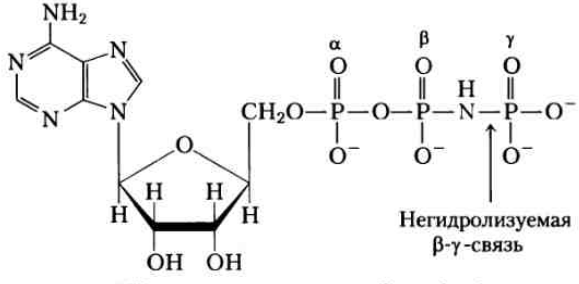


Рис. 19-25. *Продолжение.* *г* — строение комплекса F_oF_1, *вид сбоку*. Модель основана на кристаллографических данных о структуре компонента F_1, выделенного из митохондрий быка, и F_o-компонента, полученного из митохондрий дрожжей (PDB ID 1Q01). В представленной на схеме части комплекса F_oF_1 субъединицы *a*, *b*, δ и ε не показаны. *д* — Строение комплекса F_oF_1, *поперечный разрез, вид сверху*, в направлении от положительно заряженной поверхности митохондриальной мембраны к ее отрицательно заряженной поверхности. На срезе отчетливо видны расположенные по концентрическим окружностям места пересечения двух спиралей каждой из 10 субъединиц, пронизывающих мембрану насквозь. *е* — модель комплекса F_oF_1 на основе биохимических и кристаллографических данных. Две *b*-субъединицы компонента F_o прочно связаны с α- и β-субъединицами компонента F_1, в результате чего «головка» компонента F_1 находится в фиксированном положении относительно митохондриальной мембраны. Погруженный в мембрану цилиндр, состоящий из *c*-субъединиц, связан со стержнем, образованным γ- и ε-субъединицами, составляющими систему в виде буквы Г в комплексе F_1. При прохождении протонов через мембрану по каналам компонента F_o в направлении от положительно заряженной стороны мембраны к отрицательно заряженной происходит вращение цилиндра и стержня. При этом в F_1-компоненте γ-субъединица поочередно образует связи с одной из β-субъединиц, вследствие чего конформации остальных β-субъединиц изменяются.

Конформации β-субъединиц в комплексе F_1 *различны*, хотя их аминокислотные последовательности одинаковы. Одна из причин различия конформаций у этих β-субъединиц состоит в том, что в определенный момент γ-субъединица образует связь только с одной из трех β-субъединиц. Кристаллографическое изучение структуры δ- и ε-субъединиц не проводилось.

Из-за конформационных различий β-субъединиц в комплексе F_1 различаются по строению и их центры связывания ATP и ADP, что было показано в следующем эксперименте. Белок F_1 выделили в кристаллическом виде из смеси, содержащей ADP и App(NH)p — структурный аналог ATP, не гидролизующийся под действием изолированного комплекса F_1. Оказалось, что одна из β-субъединиц присоединяет App(NH)p, другая — молекулы ADP, третья β-субъединица не присоединяет ни один из этих лигандов — ее активный центр остался пустым. В соответствии со свойствами активных центров этих трех β-субъединиц, их конформации обозначены как β-ATP, β-ADP и β-пустая (рис. 19-25, *в*). Различная способность β-субъединиц к присоединению нуклеотидов играет важную роль в механизме каталитического действия комплекса F_1.



App(NH)p (β,γ-имидоаденозин-5′-трифосфат)

В состав белкового комплекса F_o входят три субъединицы (*a*, *b* и *c*) в стехиометрическом соотношении ab_2c_{10-12}; они образуют канал, предназначенный для переноса протонов. Субъединица *c* — небольшой очень гидрофобный полипептид (M_r 8000), состоящий из двух спиралей, пронизывающих мембрану насквозь, и небольшой петли, почти полностью выступающей в митохондриальный матрикс. Как было установлено в 1999 г., в кристаллической структуре комплекса F_oF_1, выделенного из дрожжей, две спирали каждой из 10 субъединиц *c* пронизывают митохондриальную мембрану насквозь почти перпендикулярно ее поверхности. Места пересечения этих спиралей с поверхностью мембраны располагаются по двум концентрическим окружностям (рис. 19-25, *г*, *д*). Внутренняя окружность соответствует местам пересечения с мембраной N-концевых спиралей, внешняя (диаметр ~55 Å) — пересечению C-концевых спиралей. Субъединицы ε и γ в компоненте F_1 образуют систему в виде буквы Г, выступающую одним концом в митохондриальный матрикс, а другим концом опирающуюся на состоящее из концентрически расположенных *c*-субъединиц основание, погруженное в митохондриальную мембрану. Расположение субъединиц комплекса F_oF_1 представлено на рис. 19-25, *е*; схема основана на данных, полученных для фермента F_1, выделенного из митохондрий быка, и комплекса F_oF_1 из дрожжей.

Механизм вращательного катализа — ключ к пониманию изменений селективности связывающих центров

На основе детального изучения кинетики и условий связывания лигандов в активных центрах в ходе реакций, катализируемых ферментом F_oF_1, Поль Бойер предложил механизм **вращательного катализа**, согласно которому каталитический цикл синтеза ATP протекает поочередно в трех активных центрах компонента F_1 (**рис. 19-26**). На первой стадии цикла происходит связывание ADP и фосфата, поступивших из внешней среды, в активном центре одной из β-субъединиц, имеющей благоприятную для этого конформацию (β-ADP). На второй стадии в результате взаимо-

Поль Бойер

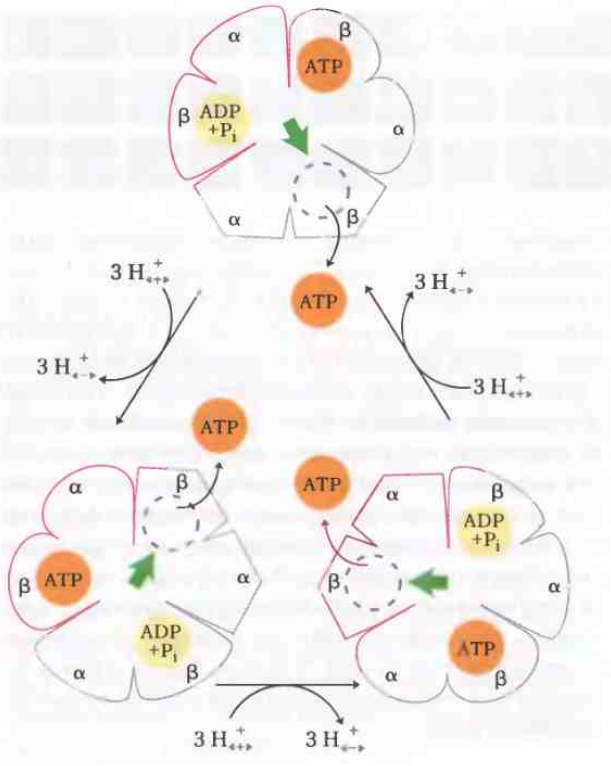


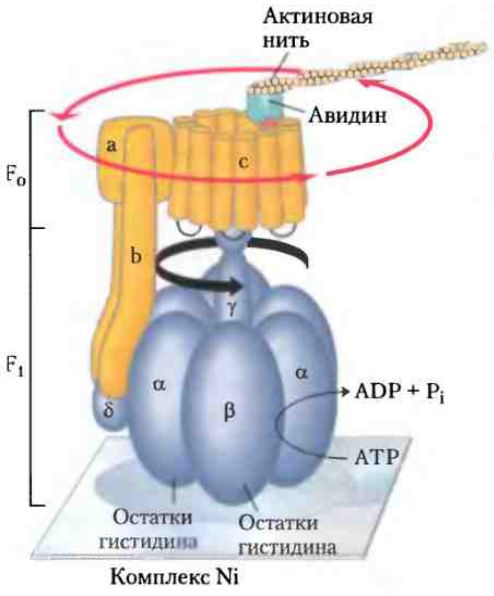
Рис. 19-26. Схема каталитического действия ATP-синтазы согласно вращательному механизму изменения селективности активных центров. Компонент F_1 ATP-синтазы имеет три неэквивалентных аденинуклеотидных центра связывания, расположенных между парами α- и β-субъединиц. В какой-то момент времени один из этих центров находится в β-ATP-конформации, т. е. способен прочно связывать ATP, другой — в β-ADP-конформации, образующей с лигандом слабые связи, третий центр имеет пустую β-конформацию, благоприятную для разрыва связей и высвобождения продукта. В результате поворотов вокруг центрального стержня под действием протон-движущей силы γ-субъединица поочередно касается каждой пары α,β-субъединиц в компоненте F_1, что вызывает одновременное изменение конформаций трех активных центров. Центр с β-ATP-конформацией переходит в пустую β-конформацию, благодаря чему происходит диссоциация ATP. Центр с β-ADP-конформацией переходит в β-ATP, что приводит к образованию ATP из ADP и фосфата. Центр с пустой β-конформацией преобразуется в центр с ADP-β-конформацией, где происходит связывание ADP и фосфата, поступивших из раствора. Согласно предложенному механизму, получившему экспериментальное подтверждение, по меньшей мере в двух из трех каталитических центров должны протекать разные процессы. А именно, молекула ATP не может освободиться из одного центра, пока в другой не поступят ADP и фосфат.

действий в активном центре этой β-субъединицы ее конформация изменяется на β-ATP, благоприятную для образования прочных связей с молекулой ATP. Удерживание молекулы ATP в активном центре приводит систему ADP + P_i и ATP на поверхности фермента в состояние равновесия. На третьей стадии в результате событий в активном центре эта же β-субъединица принимает пустую β-конформацию, для которой характерна низкая степень сродства к ATP, в результате чего молекула ATP высвобождается с поверхности фермента. Следующий цикл катализа начинается с того момента, когда эта же субъединица вновь принимает конформацию β-ADP и связывает в своем активном центре ADP и фосфат.

Гипотеза циклического изменения конформации β-субъединиц в компоненте F_1 лежит в основе теории вращательного катализа при биосинтезе ATP. Биосинтез ATP происходит за счет энергии, высвобождающейся при прохождении протонов из межмембранного пространства в матрикс через канал комплекса F_o. При каждом проходе протонов через протонный канал происходит поворот цилиндра, состоящего из *c*-субъединиц, и связанного с ним стержня, образованного γ-субъединицей, вокруг оси, перпендикулярной плоскости митохондриальной мембраны. Стержень, образованный γ-субъединицей, поворачивается внутри неподвижной (благодаря связям с b_2- и δ-субъединицами) «головки» F_1-компонента, составленной из трех пар α,β-субъединиц (рис. 19-25, *д*). При каждом повороте на 120° γ-субъединица вступает в контакт с разными β-субъединицами. Это изменяет конформацию β-субъединицы до пустой β-конформации, благоприятной для высвобождения ATP.

Изменение конформации β-субъединиц происходит в строгом порядке. Если какая-то β-субъединица переходит в пустую β-конформацию, одна из ее соседних β-субъединиц *обязательно* принимает β-ADP-конформации, а другая β-ATP. Таким образом, при повороте γ-субъединицы на 360° происходит цикл конформационных изменений каждой β-субъединицы от пустой до β-ATP, в результате чего синтезируются и высвобождаются три молекулы ATP.

В соответствии с предложенным механизмом действия ATP-синтазы следовало бы ожидать, что при одном направлении вращения



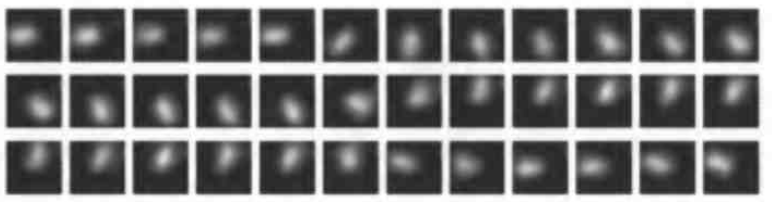


Рис. 19-27. Эксперимент, позволяющий наблюдать вращение компонента F_o и γ-субъединицы. Компонент F_1, модифицированный с помощью генной инженерии и содержащий остатки гистидина, прочно прикреплен к предметному стеклу микроскопа, покрытому комплексным соединением никеля. Биотин присоединен к *c*-субъединице ферментного компонента F_o. Белок авидин, прочно связанный с биотином, ковалентно присоединяется к длинной актиновой нити с флуоресцентной меткой. Актиновые нити соединены с *c*-субъединицей через биотин-авидиновую связь. В процессе гидролиза ATP под действием комплекса F_1 наблюдается непрерывное вращение флуоресцирующей актиновой нити, свидетельствующее о вращении цилиндра, составленного из *c*-субъединиц компонента F_o. Если флуоресцирующая актиновая нить присоединена непосредственно к γ-субъединице, на микрофотографиях, сделанных через каждые 133 мс, видно, что актиновая нить при вращении резко меняет положение в пространстве через каждые 11 кадров. Предполагается, что цилиндр из *c*-субъединиц и стержень, образованный γ-субъединицей, поворачиваются как единое целое.

γ-субъединицы фермент F_oF_1 должен синтезировать ATP, при другом — гидролизовать ATP. Это теоретическое предсказание получило экспериментальное подтверждение в работах Масасукэ Ёшида и Казухико Киношита-мл., которые присоединили длинноцепочечный полимер актин, содержащий флуоресцентную метку, к γ-субъединице и с помощью микроскопа наблюдали вращение γ-субъединицы в компоненте F_1. В аналогичном эксперименте с полноценным ферментом F_oF_1 удалось наблюдать совместно вращение γ-субъединицы и всего цилиндра, состоящего из *c*-субъединиц (**рис. 19-27**). Стержень, состоящий из одной γ-субъединицы, совершал полный поворот на 360° в предсказанном направлении не плавно, а ступенчато в три стадии, поворачиваясь каждый раз на 120°. Эффективность преобразования химической энергии в движение в этой системе, которую Бойер называл «великолепной молекулярной машиной», была рассчитана на основе данных о скорости гидролиза ATP под действием компонента F_1 и торможения длинного актинового полимера, и она оказалась близкой к 100%.

Хемиосмотическая теория допускает дробные значения для соотношения между количеством поглощенного O_2 и количеством образованного ATP

Согласно гипотезе окислительного фосфорилирования, принятой до хемиосмотической теории, суммарное уравнение реакции окисления NADH в дыхательной цепи митохондрий, сопровождающееся образованием ATP, следовало записывать следующим образом:

$$x\,ADP + x\,P_i + \tfrac{1}{2}\,O_2 + H^+ + NADH \rightarrow \rightarrow x\,ATP + H_2O + NAD^+ \qquad (19\text{-}11)$$

где x (**коэффициент P/O** или **коэффициент P/2e$^-$**) должен принимать целочисленные значения. Количество ATP, синтезированного в смеси интактных митохондрий и окисляемого субстрата, например сукцината или NADH, в присутствии кислорода оценивалось экспериментально по убыли кислорода. Однако измерить коэффициент P/O было трудно, поскольку интактные митохондрии используют ATP в различных био-

химических процессах, а кислород расходуется не только на окислительное фосфорилирование. Поэтому в большинстве таких экспериментов для P/O (или ATP / ½ O_2) получали дробные числа, например в случае NADH значения этих коэффициентов были в интервале между 2 и 3, в случае сукцината — между 1 и 2. Тем не менее в течение многих лет для величины P/O были приняты целочисленные значения, равные 3 и 2 для NADH и сукцината соответственно.

Хемиосмотическая теория, объясняющая механизм сопряжения переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий с синтезом ATP в митохондриях, не постулирует целочисленность коэффициента P/O, а подходит к вопросу о стехиометрии процесса окислительного фосфорилирования с иной позиции. Согласно хемиосмотической теории, для оценки стехиометрии процесса окислительного фосфорилирования, т. е. величины P/O, необходимо учитывать не только число протонов, выкачиваемых из матрикса через внутреннюю мембрану митохондрии за счет энергии, высвобождающейся при переносе электронов от одной молекулы NADH к кислороду, но и число протонов, вернувшихся в матрикс через протонный канал в комплексе F_oF_1, в результате чего появляется движущая сила для синтеза ATP. Измерить число протонов, проходящих через митохондриальную мембрану, сложно. Необходимо учитывать буферную емкость митохондрий, непродуктивную утечку протонов через внутреннюю мембрану, т. е. помимо протонного канала комплекса F_oF_1, а также оценивать, какая часть свободной энергии переноса электронов используется не для синтеза ATP, а для других видов клеточной активности, например для транспорта субстратов через митохондриальную мембрану. Общепринято считать, что число протонов, откачиваемых из матрикса при переносе пары электронов от NADH к O_2, равно 10, а от сукцината на O_2 — 6. Чаще всего при интерпретации результатов экспериментов число протонов, при откачке которых из матрикса возникает протон-движущая сила, достаточная для синтеза одной молекулы ATP, принимают равным 4. Протон-движущая сила, возникающая при откачивании одного протона из этих четырех, используется для переноса через митохондриальную мембрану фосфата, молекул ATP и ADP, что подробно обсуждается в других разделах. Если принять, что из 10 протонов, откачанных из матрикса при окислении одной молекулы NADH, четыре возвращаются в матрикс по градиенту концентрации с выделением свободной энергии, достаточной для синтеза одной молекулы ATP, то P/O = 2,5. Когда донором электронов является сукцинат, то при тех же допущениях P/O = 1,5 (6/4). Авторы этой книги используют значения P/O, равные 2,5 и 1,5. Однако значения 2 и 3 также приняты в биохимической литературе. Окончательный ответ на вопрос о стехиометрии реакций окислительного фосфорилирования, по-видимому, будет получен только после детального изучения механизма действия комплекса F_oF_1.

Протон-движущая сила используется для активного транспорта веществ через мембрану

Хотя протон-движущая сила, возникающая из-за наличия градиента концентрации протонов по обе стороны митохондриальной мембраны, используется главным образом для синтеза ATP, часть ее расходуется на перенос через митохондриальную мембрану необходимых для окислительного фосфорилирования веществ. Внутренняя мембрана митохондрий обычно непроницаема для заряженных частиц, но в ней имеются две специфические транспортные системы, которые делают возможным перенос ADP и фосфата в матрикс и вывод ATP в цитозоль (**рис. 19-28**).

Адениннуклеотидтранслоказа — это интегральный белок, пронизывающий толщу внутренней мембраны, связывает молекулу ADP^{3-} в межмембранном пространстве и переносит ее внутрь митохондрии в обмен на одновременно выходящую из матрикса молекулу ATP^{4-}. Ионные формы ATP и ADP изображены на рис. 13-11. Поскольку ATP/ADP-антипортер вводит в матрикс три отрицательных заряда взамен выведенных четырех отрицательных зарядов, то в результате в матрикс поступает отрицательный заряд, что способствует сохранению трансмембранного электрохимического потенциала. На обмен ATP/ADP расходуется энергия протон-движущей силы. Действие адениннуклеотидтранслоказы может быть заблокировано атрактилозидом — токсичным гликозидом,

образующимся в одном из видов чертополоха. Под действием атрактилозида прекращается поступление ADP в митохондрии и вывод ATP из них, в результате чего образование ATP и ADP оказывается невозможным.

Фосфаттранслоказа — вторая транспортная система митохондриальной мембраны, участвующая в окислительном фосфорилировании, она переносит из цитозоля в матрикс ион $H_2PO_4^-$. Перенос фосфата обязательно сопровождается транспортом одного протона с положительно заряженной стороны внутренней мембраны на ее отрицательно заряженную сторону, на что затрачивается высвобождаемая при переносе электронов энергия. Для переноса фосфата и для обмена ATP/ADP источником энергии служит мембранный протонный градиент (рис. 19-28).

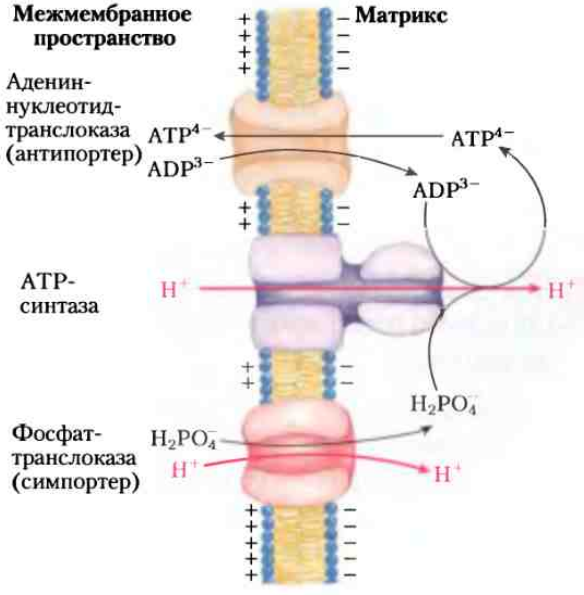


Рис. 19-28. Адениннуклеотидтранслоказа и фосфаттранслоказа — транспортные системы внутренней мембраны митохондрий. Адениннуклеотидтранслоказа — специфический белок, ATP/ADP-антипортер. Он переносит внутрь митохондрий ион ADP^{3-} в обмен на выводимый из матрикса ион ATP^{4-}. В результате такого обмена происходит перенос через мембрану одного отрицательного заряда, чему содействует наличие положительного заряда на внешней стороне внутренней мембраны. Фосфаттранслоказа избирательно переносит из цитозоля в матрикс ион $H_2PO_4^-$, хотя в условиях клетки при pH = 7 фосфат существует в виде двух заряженных частиц HPO_4^{2-} и $H_2PO_4^-$. Переносу $H_2PO_4^-$ сопутствует переход в матрикс иона H^+. В результате такого перемещения ионов не происходит переноса заряда через мембрану, но относительно низкая концентрация протонов в матриксе содействует переносу туда иона H^+. Источником энергии для функционирования ATP-синтазы и двух транспортных систем, осуществляющих перенос субстратов (ADP и P_i) в митохондриальный матрикс и вывод вновь синтезированного ATP из митохондрий в цитозоль, является протон-движущая сила. ATP-синтаза и две транспортные системы выделяются из митохондрий в виде единого комплекса — ATP-синтасомы.

ATP-синтаза и белковые комплексы обеих транслоказ связаны между собой и при разрушении митохондрий мягким детергентом могут быть выделены в виде **ATP-синтасомы**.

В окислении внемитохондриального NADH участвуют челночные системы

Комплекс NADH-дегидрогеназа внутренней митохондриальной мембраны может присоединять электроны только от NADH, находящегося в матриксе. Внутренняя мембрана митохондрии непроницаема для молекул NADH, которые находятся в цитозоле. Каким же образом NADH, образующийся в процессе гликолиза, протекающего, как известно, вне митохондрий, может вновь окисляться до NAD^+ молекулярным кислородом, поступающим через дыхательную цепь? Оказывается, существуют особые челночные системы, переносящие восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH в митохондрии непрямым путем.

Самая активная из этих челночных систем — **малат-аспартатная челночная система**, действующая в митохондриях печени, почек и сердца. Обратимся к **рис. 19-29**, чтобы понять принцип работы этой системы. От цитозольного NADH восстановительные эквиваленты сначала переносятся цитозольной малатдегидрогеназой на цитозольный оксалоацетат, что приводит к образованию малата. Малат, несущий восстановительные эквиваленты, полученные от цитозольного NADH, проходит через внутреннюю мембрану митохондрий в матрикс с помощью малат-α-кетоглутаратной транспортной системы. Внутри митохондрии малат отдает эти восстановительные эквиваленты матриксному NAD^+ в реакции, катализируемой матриксной малатдегидрогеназой. При этом NAD^+ восста-

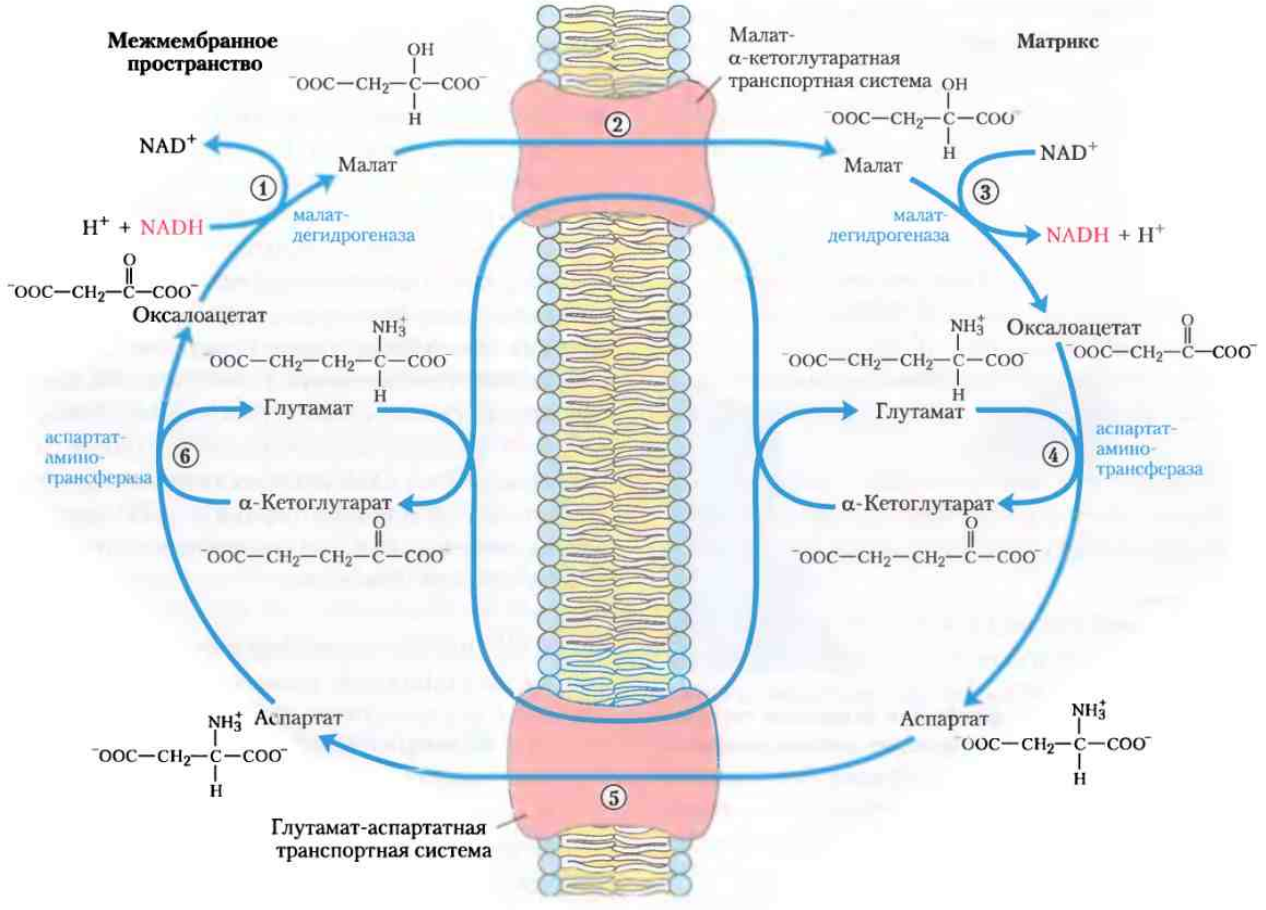


Рис. 19-29. Малат-аспартатная челночная система. Эта система осуществляет перенос восстановительных эквивалентов от цитозольного NADH в митохондриальный матрикс и действует в митохондриях печени, почек и сердца. ① Цитозольный NADH передает два восстановительных эквивалента на цитозольный оксалоацетат, что приводит к образованию малата. ② Несущий восстановительные эквиваленты малат переносится через внутреннюю мембрану при помощи малат-α-кетоглутаратной транспортной системы. ③ В матриксе малат передает два восстановительных эквивалента на матриксный NAD^+. Образовавшийся в матриксе NADH окисляется электронами митохондриальной дыхательной цепи. Продукт малатдегидрогеназной реакции оксалоацетат не способен пройти через мембрану, чтобы вернуться в цитозоль. ④ Под действием трансаминазы оксалоацетат превращается в аспартат. ⑤ Аспартат может быть перенесен через мембрану глутамат-аспартатной транспортной системой. ⑥ В цитозоле оксалоацетат регенерируется и начинается новый оборот челночного цикла.

навливается до NADH, который может теперь передавать свои электроны прямо в дыхательную цепь внутренней митохондриальной мембраны. В малат-аспартатной системе при передаче на кислород каждой пары электронов синтезируется 2,5 молекулы АТР. Цитозольный оксалоацетат регенерируется под действием трансаминазы, и начинается новый оборот челночного цикла.

В скелетных мышцах и в мозге перенос восстановительных эквивалентов от NADH осуществляется челночной системой другого типа. Это так называемая **глицерин-3-фосфатная челночная система (рис. 19-30)**. Она отличается от малат-аспартатной системы тем, что восстановительные эквиваленты передаются ею от NADH в дыхательную цепь и на убихинон, т. е. в комплекс III, а не в комплекс I. В глицерин-3-

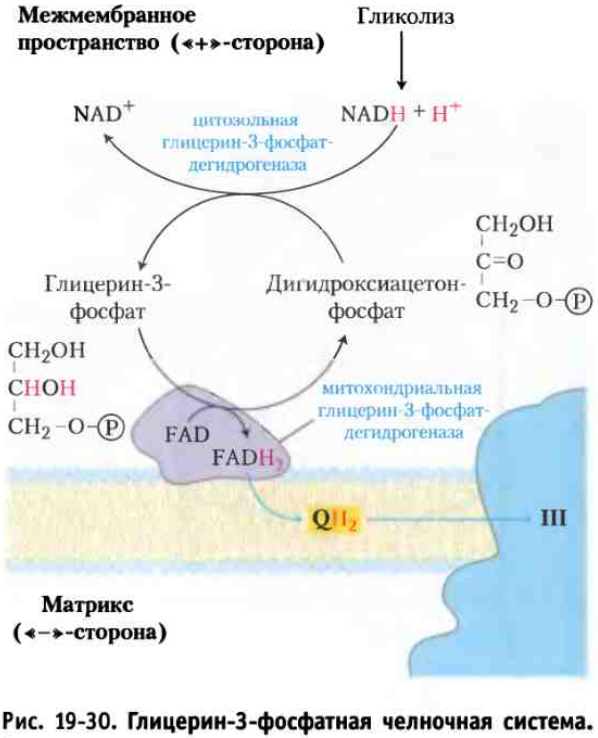


Рис. 19-30. Глицерин-3-фосфатная челночная система. Эта челночная система осуществляет перенос восстановительных эквивалентов от цитозольного NADH в митохондриальный матрикс. Система действует в скелетных мышцах и в мозге. От цитозольного NADH два восстановительных эквивалента сначала переносятся цитозольной глицерин-3-фосфатдегидрогеназой на дигидроксиацетонфосфат. Два восстановительных эквивалента от цитозольного глицерин-3-фосфата передаются затем на убихинон изоферментом глицерин-3-фосфатдегидрогеназой, расположенной на внешней стороне внутренней мембраны. Глицерин-3-фосфатная транспортная система не связана с мембранными транспортными системами.

фосфатной челночной системе при окислении NADH образуется 1,5 молекулы ATP на каждую пару перенесенных электронов.

В митохондриях растений существует так называемая «*внешняя*» NADH-дегидрогеназа, которая передает электроны от цитозольного NADH в митохондриальную дыхательную систему прямо через убихинон, минуя NADH-дегидрогеназу в комплексе I и связанную с этим комплексом откачку протонов. Окисление цитозольного NADH дает меньший выход ATP, чем окисление NADH матрикса. (см. доп. 19-1).

Краткое содержание раздела 19.2 СИНТЕЗ ATP

- Перенос электронов через ферментативные комплексы I, III и IV сопровождается выкачиванием протонов из матрикса через внутреннюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство, в результате чего матрикс становится более щелочным, а межмембранное пространство более кислым. Между двумя сторонами внутренней митохондриальной мембраны создается градиент концентрации ионов H^+. Именно этот градиент служит движущей силой синтеза ATP из ADP и неорганического фосфата под действием фермента ATP-синтазы (комплекса F_oF_1) во внутренней митохондриальной мембране.

- ATP-синтаза катализирует синтез ATP в митохондриях по вращательному механизму. Суть механизма вращательного катализа состоит в том, что при каждом переносе протонов из цитозоля в матрикс через канал F_o-компонента происходит циклическое изменение конформации каждого из трех центров связывания нуклеотидов в компоненте F_1. Эти центры поочередно принимают конформацию, благоприятную для связывания (ADP + P_i), для связывания ATP и, наконец, пустую конформацию, обеспечивающую освобождение продукта с поверхности фермента.

- Для образования ATP на поверхности фермента требуется небольшое количество энергии. Энергия протон-движущей силы при ферментативном синтезе ATP в митохондриях расходуется в основном на высвобождение ATP из центра связывания на поверхности ATP-синтазы.

- Если электроны поступают в дыхательную цепь митохондрии через комплекс I, то коэффициент P/O (отношение количества синтезированного ATP к восстановленным до H_2O атомам кислорода) равен примерно 2,5. Когда электроны по дыхательной цепи поступают сразу на кофермент Q, P/O = 1,5.

- Энергия, запасенная в виде градиента концентрации протонов, может использоваться для переноса растворенных веществ через митохондриальную мембрану.

- Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для NADH и NAD^+, находящихся в цитозоле. Восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH переносятся в матрикс с помощью одной из двух челночных систем. Малат-аспартатная система переносит восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH в дыхательную митохондриальную цепь через комплекс I. Коэффициент окислительного фосфорилирования при этом равен 2,5. Глицерин-3-фосфатная челночная система передает восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH в дыхательную митохондриальную цепь через кофермент Q. При этом P/O = 1,5.

19.3. Регуляция окислительного фосфорилирования

Основные количества необходимого ATP в аэробных клетках синтезируется в процессе окислительного фосфорилирования. На каждую молекулу глюкозы, полностью окисленную до CO_2, образуется от 30 до 32 молекул ATP (табл. 19-5). При полном окислении пальмитоил(16:0)-CoA, которое также протекает в митохондриальном матриксе, образуется 108 молекул ATP на одну молекулу пальмитоил-CoA (см. табл. 17-1). Аналогичные расчеты выхода ATP можно произвести для процессов окисления каждой из аминокислот, что подробно обсуждается в гл. 18. Для сравнения при гликолизе в анаэробных условиях, т. е. при молочнокислом брожении, на каждую окисленную молекулу глюкозы образуется только 2 молекулы ATP. Эти примеры показывают, что эволюционное развитие процесса окислительного фосфорилирования привело к резкому увеличению энергетической эффективности процессов катаболизма. Процессы окисления в аэробных клетках включают перенос электронов по дыхательной митохондриальной цепи и сопровождаются окислительным фосфорилированием, и исключительно важное значение имеет возможность определения количества образующегося ATP, а также понимание механизма регулирования процесса его образования в соответствии с меняющимися нуждами клетки.

Образование ATP при окислительном фосфорилировании регулируется энергетическими потребностями клетки

Интенсивность дыхания митохондрий, т. е. скорость потребления O_2, регулируется в клетках с высокой точностью. В общем случае скорость потребления кислорода ограничена концентрацией ADP, в результате фосфорилирования которого в митохондриях образуется ATP. Зависимость скорости потребления кислорода от концентрации ADP — акцептора фосфата — называют **акцепторным контролем** дыхания. **Коэффициент акцепторного контроля** — отношение максимального потребления кислорода в присутствии ADP к его потреблению в состоянии покоя, и в различных тканях животных это отношение равно или больше 10.

Таблица 19-5 Выход ATP при полном окислении глюкозы

Процесс	Прямой продукт	Выход ATP
Гликолиз	2 NADH (в цитозоле)	3 или 5*
	2 ATP	2
Окисление пирувата (2 мол. на 1 мол. глюкозы)	2 NADH (в митохондриальном матриксе)	5
Окисление ацетил-CoA в цикле лимонной кислоты (2 мол. на 1 мол. глюкозы)	6 NADH (в митохондриальном матриксе)	15
	2 $FADH_2$	3
	2 ATP или 2 GTP	2
Суммарный выход ATP		30 или 32

* Число образовавшихся молекул ATP зависит от типа челночной системы, переносящей восстановительные эквиваленты в митохондриях.

Одной из характеристик энергетического состояния клеток служит внутриклеточная концентрация ADP, которую можно выразить через **отношение действующих масс** системы ATP–ADP: [ATP] / [ADP] [P_i]. Обычно это отношение очень велико, т. е. система ATP–ADP почти полностью фосфорилирована. Если скорость любых клеточных процессов, например синтез белков, требующих затрат энергии (расходования ATP), возрастает, то увеличивается скорость расщепления клеточного ATP до ADP и фосфата, в результате чего отношение действующих масс уменьшается. Увеличение концентрации ADP автоматически приведет теперь к повышению скорости переноса электронов и окислительного фосфорилирования, а следовательно, к усилению регенерации ATP из ADP. Это будет продолжаться до тех пор, пока отношение действующих масс не вернется к своему нормальному высокому значению; в этот момент дыхание снова замедлится. Скорость окисления клеточного «топлива» регулируется обычно с такой чувствительностью и точностью, что в большинстве тканей отношение [ATP] / [ADP] [P_i] колеблется в очень узких пределах, даже когда потребность в энергии меняется. Иными словами, ATP образуется со скоростью, как раз достаточной для того, чтобы компенсировать его расход в процессах, требующих затраты энергии.

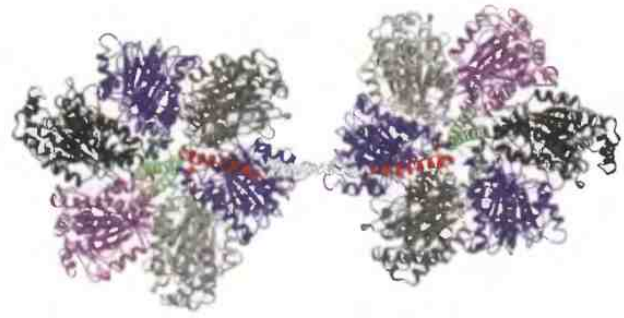


Рис. 19-31. Строение комплекса регуляторного белка IF_1 с F_1-ATPазой, выделенной из клеток быка (PDB ID 1OHH). Белковый ингибитор IF_1 (красная спираль) соединяется с двумя молекулами фермента F_1 (его структуру см. на рис. 19-25, *г*) через центры связывания, расположенные между соседними α,β-субъединицами, α-ADP- и β-ADP-конформации (соответственно) в «головке» F_1. Светлые спирали — части ингибитора IF_1, которые легко выделяются из кристаллов изолированного IF_1, но не могут быть получены из кристаллов его комплекса с ферментом F_1. Комплекс IF_1 с ферментом F_1 существует только при низких pH в цитозоле, т. е. при гликолитических процессах образования ATP. При возобновлении аэробных метаболических процессов pH в цитозоле увеличивается, действие ингибитора прекращается и функции ATP-синтазы восстанавливаются.

При гипоксии гидролиз ATP в клетках блокируется белковым ингибитором

Как показано в предыдущих разделах (см. рис. 11-39), фермент ATP-синтазу можно считать насосом по выкачиванию протонов из митохондриального матрикса в межмембранное пространство, работающим за счет энергии ATP и катализирующим процесс, обратный синтезу ATP. Если клетка находится в состоянии гипоксии, т. е. лишена кислорода, как это бывает при сердечном приступе или инсульте, поступление электронов на кислород по дыхательной цепи митохондрий прекращается, и, следовательно, приостанавливается выкачивание протонов из матрикса. Протон-движущая сила при этом исчезает. Казалось бы, в этих условиях фермент ATP-синтаза должен катализировать обратную реакцию — гидролиз ATP, чтобы поставлять энергию для выкачивания протонов из матрикса. Но это привело бы к уменьшению концентрации ATP в клетке до гибельного уровня. Поэтому никакого гидролиза ATP не происходит — ATPазная (гидролизующая) активность ATP-синтазы в этих условиях блокируется небольшим белковым ингибитором IF_1, состоящим из 84 аминокислот (**рис. 19-31**). Ингибитор IF_1 образует связи одновременно с двумя молекулами ATP-синтазы. Активность IF_1 проявляется при pH < 6,5, когда он существует в виде димера. Без доступа кислорода ATP образуется в клетках главным образом путем гликолиза, в процессе которого выделяются также пировиноградная и молочная кислоты, понижающие pH цитозоля и митохондриального матрикса. Таким образом, при прекращении доступа кислорода в клетки в них создаются условия для образования димерной формы белка IF_1, которая блокирует гидролизующую активность ATP-синтазы, в результате чего предотвращается бесполезный расточительный гидролиз ATP. При возобновлении аэробных метаболических процессов концентрация пировиноградной кислоты уменьшается, pH в цитозоле увеличивается, вследствие чего димер белкового комплекса IF_1 распадается и восстанавливаются функции фермента ATP-синтазы.

Гипоксия приводит к образованию АФК и некоторым адаптационным реакциям

В условиях гипоксии в клетках нарушается баланс между поступлением электронов от окисления топливных молекул в митохондриальном матриксе и переносом электронов к молекулярному кислороду, в результате чего происходит усиленное образование активных форм кислорода (АФК). Наряду с глутатионпероксидазой (рис. 19-18) в клетках есть две другие линии защиты от радикалов кислорода (**рис. 19-32**). Первая из них заключается в регуляции фермента пируватдегидрогеназы (PDH), поставляющей в цикл лимонной кислоты ацетил-CoA (гл. 16). В условиях гипоксии киназа пируватдегидрогеназы фосфорилирует митохондриальную PDH, инактивируя ее и замедляя поставку $FADH_2$ и NADH из цикла лимонной кислоты в дыхательную цепь. Второй путь, предотвращающий образование АФК, состоит в замене

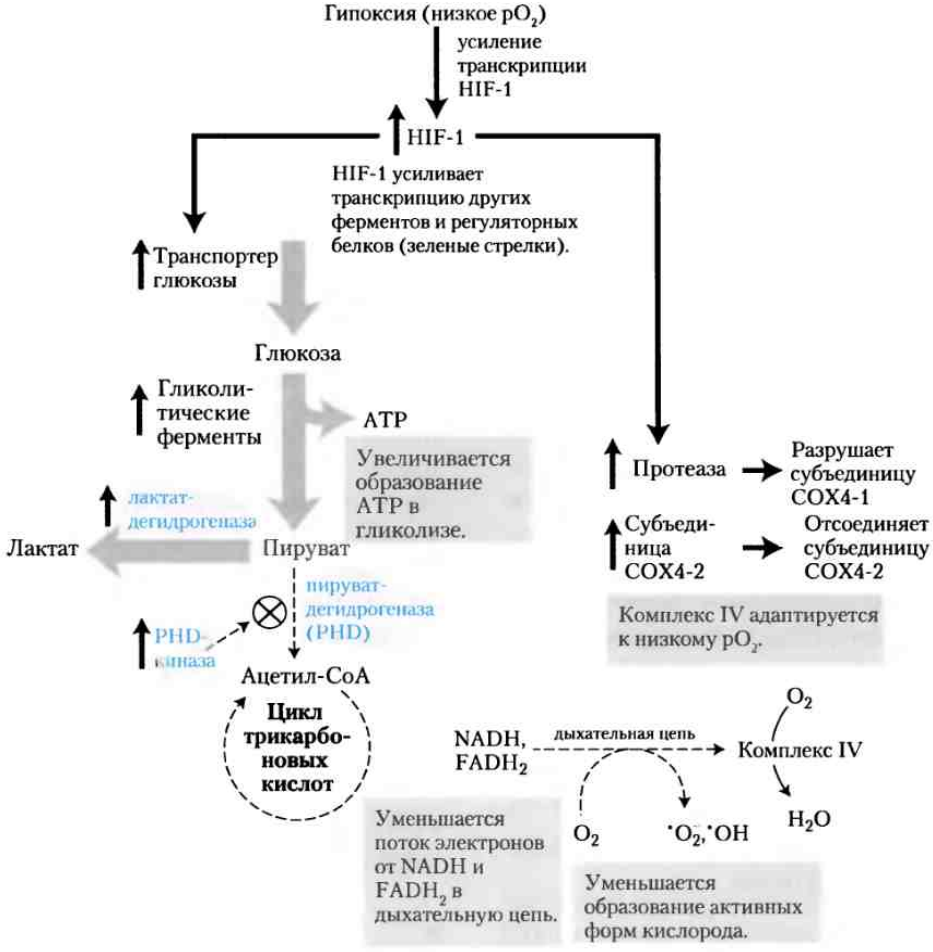


Рис. 19-32. Индуцируемый гипоксией фактор HIF-1 регулирует экспрессию генов, уменьшающих образование активных форм кислорода (АФК). При недостатке кислорода (гипоксии) HIF-1 синтезируется в больших количествах и действует как фактор транскрипции, усиливающего синтез переносчика глюкозы, гликолитических ферментов, киназы пируватдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, субъединицы цитохром-*c*-оксидазы COX4-2 и протеазы, разрушающей субъединицу цитохром-*c*-оксидазы COX4-1. Эти изменения препятствуют образованию АФК путем снижения синтеза NADH и $FADH_2$, а также с помощью оптимизации действия цитохром-*c*-оксидазы комплекса IV. Толстыми серыми стрелками обозначены реакции, стимулируемые HIF-1, тонкими штриховыми стрелками — реакции, ингибируемые HIF-1.

одной субъединицы комплекса IV, известной как цитохром-*c*-оксидаза 4-1 (COX4-1), на другую субъединицу — цитохром-*c*-оксидазу 4-2 (COX4-2), которая лучше приспособлена к условиям гипоксии. Каталитические свойства комплекса IV, содержащего COX4-1, оптимальны для дыхания в условиях нормальной концентрации кислорода, а при наличии COX4-2 комплекс IV оптимизирован для условий гипоксии.

Изменение активности PDH и замена COX4-1 на COX4-2 в составе комплекса IV происходят при участии индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 (от англ. ***hypoxia-inducible factor***-1). При гипоксии это вещество накапливается в клетках и действует как фактор транскрипции, усиливает синтез киназы пируватдегидрогеназы, COX4-2 и протеиназ, разрушающих COX4-1. Напомним, что HIF-1 также опосредует изменения транспорта глюкозы и гликолитических ферментов, что приводит к эффекту Пастера (уменьшению скорости потребления глюкозы и прекращению накопления лактата в присутствии кислорода; см. доп. 14-1).

Если перечисленных механизмов защиты от АФК оказывается недостаточно (что может быть связано с генетическими мутациями одного из защитных белков или с чрезвычайно высокими скоростями образования АФК), функционирование митохондрий нарушается. Возможно, нарушения работы митохондрий вносят свой вклад в процесс старения организма, в развитие болезней сердца, некоторых редких форм диабета (см. ниже) и некоторых наследуемых по материнской линии генетических заболеваний, поражающих нервную систему. ■

Все стадии синтеза ATP при катаболизме углеводов координируются взаимосвязанными регуляторными механизмами

Главные стадии катаболизма имеют собственные взаимосвязанные регуляторные механизмы, благодаря которым все стадии катаболизма функционируют в едином экономичном и саморегулируемом режиме. Взаимосвязанно протекают процессы образования ATP и некоторых промежуточных продуктов, используемых в качестве предшественников в реакциях биосинтеза других клеточных компонентов. Относительные концентрации ATP и ADP, иными словами, отношение действующих масс в системе ATP–ADP, определяют не только скорость переноса электронов и окислительногофосфорилирования, но и скорость цикла лимонной кислоты, окисления пирувата и процесса гликолиза (**рис. 19-33**). При увеличении расхода ATP, т. е. уменьшении его концентрации, возрастает концентрация ADP и фосфата и увеличивается скорость переноса электронов и скорость окислительного фосфорилирования. Одновременно повышается скорость окисления пирувата через цикл лимонной кислоты, таким образом, усиливается приток электронов в дыхательную цепь. Эти события в свою очередь приводят к увеличению скорости гликолиза, обеспечивая усиленное образование пирувата. Когда же концентрация ADP вследствие превращения его в ATP устанавливается на низком уровне, перенос электронов и окислительное фосфорилирование замедляются. Цикл лимонной кислоты и гликолиз при этом тоже замедляются, потому что ATP действует как аллостерический ингибитор ферментов фосфофруктокиназы-1 (см. рис. 15-14) и пируватдегидрогеназы (см. рис. 16-18).

Фосфофруктокиназа-1 также ингибируется цитратом — первым промежуточным продуктом цикла лимонной кислоты. Во время «холостого» цикла цитрат накапливается в митохондриях и затем выбрасывается в цитозоль. Когда концентрации ATP и цитрата начинают превышать их обычный уровень, они, действуя согласованно, вызывают аллостерическое ингибирование фосфофруктокиназы-1, причем эффект от такого двойного ингибирования оказывается большим, чем сумма индивидуальных эффектов.

Краткое содержание раздела 19.3 РЕГУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

- Окислительное фосфорилирование регулируется энергетическими потребностями клетки. Концентрация ADP внутри клеток и отношение действующих масс [ATP] / [ADP] [P_i] отражают энергетическое состояние клеток.

- При гипоксии, т. е. при недостаточном поступлении кислорода в клетки, белковый ингибитор блокирует фермент ATP-синтазу,

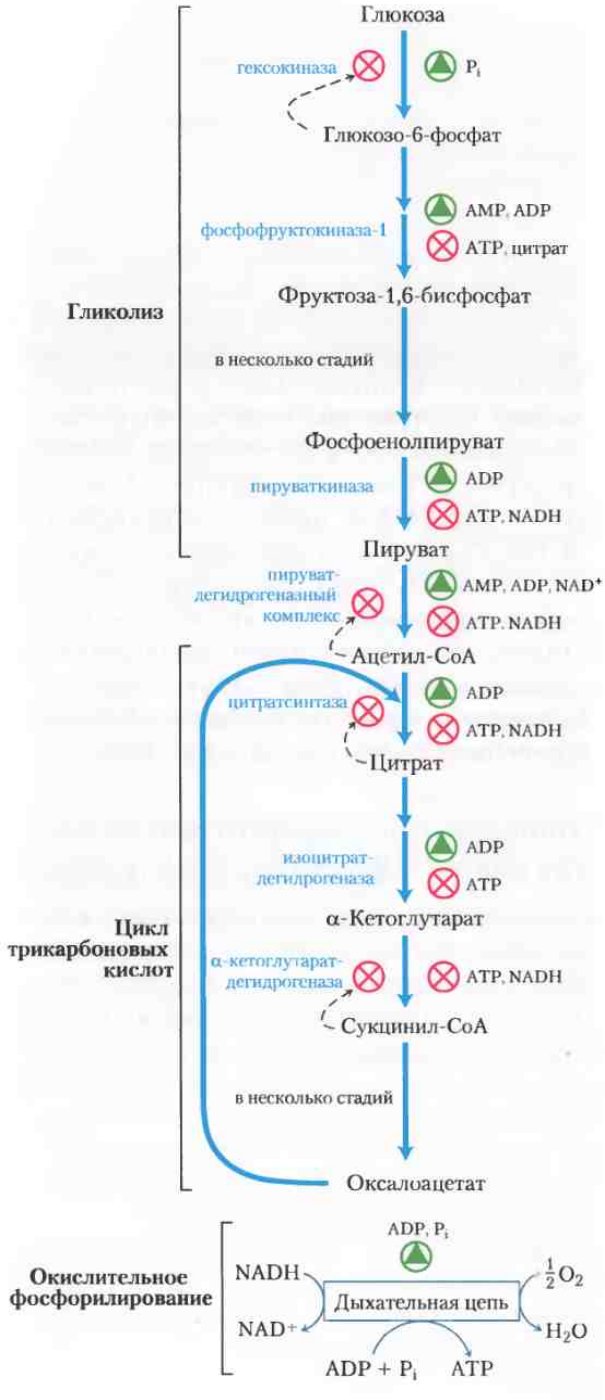


Рис. 19-33. Регуляция путей образования ATP. Взаимозависимая регуляция гликолиза, окисления пирувата, цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования, определяемая относительными концентрациями ATP, ADP, AMP и NADH. При высокой концентрации ATP и, соответственно, при низких концентрациях ADP и AMP, скорости гликолиза, окисления пирувата, цикла лимонной кислоты и окислительного фосфорилирования минимальны. Если расходование ATP в клетке резко усиливается и, значит, концентрации ADP, AMP и фосфата возрастают, все эти четыре процесса ускоряются. Взаимосвязь гликолиза и цикла лимонной кислоты, осуществляемая через цитрат, подавляющий гликолиз, дополняет регуляторное действие адениннуклеотидной системы. Кроме того, при повышении концентрации NADH и ацетил-CoA подавляется процесс окисления пирувата до ацетил-CoA, а при высоком значении отношения [ATP] / [ADP] подавляются дегидрогеназные реакции в цикле лимонной кислоты (см. рис. 16-18).

которая в таких условиях вызывает гидролиз ATP, в результате чего предотвращается понижение концентрации ATP до опасного для клеток уровня.

- Адаптация к условиям гипоксии, опосредованная действием HIF-1, заключается в замедлении передачи электронов по дыхательной цепи и оптимизации комплекса IV для работы в условиях недостатка кислорода.

- Скорости гликолиза, цикла лимонной кислоты и процесса окислительного фосфорилирования согласованы между собой. Эта согласованность обеспечивается взаимосвязанными регуляторными механизмами, реагирующими на концентрации ATP и ADP.

19.4. Роль митохондрий в термогенезе, синтезе стероидов и апоптозе

Основная функция митохондрий — синтез ATP. Однако митохондрии также принимают участие в процессах, которые в некоторых тканях и при некоторых обстоятельствах становятся решающими. В жировой ткани митохондрии создают тепло, чтобы защитить жизненно важные органы от переохлаждения, в надпочечниках и половых железах митохондрии задействованы в синтезе стероидных гормонов и практически во всех тканях они участвуют в процессе апоптоза (программируемой клеточной гибели).

Разобщение дыхания и фосфорилирования в митохондриях бурого жира позволяет генерировать тепло

Мы упоминали выше, что при адекватном поступлении АТР в клетку скорость дыхания снижается. Из этого общего правила есть одно интересное исключение. У большинства новорожденных млекопитающих, в том числе у новорожденных детей, есть особая жировая ткань — **бурый жир** (с. 588). Ее назначение в том, чтобы в процессе окисления жиров предотвращать синтез АТР и вырабатывать тепло, благодаря которому температура тела новорожденных поддерживается на должном уровне.

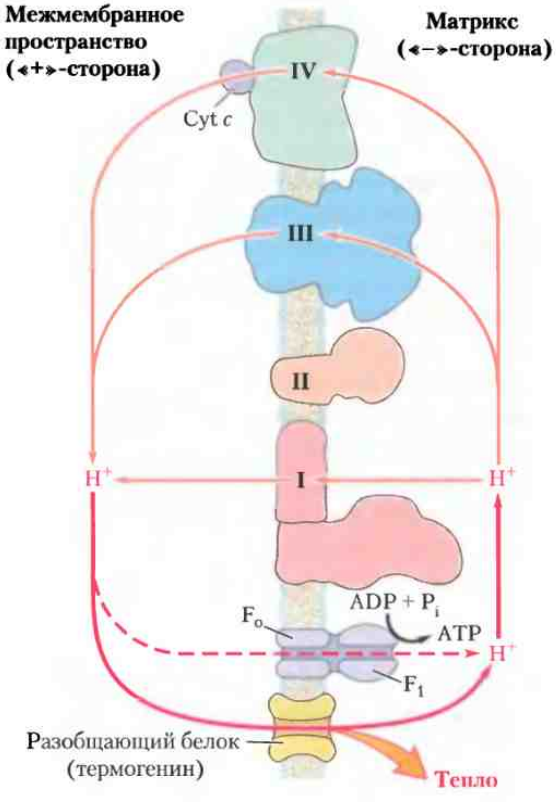


Рис. 19-34. Образование теплоты при разобщении дыхания и фосфорилирования в митохондриях. Разобщающий белок (термогенин), локализованный в мембране митохондрий бурого жира, имеет специальные поры для ионов H^+. Ионы H^+, выведенные из митохондрий в результате переноса электронов, возвращаются в митохондриальный матрикс через эти поры, минуя АТР-синтазу, вследствие чего энергия, протонного градиента рассеивается в виде теплоты, а не используется для синтеза АТР.

Эта особая жировая ткань действительно окрашена в бурый цвет, потому что в ней очень много митохондрий с большим содержанием цитохромов, гемовые группы которых интенсивно поглощают в видимой области спектра.

Митохондрии бурого жира во многом похожи на митохондрии других клеток млекопитающих, но содержат во внутренней мембране **разобщающий белок термогенин** (продукт гена *UCP1*). Благодаря термогенину ионы H^+, выведенные из митохондрий за счет энергии переноса электронов, возвращаются в матрикс минуя ферментативный комплекс F_oF_1 (**рис. 19-34**). В результате свободная энергия переноса электронов используется не для синтеза АТР, а для выработки тепла, которое идет на поддержание нужной температуры тела (см. рис. 23-17). У некоторых животных, впадающих в зимнюю спячку, разобщение дыхания и фосфорилирования в митохондриях бурого жира позволяет генерировать тепло для поддержания температуры тела во время спячки (см. доп. 17-1). Мы вернемся к роли термогенина при обсуждении регуляции массы тела в гл. 23 (с. 607–608).

Митохондриальные ферменты системы Р-450 катализируют гидроксилирование стероидов

В митохондриях происходят реакции биосинтеза, приводящие к образованию стероидных гормонов, включая половые гормоны, глюкокортикоиды, минералокортикоиды и витамин D. Эти вещества синтезируются из холестерина или родственных веществ в серии реакций гидроксилирования, катализируемых ферментами из семейства **цитохрома Р-450**, в каждом из которых присутствует гемовая группа (способность гема поглощать свет на длине волны 450 нм дала название всему семейству ферментов). В реакциях гидроксилирования один атом молекулярного кислорода включается в субстрат, а второй восстанавливается до H_2O

$$R{-}H + O_2 + NADPH \rightarrow R{-}OH + H_2O + NADP^+$$

Семейство Р-450 объединяет несколько десятков ферментов, и все они сосредоточены на внутренней митохондриальной мембране, а их каталитические центры обращены в сторону матрикса. Стероидогенные клетки (клетки, синтезирующие стероиды) содержат митохондрии, специализирующиеся на синтезе стероидов; такие митохон-

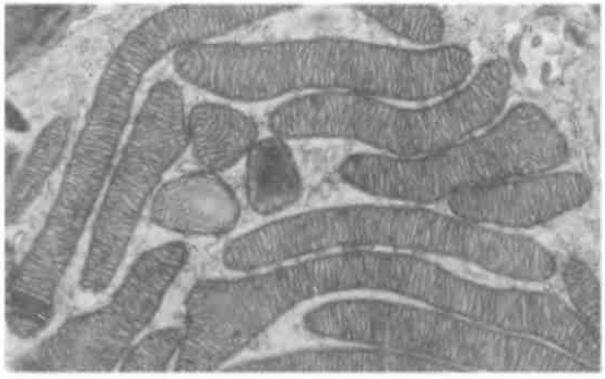


Рис. 19-35. Митохондрии надпочечников, специализирующиеся на синтезе стероидов. Как видно на этой электронной микрофотографии тонкого среза ткани надпочечников, здесь сосредоточено множество митохондрий с многочисленными кристами, что обеспечивает большую поверхность внутренней мембраны, на которой локализуются ферменты системы Р-450.

дрии обычно крупнее митохондрий клеток других тканей и имеют более развитую и извитую поверхность внутренней мембраны **(рис. 19-35)**.

Путь электронов в митохондриальной системе Р-450 достаточно сложен; в нем участвуют флавопротеин и железо-серный белок, переносящие электроны от NADPH к гему Р-450 **(рис. 19-36)**. Структура ферментов семейства Р-450 обеспечивает их субстратную специфичность и позволяет гемовой группе реагировать непосредственно с молекулой O_2.

Еще одно большое семейство ферментов Р-450 обнаружено в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов. Эти ферменты катализируют реакции, сходные с теми, что происходят при участии митохондриальных ферментов семейства Р-450, однако круг их субстратов очень широк, в частности, разнообразные гидрофобные соединения, многие из которых — **ксенобиотики** (вещества, которые не встречаются в природе, а образуются только в промышленных процессах). Ферменты семейства Р-450, находящиеся в эндоплазматическом ретикулуме, характеризуются широкими и перекрывающимися между собой субстратными специфичностями. Гидроксилирование гидрофобных соединений улучшает их растворимость в воде, что способствует их выведению из организма с мочой через почки. К субстратам оксигеназ семейства Р-450 относятся многие распространенные лекарственные препараты. Реакции, катализируемые ферментами семейства Р-450, сокращают время жизни лекарственных препаратов в кровотоке и снижают их терапевтическое действие. У разных людей набор цитохромов Р-450 в эндоплазматическом ретикулуме несколько различается в связи с генетическими особенностями, а для некоторых ферментов этого семейства обнаружены также индивидуальные вариации степени их индуцирования, например, в связи с употреблением алкоголя. Поэтому при назначениях лекарственных препаратов и выборе дозы очень важно учитывать генетические особенности и историю болезни пациента; однако на практике такой индивидуальный подход не реализуется из экономических соображений, но, возможно, он станет возможен в будущем. ■

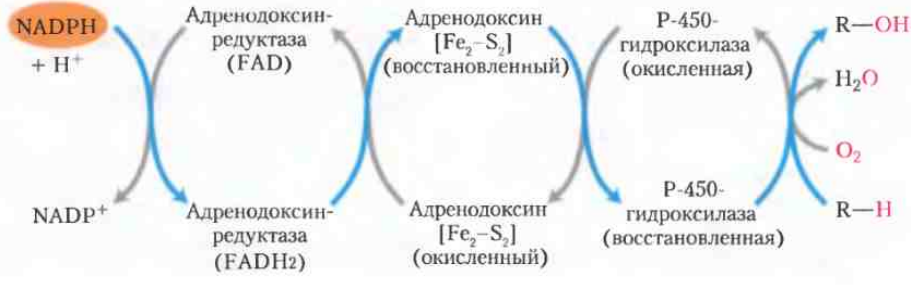


Рис. 19-36. Путь передачи электронов с участием системы цитохрома Р-450 в митохондриях клеток надпочечников. Два электрона передаются от NADPH к FAD-содержащему флавопротеину адренодоксинредуктазе, который пропускает по одному электрону к адренодоксину — небольшому растворимому в воде 2Fe-2S-белку. Адренодоксин передает одиночные электроны к гидроксилазе системы цитохрома Р-450, которая непосредственно взаимодействует с O_2 и субстратом (R–H), образуя продукты: H_2O и R–OH.

Митохондрии играют важную роль в инициировании апоптоза

Апоптоз, или **программируемая гибель клетки**, заключается в гибели отдельных клеток, когда это необходимо организму (например, в процессе нормального эмбрионального развития); при этом организм сохраняет компоненты клетки, такие как аминокислоты, нуклеотиды и т. д. Апоптоз может быть вызван внешним сигналом, действующим на рецепторы плазматической мембраны, а также внутренними событиями, такими как повреждение ДНК, вирусная инфекция, окислительное повреждение под действием АФК или другой стресс, например тепловой шок.

Митохондрии играют очень важную роль в запуске апоптоза. Когда в результате стресса поступает сигнал к уничтожению клетки, одно из первых изменений — повышение проницаемости внешней мембраны митохондрий, что позволяет цитохрому *c* проникнуть из межмембранного пространства в цитозоль (**рис. 19-37**). Повышение проницаемости мембраны происходит благодаря открыванию так называемых **гигантских пор**, образованных субъединицами белка во внешней мембране митохондрий. На открывание и закрывание этих пор влияют некоторые белки, стимулирующие или подавляющие апоптоз. При переходе в цитозоль цитохром *c* взаимодействует с мономерами белка **Apaf-1** (*apoptosis protease activating factor*-1), что приводит к образованию **апоптосомы**, состоящей из семи молекул Apaf-1 и семи молекул цитохрома *c*. В апоптозоме происходит активация протеазы прокаспазы-9 с образованием каспазы-9, принадлежащей к семейству специфичных протеаз (**каспаз**), участвующих в апоптозе. В активном центре всех белков этого семейства присутствует остаток цистеина, и все они расщепляют белки только у остатка аспарагина, причем со стороны С-конца аминокислотной последовательности; отсюда происходит их название — каспазы (от англ. *caspase: carboxyl-terminal side of* ***Asp*** *residues*). Активированная каспаза-9 инициирует каскад протеолитических процессов, в которых одна каспаза активирует другую, та — третью и т. д. (см. рис. 12-51). Участие цитохрома *c* в процессе апоптоза — пример реализации скрытых функций фермента.

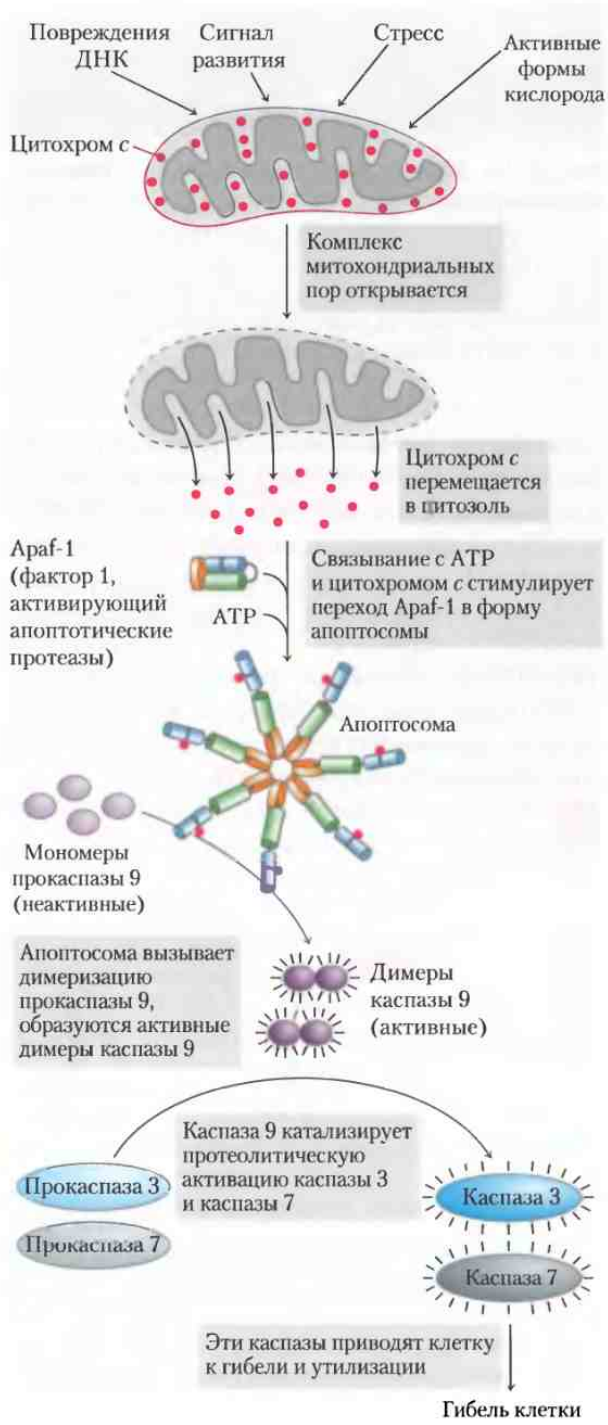


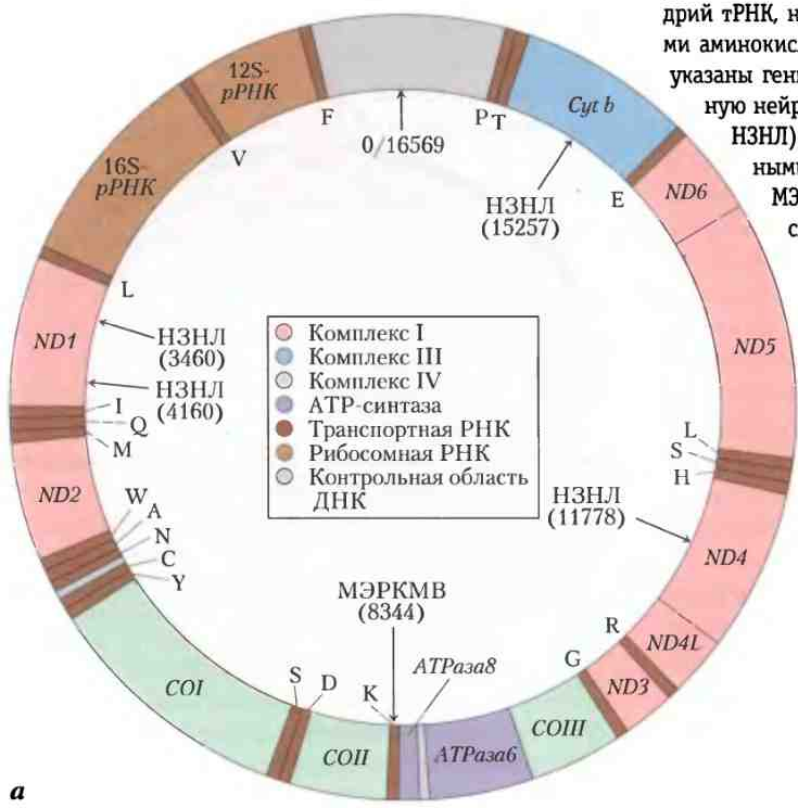
Рис. 19-37. Роль цитохрома *c* в апоптозе. Цитохром *c* — небольшой растворимый митохондриальный белок, расположенный в межмембранном пространстве; его функция заключается в переносе электронов между комплексами III и IV в дыхательной цепи. Однако он выполняет в клетке еще одну, совершенно иную функцию, запуская апоптоз путем стимуляции семейства протеиназ, называемых каспазами.

Краткое содержание раздела 19.4 РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ТЕРМОГЕНЕЗЕ, СИНТЕЗЕ СТЕРОИДОВ И АПОПТОЗЕ

- У новорожденных в митохондриях бурого жира перенос электронов по дыхательной цепи и синтез АТР разобщены, поэтому свободная энергия, высвобождающаяся при окислении жирных кислот, рассеивается в виде метаболического тепла.
- При синтезе стероидных гормонов в стероидогенных тканях (надпочечниках, половых железах, печени и почках) реакции гидроксилирования осуществляются в специализированных митохондриях.
- В процессе апоптоза разрушение белка происходит под действием протеолитического фермента каспазы 9, который активизируется цитохромом *c*, вышедшим из межмембранного пространства в цитозоль при получении клеткой сигнала к апоптозу.

19.5. Митохондриальные гены: происхождение и мутации

В кольцевых двуспиральных молекулах митохондриальных ДНК содержится набор митохондриальных генов. В типичной клетке каждая из сотен или тысяч митохондрий имеет около пяти копий своего генома. Митохондриальные хромосомы человека **(рис. 19-38)** содержат 37 генов (16 569 п. н.), из которых 13 кодируют субъединицы ферментов дыхательной цепи митохондрий (см. табл. 19-6). Остальные 24 гена кодируют митохондриальные рРНК и тРНК, играющие важ-



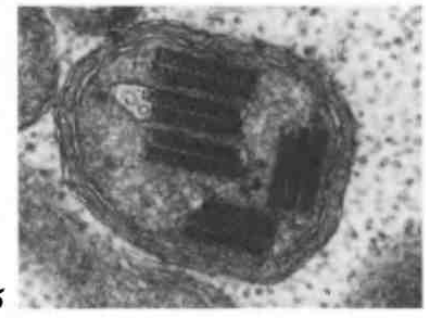

б

Рис. 19-38. Митохондриальные гены и их мутации. *а* — относительное расположение генов на генетической карте митохондриальной кольцевой молекулы ДНК человека. Гены ND1–ND6 кодируют полипептиды комплекса I (NADH-дегидрогеназы). Ген *Cyt b* кодирует цитохром *b* в комплексе III. Гены *COI–COIII* кодируют субъединицы цитохромоксидазы (комплекса IV). Гены *АТРаза6* и *АТРаза8* кодируют две субъединицы АТР-синтазы. Гены, кодирующие белковые комплексы, окрашены в те же цвета, что и белковые комплексы на рис. 19-7. Перечень этих комплексов приведен в центре схемы (в рамке). Гены, кодирующие рибосомные РНК и некоторые характерные для митохондрий тРНК, названы латинскими буквами, обозначающими аминокислоты, которые им соответствуют. Стрелками указаны гены, мутации которых вызывают наследственную нейропатию зрительного нерва Лебера (синдром НЗНЛ) и миоклоническую эпилепсию с разорванными красными мышечными волокнами (болезнь МЭРКМВ). Цифры в скобках указывают число следующих друг за другом нуклеотидных пар в кольцевой ДНК, если отсчет вести против часовой стрелки сверху от контрольной области. *б* — электронная микрофотография мутантной митохондрии с паракристаллическими белковыми включениями. Получена из мышцы человека с синдромом МЭРКМВ.

Таблица 19-6 Ферменты дыхательной цепи митохондрий, кодируемые митохондриальными генами человека

Комплекс	Число субъединиц	Число субъединиц, кодируемых мтДНК
Комплекс I (NADH-дегидрогеназа)	43	7
Комплекс II (сукцинатдегидрогеназа)	4	0
Коплекс III (убихинон-цитохром-*c*-оксидоредуктаза)	11	1
Комплекс IV (цитохромоксидаза)	13	3
Комплекс V (АТР-синтаза)	8	2

ную роль в белковом синтезе в митохондриях. Подавляющее большинство митохондриальных белков — примерно 900 различных типов — кодируются генами ядерной ДНК и синтезируются цитоплазматическими рибосомами, а затем переносятся и собираются в митохондриях. Эти вопросы подробно излагаются в гл. 27 (т. 3).

Митохондрии возникли в результате эндосимбиоза

Митохондрии содержат небольшие количества ДНК, а также тРНК и рибосомы (см. рис. 1-36, т. 1). Почему в митохондриях содержится ДНК? Для ответа на этот вопрос была создана гипотеза эндосимбиотического происхождения митохондрий. Согласно этой гипотезе, первыми клетками, способными использовать молекулярный кислород для окисления питательных веществ и синтеза АТР за счет энергии переноса электронов, были прокариотические клетки. В результате вторжения малых аэробных прокариотических клеток (бактерий) в цитоплазму крупных эукариотических анаэробных клеток (живущих за счет брожения) и дальнейшего эволюционного развития этих симбиотических отношений между клетками-хозяевами и клетками-паразитами, примитивные эукариоты приобрели способность к окислительному фосфорилированию, а бактерии, внедренные в цитоплазму эукариотических клеток, превратились в митохондрии.

Эта гипотеза возникновения митохондрий предполагает, что древние свободноживущие прокариотические клетки имели ферментативный аппарат для осуществления процессов окислительного фосфорилирования. Поэтому следует ожидать, что у современных бактерий, которые являются потомками этих аэробных прокариотических клеток, дыхательная цепь по своему строению и свойствам должна быть похожа на дыхательную цепь в современных эукариотических клетках. Действительно, у аэробных бактериях перенос на кислород электронов, отщепленных от субстратов с помощью NAD-зависимых дегидрогеназ, сопряжен с процессом фосфорилирования цитозольного ADP. Дегидрогеназы располагаются в бактериальных клетках в цитозоле, а переносчики электронов дыхательной цепи —

Рис. 19-39. Вращение бактериальных жгутиков под действием протон-движущей силы. Вращательное движение бактериальным жгутикам сообщает расположенная в клеточной мембране и состоящая из стержня и колец особая структура, которую называют «протонной турбиной». Ионы H^+, выведенные наружу в результате переноса электронов, поступают обратно в клетку через эту «турбину», вызывая вращение стержня жгутика. Движение бактериальных жгутиков отличается от движения соответствующих образований в эукариотических клетках, ресничек и мышц, происходящего за счет высвобождающейся при гидролизе АТР энергии.

в плазматической мембране. В бактериальных клетках при переносе электронов на кислород происходит выкачивание ионов H^+ наружу через плазматическую мембрану. В плазматических мембранах бактерии *Escherichia coli* имеются ферментные комплексы F_oF_1, компонент F_1 которых погружен в цитозоль и катализирует синтез ATP из ADP и фосфата при возвращении протонов в клетку через протонный канал компонента F_o.

Транспорт протонов через плазматическую мембрану бактериальных клеток за счет энергии, высвобождающейся при переносе электронов по дыхательной цепи, приводит к возникновению движущей силы, используемой не только для синтеза ATP, но и для поддержания других биологических процессов. Транспортные системы некоторых бактерий способны переносить питательные вещества, например лактозу, внутрь против градиента концентрации в симпорте с протонами (см. рис. 11-42, т. 1). Бактериальным жгутикам сообщают вращательное движение «протонные турбины» — молекулярные моторы, работающие непосредственно за счет энергии трансмембранного электрохимического потенциала, возникшего вследствие выкачивания протонов из матрикса при переносе электронов по дыхательной цепи **(рис. 19-39)**. Можно считать, что хемиосмотический механизм передачи энергии переноса электронов на синтез ATP возник раньше, чем появились эукариотические клетки.

На протяжении жизни организма в митохондриальной ДНК накапливаются мутации

Дыхательная цепь представляет собой основной источник активных форм кислорода в клетке, поэтому митохондрии, включая митохондриальный геном, в большей степени, чем другие отделы клетки, подвержены негативному воздействию свободных радикалов кислорода. Кроме того, система репликации митохондриальной ДНК не так эффективно исправляет допущенные ошибки, как система репликации ядерной ДНК. В результате со временем в митохондриальной ДНК накапливаются ошибки. По одной из теорий именно это постепенное накопление ошибок и является основной причиной «симптомов» старения, например таких, как развитие слабости скелетных и сердечной мышц.

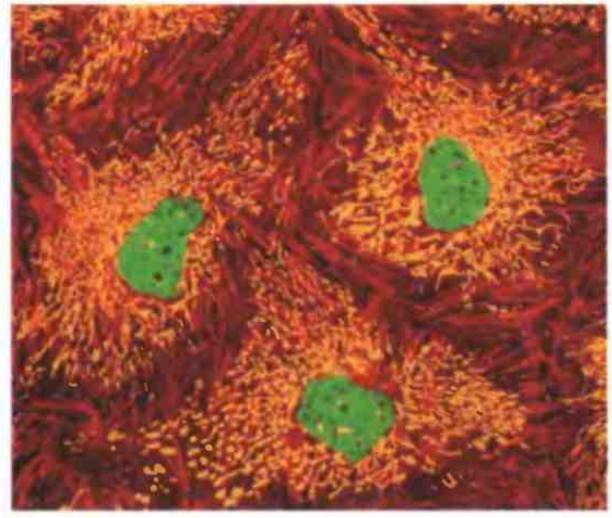


Рис. 19-40. В каждой клетке содержится множество митохондрий. Обычная клетка организма животного содержит несколько сотен или тысяч митохондрий, причем геном некоторых из этих митохондрий может содержать мутации, нарушающие функционирование митохондрии. Эта эпителиальная клетка почки овцы была выращена в лабораторных условиях, зафиксирована, а затем окрашена с помощью флуоресцентных маркеров. При визуализации с помощью флуоресцентного микроскопа митохондрии выглядят золотыми, актиновые микрофиламенты — красными, а ядра — зелеными.

Особенности наследования генетического материала митохондрий приводят к тому, что отдельные клетки, а также разные организмы несут разное количество мутаций. Обычная клетка содержит сотни или тысячи митохондрий, каждая имеет свою собственную копию генома **(рис. 19-40)**. Предположим, что в организме женщины произошло повреждение митохондриального генома зародышевой клетки, из которой образуется яйцеклетка, в результате чего эта зародышевая клетка содержит в основном митохондрии с генами дикого типа и одну митохондрию с дефектным геном. В процессе созревания яйцеклетки при ее многократном делении число митохондрий с дефектом увеличивается и распределяется случайным образом среди дочерних клеток. В итоге зрелые яйцеклетки содержат разное количество дефектных митохондрий. После оплодотворения яйцеклетки и многократного деления клеток в процессе развития зародыша образуются соматические клетки, содержащие разное количество мутиро-

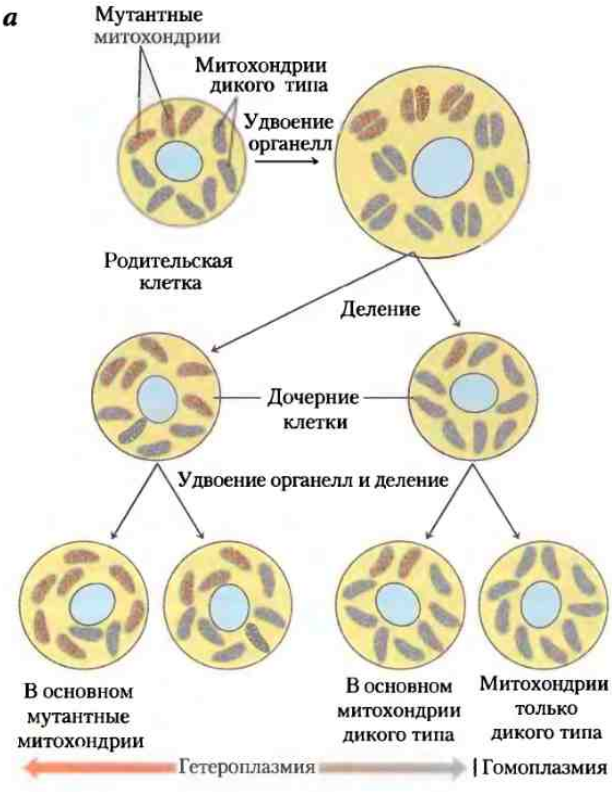


Рис. 19-41. Гетероплазмия митохондриальной ДНК. *а* — после оплодотворения зрелой яйцеклетки все митохондрии образующейся диплоидной клетки (зиготы) являются материнскими — ни одна не происходит от сперматозоида. Если некоторые митохондрии материнской клетки содержали мутировавший ген, в результате случайного распределения митохондрий в ходе последующих делений клетки появятся дочерние клетки с высоким, промежуточным и низким содержанием дефектных митохондрий. Таким образом, дочерние клетки различаются по степени гетероплазмии. *б* — различная степень гетероплазмии приводит к образованию разного фенотипа. Здесь представлен срез мышечной ткани человека с дефектом цитохромоксидазы. Образец окрашен таким образом, что клетки дикого типа выглядят синими, а клетки с мутантным ферментом коричневыми. Как видно, мутация митохондриальной ДНК в различной степени влияет на отдельные клетки в одной и той же ткани.

вавших митохондрий (**рис. 19-41, *а***). (Вспомните, что все митохондрии в клетках зародыша происходят от яйцеклетки, а не от сперматозоида.) Подобная **гетероплазмия** митохондриальной ДНК (в отличие от **гомоплазмии**, при которой геномы всех митохондрий во всех клетках идентичны) приводит к появлению мутантных фенотипов с отклонениями разной степени тяжести. Клетки (и ткани), содержащие в основном митохондрии дикого типа, имеют фенотип дикого типа и являются нормальными. Другие клетки с гетероплазмией митохондриальной ДНК имеют промежуточный фенотип: одни практически нормальные, другие (с более высоким содержанием мутантных митохондрий) — аномальными (рис. 19-41, *б*). Если такой аномальный фенотип связан с каким-либо заболеванием (см. ниже), то люди с одинаковой мутацией митохондриальной ДНК могут иметь симптомы заболевания разной степени тяжести — в зависимости от количества и распределения поврежденных митохондрий.

Мутации митохондриальных генов вызывают заболевания человека

Все большее число заболеваний человека связывают с мутациями митохондриальных генов, снижающими способность клеток производить АТР. Некоторые типы клеток и тканей — нейроны, миоциты скелетных и сердечной мышц, а также клетки поджелудочной железы — хуже других клеток переносят уменьшение количества АТР и поэтому сильнее повреждаются при мутациях генов митохондриальных белков. Число выявленных заболеваний человека, вызванных мутациями митохондриальных генов, возрастает по мере развития методов регистрации последствий мутаций.

Многие из этих болезней, известные под названием **митохондриальных энцефалопатий**, связаны в основном с поражением мозга и скелетных мышц. Это наследственные заболевания; они передаются от матери, поскольку эмбрион получает митохондриальные гены, в том числе мутантные, от материнской яйцеклетки. Редкое заболевание **наследственная нейропатия зрительного нерва Лебера (НЗНЛ)**, связанная с поражением центральной нервной системы, включая зрительные нервы, вызывает двусто-

роннюю потерю зрения уже в раннем возрасте. Замена одного азотистого основания на другое в митохондриальном гене *ND4* вызывает в полипептидной цепи комплекса I изменение: вместо остатка аргинина там находится гистидин, в результате чего митохондрии недостаточно эффективно выполняют функции по переносу электронов от NADH на убихинон (рис. 19-38, *а*). Митохондрии с мутантным геном сохраняют способность синтезировать некоторое количество АТР за счет энергии переноса электронов от сукцината, но этого оказывается недостаточно для поддержания активных процессов метаболизма в нейронах, в результате чего возникает повреждение зрительного нерва, приводящее к слепоте. Замена одного азотистого основания на другое в митохондриальном гене, кодирующем цитохром *b* в комплексе III, также вызывает появление синдрома НЗНЛ. Эти примеры показывают, что у человека наследственные патологии могут возникать из-за общего снижения способности митохондрий выполнять свои функции, а не из-за нарушений в механизме переноса электронов через комплекс I.

Мутация (в *ATP6*), поражающая протонный канал АТР-синтазы, приводит к снижению скорости синтеза АТР, не затрагивая последовательности дыхательной цепи. Окислительный стресс, связанный с постоянным поступлением электронов от NADH, сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода, а вызываемое ими повреждение митохондрий замыкает порочный круг. Половина новорожденных с мутацией данного гена умирает через несколько дней или месяцев после рождения.

Миоклоническая эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами (синдром МЭРКМВ) возникает в результате мутаций в митохондриальном гене, кодирующем транспортную РНК, связывающую лизин ($тРНК^{Lys}$). Для этого заболевания характерно неконтролируемое подергивание мышц, по-видимому, вследствие нарушения биосинтеза нескольких белков с участием митохондриальных тРНК. Митохондрии из волокон скелетных мышц человека, страдающего синдромом МЭРКМВ, имеют резко очерченный контур и иногда содержат паракристаллические включения (рис. 19-38, *б*). Другие мутации митохондральных генов, вероятно, вызывают прогрессирующую слабость мышц, характерную для митохондриальной миопатии, а также увеличение и нарушения работы сердечной мышцы, характерное для гипертрофированной кардиомиопатии. Согласно одной из гипотез, прогрессирующие возрастные изменения в организме человека являются результатом накопления в течение жизни мутаций митохондриальных ДНК, возникших под действием таких АФК, как $^{\bullet}O_2^-$. Митохондрии с поврежденными ДНК не могут обеспечить клетки организма достаточным количеством АТР. Заболевания, вызванные дефектами митохондрий, могут возникнуть также из-за мутаций любого из 900 генов ядерной ДНК, кодирующих полипептидные цепи митохондрий. ■

Диабет может возникать из-за дефекта митохондрий в β-клетках поджелудочной железы

Механизм регуляции высвобождения инсулина β-клетками поджелудочной железы тесно связан с концентрацией АТР в этих клетках. При высоком уровне глюкозы крови глюкоза, поступая в β-клетки, окисляется там в процессе гликолиза и в цикле лимонной кислоты, в результате чего концентрация АТР увеличивается выше порогового уровня (**рис. 19-42**). Как только концентрация АТР превышает это значение, закрываются АТР-зависимые калиевые каналы в плазматической мембране, что приводит к деполяризации мембраны и высвобождению инсулина (см. рис. 23-28). Панкреатические β-клетки с нарушением окислительного фосфорилирования не могут создавать концентрацию АТР выше порогового значения, в результате чего нарушается процесс высвобождения инсулина и развивается диабет. Например, дефекты гена глюкокиназы (изофермент гексокиназы IV, присутствующий в β-клетках) приводят к появлению редкой формы диабета с фенотипом MODY2 (см. доп. 15-3). Низкая активность глюкокиназы не позволяет превысить пороговую концентрацию АТР, блокируя секрецию инсулина. Мутации митохондриальных генов $тРНК^{Lys}$ или $тРНК^{Leu}$ также нарушают выработку АТР в митохондриях, поэтому у человека с такой мутацией нередко возникает сахарный диабет II типа (хотя эти случаи составляют лишь малую долю всех случаев заболевания диабетом).

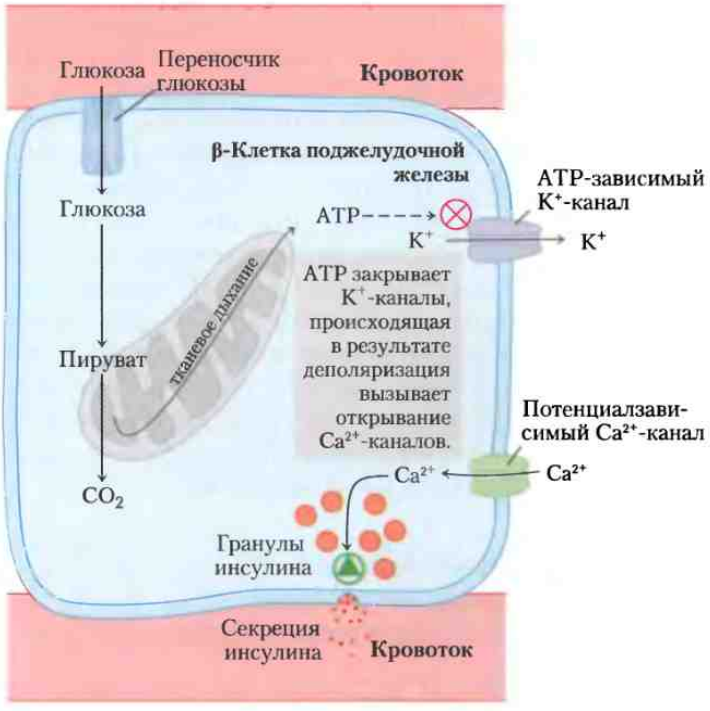


Рис. 19-42. Нарушение окислительного фосфорилирования в β-клетках поджелудочной железы блокирует секрецию инсулина. В норме при повышении концентрации глюкозы усиливается выработка АТР в клетках. АТР блокирует K^+-каналы, что приводит к деполяризации мембраны и открыванию потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов. Происходящий при этом приток Ca^{2+} запускает экзоцитоз содержащих инсулин секреторных гранул и высвобождение инсулина. При нарушении окислительного фосфорилирования в клетках концентрация АТР никогда не достигает необходимого уровня, чтобы запустить этот процесс, поэтому высвобождения инсулина не происходит.

При генетических мутациях NADP-трансгидрогеназы — важного элемента системы защиты от АФК (рис. 19-18) — накопление свободных радикалов приводит к повреждению митохондрий, уменьшая образование АТР и блокируя высвобождение инсулина β-клетками (рис. 19-42). Вызванные свободными радикалами повреждения, включая повреждения митохондриальной ДНК, могут быть причиной и других заболеваний человека; известны данные, что они способствуют возникновению болезней Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и заболеваний сердца, а также связаны с процессами старения. ■

Краткое содержание раздела 19.5 МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ ГЕНЫ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ И МУТАЦИИ

- Гены митохондриальной ДНК в клетках человека кодируют лишь некоторые митохондриальные белки (около 13 белков), синтезируемых в митохондриях и участвующих в окислительном фосфорилировании.
- Митохондрии происходят от аэробных бактерий, когда-то проникших в эукариотические клетки и закрепившихся в них в процессе эволюции.
- Мутации митохондриального генома накапливаются в течение жизни организма. Мутации в генах, которые кодируют компоненты дыхательной цепи, АТР-синтазу, систему защиты от АФК, а также мутации в генах тРНК вызывают у человека ряд заболеваний, чаще всего поражающих мышечный аппарат, сердце, β-клетки поджелудочной железы и мозг.

ФОТОСИНТЕЗ: ПОГЛОЩЕНИЕ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

Обратимся к рассмотрению молекулярных процессов, в результате которых под действием энергии света, поглощаемой фотосинтезирующими организмами, происходит движение электронов и сопряженное с ним образование АТР. В итоге солнечная энергия, превращенная в химическую энергию восстановленных органических соединений, служит источником почти всей биологической энергии. Фотосинтезирующие и гетеротрофные организмы сосуществуют в биосфере в сбалансированном стационарном состоянии

(рис. 19-43). Фотосинтезирующие организмы поглощают солнечную энергию и запасают ее в форме ATP и NADPH, которые служат им источником энергии для синтеза углеводов и других органических компонентов клетки из углекислого газа и воды; при этом они выделяют в атмосферу кислород. Аэробные гетеротрофы, например человек и растения в темноте, используют этот кислород для расщепления богатых энергией органических продуктов фотосинтеза до CO_2 и H_2O и за счет этой энергии синтезируют ATP для своих собственных нужд. Углекислый газ CO_2, образующийся при дыхании гетеротрофов, возвращается в атмосферу и вновь используется фотосинтезирующими организмами. Солнечная энергия создает движущую силу для круговорота, в процессе которого углекислый газ и кислород атмосферы непрерывно циркулируют, проходя через биосферу и образуя восстановленные субстраты, например глюкозу, которая служит источником энергии для нефотосинтезирующих организмов.

Фотосинтез происходит не только в хорошо знакомых нам сосудистых растениях, но также в одноклеточных эукариотах (водорослях) и разнообразных бактериях. В принципе у различных организмов фотосинтез протекает одинаково, хотя заметны и некоторые особенности в зависимости от вида фотосинтезирующих клеток. Результаты изучения процесса фотосинтеза у простейших организмов можно использовать при установлении механизмов фотосинтеза в высших растениях. Для процесса фотосинтеза у растений, когда для восстановления углекислого газа до углеводов в качестве донора электронов (водорода) используется вода, общее уравнение можно записать следующим образом:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{свет}} O_2 + (CH_2O)_n$$

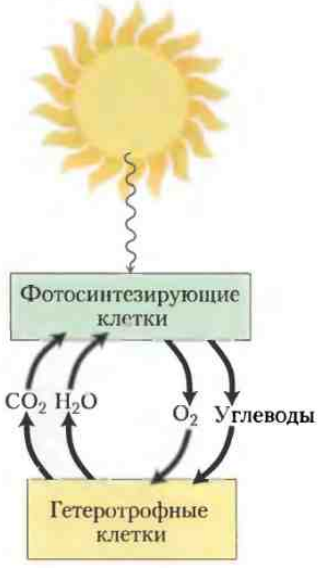


Рис. 19-43. Солнечная энергия — первичный источник всей биологической энергии. Фотосинтезирующие клетки используют энергию солнечного света для образования глюкозы и других органических веществ. Эти органические продукты служат гетеротрофным клеткам источником энергии и углерода.

19.6. Основные особенности фотофосфорилирования

Существенная особенность реакции фотосинтеза состоит в том, что электроны от воды, стандартный потенциал восстановления которой +0,816 В, переходят к $NADP^+$ со стандартным потенциалом −0,320 В, а в дыхательной цепи митохондрий они движутся в обратном направлении от NADH к кислороду с потерей свободной энергии. Поскольку у фотосинтезирующих организмов поток электронов всегда направлен против градиента стандартного восстановительного потенциала, этот процесс невозможен без притока свободной энергии извне. Необходимую энергию поставляет свет, поглощаемый фотосинтезирующими организмами, а также *создающий* в них донор (с большой отрицательной величиной стандартного восстановительного потенциала) и подходящий (хороший) акцептор электронов. В процессе фотофосфорилирования электроны проходят через цепь встроенных в мембрану переносчиков, включая цитохромы, хиноны и железо-серные белки. Под влиянием индуцированного светом потока электронов происходит перекачивание протонов H^+ через мембрану тилакоидов, в результате чего возникает трансмембранный электрохимический потенциал. Перенос электронов при фотосинтезе и связанное с ним перекачивание протонов H^+ катализируются встроенными в мембрану комплексами, которые по строению и функциям напоминают комплекс III митохондрий. Возникающий при этом электрохимический потенциал является движущей силой для синтеза ATP из ADP и фосфата.

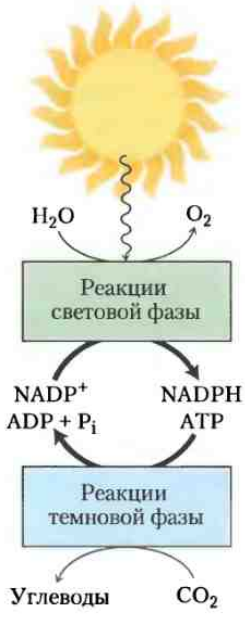


Рис. 19-44. За счет солнечной энергии образуются высокоэнергетические соединения NADPH и ATP. NADPH и ATP используются в реакциях фиксации углерода для восстановления CO_2 до триоз и более сложных моносахаридов, таких как глюкоза и другие производные триоз.

Процесс фотосинтеза в растениях протекает в две стадии: первая из них объединяет **световые реакции**, идущие только тогда, когда растение освещено, вторая — **реакции ассимиляции (фиксации) углерода**, иногда необоснованно называемые темновыми, которые регулируются продуктами, образовавшимися в световых реакциях **(рис. 19-44)**. В световых реакциях энергия света поглощается хлорофиллом и другими пигментами фотосинтезирующих клеток и запасается в химической форме в виде двух высокоэнергетических продуктов — ATP и NADPH; одновременно выделяется кислород. В реакциях фиксации углерода, для которых свет не требуется, ATP и NADPH, образовавшиеся в световых реакциях, используются для восстановления углекислого газа до триозофосфата, крахмала и других органических продуктов. В этой главе рассматриваются только световые реакции, в результате которых образуются ATP и NADPH. Реакции фиксации углерода, т. е. восстановления CO_2, обсуждаются в гл. 20.

Фотосинтез растений происходит в хлоропластах

В эукариотических фотосинтезирующих клетках как световые, так и реакции фиксации углерода протекают в хлоропластах **(рис. 19-45)**. Хлоропласты представляют собой внутриклеточные органеллы самой разнообразной формы в диаметре до нескольких микрометров. Подобно митохондриям, хлоропласты окружены двумя мембранами. Внешняя мембрана проницаема для небольших молекул и ионов, а внутренняя мембранная система ограничивает внутренний компартмент хлоропласта. В нем находится много плоских мембранных мешочков, или пузырьков, часто связанных с мембраной. Это **тилакоиды**, которые обычно собраны в стопки, называемые **гранами** (рис. 19-45, *б*). В тилакоидных мембранах **(ламеллах)** содержатся все фотосинтези-

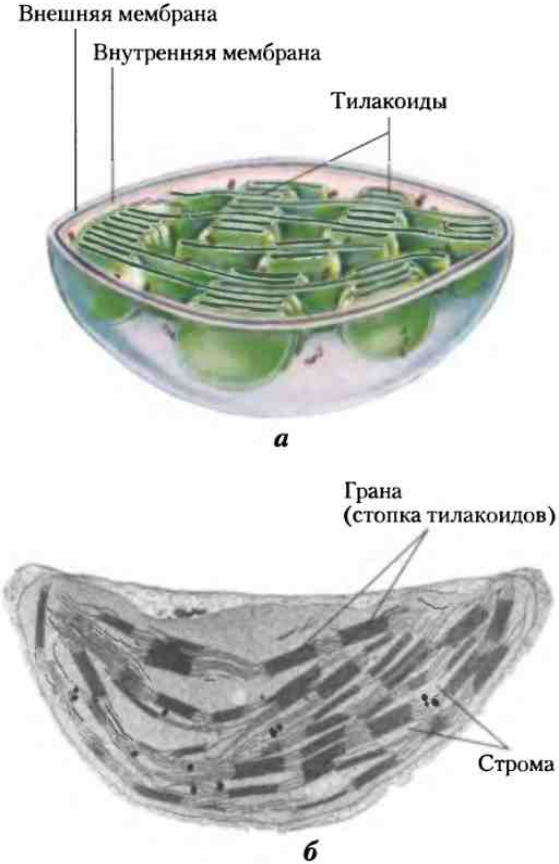


Рис. 19-45. Хлоропласт. *а* — схема строения. *б* — микрофотография с большим увеличением, на которой видны граны, состоящие из стопок тилакоидных мембран.

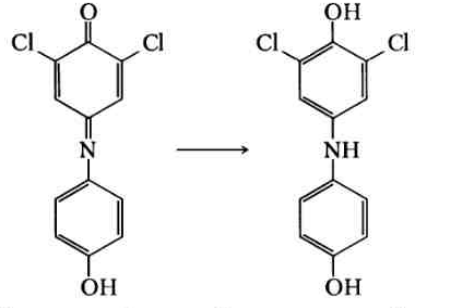
рующие пигменты хлоропласта и все ферменты, необходимые для световых реакций и синтеза АТР. Большинство ферментов, участвующих в реакциях фиксации углерода, находятся в жидкости, заполняющей внутренний компартмент хлоропласта и окружающей тилакоиды; ее называют **стромой**.

Свет индуцирует поток электронов в хлоропластах

Каким же образом поглощенная световая энергия превращается в химическую? Ключ к ответу на этот вопрос был получен Робертом Хиллом в 1937 г. Он обнаружил, что если добавить к листовым экстрактам, содержащим хлоропласты, какой-нибудь небиологический акцептор электронов, а затем осветить эти препараты, то они будут выделять кислород и одновременно в них будет происходить восстановление акцептора электронов **по реакции Хилла**.

$$2\,H_2O + 2\,A \xrightarrow{\text{свет}} 2\,AH_2 + O_2$$

где А — искусственный (небиологический) акцептор электронов, называемый **реагентом Хилла**. Среди небиологических акцепторов электронов, которые использовал Хилл, был краситель 2,6-дихлорфенолиндофенол; его окисленная форма А окрашена в синий цвет, а восстановленная AH_2 бесцветна. При освещении экстрактов, в которых присутствовал этот краситель, раствор обесцвечивался и выделялся кислород, в темноте не происходило ни выделения кислорода, ни восстановления красителя.



Окисленная форма (синяя) Восстановленная форма (бесцветная)

Дихлорфенолиндофенол

Это наблюдение послужило первым доказательством того, что энергия света вызывает перенос электронов от H_2O на молекулу-акцептор. Хилл обнаружил также, что для этой реакции не требуется углекислого газа и что в этих условиях CO_2 не восстанавливается ни до какой стабильной формы. Из этого Хилл заключил, что процессы выделения кислорода и восстановления углекислого газа могут быть разобщены. Далее начались поиски природного биологически активного аналога реагента Хилла, т. е. акцептора электронов, который присутствует в хлоропластах и присоединяет атомы водорода, отщепляемые на свету от воды. Спустя несколько лет Северо Очоа показал, что в хлоропластах роль этого природного биологического акцептора электронов играет $NADP^+$. Реакция описывается уравнением

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ \xrightarrow{\text{свет}} 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2$$

Для детального понимания механизма фотосинтеза необходимо знание молекулярной структуры участвующих в нем соединений.

Краткое содержание раздела 19.6 ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

- Световые реакции фотосинтеза идут только тогда, когда растение освещено; поглощенная световая энергия создает поток электронов, направленный от H_2O через встроенные в мембрану переносчики к $NADP^+$, который при этом восстанавливается в NADPH. Вторым продуктом реакции является АТР.
- В реакциях фиксации углерода при фотосинтезе для восстановления CO_2 используются высокоэнергетические NADPH и АТР.

19.7. Поглощение света

Видимый свет — это электромагнитное излучение с длинами волн от 400 до 700 нм, т. е. небольшая часть спектра солнечного излучения в диапазоне от фиолетового до красного (**рис. 19-46**). Энергия **фотонов (квантов световой энергии)** обратно пропорциональна длине световой волны. Фотоны фиолетовой (коротковолновой, более высокочастотной) области видимого спектра не-

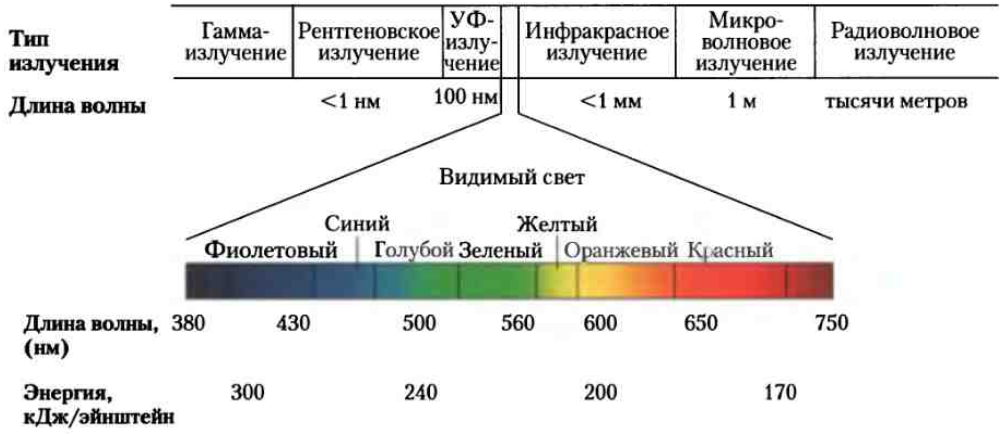


Рис. 19-46. Электромагнитное излучение. Спектр электромагнитного излучения и энергия фотонов в видимой области спектра. 1 эйнштейн = $6 \cdot 10^{23}$ фотонов.

сут более высокую энергию по сравнению с фотонами красной области. Энергия (E) одного фотона в видимой области спектра можно рассчитать по уравнению Планка:

$$E = h\nu = hc / \lambda$$

где h — постоянная Планка, $h = 6{,}625 \cdot 10^{-34}$ Дж · с, ν — волновое число, частота в $с^{-1}$, c — скорость света, $c = 3{,}00 \cdot 10^{8}$ м/с, λ — длина волны (в метрах). Энергия фотона видимого света различна в зависимости от его длины волны (частоты): в красной области ~ 150 кДж/эйнштейн, в фиолетовой области ~300 кДж/эйнштейн.

Способность химического соединения поглощать свет зависит от распределения электронов вокруг ядер в его молекуле. При поглощении молекулой (хромофором) одного фотона один из ее электронов переходит на более высокий энергетический уровень. Происходит это по закону «все или ничего»: чтобы перевести электрон на более высокий энергетический уровень, фотон должен обладать определенным количеством энергии (**квантом**, от лат. *quantum* — количество), точно соответствующем энергии перехода электрона. Молекула, поглотившая один фотон, находится в высокоэнергетическом, **возбужденном состоянии**, которое, как правило, неустойчиво. Если отключить источник света, электроны с высокоэнергетических орбиталей обычно быстро вновь переходят на свои низкоэнергетические уровни; при этом молекула возвращается в

Пример 19-2 ЭНЕРГИЯ ФОТОНА

Сосудистые растения при фотосинтезе используют свет с длиной волны около 700 нм. Найдите энергию «моля» фотонов (эйнштейна фотонов) света с этой длиной волны и сравните полученную величину с энергией, необходимой для синтеза 1 моль ATP.

Решение. Энергия одного фотона определяется по уравнению Планка. При длине волны $700 \cdot 10^{-9}$ м энергия одного фотона равна

$$E = hc / \lambda$$
$$= [(6{,}626 \cdot 10^{-34}\ \text{Дж} \cdot \text{с})(3{,}00 \cdot 10^{8}\ \text{м/с})]/(7{,}00 \cdot 10^{-7}\ \text{м})$$
$$= 2{,}84 \cdot 10^{-19}\ \text{Дж}$$

1 эйнштейн = 1 моль фотонов, что соответствует числу фотонов, равноиу числу Авогадро ($6{,}022 \cdot 10^{23}$). Отсюда можно рассчитать энергию одного эйнштейна фотонов при 700 нм:

$$(2{,}84 \cdot 10^{-19}\ \text{Дж/фотон})\,(6{,}022 \cdot 10^{23}\ \text{фотон/эйнштейн})$$
$$= 17{,}1 \cdot 10^{4}\ \text{Дж/эйнштейн} =$$
$$= 171\ \text{кДж/эйнштейн}$$

Таким образом, 1 моль фотонов красного света обладает энергией, которая примерно в 5 раз превышает энергию образования 1 моль ATP из ADP и P_i (30,5 кДж/моль).

исходное стабильное, так называемое **основное состояние**, высвобождая энергию возбуждения (в форме света или тепла). **Флуоресценция** — свет, испускаемый возбужденной молекулой при ее возвращении в основное состояние; длина волны испускаемого при флуоресценции света всегда больше длины волны поглощенного света (см. доп. 12-3, т. 1). Другой тип перехода возбужденной молекулы в исходное состояние, очень важный для фотосинтеза, заключается в прямой передаче энергии возбуждения от возбужденной молекулы к соседней, находящейся в основном состоянии. Такой процесс передачи энергии называется **передачей экситона**, а квант энергии, переданной от одной молекулы к другой, называется **экситоном**, по аналогии с фотоном — квантом энергии света.

При фотосинтезе энергию света поглощают хлорофиллы

Обратимся теперь к рассмотрению светопоглощающих пигментов тилакоидных мембран. Главную роль среди них играют зеленые пигменты **хлорофиллы** — Mg^{2+}-содержащие молекулярные комплексы с полициклической плоской структурой, как у протопорфирина гемоглобина, но комплексообразователем является не Fe^{2+}, а Mg^{2+} (см. рис. 5-1, т. 1). Четыре атома азота, обращенные в центр кольцевой структуры, координационно связаны с ионом Mg^{2+} (**рис. 19-47**). У всех хлорофиллов длинная изопреноидная боковая цепь — это остаток спирта **фитола**, присоединенного сложноэфирной связью к карбоксильной группе заместителя в кольце IV. В хлорофиллах, в отличие от гемов, есть пятое (непиррольное) кольцо.

Пятичленные гетероциклы вокруг иона Mg^{2+} образуют сопряженную систему двойных и одинарных связей, которая дает интенсивные характеристические полосы в видимой области спектра, что очень важно для фотосинтеза (**рис. 19-48**). У хлорофиллов необычно высокие коэффициенты экстинкции (см. доп. 3-1, т. 1), а значит во время фотосинтеза они хорошо поглощают в видимой области спектра.

В хлоропластах всегда присутствуют хлорофиллы двух типов — *a* и *b* (рис. 19-47, *а*). Хотя оба они окрашены в зеленый цвет, их спектры поглощения слегка различаются (рис. 19-48). У большинства высших растений количество хлорофилла *a* примерно вдвое превышает количество хлорофилла *b*. Хлорофиллы водорослей и фотосинтезирующих бактерий слегка отличаются от хлорофиллов высших растений.

Молекулы хлорофилла всегда связаны со специальными белками, образуя **светопоглощающие комплексы**, в которых они определенным образом ориентированы относительно друг друга и к остальным белковым комплексам в мембране тилакоидов. Один светопоглощающий комплекс (тип II; **рис. 19-49**) содержит семь молекул хлорофилла *a*, пять молекул хлорофилла *b* и две молекулы вспомогательного пигмента лютеина (см. ниже).

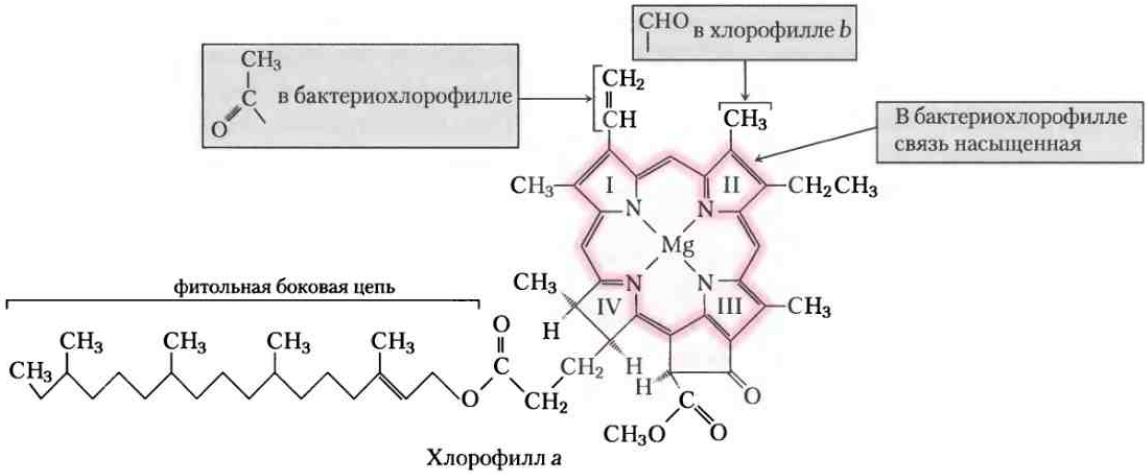
У цианобактерий и красных водорослей рецепторы световой энергии представлены пигментами другого класса — это красные и синие **фикобилины** (фикоэритробилины и фикоцианобилины соответственно; рис. 19-47, *б*). Фикобилины — тетрапирролы с открытой цепью и с большим числом сопряженных двойных связей. В отличие от хлорофилла фикобилины не содержат Mg^{2+} и не имеют циклической тетрапиррольной структуры. Фикобилипротеинами называются комплексы фикобилинов со специальными белками. Они организованы в крупные комплексы — фикобилисомы (**рис. 19-50**), которые служат главными светопоглощающими системами у этих микроорганизмов.

Вспомогательные пигменты расширяют диапазон длин волн поглощаемого света

В мембранах тилакоидов присутствуют наряду с хлорофиллами также второстепенные, или **вспомогательные, светопоглощающие пигменты**. К вспомогательным пигментам относятся различные **каротиноиды**, окрашенные в желтый, красный и пурпурный цвета. Среди них наиболее важны красный пигмент изопреноидного строения **β-каротин** и желтый каротиноид **лютеин** (рис. 19-47, *в* и *г*). Каротиноиды поглощают свет в другом диапазоне длин волн, чем хлорофиллы, и поэтому функционируют как световые рецепторы, дополняющие хлорофиллы (рис. 19-48).

Экспериментальные данные по оценке эффективности фотосинтеза в зависимости от длины волны представляют в виде фотохимического **спектра действия** (**рис. 19-51**), который может быть использован также для идентификации

а

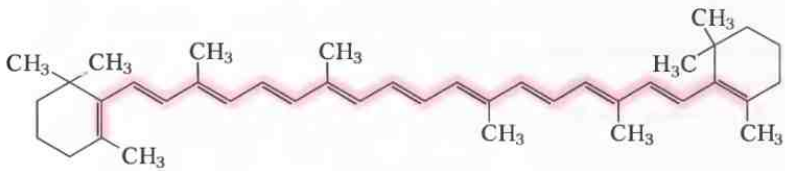


Хлорофилл *a*

б

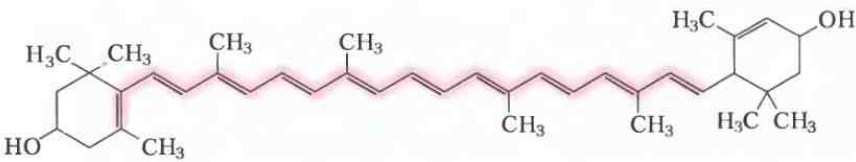
Фикоэритробилин

в



β-Каротин

г



Лютеин (ксантофилл)

Рис. 19-47. Главные и вспомогательные фотопигменты. *а* — хлорофиллы *a* и *b* и бактериохлорофилл — главные светопоглощающие пигменты. *б* — фикоэритробилин и фикоцианобилин (группа фикобилинов) — антенные, или светособирающие, пигменты цианобактерий и красных водорослей. *в* — β-каротин и другие каротиноиды, а также лютеин (ксантофилл) — вспомогательные пигменты зеленых листьев. Все эти пигменты содержат систему сопряженных связей, которая дает им способность поглощать свет в видимой области (выделена розовым цветом).

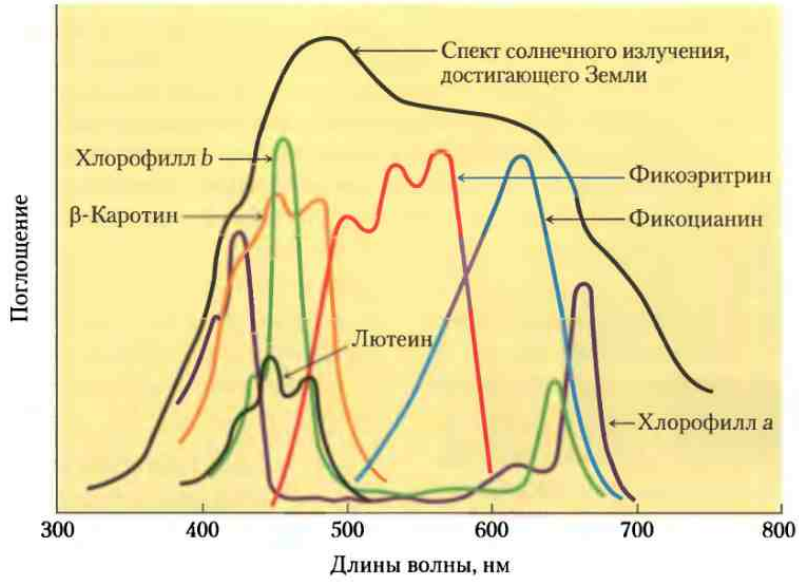


Рис. 19-48. Спектры поглощения фотопигментов в видимой области. Растения имеют зеленую окраску из-за того, что их пигменты поглощают видимый свет в красной и голубой областях, а зеленый свет отражают или пропускают. Сравнение спектра солнечного излучения, достигающего земной поверхности, со спектрами поглощения растительных пигментов показывает, что хлорофиллы *a* и *b* и вспомогательные пигменты позволяют растениям поглощать основные количества поступающей на Землю солнечной энергии. Соотношение между хлорофиллами и различными каротиноидами у разных видов растений заметно варьирует, что и определяет характерную зеленую окраску фотосинтезирующих клеток, которая изменяется от сине-зеленой, как у хвоинок ели, или ярко-зеленой, как у листьев клена, до красной, бурой и даже пурпурной, как у разных видов многоклеточных водорослей и листьев некоторых декоративных растений.

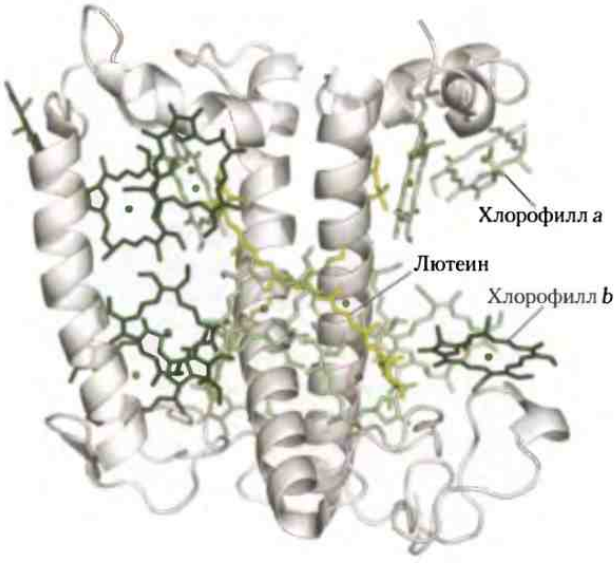


Рис. 19-49. Строение светопоглощающего комплекса типа II (PDB ID 2BHW). Функциональный светопоглощающий комплекс представляет собой тример, содержащий 36 молекул хлорофилла и 6 молекул лютеина. В состав представленного здесь мономера (вид в плоскости мембраны) входят три сегмента α-спирали, пронизывающих мембрану насквозь, семь молекул хлорофилла *a* (светло-зеленые), пять молекул хлорофилла *b* (темно-зеленые) и две молекулы вспомогательного пигмента лютеина (желтые), образующих внутренний каркас.

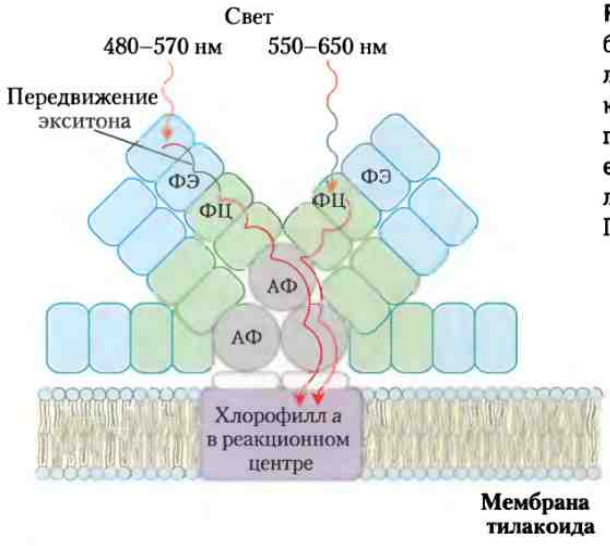
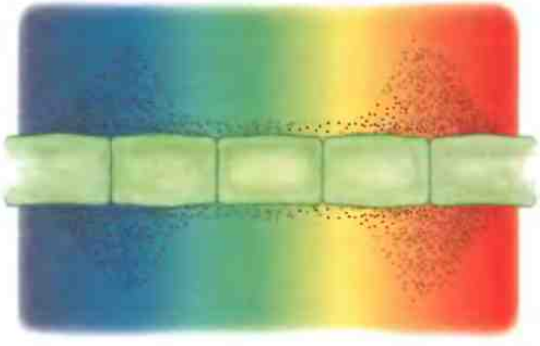
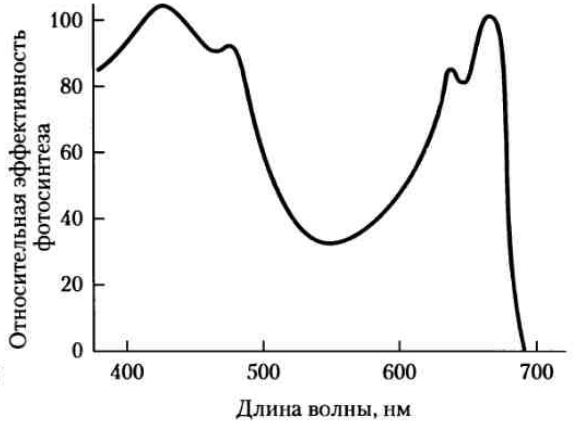


Рис. 19-50. Строение фикобилисомы. Фикобилисома цианобактерий и красных водорослей включает комплексы фикобилинов со специальными белками — фикоэритрином (ФЭ), фикоцианином (ФЦ) и аллофикоцианином (АФ). Энергия фотонов, поглощенная фикоэритрином и фикоцианином, быстро передается в виде экситона через белковый комплекс фикоцианобилина аллофикоцианин–хлорофилл *a* (в реакционном центре). Подробнее этот вопрос обсуждается в тексте.



а



б

Рис. 19-51. Два метода изучения фотохимического спектра действия. *а* — результаты классического эксперимента, проведенного в 1882 г. Т. В. Энглеманном, по определению длины волны, наиболее эффективной для фотосинтеза. Волокна фотосинтезирующей морской водоросли поместили на предметное стекло микроскопа и освещали светом, прошедшим через диспергирующую призму, причем на одну часть волокон попадала синяя область спектра, на другую часть — желтая, на третью — красная. На это же стекло помещали бактерии, обладающие свойством мигрировать к с наиболее высокой концентрации кислорода. Эффективность видимого света данной длины волны оценивали числом скопившихся на участке бактерий — лучшие результаты обеспечивали фиолетовый и красный свет. *б* — результаты аналогичного эксперимента, отличающегося от предыдущего тем, что количество выделившегося при фотосинтезе кислорода оценивали с помощью кислородного электрода. Фотохимический спектр действия показывает зависимость относительной эффективности фотосинтеза от длины волны. Сравнение спектров поглощения пигментов и фотохимического спектра действия фотосинтезирующих клеток позволяет оценить светопоглощающие свойства пигментов (см. рис. 19-48).

главных пигментов, ответственных за биологическую активность света определенной длины волны. Благодаря способности поглощать световую энергию в определенной области длин волн фотосинтезирующие организмы могут занимать свою уникальную экологическую нишу. Например, пигменты фикобилины красных водорослей и цианобактерий поглощают свет в диапазоне 520–630 нм (рис. 19-48), что позволяет им выживать в окружении организмов, пигменты которых и сама вода поглощают свет в более коротковолновом или более длинноволновом диапазоне.

Хлорофиллы передают энергию света реакционным центрам путем переноса экситона на соседние молекулы

Светопоглощающие пигменты тилакоидных мембран собраны в функциональные комплексы **фотосистемы**. Фотосистема, например, в хлоропластах шпината содержит около 200 молекул хлорофиллов и около 50 молекул каротиноидов. Молекулы всех пигментов поглощают фотоны, но только некоторые молекулы хлорофиллов могут превращать свет в химическую энергию. Эти специализированные хлорофиллы связаны с особыми белками и образуют фотохимический **реакционный центр**. Все прочие молекулы пигментов называются **светособирающими** или **антенными**. Они поглощают свет и очень быстро передают его энергию фотохимическим реакционным центрам, где и происходит фотохимическая реакция (**рис. 19-52**).

Светопоглощающие свойства молекул хлорофилла в фотохимических реакционных центрах и изолированных молекул сильно различаются. При освещении раствора хлорофилла *in vitro* поглощенная энергия быстро теряется в виде флуоресценции или рассеивается в виде

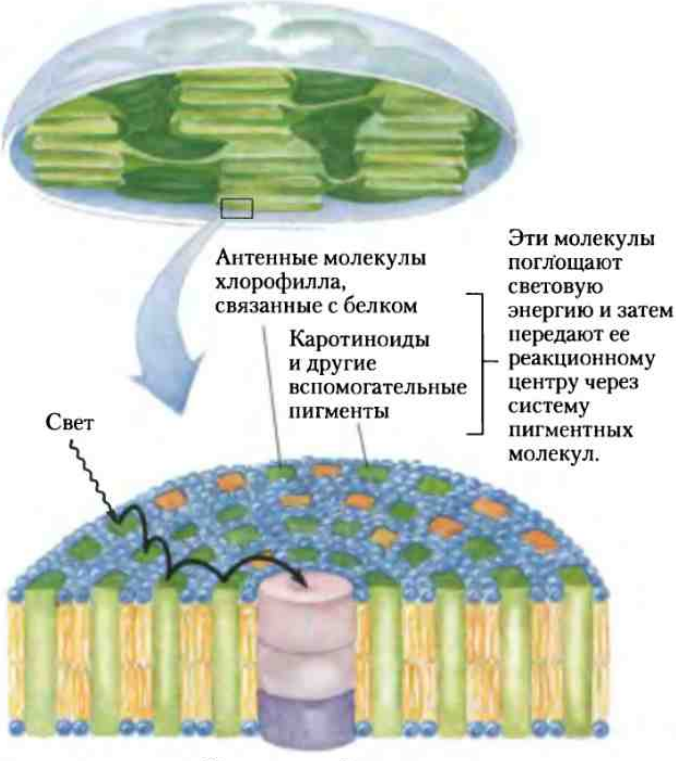


Рис. 19-52. Строения фотосистемы в тилакоидной мембране. Фотосистемы тилакоидных мембран составлены из нескольких сотен антенных молекул хлорофиллов и вспомогательных пигментов, определенным образом ориентированных относительно фотохимического реакционного центра. Поглощение фотона одной из антенных молекул хлорофилла переводит эту молекулу в возбужденное состояние. Затем энергия возбуждения (экситон) быстро переносится по пигментным молекулам к реакционному центру (путь экситона обозначен черной стрелкой). Тилакоидные мембраны включают также цитохромный комплекс b_6f и АТР-синтазу (см. рис. 19-60).

тепла. Однако хлорофилл в интактных листьях под действием видимого света переходит в возбужденное состояние при очень небольшой интесивности флуоресценции (**рис. 19-53**, стадия ①). Вместо этого в хлоропластах поэтапно происходят другие события. Возбужденная антенная молекула хлорофилла передает энергию непосредственно соседней молекуле, переводя ее в возбужденное состояние, а сама возвращается в основное состояние (стадия ②). Затем энергия возбуждения (экситон) быстро мигрирует через третью, четвертую и т. д. молекулу пигмента к фотохимическому реакционному центру, в котором одна молекула хлорофилла в особой паре хлорофиллов типа *a* переходит в возбужденное состояние (стадия ③). В возбужденной молекуле хлорофилла один из электронов переходит на более высокую энергетическую орбиталь. Этот возбужденный электрон покидает молекулу хлорофилла в реакционном центре и присоединяется к первому переносчику в цепи переноса электронов, оставляя в реакционном центре так называемую «дырку», обычно обозначаемую на схемах знаком «+» (рис. 19-53) (стадия ④). Первый переносчик в цепи переноса электронов оказывается восстановленным, поскольку он присоединяет электрон, а реакционный центр — окисленным, поскольку он отдал свой электрон. Потеря электрона молекулой хлорофилла в реакционном центре восполняется электроном от соседней электронодонорной молекулы, приобретающей положительный заряд (стадия ⑤). Таким образом, *световая энергия, поглощаемая хлоропластами, индуцирует цепь окислительно-восстановительных реакций.*

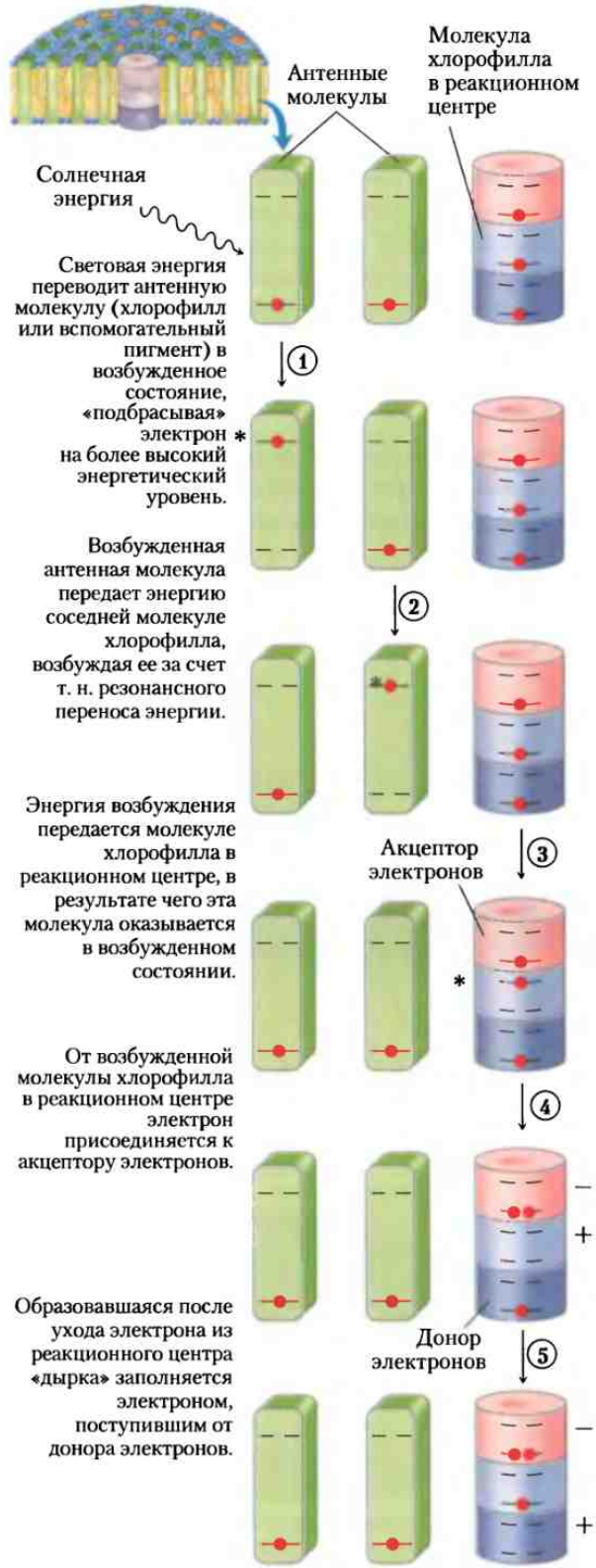


Рис 19-53. Путь экситонов и электронов в хлоропластах. Преобразование поглощаемой энергии фотонов в транспорт зарядов в фотохимических комплексах хлоропластов осуществляется в несколько стадий. Стадия ① повторяется в антенных молекулах до тех пор, пока экситон не достигнет молекулы хлорофилла в реакционном центре и не переведет ее в возбужденное состояние. О других состояниях см. текст. Звездочкой обозначено возбужденное состояние молекулы.

Краткое содержание раздела 19.7 ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА

- Фотофосфорилирование в хлоропластах зеленых растений и цианобактерий сопряжено с переносом электронов по цепи переносчиков.
- В световых реакциях фотосинтеза зеленых растений поглощенная световая энергия возбуждает молекулы хлорофилла и вспомогательных пигментов, которые затем передают энергию возбуждения реакционным центрам в тилакоидных мембранах. В реакционных центрах фотовозбуждение создает электрические заряды, в результате чего образуется сильный донор электронов (восстановитель) и сильный акцептор электронов (окислитель).

19.8. Основной фотохимический процесс — это индуцированный светом перенос электронов

Индуцированный светом перенос электронов в хлоропластах растений осуществляется полиферментной системой, встроенной в мембрану тилакоидов. Как показали результаты изучения строения и функций хлоропластов растений, различных бактерий и водорослей, фотосинтез осуществляется по сложным механизмам и выяснение этих механизмов составляет одну из фундаментальных проблем биохимии. Значительный вклад в понимание молекулярных механизмов фотосинтеза внесло изучение структуры фотосинтезирующих комплексов в бактериях методом рентгеноструктурного анализа.

У бактерий присутствует один из двух типов фотохимических реакционных центров

Важные данные о процессах фотосинтеза у бактерий были получены Луи Дюйзенсом. В 1952 г. он провел ряд экспериментов по облучению фотосинтезирующих мембран пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* пульсирующим светом с длиной волны 870 нм и наблюдал временное снижение интенсивности поглощения в этой области, т. е. обесцвечивание (выцветание) клеток под действием световой волны 870 нм.

Несколько лет спустя Бессел Кок и Хорст Витт наблюдали обесцвечивание пигментов в хлоропластах растений при освещении их светом с длинами волн 680 и 700 нм. Поскольку такой же эффект наблюдался *без освещения*, но при добавлении к суспензии мембран фотосинтезирующих клеток сильного, но небиологического акцептора электронов феррицианида $[Fe(CN)_6]^{3-}$, обесцвечивание пигментов стали связывать с потерей электрона фотохимическим реакционным центром. В соответствии с длинами волн, вызывающими обесцвечивание, пигменты стали обозначать как P870, P680 и P700.

Фотохимическая реакционная система у фотосинтезирующих бактерий относительно простая и включает один из двух главных типов реакционных центров. У пурпурных бактерий есть реакционный центр, от которого возбужденные электроны через переносчик электронов **феофитин** (хлорофилл, не содержащий ион Mg^{2+}) поступают к хинону. У зеленых серных бактерий электроны переносятся через хинон к железо-серному белку. У цианобактерий и растений присутствуют две фотосистемы ФСI и ФСII (по одной каждого типа), они выполняют разные функции, но взаимодействуют между собой.

Биохимическими и биофизическими методами подробно изучен молекулярный механизм процессов, протекающих в фотохимических реакционных системах бактерий, которые являются прототипом более сложных протонпреобразующих систем у высших растений.

Фотохимическая реакционная система типа II — феофитин-хиноновая система. Фотосинтезирующий ансамбль пурпурных бактерий включает три основных компонента (**рис. 19-54, *а***): реакционный центр, содержащий пигмент P870, переносчик электронов — цитохромный комплекс bc_1, близкий по строению к комплексу III в митохондриальной цепи переноса электронов, и комплекс АТР-синтазу, аналогичный АТР-синтазному комплексу в дыхательной цепи митохондрий. При освещении фотосинтезирующих клеток выброшенные из реакционного центра электроны поступают через феофитин и хинон к цитохромному комплексу bc_1 и затем вновь возвращаются в реакционный центр через цитохром c_2 на прежнюю энергетическую орбиталь. Индуцированный светом поток электронов в такого рода цепи, так называемый *циклический поток*, высвобождает

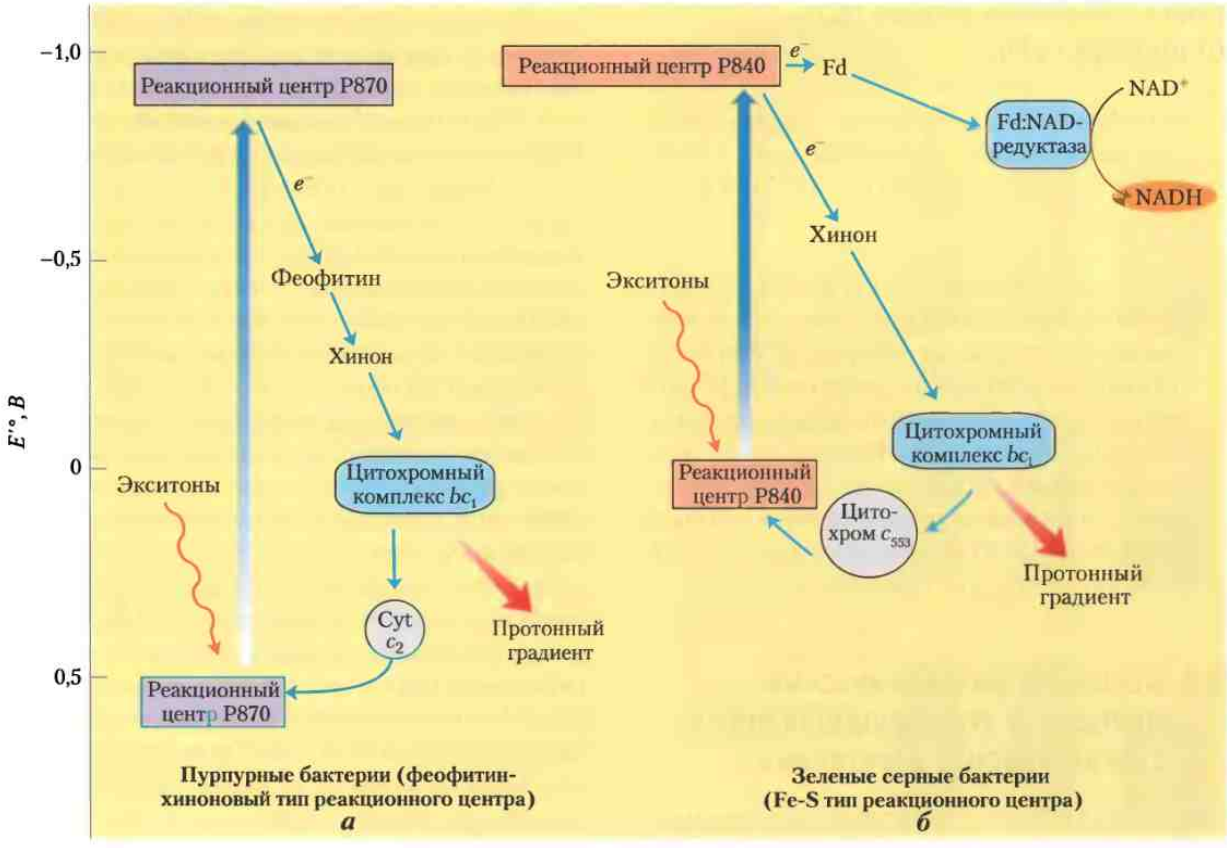


Рис. 19-54. Функциональные ансамбли, участвующие в фотосинтетическом преобразовании световой энергии у пурпурных и зеленых серных бактерий. *а* — у пурпурных бактерий электроны, выброшенные под действием энергии света реакционным центром P870, проходят через переносчики электронов феофитин, хинон и цитохромный комплекс bc_1 и вновь возвращаются в реакционный центр через цитохром c_2. При прохождении электронов через комплекс bc_1 происходит перекачивание протонов внутрь тилакоида, в результате чего создается электрохимический потенциал, поставляющий энергию для синтеза АТР. *б* — у зеленых серных бактерий есть два пути движения электронов, выброшенных из реакционного центра P840 под действием световой энергии. Во-первых, циклический путь, по которому электроны из реакционного центра проходят через хинон к цитохромному комплексу bc_1 и возвращаются в реакционный центр через цитохром c_2. Во-вторых, нециклический путь, когда возбужденные электроны движутся от реакционного центра через железо-серный белок, ферредоксин и флавопротеин ферредоксин-NAD-редуктазу к NAD^+.

энергию для перекачивания протонов из среды в тилакоид с помощью цитохромного комплекса bc_1, в результате чего возникает трансмембранный градиент H^+. При возврате ионов H^+ наружу через АТР-синтазу происходит синтез АТР, так же как в митохондриях.

Данные рентгеноструктурного анализа о трехмерном строении реакционных центров пурпурных бактерий (*Rhodopseudomonas viridis* и *Rhodobacter sphaeroides*) позволили предложить молекулярный механизм фотохимических процессов в феофитин-хиноновой системе. Реакционный центр бактерии *Rhodopseudomonas viridis* представляет собой крупный белковый комплекс, включающий четыре полипептидные субъединицы и 13 кофакторов, в которые входят две пары молекул бактериохлорофилла, пара молекул феофитина, две молекулы хинона, негеминовый железосодержащий белок и четыре гема, связанные с цитохромом *c* (**рис. 19-55, *а***).

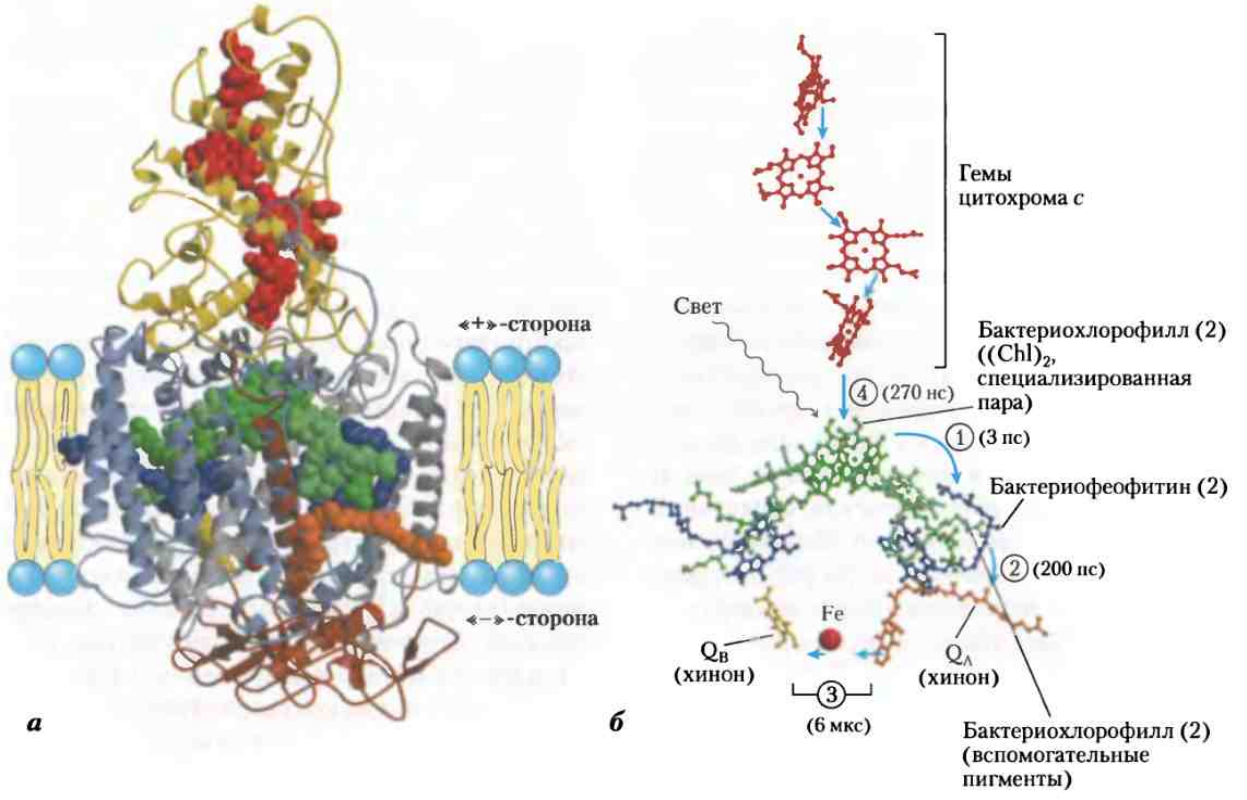


Рис. 19-55. Фотореакционная система пурпурной бактерии *Rhodopseudomonas viridis* (PDB ID 1 PRC). *а* — система включает четыре компонента: три субъединицы H, M, L (окрашенные на рисунке в коричневый, синий и серый цвета соответственно), 11 сегментов спиралей которых пронизывают насквозь мембрану тилакоидов, и белковый комплекс цитохром *с* (желтый), встроенный в поверхность тилакоидной мембраны. Субъединицы L и M спарены с трансмембранными белками и образуют цилиндрическую структуру с осью второго порядка. Здесь, как и на схеме (*б*), также изображены простетические группы, участвующие в фотохимических процессах. Субъединицы L и M связаны с двумя парами молекул бактериохлорофилла (зеленые). Одна из этих двух пар — «специализированная пара» $(Chl)_2$ — реакционный центр, в котором после поглощения световой энергии начинается фотохимический акт. В систему входят также две молекулы феофитина (голубые), менахинон Q_A и убихинон Q_B (оранжевый и желтый соответственно), расположенные приблизительно симметрично между двумя молекулами хинона. Вверху изображены четыре гемовые группы (красные), связанные с цитохромом *с*. Фотореакционная система бактерии *Rhodobacter sphaeroides* включает те же самые функциональные блоки, что и система *Rhodopseudomonas viridis*, за исключением цитохрома с. *б* — стадии процесса фотосинтеза в фотореакционных системах бактерий *Rhodopseudomonas viridis* и *Rhodobacter sphaeroides* после возбуждения специализированной пары молекул бактериохлорофилла. Все компоненты системы окрашены в те же цвета, что на схеме (*а*). В скобках указано время, необходимое для передвижения электронов по этому участку. ① Возбужденная специализированная пара молекул бактериохлорофилла передает электрон феофитину. ② От феофитина электрон быстро передвигается к прочно связанной с феофитином молекуле менахинона Q_A. ③ Молекула Q_A передает электроны в более медленном темпе негеминовому железу и затем диффундирующей молекуле убихинона Q_B. ④ «Электронная дырка» в специализированной паре хлорофиллов заполняется электронами, поступившими от гема, связанного с цитохромом *с*.

На основе изучения последовательности стадий очень быстрого переноса электронов (рис. 19-55, *б*) было установлено, что способностью превращать световую энергию в химическую в реакционных центрах бактерий обладает так называемая «специализированная пара» молекул бактериохлорофилла. Ее обычно обозначают $(Chl)_2$, именно она служит начальной точкой фотохимического акта. Световая энергия, поглощенная одной из многих антенных молекул хлорофилла, окружающих реакционный центр, передается в виде экситона специализированной паре молекул бактериохлорофилла, электронные орбитали которых сильно перекрываются, и переводит ее в возбужденное состояние. В результате окислительно-восстановительный потенциал $(Chl)_2$ изменяется на величину энергии поглощенного фотона. Пара $(Chl)_2$ становится сильным восстановителем и теряет один электрон, который проходит через соседние молекулы хлорофилла к феофитину Pheo. При получении электрона феофитином образуются два радикала — положительно заряженная пара молекул хлорофилла и отрицательно заряженный радикал феофитина:

$$(Chl)_2 + 1 \text{ экситон} \rightarrow (Chl)_2^*$$

(стадия возбуждения $(Chl)_2$)

$$(Chl)_2^* + Pheo \rightarrow {}^\bullet(Chl)_2^+ + {}^\bullet Pheo^-$$

(стадия разделения зарядов)

Электрон от радикала $^\bullet Pheo^-$ затем передается прочно связанной с ним молекуле хинона Q_A, превращая его в радикал семихинона. Радикал семихинона в свою очередь передает приобретенный электрон молекуле хинона Q_B, слабо связанной с феофитином. При присоединении двух электронов хинон Q_B восстанавливается до гидрохинона Q_BH_2, который покидает реакционный центр и диффундирует в бислой мембраны. Уравнение этой реакции имеет следующий вид:

$$2\ {}^\bullet Pheo^- + 2\ H^+ + Q_B \rightarrow 2\ Pheo + Q_BH_2$$

(восстановление хинона)

Молекула гидрохинона Q_BH_2, в химических связях которой заключена часть энергии фотонов, возбудивших реакционный центр P870, проходит через пул растворенного в мембране восстановленного гидрохинона QH_2 и движется через липидную фазу бислоя к цитохромному комплексу bc_1.

Цитохромный комплекс bc_1 пурпурных бактерий, подобно комплексу III в дыхательной цепи митохондрий, переносит электроны от донора — молекулы хинона QH_2 — к акцептору электронов, а высвобождающаяся при этом энергия используется для перекачивания протонов через мембрану, в результате чего возникает протон-движущая сила. Путь электронов через комплекс bc_1 напоминает путь электронов через комплекс III в дыхательной цепи митохондрий, включенной в Q-цикл (см. рис. 19-12), в результате которого создается трансмембранный градиент pH. Конечным акцептором электронов в клетках пурпурных бактерий является потерявший электрон реакционный центр P870, иначе говоря, $^\bullet(Chl)_2^+$ (рис. 19-54, *а*). Электроны, выброшенные реакционным центром P870, движутся от цитохромного комплекса bc_1 через цитохром c_2 — водорастворимую форму цитохрома c_1 — снова к реакционному центру. Таким образом, при освещении пурпурных бактерий электроны совершают циклические переходы — покидают реакционный центр фотосистемы и вновь возвращаются в него на прежние невозмущенные орбитали, в результате чего реакционный центр переходит в восстановленное состояние и способен снова поглощать экситон от антенных молекул хлорофилла.

Следует отметить, что все химические реакции в этой фотохимической системе протекают между *твердыми частицами*, расположенными близко друг к другу и ориентированными определенным образом, что обеспечивает большую скорость и эффективность реакций.

Фотохимическая реакционная система типа I — реакционная Fe-S-система. У зеленых серных бактерий, кроме функциональных ансамблей, характерных для пурпурных бактерий, в фотосинтезе участвуют дополнительные ферментные комплексы (рис. 19-54, *б*) и пути переноса электронов. Во-первых, у зеленых серных бактерий существует циклический поток, когда выброшенные из реакционного центра электроны присоединяются первым переносчиком электронов хиноном Q, а затем переходят к цитохромному комплексу bc_1. Этот про-

цесс сопровождается транспортом протонов через мембрану тилакоидов и возникновением протон-движущей силы, поставляющей энергию для синтеза АТР, как это происходит у пурпурных бактерий и в дышащих митохондриях. Во-вторых, у них кроме циклического потока существует еще поток электронов другого типа, также индуцируемый светом, — нециклический. В нециклическом потоке часть выброшенных из реакционного центра электронов движется к железо-серному белку **ферредоксину**, а затем через флавопротеин ферредоксин-NAD-редуктазу к NAD^+, восстанавливая последний до NADH, — таким образом, электроны все время движутся в одном направлении. Электроны, ушедшие из реакционного центра на восстановление NAD^+, заменяются электронами, полученными при окислении H_2S до элементной серы, а затем до SO_4^{2-}, т. е. в реакциях, характерных для фотосинтеза зеленых серных бактерий. Процесс окисления H_2S бактериями сходен с процессом окисления H_2O растениями–продуцентами кислорода.

Кинетические и термодинамические факторы, препятствующие потере энергии

Сложное строение фотореакционных систем — результат эволюционного отбора наиболее эффективных фотосинтезирующих молекулярных структур. Специализированная пара молекул хлорофилла, поглотившая фотон, находится в высокоэнергетическом, возбужденном состоянии $(Chl)_2^*$, которое, в принципе, крайне неустойчиво. «Высокоэнергетические» электроны могут очень быстро (в течение 10 пикосекунд; 1 пс = 10^{-12} с) возвратиться в основное состояние, высвобождая энергию поглощенного фотона в виде тепла (кинетическая энергия молекул). Однако реакционные фотоцентры имеют молекулярную структуру, препятствующую неэффективному использованию поглощенной энергии света на внутренние превращения. Белковые молекулы реакционной системы закрепляют молекулы бактериохлорофилла, бактериофитина и хинонов в мембране тилакоидов и удерживают их в определенном положении по отношению друг к другу, в результате чего фотохимические реакции фактически протекают в частицах, находящихся в твердой фазе. Причина высокой эффективности и быстроты протекающих фотохимических реакций — отсутствие столкновений или беспорядочной диффузии частиц в фотосистеме. Передача экситона от антенного хлорофилла специализированной паре хлорофиллов в реакционном центре происходит менее чем за 100 пс с эффективностью выше 90%. В течение 3 пс после возбуждения реакционного центра P870 молекула феофитина получает электрон и превращается в радикал с отрицательным зарядом. Менее чем за 200 пс электрон достигает молекулы хинона Q_B (рис. 19-55, *б*). Реакции фотосинтетического переноса электронов не только имеют большую скорость, но их направление согласуется с законами термодинамики, т. е. электроны движутся «вниз» от мощного восстановителя к мощному окислителю. Действительно, специализированная пара хлорофиллов в возбужденном состоянии $(Chl)_2^*$ является очень хорошим донором электронов ($E'^\circ = -1$ В) и электроны от нее движутся к акцептору, с менее отрицательным значением стандартного восстановительного потенциала E'°. Изменение стандартной свободной энергии в процессе фотосинтеза — большая отрицательная величина. Как было показано в гл. 13, изменение стандартной свободной энергии можно рассчитать по формуле $\Delta G'^\circ = -n\Delta E'^\circ$, где $\Delta E'^\circ$ — разность стандартных потенциалов восстановления двух полуреакций:

(1) $(Chl)_2^* \rightarrow (Chl)_2^+ + e^-$ $\qquad E'^\circ = -1$ В

(2) $Q + 2H^+ + 2e^- \rightarrow QH_2$ $\qquad E'^\circ = -0{,}045$ В

Тогда

$$\Delta E'^\circ = -0{,}045 \text{ В} - (-1{,}0 \text{ В}) \approx 0{,}95 \text{ В}$$

$$\Delta G'^\circ = -2\,(96{,}5 \text{ кДж/В} \cdot \text{моль})(0{,}95 \text{ В})$$
$$= -180 \text{ кДж/моль}$$

Высокая скорость реакций и их соответствие законам термодинамики делают процессы фотосинтеза необратимыми и высокоэффективными. Общий энергетический выход реакции фотосинтеза, т. е. доля поглощенной энергии фотонов, конвертированной в QH_2, составляет более 30% с учетом энергии, рассеянной в виде тепла и энтропии.

У растений две реакционные фотосистемы взаимодействуют между собой

У современных цианобактерий, водорослей и сосудистых растений более сложный фотосинтезирующий аппарат, чем у фотосинтезирующих бактерий, у которых есть только один тип фотохимической реакционной системы. Накопленный фактический материал позволяет сделать вывод, что фотосинтезирующие системы сложных клеток, по-видимому, являются комбинацией двух простых бактериальных фотосистем, работающих взаимосогласованно и составляющих единую последовательность рабочих звеньев. В тилакоидных мембранах хлоропластов присутствуют два типа фотохимических систем, каждая со своим собственным ансамблем светопоглощающих

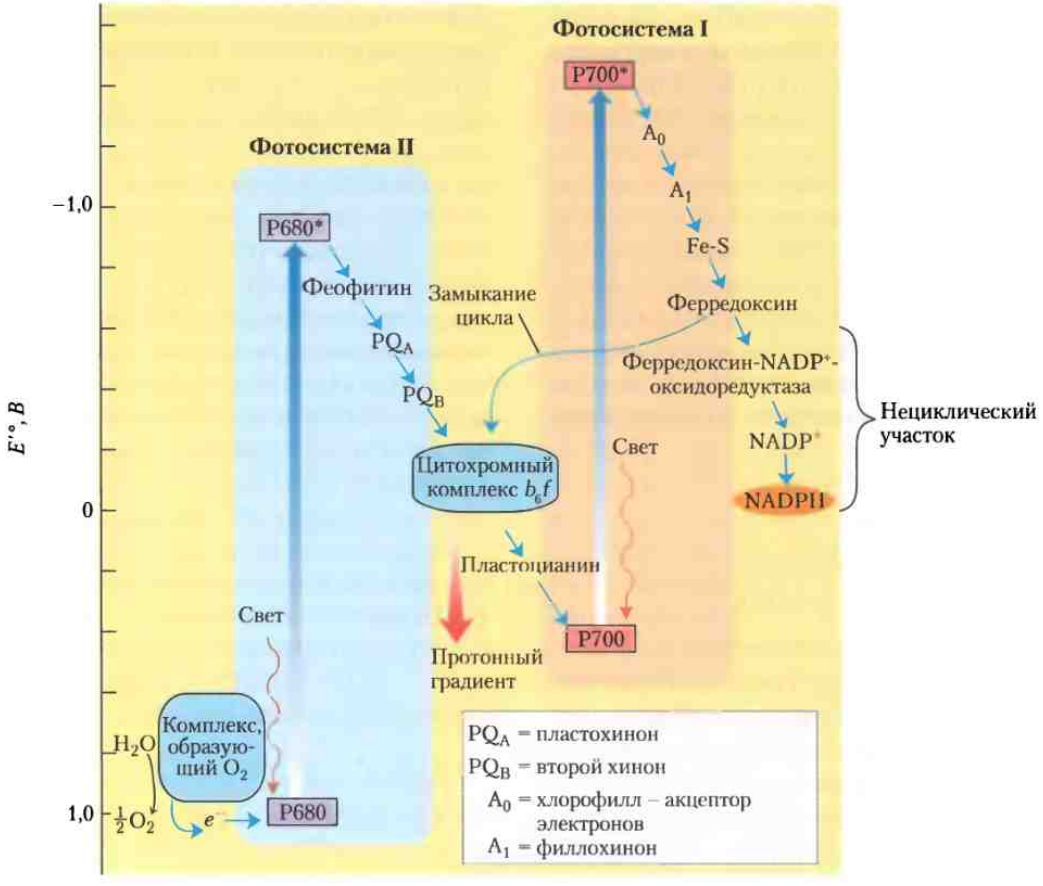


Рис. 19-56. Совместное действие фотосистем I и II в хлоропластах. Зигзагообразная схема (**Z-схема**) показывает путь потока электронов от H_2O к $NADP^+$ (*внизу справа*) в нециклическом фотосинтезе растений. Вертикальная шкала *слева* отражает энергетические взаимоотношения. Для того чтобы электроны, происходящие из молекулы H_2O, оказались на энергетическом уровне, на котором они смогут восстановить $NADP^+$ в NADPH, каждый из них должен быть дважды «подброшен вверх» (толстые голубые стрелки) фотонами, поглощенными фотосистемой I и фотосистемой II. В каждой фотосистеме на один «подброшенный вверх» электрон расходуется один квант, или фотон. После каждого из таких «подбрасываний» электроны с избыточной энергией устремляются «вниз» (маленькие синие стрелки) по цепи переносчиков. Движение электронов в цепи, соединяющей фотосистему II с фотосистемой I, в которую включен цитохромный комплекс b_6f, сопряжено с возникновением протонного градиента, поставляющего энергию для фотофосфорилирования. Прерывистая черная стрелка указывает путь электронов в циклическом потоке электронов (см. в след. разд.), в котором участвует только фотосистема I; электроны возвращаются по обходному пути к фотосистеме I вместо того, чтобы восстанавливать $NADP^+$ в NADPH.

пигментов (антенных молекул) и реакционным центром для захвата энергии. Каждая система имеет свои основные и дополнительные функции (**рис. 19-56**). **Фотосистема II (ФС II)**, так называемая феофитин-хиноновая система, аналогична единственной фотосистеме пурпурных бактерий; она включает примерно одинаковые количества молекул хлорофилла *a* и *b*. Реакционный центр фотосистемы II содержит пигмент P680, при возбуждении которого электроны выводятся из систем через цитохромный комплекс b_6f, что сопряжено с переносом протонов через тилакоидную мембрану. **Фотосистема I (ФС I)** по строению и функциям аналогична фотосинтезирующей системе типа I у зеленых серных бактерий. Фотосистема I характеризуется высоким соотношением между количеством хлорофилла *a* и хлорофилла *b* и имеет в реакционном центре пигмент P700, способный захватывать экситоны с последующей передачей электрона через железо-серный белок ферредоксин к $NADP^+$, переводя его в восстановленное состояние NADPH. У шпината в тилакоидных мембранах одного хлоропласта имеются сотни фотосистем того и другого типа.

У растений фотосистемы I и II функционируют совместно в реакциях фотосинтеза, от которых зависит движение электронов от H_2O к $NADP^+$ (рис. 19-56). Перенос электронов между двумя фотосистемами осуществляется водорастворимым белком **пластоцианином** (одноэлектронным переносчиком); по своим свойствам он аналогичен цитохрому *c* в митохондриях. «Дырки» от электронов, ушедших из системы ФС II к $NADP^+$, у цианобактерий и растений, выделяющих кислород, заполняются электронами, поступающими от H_2O при окислении. В отличие от фотосинтеза у пурпурных и зеленых серных бактерий, окисляющих H_2S и не выделяющих кислород, такой процесс называется **оксигенным фотосинтезом**. Во всех фотосинтезирующих клетках, выделяющих кислород, т. е. в клетках высших растений, водорослей и цианобактерий, содержатся обе фотосистемы I и II. У фотосинтезирующих бактерий, не выделяющих кислород, есть только одна фотосистема. На рис. 19-56 приведена схема, которую из-за ее зигзагообразной формы часто называют **Z-схемой**. Она позволяет проследить поток электронов между фотосистемами I и II, а также энергетические взаимоотношения этих двух фотосистем в световых реакциях. Таким образом, Z-схема описывает весь путь, по которому электроны переходят от H_2O к $NADP^+$ согласно уравнению:

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ + 8\text{ фотонов} \rightarrow O_2 + 2\,NADPH + 2\,H^+$$

На каждый электрон, переходящий от H_2O к $NADP^+$, поглощаются два кванта света, по одному на каждую фотосистему. Для образования одной молекулы O_2 от H_2O к $NADP^+$ должны быть переданы четыре электрона, т. е. должно быть поглощено восемь квантов — по четыре на каждую фотосистему.

У растений и бактерий молекулярные механизмы световых фотохимических реакций в фотосистемах I и II в основном аналогичны. Однако есть и некоторые различия. Фотосистема II бактерий включает два небольших почти одинаковых белковых ансамбля D_1 и D_2, образующих почти симметричный димерный комплекс, содержащий все электронпереносящие кофакторы (**рис. 19-57**). Поглощение световой энергии реакционным цен-

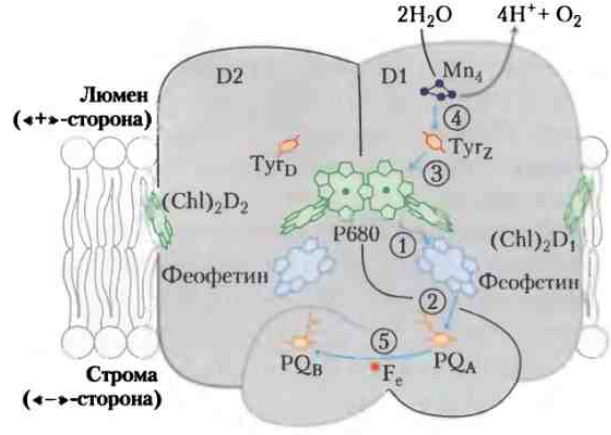


Рис. 19-57. Строение фотосистемы II у цианобактерии *Synechococcus elongates*. Мономер представленного на схеме комплекса включает два главных белка D1 и D2, пронизывающих тилакоидную мембрану и содержащих набор кофакторов. Хотя обе субъединицы D1 и D2 почти симметричны, электроны переносятся только через одну из субъединиц — D1 (*справа*). Стрелками показан путь электронов от ионного кластера Mn_4 (окрашен в красный цвет), расщепляющего воду на ионы H^+ и кислород, к хинону PQ_B (оранжевый). Последовательность фотохимических событий, происходящих в фотосистеме II, обозначена цифрами в кружочках. Расположение кофакторов совпадает с положением фотореакционных центров бактерий на рис. 19-55. Функции остатка Tyr в фотосинтезе цианобактерий рассматриваются в последующих разделах.

тром P680 в фотосистеме II переводит пигмент P680 в возбужденное состояние P680*, в котором он легко теряет электроны. Поступающие от возбужденного реакционного центра электроны переносятся за несколько пикосекунд к феофетину, преобразуя его в $^{\cdot}Pheo^{-}$. При потере электрона P680* переходит в катион-радикал $P680^{+}$. $^{\cdot}Pheo^{-}$ очень быстро передает электрон связанному с белком **пластохинону PQ_A**, или Q_A. Восстановленная форма пластохинона PQ_A в свою очередь передает электроны пластохинону другого типа PQ_B, или Q_B, не связанному с белком. После получения двух электронов от PQ_A и двух протонов от молекул воды пластохинон PQ_B переходит в полностью восстановленную хинольную форму PQ_BH_2. Уравнение этой индуцируемой светом реакции в фотосистеме II можно записать следующим образом:

$$4\ P680 + 4\ H^{+} + 2\ PQ_B + 4\ \text{фотона} \rightarrow 4\ P680^{+} + 2\ PQ_BH_2 \qquad (19\text{-}12)$$

В итоге, восстановленная форма пластохинона PQ_BH_2 передает электроны цитохромному комплексу b_6f, который препятствует фотосинтезу АТР (рис. 19-56). «Дырки» в реакционном центре P680 фотосистемы II заполняются электронами, отщепляемыми от воды в процессе ее окисления, что обсуждается в следующих разделах. Фотофосфорилирование у растений можно разобщить с переносом электронов при помощи любых гербицидов, способных присоединяться к пластохинону и блокировать передачу электронов через цитохромный комплекс b_6f, что приводит к гибели растения.

Аналогичным образом в фотосистеме I под действием квантов света реакционный центр P700 переходит в возбужденное состояние P700* и легко отдает электрон акцептору A_0 (полагают, что это особая форма хлорофилла), функции которого сходны с функциями феофитина в фотосистеме II. В результате этого процесса образуется A_0^{-} и «дырка» $P700^{+}$ (рис. 19-56, *справа*), т. е. энергия света вызывает разделение зарядов в фотохимическом реакционном центре. Молекула пигмента после потери электрона ($P700^{+}$) становится очень сильным окислителем и очень быстро присоединяет электрон от пластоцианина — растворимого медьсодержащего голубого белка, который служит непосредственным донором электронов для «дырок» в реакционном центре P700 фотосистемы I. A_0^{-} — исключительно сильный восстановитель; он переносит свой электрон по цепи переноса электронов к $NADP^{+}$. Первым переносчиком в цепи переноса электронов от A_0^{-} к $NADP^{+}$ является **филлохинон** A_1. Второй переносчик электронов — железо-серный белок с тремя FeS-центрами. Третий — другой железо-серный белок **ферредоксин** Fd; у шпината Fd связан с тилакоидной мембраной. Молекулярная масса ферредоксина, полученного в кристаллическом виде из листьев шпината, около 10 700; его молекула содержит 2Fe-2S-центра (рис. 19-5), которые вступают в окислительно-восстановительные реакции с переносом одного электрона. Роль четвертого переносчика электронов играет флавопротеин **ферредоксин-NADP-оксиредуктаза**. Этот фермент переносит электроны от восстановленного ферредоксина (Fd_{red}) к $NADP^{+}$, восстанавливая последний в NADPH.

$$2\ (Fd_{red}) + 2\ H^{+} + NADP^{+} \rightarrow 2\ (Fd_{ox}) + NADPH + H^{+}$$

Этот фермент по своим функциям и строению аналогичен ферредоксин-NAD-редуктазе зеленых серных бактерий (рис. 19-54, *б*).

Антенные молекулы хлорофиллов образуют с переносчиками электронов функциональные комплексы

Кристаллографическими методами была установлена структура надмолекулярных ансамблей фотосистемы I, включающих переносящие электроны кофакторы, светопоглощающие комплексы, а также связанные с ними липиды (**рис. 19-58, *а***). Белковые агрегаты таких систем содержат три идентичных комплекса, состоящих из 11 различных белков (рис. 19-58, *б*). Несколько сотен антенных молекул хлорофиллов и каротиноидов ориентированы определенным образом по отношению к реакционному центру (рис. 19-58, *в*). Кофакторы реакционного центра, осуществляющие перенос электронов, прочно связаны с антенными молекулами. В таких системах поглощенный одной из антенных молекул экситон быстро мигрирует по пигментным молекулам к реакционному центру. В отличие от фотосистемы II, в которой движение электронов происходит по одной ветви, индуцированный светом поток электронов в ФС I проходит через обе ветви переносчиков электронов.

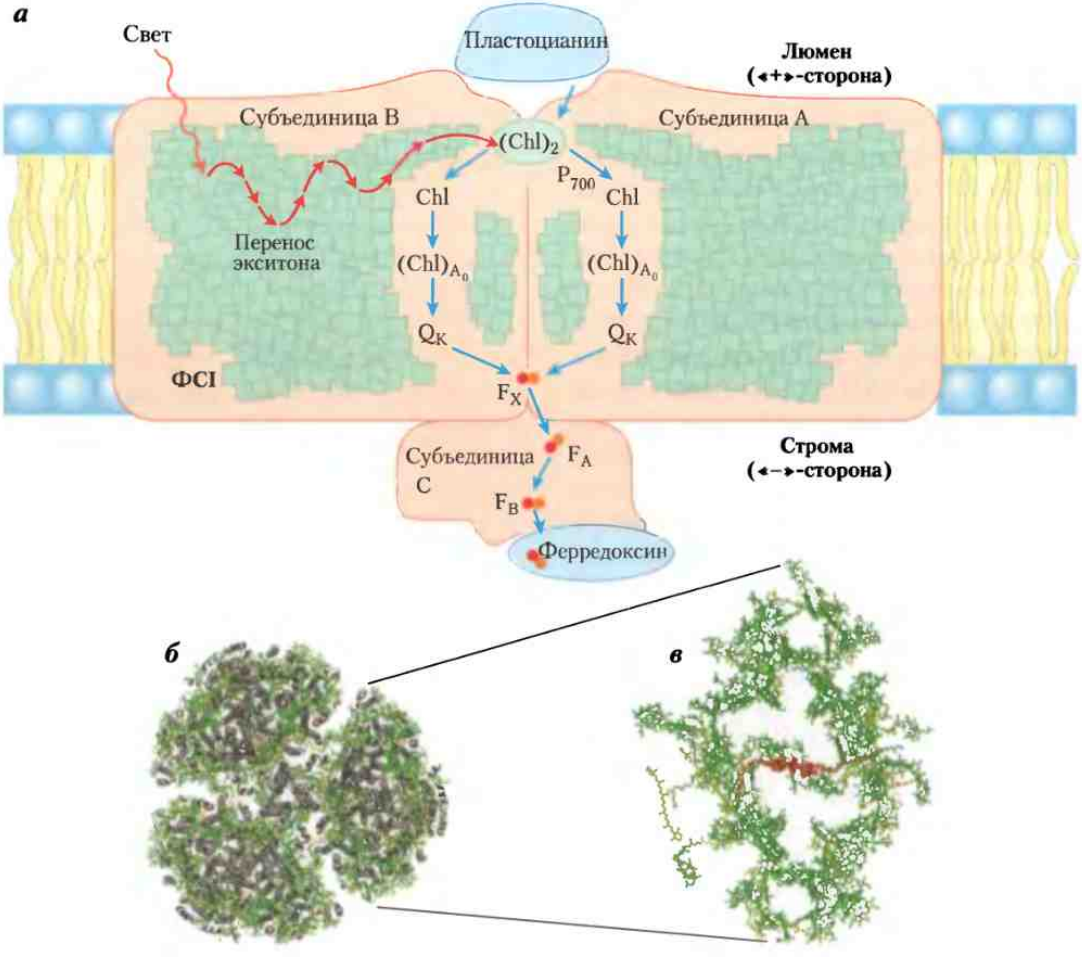
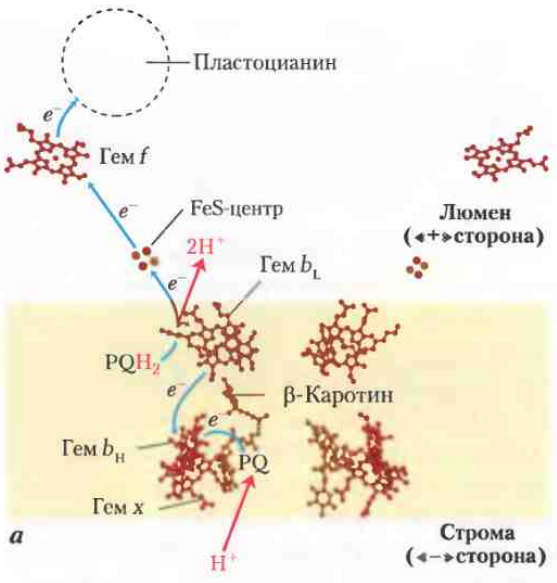
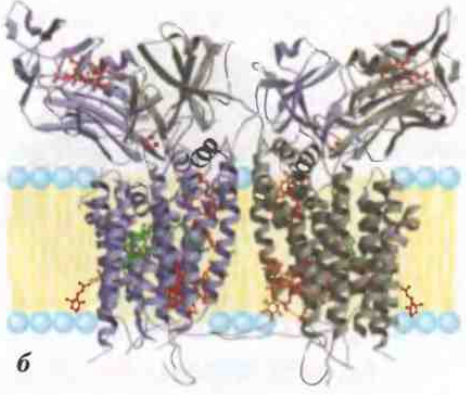


Рис. 19-58. Надмолекулярный комплекс, образованный фотосистемой I и антенными молекулами хлорофиллов. *а* — белки и кофакторы в функциональной единице фотосистемы I. Огромное число антенных молекул хлорофиллов окружают реакционный центр и передают ему энергию поглощенных квантов (движение экситона показано красными стрелками), в результате чего пара молекул хлорофиллов в ансамбле P700 переходит в возбужденное состояние и передает электрон через две соседние молекулы хлорофиллов к филлохинону Q_K, называемому также A_1. Восстановленный филлохинон Q_K вновь окисляется и его молекулы в обеих ветвях одновременно передают по одному электрону (всего два электрона) железо-серному белку F_X, расположенному на отрицательно заряженной стороне тилакоидной мембраны. От железо-серного белка F_X электроны переносятся еще через два FeS-центра (F_A и F_B) и попадают на железо-серный белок ферредоксин, расположенный в строме. Ферредоксин в свою очередь направляет энергию к $NADP^+$ (не показан), восстанавливая его до высокоэнергетического соединения NADPH, в форме которого хлоропласты запасают энергию поглощенных фотонов. *б* — трехмерное строение фотосистемы I (PDB ID 1JB0). Вид со стороны освещенной части тилакоидной мембраны, в перпендикулярном к ней направлении. В виде спиралей серого цвета изображены субъединицы белка. Расположение кофакторов показано на схеме (*в*). *в* — мономер функциональной единицы фотосистемы. Взаимное расположение антенных и принадлежащих реакционному центру молекул хлорофиллов (окрашены в зеленый цвет) с ионами Mg^{2+} в центре (темно-зеленые), а также каротиноидов (желтые) и FeS-центров (красные и оранжевые шарики), включенных в реакционный центр. Белковые комплексы, удерживающие хлорофиллы и каротиноиды в определенном положении, расположены оптимально для эффективной передачи экситонов в фотосистеме.

Цитохромный комплекс b_6f связывает фотосистемы I и II

Электроны, вышедшие из реакционного центра P680 в ФСII при возбуждении, на некоторое время задерживаются в пластохиноле и переносятся на реакционный центр P700 в ФСI через цитохромный комплекс b_6f и затем через водорастворимый белок пластоцианин (рис. 19-56, в центре). Цитохромный комплексе b_6f — аналог митохондриального комплекса III **(рис. 19-59)** и включает цитохром *b* с двумя гемовыми группами (обозначаются как b_H и b_L), железо-серный белок Риске (M_r = 20 000) и цитохром *f* (от лат. *frons* — листья). В комплексе b_6f электроны движутся от восстановленной формы пластохинона PQH_2 к цитохрому *f*, затем к пластоцианину и, наконец, к реакционному центру P700 в фотосистеме I, восстанавливая его.





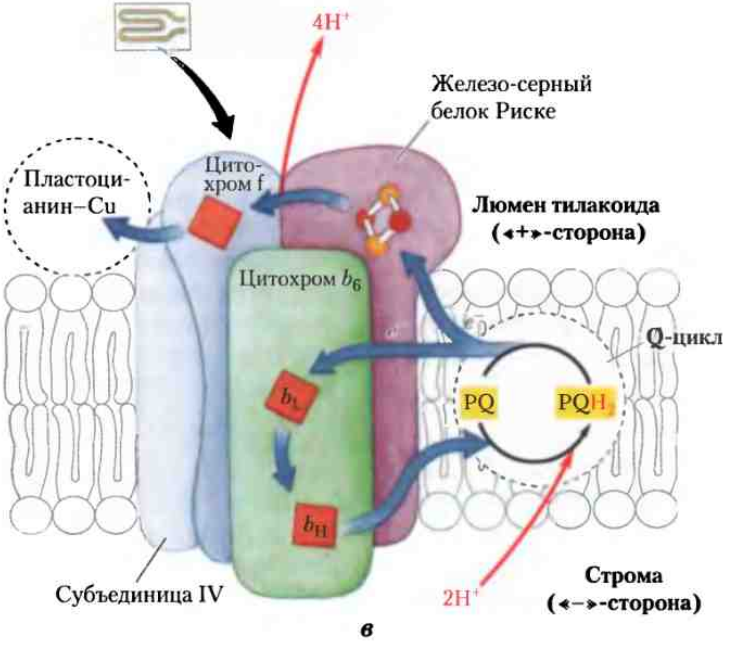


Рис. 19-59. Путь электронов и протонов через цитохромный комплекс b_6f. *а* — расположение кофакторов, участвующих в переносе электронов, в кристаллической структуре комплекса b_6f (PDB ID 1UM3). Кроме гемовых групп цитохрома *b* — b_H и b_L (или $b_{«-»}$ и $b_{«+»}$ из-за их близости к отрицательно и положительно заряженным сторонам бислоя тилакоидных мембран) комплекс b_6f содержит вблизи гема b_H еще один гем — так называемый гем *x* — и β-каротин, о функции которого пока ничего не известно. Пластохинон включает два центра связывания электронов: PQH_2 вблизи положительно заряженной стороны бислоя и PQ — вблизи отрицательно заряженной стороны. FeS-центры белка Риске находятся с внешней стороны положительно заряженной стороны люмена, гем цитохрома *f* расположен в белковом домене и встроен в люмен тилакоидной мембраны. *б* — в гомодимерном комплексе b_6f находятся поры, по которым пластохинон может передвигаться между двумя центрами, принимая в них окисленную (PQ) или восстановленную (PQH_2) форму. Аналогичные процессы протекают в митохондриальном комплексе III (см. рис. 19-12). *в* — окисление образовавшегося в ФСII пластохинона PQH_2 цитохромным комплексом b_6f и последующее восстановление PQ протекает по циклической схеме, аналогичной Q-циклам в цитохромном комплексе bc_1 митохондрий (см. рис. 19-11). Один из отщепленных от PQH_2 электронов проходит через FeS-центр белка Риске (красного цвета), другой — через гем b_L цитохрома b_6 (зеленый). В результате такого процесса электроны поступают от PQH_2 к водорастворимому белку пластоцианину, который переносит их в ФСI.

Аналогично митохондриальному комплексу III цитохромный комплекс b_6f переносит электроны от восстановленного хинона PQ_B — подвижного жирорастворимого переносчика двух электронов, напоминающего убихинон Q дыхательной цепи митохондрий, к водорастворимому белку пластоцианину — одноэлектронному переносчику, подобному цитохрому *c* в митохондриях. В процессе циклического переноса комплексом b_6f электроны по одному переходят от PQ_BH_2 к цитохрому b_6. Аналогом такого цикла в митохондриях является Q-цикл (рис. 19-12). Фотосинтетический перенос электронов в хлоропластах из ФСII в ФСI вызывает перекачивание протонов через мембрану из наружной (стромальной) среды во внутренний тилакоидный компартмент — по четыре протона на каждую пару перенесенных электронов, в результате чего возникает трансмембранный градиент H^+. Из-за малого объема уплощенных тилакоидных пузырьков в люмене поступление в них относительно небольшого числа протонов вызывает значительное изменение pH люмена. Экспериментально полученное различие значений pH = 8 для стромы и pH = 5 для люмена соответствует 1000-кратной разнице концентраций протонов, что и служит мощной движущей силой синтеза ATP.

Циклический поток электронов между ФСI и цитохромным комплексом b_6f увеличивает продукцию ATP по сравнению с NADPH

Поток электронов от ФСII к цитохромному комплексу b_6f и далее через ФСI к $NADP^+$ иногда называют **нециклическим потоком электронов**, чтобы отличить его от **циклического потока электронов**, которые зависят главным образом от условий освещения. Нециклический поток создает протонный градиент, который расходуется на синтез ATP и NADPH, который используется в биосинтезе. В циклический поток электронов вовлекается только фотосистема I (рис. 19-56), ФСII не участвует. Циклическим этот поток называется потому, что электроны, выброшенные реакционным центром P700 при освещении ФСI и присоединенные к ферредоксину, не переходят затем к $NADP^+$, а возвращаются через цитохромный комплекс b_6f к пластоцианину, как это происходит у зеленых серных бактерий (рис. 19-54, *б*). Пластоцианин отдает электроны реакционному центру P700, который их вновь перебрасывает ферредоксину. Таким образом, при освещении ФСI электроны могут совершать циклические переходы — покидать реакционный центр ФСI и вновь возвращаться в него. Энергия, необходимая для проведения одного электрона через такой цикл, обеспечивается поглощением одного кванта света. Циклический поток электронов не сопровождается образованием NADPH и выделением кислорода, однако ему сопутствует фосфорилирование ADP до ATP — так называемое **циклическое фотофосфорилирование**. Суммарное уравнение для циклического потока электронов и фотофосфорилирования имеет простой вид:

$$ADP + P_i \xrightarrow{\text{свет}} ATP + H_2O$$

Нециклический поток электронов, направленный на восстановление $NADP^+$, и циклическое фотофосфорилирование включаются в растительной клетке в зависимости от ее потребности в ATP и NADPH, необходимых для ассимиляции углерода и других биосинтетических процессов. Как показано в гл. 20, для успешной ассимиляции углерода растительная клетка должна быть обеспечена ATP и NADPH в соотношении 3 : 2.

Эта регуляция электронтранспортного пути является частью системы краткосрочной адаптации к изменениям цвета (длины волны) и количества (интенсивности) света, о чем будет сказано ниже.

Перестройка фотосинтетического аппарата изменяет распределение светопоглощающего комплекса II между двумя фотосистемами

Для возбуждения реакционного центра P700 в фотосистеме I требуется свет с длиной волны 700 нм. Его энергия меньше, чем энергия излучения с длиной волны 680 нм для возбуждения центра P680 в ФС II, поскольку более коротковолновое излучение несет больше энергии. Если фотосистемы I и II были бы физически связаны между собой, экситоны от антенных молекул системы ФСII поступали бы только на реакционный центр ФСI, возбуждение которого требует меньших затрат энергии. В та-

ком случае реакционный центр ФСII никогда не переходил бы в возбужденное состояние, и функциональная связь обеих фотосистем была бы нарушена. Дисбаланса в обеспечении фотосистем экситонами удается избежать благодаря пространственному разделению двух фотосистем на мембране тилакоидов **(рис. 19-60)**. ФСII почти полностью расположена в сильносжатых слоях тилакодных гран (в ламеллах гран). Светопоглощающий комплекс прочно связывает соседние мембраны в гранах. ФСI и ферментный комплекс АТР-синтаза находятся только в свободных, несцепленных слоях тилакоидных мембран (в ламеллах стромы) и могут

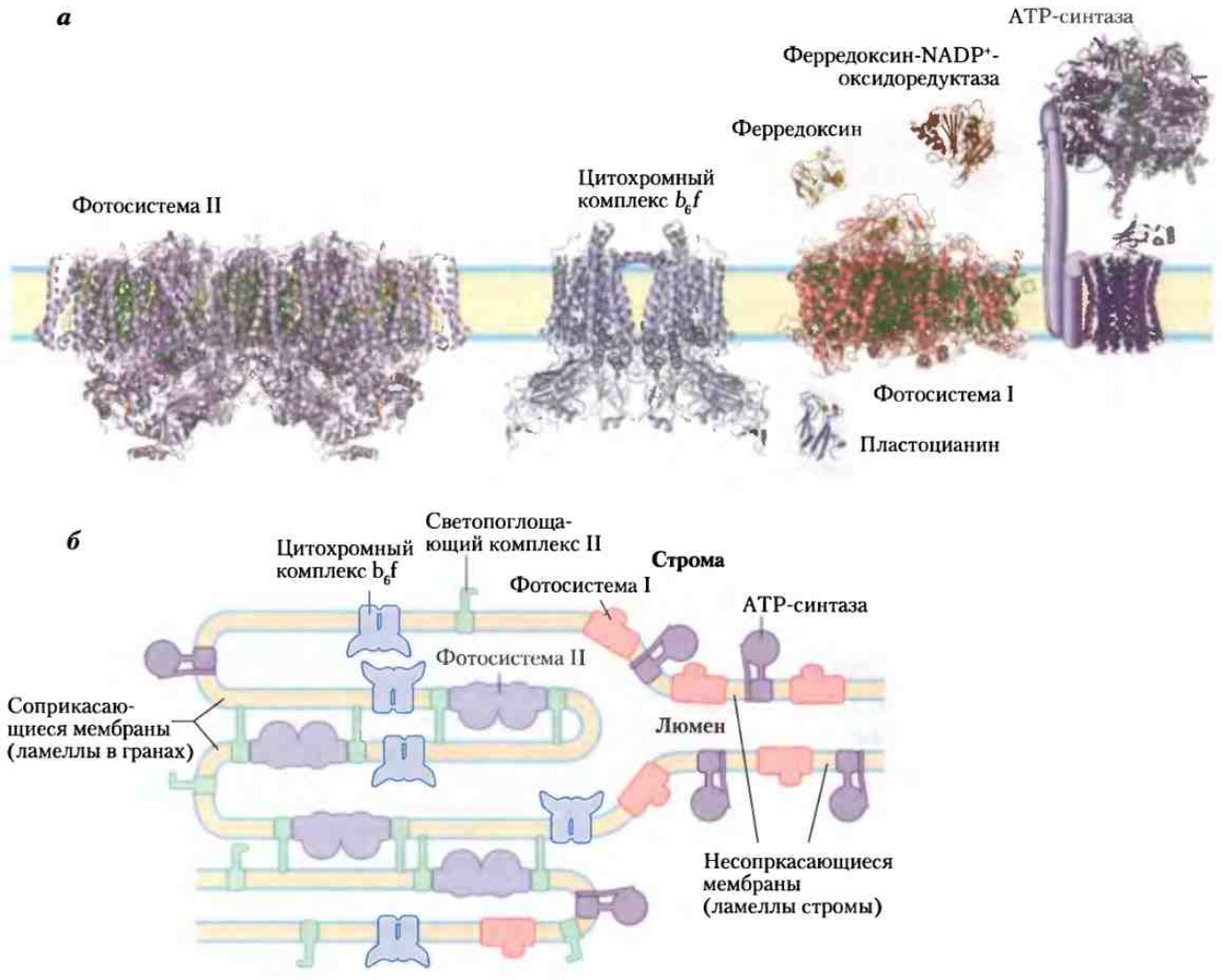


Рис. 19-60. Локализация ФСI и ФСII в тилакоидных мембранах. *а* — строение комплексов и растворимых белков фотосинтетического аппарата сосудистых растений или водорослей. PDB ID для ФСII — 2AXT; ФСI — 1QZV; цитохром b_6f — 2E74; пластоцианин — 1AG6; ферредоксин — 1A70; ферредоксин:NADP⁺-редуктаза — 1QG0. Изображенная здесь структура АТР-синтазы составлена из митохондриального фермента из дрожжей (PDB ID 1Q01) и митохондриального фермента из клеток быка (PDB ID 1BMF). *б* — светопоглощающий комплекс II и АТР-синтаза сосредоточены как в сжатых областях тилакоидных мембран (гранальные тилакоиды, в которых осуществляется контакт нескольких мембран), так и в области тилакоидов стромы (ламелл) и имеют доступ к ADP и NADP⁺ в строме. ФСII присутствует почти исключительно в сжатых областях, а ФСI — почти исключительно в несжатых областях, экспонированных в область стромы. Светопоглощающий комплекс выполняет функцию «клея», удерживающего вместе сжатые области тилакоидных мембран (см. рис. 19-61).

использовать в своих молекулярных процессах содержимое стромы, включая соединения ATP и $NADP^+$. Цитохромный комплекс b_6f располагается в основном в гранах.

Взаимодействие светопоглощающего комплекса II с ФСI и ФСII зависит от интенсивности и энергии поглощаемого света, который может быстро изменяться, что приводит к **перестройкам** в хлоропласте. В состоянии 1 остаток Ser светопоглощающего комплекса не фосфорилирован, а сам комплекс сопряжен с ФСII. При освещении растения ярким солнечным светом, в спектре которого обычно преобладает голубая область, ФСII поглощает больше солнечной энергии и восстанавливает пластохинон до пластохинола PQH_2 быстрее, чем ФСI может его окислить. Накопление PQH_2 в свою очередь активизирует протеинкиназу, которая вызывает переход в состояние 2, фосфорилируя остаток Thr в светопоглощающем комплексе II (**рис. 19-61**). Процессы фосфорилирования ослабляют взаимодействие светопоглощающего комплекса и остальных модулей ФСII, что приводит к частичной диссоциации светопоглощающего комплекса ФСII и перемещению его компонентов в ламеллы стромы. В строме частицы светопоглощающего комплекса II захватывают фотоны для

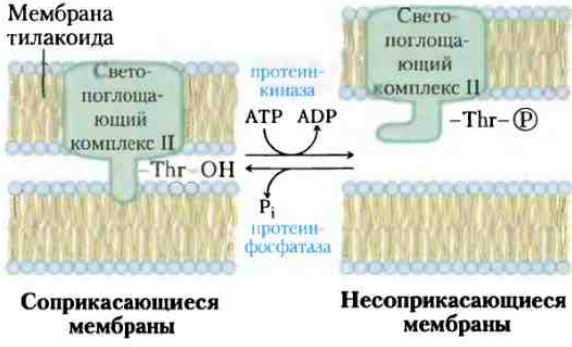


Рис. 19-61. Равновесие электронных потоков в ФСI и ФСII. Гидрофобный домен ССК2 одной тилакоидной мембраны внедряется в другую, в результате чего две мембраны оказываются тесно прижатыми друг к другу (состояние 1). Накопление пластохинола (не показан) стимулирует протеинкиназу, которая фосфорилирует остаток Tyr в гидрофобном домене ССК2, что снижает сродство между мембранами и способствует переходу сжатого состояния в несжатое (состояние 2). Специфичная протеинфосфатаза осуществляет обратную реакцию, когда соотношение $[PQ]/[PQH_2]$ возрастает.

ФСI, ускоряя тем самым процессы окисления PQH_2 и уравнивая электронные потоки в фотосистемах I и II. При небольшой интенсивности освещения, например, если растение находится в тени и в поглощенном свете преобладают красные длины волн, процессы окисления PQH_2 протекают в ФСI быстрее, чем в ФСII, – в результате увеличивается концентрация PQ, активизирующего процессы дефосфорилирования.

Перестройка в светопоглощающем комплексе II связана с переходом между циклическим и нециклическим фосфорилированием, описанным выше. В состоянии 1 путь электронов главным образом нециклический, а в состоянии 2 – циклический.

Вода расщепляется кислород-образующим комплексом

У фотосинтезирующих растений – продуцентов кислорода – главным источником электронов, поступающих к NADPH, служит вода. После потери электрона молекулой P680 в ФСII и восстановления им феофитина в молекуле пигмента остается «электронная дырка» $P680^+$, которая должна быть заполнена для возврата пигмента в основное электронное состояние и восстановления его способности к захвату фотона. Электрон для заполнения такой «дырки» может поступать как от органических, так и от неорганических соединений. Фотосинтезирующие бактерии в качестве доноров электронов могут использовать ацетат, сукцинат, малат или сульфиды в зависимости от вида синтезирующих организмов. Полагают, что 3 млрд лет назад в процессе эволюционного развития примитивных фотосинтезирующих бактерий (прародителей современных цианобактерий) возникла фотосистема, способная отщеплять электроны от наиболее доступного донора воды, что можно записать уравнением:

$$2\,H_2O \rightarrow 4\,H^+ + 4\,e^- + O_2$$

При расщеплении двух молекул воды образуются четыре электрона, четыре протона и молекулярный кислород. Энергии одного фотона видимого света недостаточно для разрыва химических связей воды. Квантовая потребность этой фотолитической реакции расщепления равна четырем фотонам.

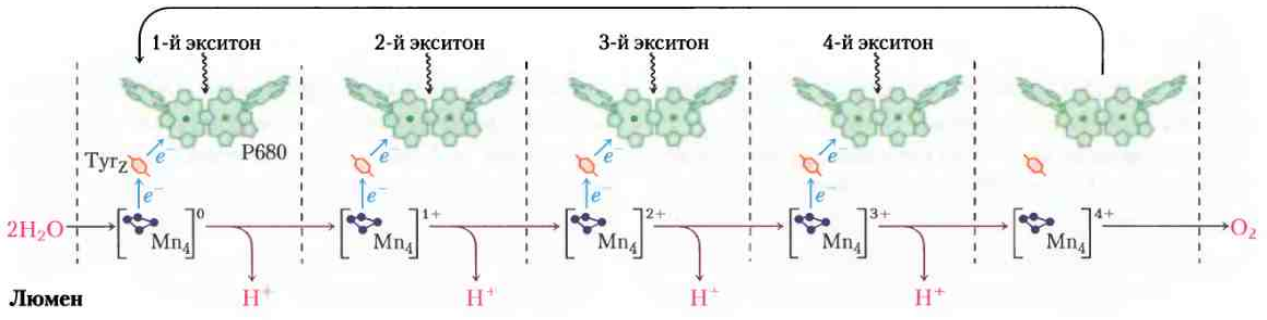


Рис. 19-62. Водорасщепляющая активность кислород-образующего комплекса. Показан процесс, при котором в водорасщепляющем комплексе ФСII образуется четырехэлектронный окислитель — многоядерный центр с несколькими ионами Mn. При каждом присоединении фотона (эксистона) Mn-центр теряет один электрон, последовательное связывание четырех фотонов приводит к образованию окислителя, который способен отщепить четыре электрона от молекулы воды с выделением O_2. Электроны, уходящие от Mn-центра, один за другим передаются на остаток Tyr в белке в составе ФСII, а затем на $P680^+$.

Отщепленные от воды четыре электрона попадают на окисленный реакционный центр $P680^+$ не сразу все и неодновременно, поскольку $P680^+$ способен присоединять одномоментно только один электрон. Эти четыре электрона *по одному* пересылаются на $P680^+$ замечательным молекулярным устройством — **кислород-образующим**, или **водорасщепляющим**, **комплексом (рис. 19-62)**. Прямым донором электронов для пигмента $P680^+$ выступает остаток Tyr, обозначаемый также символом Z или Tyr_Z, в белковой субъединице D1, входящей в состав реакционного центра ФСII. Теряя протон и электрон, остаток Tyr превращается в электрически нейтральный свободный радикал $^\bullet$Tyr согласно уравнению

$$4\ P680^+ + 4\ Tyr \rightarrow 4\ P680 + 4\ {}^\bullet Tyr \qquad (19\text{-}13)$$

Потерю электрона и протона радикал $^\bullet$Tyr восполняет при окислении четырехзарядного кластера марганца, входящего в состав водорасщепляющего комплекса. При каждой передаче одного электрона кластер марганца становится на единицу заряда более окисленным. После отщепления четырех электронов, на каждый затрачивается энергия одного поглощенного фотона, марганецсодержащий кластер приобретает заряд +4 (рис. 19-62).

$$4\ {}^\bullet Tyr + [Mn\text{-комплекс}]^0 \rightarrow 4\ Tyr + [Mn\text{-комплекс}]^{4+} \qquad (19\text{-}14)$$

Потерю четырех электронов кластер $[Mn]^{4+}$ восполняет, отщепляя их от двух молекул воды, распадающихся на четыре протона и молекулярный кислород согласно уравнению:

$$[Mn\text{-комплекс}]^{4+} + 2\ H_2O \rightarrow [Mn\text{-комплекс}]^0 + 4\ H^+ + O_2 \qquad (19\text{-}15)$$

Образовавшиеся в реакции 19-15 четыре протона перекачиваются в тилакоидный люмен кислород-образующим комплексом — протонным насосом, работающим за счет энергии переноса электронов. Суммарно уравнения с 19-12 по 19-15 можно записать следующим образом:

$$2\ H_2O + 2\ PQ_B + 4\ \text{фотона} \rightarrow O_2 + 2\ Q_BH_2 \qquad (19\text{-}16)$$

Кислород-образующий комплекс ассоциирован с периферическим мембранным белком (M_r = 33 000) на люменальной стороне тилакоидной мембраны, который стабилизирует кластер с четко заданной геометрией из четырех ионов Mn (в разных состояниях окисления), одного иона Ca^{2+}, пяти атомов кислорода и иона Cl^-. Химические превращения, которые происходят в этом кластере, еще не до конца ясны, но именно эта химия лежит в основе жизни на Земле и благодаря биологическому значению очень интересна для изучения биоорганической химии. Для марганца устойчивы степени окисления от +2 до +7, поэтому кластер ионов Mn может

и принимать, и отдавать электроны. Определение структуры полиметаллического центра способствовало появлению нескольких вполне обоснованных, но все еще проверяемых гипотез. Исследования в этом направлении еще находятся в самом разгаре.

Краткое содержание раздела 19.8 ОСНОВНОЙ ФОТОХИМИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС — ЭТО ИНДУЦИРОВАННЫЙ СВЕТОМ ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНОВ

- У фотосинтезирующих бактерий есть только один из двух возможных типов фотосистем: у пурпурных бактерий — фотосистема феофитин-хинонового типа, у зеленых серных бактерий — FeS-типа.
- Как показало изучение молекулярного строения фотосистемы пурпурных бактерий, индуцированный светом поток электронов переносится от возбужденной специализированной пары молекул хлорофилла через феофитин к хинону, от которого через цитохромный комплекс bc_1 электроны вновь возвращаются в фотохимический реакционный центр.
- У зеленых серных бактерий путь электронов другой — от хинона к NAD^+.
- В световых реакциях фотосинтеза цианобактерий и растений две фотосистемы функционируют совместно.
- У растений фотосистема I направляет поток электронов от реакционного центра P700 по цепи переносчиков к ферредоксину, который передает их на восстановление $NADP^+$ до NADPH.
- Реакционный центр P680 фотосистемы II растений высвобождает богатые энергией электроны и передает их пластохинону. Возникшая в ФСII электронная «дырка» заполняется — электрон поступает от H_2O. В качестве доноров электронов некоторые фотосинтезирующие организмы используют вместо воды другие соединения.
- Поток электронов через фотосистемы приводит к образованию NADPH и ATP в соотношении примерно 2 : 3. Циклический поток электронов приводит только к образованию ATP и обеспечивает вариабельность соотношения образующихся NADPH и ATP.
- Локализация ФСI и ФСII между гранами и ламеллами стромы может изменяться и косвенным образом регулируется интенсивностью света, оптимизируя распределение экситонов между ФСI и ФСII для эффективного поглощения энергии.
- Индуцированная светом реакция расщепления H_2O, при которой выделяется кислород, катализируется Mn-содержащим белковым комплексом. Восстановленный пластохинон переносит электроны на цитохромный комплекс b_6f, откуда они поступают на пластоцианин и затем на реакционный центр P700, заполняя там «дырку», образовавшуюся в результате потери электрона во время фотовозбуждения.
- Поток электронов через цитохромный комплекс b_6f вызывает перекачивание протонов через плазматическую мембрану, в результате чего возникает протон-движущая сила, поставляющая энергию для синтеза ATP, катализируемого ферментным комплексом ATP-синтазой.

19.9. Синтез ATP в процессе фотофосфорилирования

У растений при взаимосогласованной работе двух фотосистем происходит перенос электронов от воды к $NADP^+$, что приводит к превращению поглощенной световой энергии в энергию химических связей NADPH (см. рис. 19-56). Одновременно с переносом электронов в фотосистемах растений возникает транспорт протонов через тилакоидную мембрану, что создает трансмембранный электрохимический потенциал, который служит хранилищем энергии, высвобождающейся при переносе электронов. Теперь

Даниэль Арнон,
1910–1994

интересно узнать, каким образом под действием энергии протонного градиента происходит образование ATP — высокоэнергетического продукта световых реакций.

В 1954 г. Даниэль Арнон с сотрудниками обнаружил, что при переносе электронов в освещаемых хлоропластах шпината происходит образование ATP из ADP и фосфата. Независимо от них Альберт Френкель наблюдал синтез ATP в освещаемых мембранных пигментсодержащих структурах (**хроматофорах**), выделенных из фотосинтезирующих бактерий. Обе группы исследователей пришли к выводу, что часть световой энергии, поглощаемой фотосинтетическими системами этих организмов, превращается в энергию фосфатной связи ATP. Этот процесс стали называть **фотофосфорилированием** в отличие от окислительного фосфорилирования, протекающего в дыхательной цепи митохондрий.

Протонный градиент связывает процессы фосфорилирования и переноса электронов

Сходство переноса электронов при фотосинтезе и фотофосфорилировании в хлоропластах с переносом электронов и окислительным фосфорилированием в митохондриях указывает на то, что протонный градиент играет одинаковую роль в обоих процессах. Сходство этих процессов проявляется в следующем. (1) Реакционные центры, переносчики электронов и ферменты, участвующие в синтезе ATP, находятся в непроницаемой для протонов H^+ тилакоидной мембране. Необходимым условием фотофосфорилирования является целостность тилакоидных мембран. (2) Фотофосфорилирование можно разобщить с переносом электронов при помощи реагентов, способных стимулировать проход протонов H^+ через тилакоидную мембрану. (3) Фотофосфорилирование можно блокировать вентурицидином и другими аналогичными препаратами, подавляющими в митохондриях синтез ATP из ADP и фосфата, катализируемый ATP-синтазой (табл. 19-4). (4) Синтез ATP осуществляется ферментными комплексами F_oF_1, находящимися на наружной поверхности тилакодных мембран. По своей структуре и функции они очень напоминают аналогичные комплексы митохондрий.

Тилакоидная мембрана асимметрична по своему молекулярному строению. Молекулы переносчиков в цепи переноса электронов, ведущей от фотосистемы II к фотосистеме I, ориентированы в тилакоидной мембране таким образом, что перенос электронов создает реальный поток протонов H^+ через тилакоидную мембрану, направленный снаружи (из стромы) в тилакоидный люмен (**рис. 19-63**). Адрэ Ягендорф, ранее получивший экспериментальное подтверждение правильности хемиосмотической гипотезы Митчелла, в 1966 г. поставил эксперимент, доказавший, что источником энергии для синтеза ATP действительно может служить трансмембранный градиент pH (с более щелочной средой снаружи).

В этом эксперименте хлоропласты сначала инкубировали в темноте в буферном растворе (pH 4), который медленно проникал во внутренний компартмент тилакоидов, снижая pH их содержимого. Затем после добавления к этой темновой суспензии хлоропластов ADP и фосфата быстро доводили pH среды до 8,

Андрэ Ягендорф

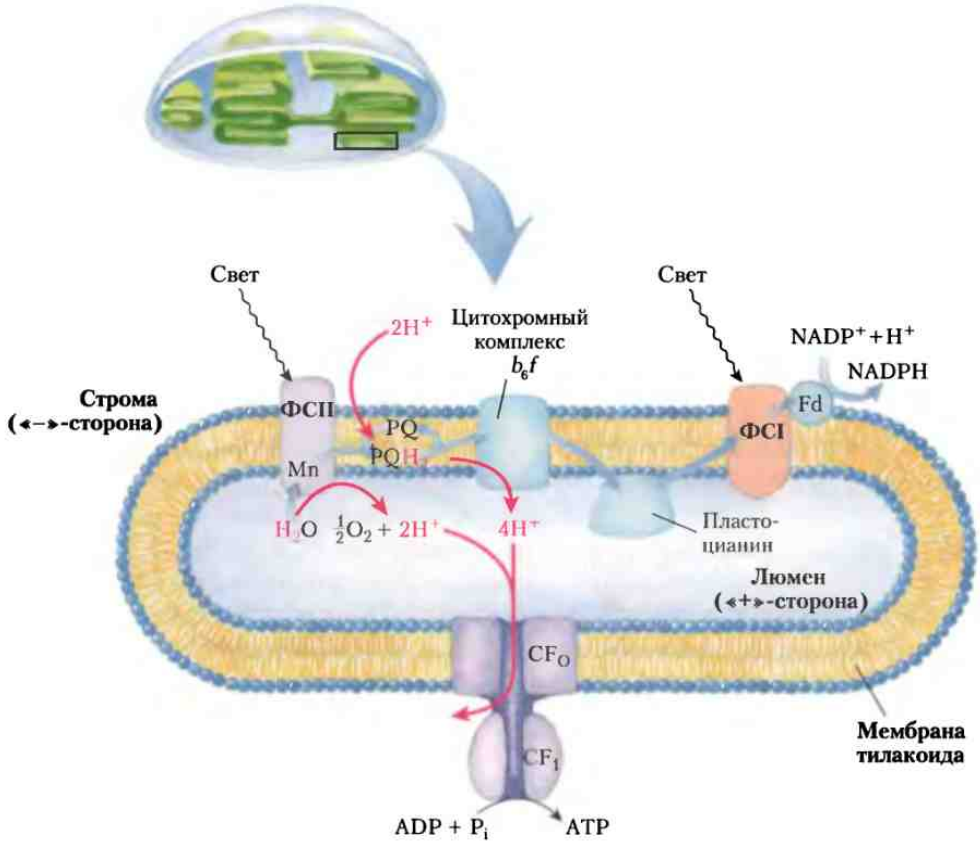


Рис. 19-63. Пути протонов и электронов в тилакоидной мембране. Индуцированный светом поток электронов, путь которого показан голубыми стрелками, направляется от H_2O через ФСII, промежуточную цепь переносчиков, и ФСI к $NADP^+$. Перенос электронов через цепь переносчиков, связывающих ФСI и ФСII, вызывает перекачивание протонов (красные стрелки) в тилакоидный люмен. Возврат ионов H^+ наружу в строму происходит через протонные каналы компонента F_o ферментного комплекса АТР-синтазы, обозначаемого CF_o. Компонент F_1 АТР-синтазы, или CF_1, катализирует синтез АТР.

добавляя к ней щелочной буфер, т. е. создавали большой трансмембранный градиент pH мгновенно. Когда этот градиент начинал уменьшаться вследствие выхода протонов H^+, происходило образование АТР из ADP и фосфата. Поскольку АТР синтезировался в темноте (без доступа энергии света) эксперимент доказывал, что трансмембранный градиент pH создает высокоэнергетическое состояние, посредством которого, как и при окислительном фосфорилировании в митохондриях, энергия переноса электронов преобразуется в энергию химических связей АТР.

Установлена стехиометрия процесса фотофосфорилирования

В хлоропластах растений индуцированный светом поток электронов от воды к $NADP^+$ при переносе каждых четырех электронов (что соответствует образованию одной молекулы O_2 при расщеплении воды) примерно 12 ионов H^+ перекачивается из стромы в тилакоидный люмен. Четыре из этих 12 протонов переносит кислород-образующий комплекс, а остальные восемь — цитохромный комплекс b_6f. В результате возникает 1000-кратная разница в концен-

трации протонов по обе стороны тилакоидной мембраны, что соответствует $\Delta pH = 3$. Как известно, энергия протонного градиента (электрохимического потенциала) включает два компонента: химический, обусловленный разностью концентраций протонов (ΔpH) по обе стороны тилакоидной мембраны, и электрический потенциал ($\Delta\psi$), возникший из-за появления заряда между двумя сторонами мембраны. В хлоропластах градиент pH (ΔpH) вносит больший вклад в электрохимический потенциал. В основном энергия электрического потенциала, по-видимому, расходуется на передвижение ионов H^+. В освещенных хлоропластах энергия градиента pH в расчете на 1 моль протонов составляет

$$\Delta G = 2{,}3\,RT\,\Delta pH + ZJ\,\Delta\psi = -17 \text{ кДж/моль}.$$

Следовательно, в результате прохода 12 моль протонов через тилакоидную мембрану запасается около 200 кДж энергии, за счет которой синтезируется несколько молей ATP (для синтеза ATP $\Delta G'^{\circ} = 30{,}5$ кДж/моль). Полученные данные показывают, что индуцированный светом перенос электронов дает 3 молекулы ATP на каждую образовавшуюся молекулу O_2.

Относительно квантового выхода фотосинтеза известно, что фотосинтезирующие клетки должны получить по меньшей мере 8 квантов видимого света, чтобы передать четыре электрона от молекулы H_2O на NADPH, т. е. при переносе одного электрона каждый реакционный центр должен принять по одному фотону. Энергии восьми поглощенных фотонов видимого света более чем достаточно для образования трех молекул ATP.

У растений при фотосинтезе поглощенная энергия видимого света запасается не только в форме ATP, но и как NADPH — другого высокоэнергетического продукта, образующегося на конечном этапе переноса электронов в хлоропластах, и близкого аналога митохондриального NADH. Суммарное уравнение для нециклического фосфорилирования, которое подробнее рассмотрено в следующем разделе, таково:

$$2\,H_2O + 8\,\text{фотонов} + 2\,NADP^+ + \sim 3\,ADP + \sim 3\,P_i \rightarrow$$
$$\rightarrow O_2 + \sim 3\,ATP + 2\,NADPH \qquad (19\text{-}17)$$

ATP-синтаза хлоропластов по строению и функциям напоминает ферментативный комплекс в митохондриях

Синтез ATP в хлоропластах осуществляется большим ферментным комплексом, включающим два функциональных компонента CF_o и CF_1 (C от лат. *chloroplast* — хлоропласт). Несколько интегральных белков компонента CF_o, аналогичных белкам митохондриального комплекса F_o, образуют протонный канал, пронизывающий мембрану. Компонент CF_1, находящийся на наружной поверхности тилакоидной мембраны, по белковому составу, строению и функции очень напоминает митохондриальный компонент F_1.

Электронные микрофотографии срезов хлоропластов показывают, что ферментный комплекс ATP-синтазы, осуществляющий синтез ATP, имеет «грибовидную» форму и расположен на *внешней*, или стромальной, отрицательно заряженной поверхности тилакоидной мембраны. По структуре и функции ATP-синтаза хлоропластов напоминает комплекс ATP-синтазы на *внутренней*, или матриксной, отрицательно заряженной поверхности внутренней мембраны митохондрий. Комплекс ATP-синтаза в тилакоидной и митахондриальной мембранах ориентирован таким образом, что направление перекачивания протонов через мембрану в обоих случаях одинаково. Возврат ионов H^+ по градиенту концентрации происходит как в хлоропластах, так и в митохондриях через компонент F_1 ATP-синтазы, расположенной на более щелочной, отрицательно заряженной стороне мембраны в направлении от «+» к «–» **(рис. 19-64)**.

Механизмы каталитического действия ATP-синтазного комплекса в хлоропластах и митохондриях совершенно идентичны. Реакция образования ATP из ADP и фосфата протекает на поверхности фермента. Высвобождение молекулы ATP с поверхности фермента происходит за счет энергии протон-движущей силы. Каждая из трех β-субъединиц ATP-синтазы последовательно катализирует синтез ATP, высвобождение ATP с поверхности фермента и взаимодействие ADP с фосфатом (см. рис. 19-26 и 19-27).

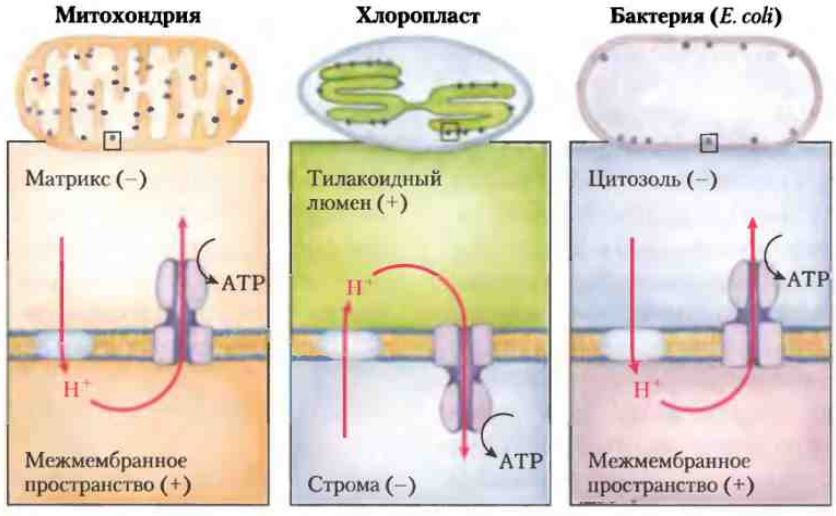


Рис. 19-64. Сравнение топологии движения протонов по протонному градиенту и ориентации АТР-синтазного комплекса в мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий *E. coli*. Во всех случаях головка АТР-синтазного комплекса обращена в сторону движения протонов по протонному градиенту.

Краткое содержание раздела 19.9 СИНТЕЗ АТР В ПРОЦЕССЕ ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

- Во время фотосинтеза у растений реакции расщепления воды и процесс переноса электронов через цитохромный комплекс b_6f сопровождаются перекачиванием протонов через мембрану тилакоидов. Создаваемая при этом протон-движущая сила служит источником энергии для синтеза АТР ферментным комплексом CF_oCF_1, строение и функция которого аналогичны митоходриальному комплексу F_oF_1.

- АТР-синтаза хлоропластов (CF_oCF_1) по структуре и каталитическому механизму очень напоминает АТР-синтазу из митохондрий и бактерий. Физическое вращение, направляемое градиентом протонов, сопровождается синтезом АТР в участках, находящихся поочередно в трех конформациях: с высоким сродством к АТР, с высоким сродством к ADP + P_i и с низким сродством к обоим нуклеотидам.

19.10. Эволюция оксигенного фотосинтеза

Появление на Земле оксигенного фотосинтеза 2,5 млрд лет тому назад было ключевым событием в эволюции биосферы. До этого времени Земля практически не имела молекулярного кислорода и озонового слоя, защищающего живые организмы от ультрафиолетового излучения Солнца. Оксигенный фотосинтез служит практически неисчерпаемым источником восстанавливающих агентов, осуществляющих образование органических соединений в ходе восстановительных реакций биосинтеза. Соответствующие механизмы реакций позволяют организмам использовать O_2 в качестве конечного акцептора электронов в высокоэнергетических реакциях с электронным переносом от органических веществ, а энергию окисления — для поддержания собственного метаболизма. Сложный фотосинтетический аппарат современных сосудистых растений — это высшее достижение эволюции; позднее установились связи между эукариотическими клетками и цианобактериями в качестве эндосимбионтов.

Хлоропласты возникли в результате эволюционного развития эндосимбиоза бактерий

Хлоропласты современных организмов по некоторым свойствам напоминают митохондрии; считается, что они были образованы в результате действия того же механизма, что привел к появлению митохондрий, а именно, эндосимбиоза. Подобно митохондриям, хлоропласты имеют свой собственный набор генов в молекулах ДНК и белоксинтезирующую систему. Некоторые белки хлоропластов кодируются хлоропластными генами и синтезируются в хлоропластах, другие — кодируются генами ядерной ДНК, синтезируются за пределами хлоропластов и затем переносятся в хлоропласты. Подробно эти вопросы рассматриваются в гл. 27 (т. 3). Рост и деление клеток растения вызывает деление хлоропластов, во время которого происходит репликация ДНК и распределение ее между дочерними клетками хлоропластов. Молекулярный аппарат и механизм поглощения энергии света, система для переноса потока электронов и синтеза АТР у фотосинтезирующих бактерий и хлоропластов во многом очень похожи. На основании этих данных возникла получившая в настоящее время широкое распространение гипотеза эндосимбиотического происхождения хлоропластов, согласно которой современные клетки растений происходят от фотосинтезирующих бактерий, проникших когда-то в эукариотические клетки и закрепившихся в них в процессе эволюции (см. рис. 1-36, т. 1).

Не менее половины всего фотосинтеза на Земле осуществляется микроорганизмами — водорослями, низшими формами эукариот и фотосинтезирующими бактериями. У цианобактерий кислород-образующая система сходна с той, которая есть у зеленых растений, — это согласованно работающие фотосистемы II и I, одна из которых включает водорасщепляющий комплекс. У всех остальных фотосинтезирующих бактерий одна фотосистема, они не расщепляют воду и не образуют кислород. Более того, многие фотосинтезирующие бактерии — облигатные анаэробы, т. е. вообще не переносят кислорода, а в качестве донора электронов (водорода) вместо воды используют неорганические соединения. Например, у зеленых серных бактерий донором водорода служит сероводород

$$2\,H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{свет}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$$

Эти бактерии выделяют вместо молекулярного кислорода элементную серу — продукт окисления H_2S. Сера затем окисляется до SO_4^{2-}. Другие фотосинтезирующие бактерии используют в качестве донора электронов (водорода) органические соединения, например лактат:

$$2\,\text{лактат} + CO_2 \xrightarrow{\text{свет}} (CH_2O) + H_2O + 2\,\text{пируват}$$

Накопленный фактический материал свидетельствует о том, что у растений и бактерий процессы фотосинтеза в основе своей одинаковы, хотя в них используются разные доноры водорода. Сходство это становится явным, если написать уравнение фотосинтеза в более общей форме:

$$2\,H_2D + CO_2 \xrightarrow{\text{свет}} (CH_2O) + H_2O + 2\,D,$$

где H_2D — донор водорода, D — окисленная форма этого донора. Роль H_2D могут играть вода, сероводород, лактат или другие органические соединения в зависимости от вида фотосинтезирующего организма. Наиболее вероятно, что на Земле первыми фотосинтезирующими организмами были бактерии, которые использовали H_2S как донор электронов.

Древние родственники современных цианобактерий, возможно, возникли в результате комбинации генетического материала от двух видов фотосинтезирующих бактерий, которые сохранились до наших дней — у пурпурных бактерий (с электронным транспортом, как в ФСII) и зеленых серных бактерий (с электронным транспортом, как в ФСI). Бактерии с двумя независимыми фотосистемами могут использовать одну из них при одних условиях, а другую — при других. Со временем появился механизм, связывающий две фотосистемы и позволяющий использовать обе системы одновременно; система, подобная ФСII, у современных цианобактерий способна расщеплять молекулу воды.

Современные цианобактерии могут синтезировать АТР в процессе окислительного фосфорилирования или в процессе фотофосфорилирования, хотя у них нет ни митохондрий, ни

хлоропластов. Ферментативный аппарат, необходимый для осуществления обоих процессов, сосредоточен в сильноизвитой плазматической мембране (см. рис. 1-6, т. 1). В обоих случаях функционируют три белковых компонента, что указывает на общее эволюционное происхождение этих процессов (**рис. 19-65**). Во-первых, цитохромный комплекс b_6f прокачивает протоны от пластохинона на цитохром c_6 в процессе фотосинтеза, а также от убихинона на цитохром c_6 в процессе окислительного фосфорилирования (в митохондриях эту роль выполняет цитохром bc_1). Во-вторых, цитохром c_6, гомологичный митохондриальному цитохрому *c*, переносит электроны от комплекса III к комплексу IV у цианобактерий; он также может переносить электроны от цитохромного комплекса b_6f к ФСI (в растениях эту роль выполняет пластоцианин). Таким образом, наблюдается функциональная гомология между цитохромным комплексом b_6f цианобактерий и митохондриальным цитохромным комплексом bc_1, а также между цитохромом c_6 цианобактерий и пластоцианином растений. Третий консервативный компонент системы — это АТР-синтаза, которая принимает участие в окислительном фосфорилировании и фотофосфорилировании цианобактерий, и присутствует в митохондриях и хлоропластах фотосинтезирующих эукариот. Строение и удивительный механизм действия этого фермента полностью сохранились в процессе эволюции.

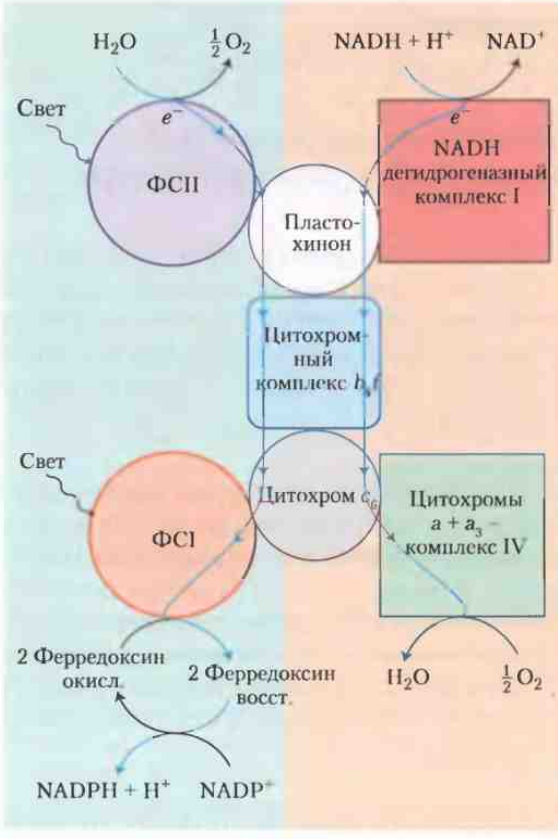


Рис. 19-65. Двоякая роль цитохрома b_6f и цитохрома c_6 у цианобактерий отражает их эволюционное происхождение. Цианобактерии используют цитохром b_6f, цитохром c_6 и пластохинон как для окислительного фосфорилирования, так и для фотофосфорилирования. *а* — при фотофосфорилировании электроны переходят (*сверху вниз*) от воды к $NADP^+$. *б* — при окислительном фосфорилировании электроны переходят от NADP к O_2. Оба процесса сопровождаются переносом протонов через мембрану в реакциях Q-цикла.

У галофильных бактерий один и тот же белок поглощает энергию солнечного света и перекачивает протоны из клетки, создавая движущую силу для синтеза АТР

У некоторых современных архей реализуется несколько иной механизм превращения энергии света в электрохимический градиент. Древняя сохранившаяся в ходе эволюционного развития галофильная (любящая соль) бактерия *Halobacterium salinarum* запасает энергию солнечного света совершенно иным способом, нежели это делают истинные фотосинтезирующие организмы. Эта своеобразная бактерия обитает только в водоемах с соленой водой (прудах и соляных озерах, например, в Большом Солёном озере и в Мёртвом море), т. е. там, где из-за испарения воды концентрация соли может превышать 4 М. Эти бактерии вообще не способны существовать при концентрациях NaCl ниже 3 М. Будучи аэробами, они обычно используют для окисления своего органического «топлива» кислород. Однако в воде соляных водоемов растворимость кислорода очень низкая. Поэтому галофильным бактериям

иногда приходится использовать другой источник энергии — солнечный свет.

В цитоплазматической мембране бактерии *H. salinarum* имеются скопления светопоглощающих пигментов, состоящие из молекул белка **бактериородопсина**, содержащего в качестве простетической группы остаток ретиналя — альдегида витамина А (см. рис. 10-21, т. 1). При освещении *полностью транс*-ретиналь, связанный с бактериородопсином, поглощает фотон и претерпевают фотоизомеризацию в 13-*цис*-ретиналь. При возвращении в первоначальную *полностью транс*-конфигурацию выделяется энергия, которая используется на перекачивание протонов из клетки в наружную среду. Молекула бактериородопсина состоит всего лишь из 247 аминокислотных остатков и выполняет функцию простейшего белкового насоса, который под действием света выкачивает протоны наружу. На **рис. 19-66, *а*** изображена трехмерная структура бактериородопсина в темноте и на свету и показан путь протонов через мембрану путем последовательности согласованных «прыжков». В бактериородопсине хромофор ретиналь присоединен к ε-аминогруппе остатка Lys через шиффово основание. В темноте атом азота в шиффовом основании протонируется. На свету происходит фотоизомеризация ретиналя, в результате чего pK_a шиффова основания понижается и от атома N отщепляется протон, который присоединяется к соседнему остатку Asp. Происходит серия протонных «прыжков» — в результате протон переходит с внешней поверхности мембраны в наружную среду, что приводит к возникновению трансмембранного градиента pH с более кислой средой снаружи (рис. 19-66, *б*).

Поскольку концентрация ионов H^+ снаружи оказывается выше, чем внутри, эти ионы стремятся диффундировать обратно в клетку через находящиеся в мембране молекулы фермента АТР-синтазы, похожей на АТР-синтазу митохондрий и хлоропластов. Проходя через эту бактериальную АТРазу, ионы H^+ отдают свою энергию, которая используется для синтеза АТР из ADP и фосфата. Таким способом галофильные бактерии при отсутствии O_2 запасают световую энергию в форме АТР в дополнение к АТР, синтезированному путем окислительного фосфорилирования при наличии кислорода. Однако галофильные бактерии не выделяют кислород и не осуществляют фотовосстановление $NADP^+$. Процессы светозависимого преобразования энергии у галофильных бактерий проще, чем у цианобактерий или растений. Можно надеяться, что знакомство с молекулярной структурой и механизмом действия бактериородопсина — самого простого из всех известных белковых насосов, перекачивающих ионы H^+ за счет энергии света, позволит лучше понять работу более сложных H^+-насосов. ●

Бактериородопсин

Краткое содержание раздела 19.10 ЭВОЛЮЦИЯ ОКСИГЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА

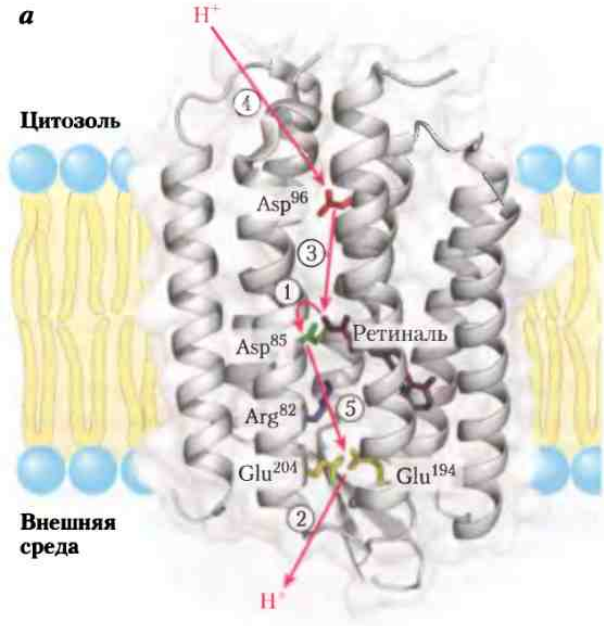
- Современные цианобактерии произошли от древнего организма, обладавшего двумя фотосистемами: систему одного типа сегодня можно обнаружить в пурпурных бактериях, систему другого типа — в зеленых серных бактериях.

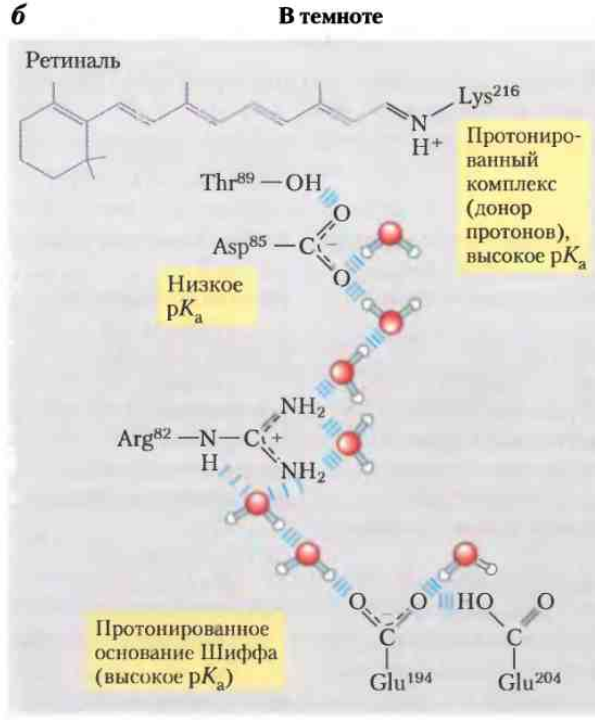
- Многие фотосинтезирующие организмы получают электроны для фотосинтеза не из воды, а от других доноров, таких как H_2S.

- Цианобактерии с двумя сопряженными фотосистемами и способностью расщеплять молекулу воды с выделением кислорода в атмосферу появились на Земле около 2,5 млрд лет назад.

- Хлоропласты, как и митохондрии, произошли в результате эволюционного развития эндосимбиоза с бактериями, внедрившимися когда-то в клетки древних эукариот. Поэтому у бактерий, цианобактерий, митохондрий и хлоропластов есть общий предшественник АТР-синтазного ферментативного комплекса и, следовательно, общий механизм каталитического действия.

- Совершенно другой механизм превращения световой энергии в градиент протонов возник у современных архей, у которых функцию светопоглощающего пигмента выполняет ретиналь.





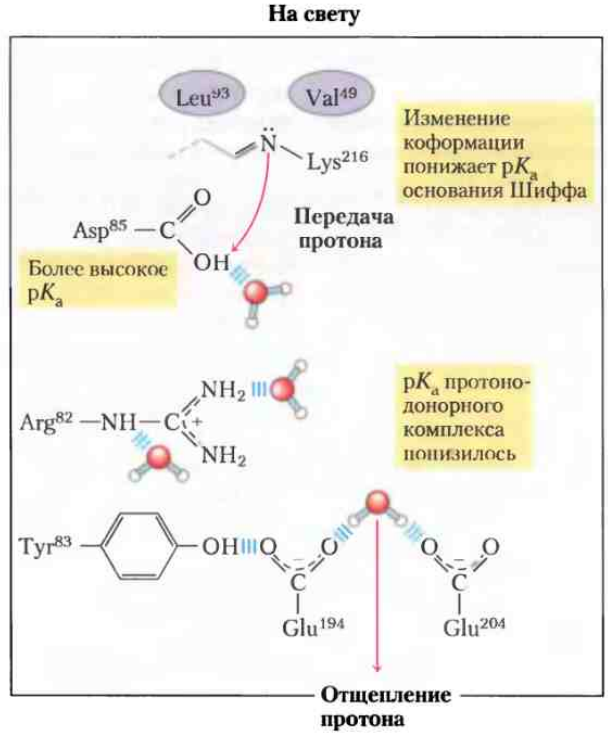


Рис.19-66. Эволюция второго механизма перекачивания протонов за счет энергии света у галофильных архей. *а* — бактериородопсин (M_r = 26 000) *Halobacterium halobium* содержит семь α-спиралей, пронизывающих мембрану (PDB ID 1C8R). Хромофор *полностью транс*-ретиналь (окрашен в пурпурный цвет) соединен с ε-аминогруппой остатка Lys, образуя шиффово основание внутри мембраны. Остатки Asp и Glu в α-спиралях и несколько координированных молекул воды обеспечивают скачки протонов при транспорте через мембрану (показано красными стрелками). В стадиях от ① до ⑤ происходит перемещение протонов, что обсуждается далее. *б* — в темноте (*справа вверху*) шиффово основание, связывающее хромофор бактериородопсина с остатком Lys, протонируется. На свету (*справа внизу*) в результате фотоизомеризации ретиналя происходят небольшие конформационные изменения белка — меняются расстояния между шиффовым основанием и ближайшими к нему аминокислотными остатками, что вызывает понижение pK_a шиффова основания и отщепление от него протона, который передается на карбонильную группу соседнего остатка Asp^{85}. Этот процесс (① на рис. *а*) индуцирует перенос протона «прыжками» по молекулам воды, координированным внутри белка, и в итоге (стадия ②) приводит к отщеплению протона от двух аминокислотных остатков Glu^{194}–Glu^{204} на внешней поверхности клетки. Далее (стадия ③) шиффово основание вновь присоединяет протон, отщепленный от Asp^{96}, который в свою очередь получает протон из цитозоля (стадия ④). Наконец Asp^{85} отдает протон паре аминокислотных остатков Glu^{204}–Glu^{194} (стадия ⑤), и в системе начинается новый цикл перекачивания протонов через мембрану в наружную среду.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

АТР-синтаза 327
F_1-АТРаза 331
Q-цикл 318
активные формы кислорода (АФК) 316
акцепторный контроль 343
апоптоз 350
апоптосома 350
бурый жир 348
векторный перенос 315
водорасщепляющий комплекс 380
возбужденное состояние 360
восстановительный эквивалент 309
вращательный катализ 336
вспомогательные пигменты 361
гетероплазмия 354
глицерин-3-фосфатная челночная система 341
гомоплазмия 354
грана 358
железо-серный белок 310
железо-серный белок Риске 310
каротиноиды 361
каспаза 350
квант 360
кислород-образующий комплекс 380
комплекс I 314
комплекс II 316
комплекс III 318
комплекс IV 318
коэффициент $P/2e^-$ 338
коэффициент P/O 338
ксенобиотики 349
малат-аспартатная челночная система 340
нециклический поток электронов 377
никотинамиднуклеотид-зависимые дегидрогеназы 307
оксигенный фотосинтез 373
основное состояние 360
отношение действующих масс 343
передача экситона 361
пластохинон (PQ_A) 374
пластоцианин 373
протон-движущая сила 323
реакции ассимиляции углерода 358
реакции фиксации углерода 358
реакция Хилла 359
респирасома 320
световые реакции 358
светозависимые реакции 358
светопоглощающие комплексы 361
светопоглощающие (антенные) молекулы 365
спектр действия 361
строма 359
сукцинатдегидрогеназа 316
супероксидный радикал ($^{\cdot}O_2^-$) 316
термогенин 348
тилакоид 358
убихинон (кофермент Q, Q) 309
ферредоксин 371
флавопротеины 308
флуоресценция 361
фотон 359
фотосистема 365
фотосистема II (ФСII) 367
фотосистема I (ФСI) 370
фотофосфорилирование 382
фотохимический реакционный центр 365
хемиосмотическая теория 306
хлорофиллы 361
циклический поток электронов 377
циклическое фотофосфорилирование 377
цитохромный комплекс bc_1 318
цитохромоксидаза 318
цитохром P-450 348
цитохромы 309
экситон 361

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

История и общие сведения

Arnon, D. I. (1984) The discovery of photosynthetic phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 258–262.

Beinert, H. (1995) These are the moments when we live! From Thunberg tubes and manometry to phone, fax and FedEx. In *Selected Topics in the History of Biochemistry: Personal Recollections*, Comprehensive Biochemistry, Vol. 38, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Описание замечательного периода становления исследований биохимических процессов, протекающих при переносе электронов в дыхательной цепи митохондрий, в изложении участника этих исследований.

Blankenship, R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science Inc., London.

Доступное для всех изложение различных проблем фотосинтеза.

Govindjee, Beatty, J. T., Gest, H., & Allen, J. F. (eds). (2006) *Discoveries in Photosynthesis*, Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 20, Springer Verlag, Dordrecht, The Netherlands.

Прекрасное описание истории открытия фотосинтеза от людей, вошедших в историю науки.

Harold, F. M. (1986) *The Vital Force: A Study in Bioenergetics*, W. H. Freeman and Company, New York.

Четкое изложение законов биоэнергетики и результатов применения их к изучению энергетического обмена в клетках.

Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford или **Хелдт Г.-В.** (2011) *Биохимия растений*, М. БИНОМ. Лаборатория знаний.

Учебное пособие по биохимии растений с великолепным изложением вопросов фотофосфорилирования.

Keilin, D. (1966) *The History of Cell Respiration and Cytochrome*, Cambridge University Press, London.

Компетентный увлекательный обзор работ, приведших к открытию цитохромов и выяснению их роли в дыхании клеток, написанный автором этого открытия.

Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2004) Britton Chance: Olympian and developer of stop-flow methods. *J. Biol. Chem.* **279**, e10, www.jbc.org.

Классика JBC (на сайте в разделе "Classic Articles") – описание методов, которые были использованы для определения последовательности переносчиков электронов.

Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2006) Forty years of superoxide dismutase research: the work of Irwin Fridovich. *J. Biol. Chem.* **281**, e17, www.jbc.org.

Статья из раздела Классика JBC.

Lane, N. (2005) *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and the Meaning of Life*, Oxford University Press, Oxford.

Описание роли митохондрий в запасании энергии и в апоптозе. Начальный уровень сложности.

Mitchell, P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148–1159.

Нобелевская лекция, в которой рассказано об истории создания хемиосмотической гипотезы.

Nicholls, D. G. & Ferguson, S. J. (2002) *Bioenergetics 3*, Academic Press, Amsterdam.

Современное, исчерпывающее, прекрасно иллюстрированное изложение всех аспектов преобразования энергии в митохондриях и хлоропластах. Фундаментальное учебное пособие.

Scheffler, I. E. (1999) *Mitochondria*, Wiley-Liss, New York.

Великолепный обзор работ по изучению структуры и функций митохондрий.

Slater, E. G. (1987) The mechanism of the conservation of energy of biological oxidations. *Eur. J. Biochem.* **166**, 489–504.

Четкое, критическое изложение процесса развития хемиосмотической гипотезы.

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

Реакции с переносом электронов

Adam-Vizi, V. & Chinopoulos, C. (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol.* **27**, 639–645.

Babcock, G. T. & Wickstrom, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301–309.

Современное описание процессов восстановления воды и перекачивания протонов цитохромоксидазой.

Boekema, E. J. & Braun, H.-P. (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **282**, 1–4.

Brandt, U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH: ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Ada* **1318**, 79–91.

Современное описание моделей переноса электронов через комплекс I.

Brandt, U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I) *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69–92.

Обсуждение строения комплекса I и его работы. Повышенный уровень сложности.

Brandt, U. & Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 165–197.

Crofts, A. R. & Berry, E. A. (1998) Structure and function of the cytochrome *bci* complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol. 8*, 501–509.

Heinemeyer, J., Braun, H.-P., Boekema, E. J., & Kouril, R. (2007) A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**, 12240–12248.

Главное исследование, в котором были получены доказательства наличия суперкомплексов в митохондриях.

Hosler, J. P., Ferguson-Miller, S., & Mills, D. A. (2006) Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 165–187.

Описание передачи электронов. Повышенный уровень сложности.

Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006) Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1406–1420.

Обзор строения и работы комплекса I. Средний уровень сложности.

Lenaz, G. & Genova, M. L. (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, 1221–1239.

Проверка гипотезы существования суперкомплексов в митохондриях.

Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., & Kannt, A. (1998) Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 329–356.

Современный обзор материалов о структуре и функциях комплекса IV.

Osyczka, A., Moser, C. C., & Dutton, P. L. (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 176–182.

Обзор о Q-цикле. Средний уровень сложности.

Rottenberg, H. (1998) The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 1–16.

Sazanov, L. A. (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* **46**, 2275–2286.

Главная исследовательская работа о строении комплекса I.

Smith, J. L. (1998) Secret life of cytochrome bc1. *Science* **281**, 58–59.

Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory protein complex II. *Cell* **121**, 1043–1057.

Tielens, A. G. M., Rotte, C., van Hellemond, J. J., & Martin, W. (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 564–572.

Описание организмов, в митохондриях которых кислород не конечный акцептор электронов.

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136–1144.

Изложены результаты изучения крупного мембранного белка методом рентгеноструктурного анализа.

Wikström, M. & Verkhovsky, M. I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 1200–1214.

Xia, D., Yu, C.-A., Kirn, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., & Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc1* complex from bovine heart, mitochondria. *Science* **277**, 60–66.

Результаты кристаллографического изучения структуры комплекса III.

Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Myoshi, H., Leger, C., Byrne, B., Cecchini, G., & Iwata, S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**, 700–704.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., & Dowhan, W. (2005) Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 29403–29408.

Главная исследовательская работа по этой теме.

Сопряжение синтеза ATP и переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., & Walker, J. E. (1994) The structure of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria determined at 2.8 Å resolution. *Nature* **370**, 621–628.

Bianchet, M. A., Hullihen, J., Pedersen, P. L., & Amzel, L. M. (1998) The 2.80 Å structure of rat liver F_1-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. *Proc. Natl,. Acad. Sci. USA* **95**, 11065–11070.

Статья, в которой изложены результаты изучения молекулярной структуры F_1-АТРазы и предложен механизм ее каталитического действия.

Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase — a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.

История развития и современное состояние модели каталитического действия ATP-синтазы по принципу замены связей, изложенное автором модели.

Cabezon, E., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2003) The structure of bovine F_1-ATPase in complex with its regulatory protein IF_1, *Nat. Struct. Biol.* **10**, 744–750.

Hinkle, P. C., Kumar, M. A., Resetar, A., & Harris, D. L. (1991) Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry* **30**, 3576–3582.

Теоретические основы экспериментальных методов, с помощью которых получены целочисленные значения для отношения P/O.

Khan, S. (1997) Rotary chemiosmotic machines. *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 86–105.

Подробное рассмотрение белковых структур, ответственных за вращение ферментного комплекса ATP-синтазы и бактериальных жгутиков под действием протон-движущей силы.

Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2006) ATP synthesis and the binding change mechanism: the work of Paul D. Boyer. *J. Biol. Chem.* **281**, e18, www.jbc.org.

Статья из раздела Классика JBC.

Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2006) Unraveling the enzymology of oxidative phosphorylation: the work of Efraim Racker. *J. Biol. Chem.* **281**, e4, www.jbc.org.

Статья из раздела Классика JBC.

Nishizaka, T., Oiwa, K., Noji, H., Kimura, S., Muneyuki, E., Yoshida, M., & Kinosita, K., Jr. (2004) Chemomechanical coupling in F1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 142–148.

Захватывающая демонстрация вращения ATP-синтазы.

Sambongi, Y, Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., & Futai, M. (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F_oF_1): direct observation. *Science* **286**, 1722–1724.

Описание экспериментального подхода, позволяющего доказать вращение цилиндра, состоящего из с-субъединиц, в комплексе F_oF_1.

Stock, D., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700–1705.

Описание результатов первого кристаллографического изучения субъединицы F_o в ферментном комплексе F_oF_1 дрожжей с комментариями редактора журнала.

Weber, J. & Senior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of F_1-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1319**, 19–58.

Современный обзор кинетических, структурных и биохимических данных, на основе которых предложен механизм каталитического действия ATP-синтазы.

Регуляция процесса окислительного фофорилирования в митохондриях

Brand, M. D. & Murphy, M. P. (1987) Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells. *Biol. Rer. Camb. Philos. Soc.* **62**, 141–193.

Подробное описание механизма дыхательного контроля в митохондриях.

Harris, D. A. & Das, A. M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* **280**, 561–573.

Подробное обсуждение механизма регуляторного действия ионов Ca^{2+} и других факторов на функцию АТР-синтазы.

Klingenberg, M. & Huang, S.-G. (1999) Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Ada* **1415**, 271–296.

Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. M., Brandolin, G., & Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 713–741.

Обзор повышенного уровня сложности.

Semenza, G. L. (2007) Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* **405**, 1–9.

Обзор среднего уровня сложности.

Simon, M. C. (2006) Coming up for air: HIF-1 and mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **3**, 150–151.

Краткий обзор среднего уровня сложности, посвященный факторам, вызванным гипоксией.

Апоптоз и заболевания, вызванные дефектами митохондрий

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163.

Интересный обзор повышенной сложности о роли цитохрома с в апоптозе.

McCord, J. M. (2002) Superoxide dismutase in aging and disease: an overview. *Meth. Enzymol.* **349**, 331–341.

Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. (2007) The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 405–413.

Обзор среднего уровня сложности.

Митохондриальные гены: происхождение и мутации

Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. K., & Wood, N. W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 207–219.

Boudina, S. & Abel, E. D. (2006) Mitochondrial uncoupling: a key contributer to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology* **21**, 250–258.

Brandon, M., Baldi, P., & Wallace, D. C. (2006) Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* **25**, 4647–4662.

Chatterjee, A., Mambo, E., & Sidransky, D. (2006) Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* **25**, 4663–4674.

Chen, Z. J. & Butow, R. A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 815–825.

Обзор среднего уровня сложности.

de Duve, C. (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat. Rev. Genet.* 8, 395–403.

Среднего уровня сложности обсуждение доказательства эндосимбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов.

Freeman, H., Shimomura, K., Horner, E., Cox, R. D., & Ashcroft, F. M. (2006) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab.* **3**, 35–45.

Houstek, J., Pickova, A., Vojtiskova, A., Mracek, T., Pecina, P., & Jesina, P. (2006) Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. Biochim. Biophys. *Acta* **1757**, 1400–1405.

Neubauer, S. (2007) The failing heart – an engine out of fuel. *New Engl. J. Med.* **356**, 1140–1151.

Обзор среднего уровня сложности о связи нарушений окислительного фосфорилирования и заболеваний сердца.

Remedi, M. S., Nichols, C. G., & Koster, J. C. (2006) The mitochondria and insulin release: *Nnt* just a passing relationship. *Cell Metab.* **3**, 5–7

Smeitink, J. A., Zeviani, M., Turnbull, D. M., & Jacobs, H. T. (2006) Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* **3**, 9–13.

Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. (2005) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 389–402.

Обзор среднего уровня сложности.

Wallace, D. C. (1999) Mitochondrial disease in man and mouse. *Science* **283**, 1482–1487.

Wiederkehr, A. & Wollheim, C. B. (2006) Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* **147**, 2643–2649.

Среднего уровня сложности обсуждение функций митохондрий в β-клетках.

ФОТОСИНТЕЗ: ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА

Cogdell, R. J., Isaacs, N. W., Howard, T. D., McLuskey, K., Fraser, N. J., & Prince, S. M. (1999) How photosynthetic bacteria harvest solar energy. *J. Bacterial.* **181**, 3869–3879.

Краткий обзор материалов по структуре и функциям светоулавливающего комплекса и механизму передачи экситонов реакционному центру в фотосистеме пурпурных бактерий. Предназначен для широкого круга читателей.

Green, B. R., Pichersky, E., & Kloppstech, K. (1991) Chlorophyll *a/b-bindimg* proteins: an extended family. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 181–186.

Описание белков, удерживающих молекулы хлорофиллов в хлоропластах в определенном положении.

Kargul, J., Nield, J., & Barber, J. (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting Complex I-Photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **278**, 16135–16141.

Zuber, H. (1986) Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 414–419.

Индуцируемый светом поток электронов

Amunts, A., Drory, O., & Nelson, N. (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature* **447**, 58–63.

Кристаллографическое определение строения ФСI.

Barber, J. (2002) Photosystem II: a multisubunit membrane protein that oxidizes water. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 523–530.

Краткий обзор материалов по структуре ФСII. Предназначен для широкого круга читателей.

Barber, J. & Anderson, J. M. (eds) (2002) Photosystem II: molecular structure and function. *Philos. Trans. R. Soc. (Biol. Sci.)* **357**, 1321–1512.

16 статей по фотосистеме II.

Chitnis, P. R. (2001) Photosystem I: function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 593–626.

Современный фундаментальный обзор.

Dau, H. & Haumann, M. (2007) Eight steps preceding O–O bond formation in oxygenic photosynthesis – a basic reaction cycle of the photosystem II manganese complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 472–483.

В этом номере это одна из нескольких статей о моделях механизма фотолиза воды.

Deisenhofer, J. & Michel, H. (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 1–23.

Рассмотрение строения реакционного центра пурпурных бактерий и работы реакционных центров бактерий и растений.

Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoul, K., Barber, J., & Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**, 1831–1838.

Fromme, P., Jordan, P., & Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1507**, 5–31.

Heathcote, P., Fyfe, P. K., & Jones, M. R. (2002) Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends. Biochem Sci.* **27**, 79–87.

Обзор материалов по фотосистемам I и II. Предназначен для широкого круга читателей.

Huber, R. (1990) A structural basis of light energy and electron transfer in biology. *Eur. J. Biochem.* **187**, 283–305.

Нобелевская лекция, в которой представлены данные о протекающих во время фотопревращений химических и физических процессах, полученные в результате изучения реакционных центров кристаллографическим методом. Материал изложен ясным доступным языком и хорошо иллюстрирован.

Jensen, P. E., Bassi, R., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Jansson, S., Leister, D., Robinson, C., & Scheller, H. V. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 335–352.

Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å. *Nature* **411**, 909–917.

Kamiya, N. & Shen, J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98–103.

Kargul, J., Nield, J., & Barber, J. (2003) Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardlii:* insights into light harvesting for PSI. *J. Biol. Chem.* **278**, 16135–16141.

Kok, B., Forbush, B., & McGloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution: 1. A linear 4-step mechanism. *Photochem. Photobiol.* **11**, 457–475.

Классический эксперимент, демонстрирующий, что для расщепления воды необходимы четыре фотона.

Kramer, D. M., Avenson, T. J., & Edwards, G. E. (2007) Dynamic flexibility in the light reactions of photosynthesis governed by both electron and proton transfer reactions. *Trends Plant Sci.* **9**, 349–357.

Обзор среднего уровня сложности о регуляции перестроек в хлоропласте.

Vink, M., Zer, H., Alumot, N., Gaathon, A., Niyogi, K., Herrmann, R. G., Andersson, B., & Ohad, I. (2004) Light-modulated exposure of the light-harvesting complex II (LHCII) to protein kinase(s) and state transition in *Chlamydomonas reinhardtii* xanthophyll mutants. *Biochemistry* **43**, 7824–7833.

Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M. J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., & Yachandra, V. K. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn_4Ca cluster. *Science* **314**, 821–825.

Синтез ATP путем фотофосфорилирования

Jagendorf, A. T. (1967) Acid-base transitions and phosphorylation by chloroplasts. *Fed. Proc.* **26**, 1361–1369.

Классический эксперимент, устанавливающий способность протонного градиента стимулировать синтез ATP в темноте.

Эволюция оксигенного фотосинтеза

Allen, J. F. & Martin, W. (2007) Out of thin air. *Nature* **445**, 610–612.

Краткое обсуждение того, как Z-схема развивалась до современного состояния. Средний уровень сложности.

Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 133–156.

Современный обзор материалов о строении протонного насоса, использующего внутриклеточную цепочку молекул воды для перекачивания протонов.

Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., & Lanyi, J. K. (1999) Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 angstrom resolution. *Science* **286**, 255–264.

В статье и во введении к ней, написанной редактором журнала, рассматривается «прыжковая» модель переноса ионов H^+ в хлоропластах.

Poole, A. M. & Penny, D. (2007) Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *BioEssays* **29**, 74–84.

Обсуждение симбиотической теории. Средний уровень сложности.

Stiller, J. W. (2007) Plastid endosymbiosis, genome evolution and the origin of green plants. *Trends Plant Sci.* **12**, 391–396.

Вопросы и задачи

1. Окислительно-восстановительные реакции. NADH-дегидрогеназный комплекс митохондриальной дыхательной цепи катализирует следующие окислительно-восстановительные реакции:

(1) $NADH + H^+ + E\text{-}FMN \rightarrow NAD^+ + E\text{-}FMNH_2$

(2) $E\text{-}FMNH_2 + 2\,Fe^{3+} \rightarrow E\text{-}FMN + 2\,Fe^{2+} + 2\,H^+$

(3) $2\,Fe^{2+}\,2\,H^+ + Q \rightarrow 2\,Fe^{3+} + QH_2$

Суммарная реакция:

$$NADH + H^+ + Q \rightarrow NAD^+ + QH_2$$

Здесь Fe^{3+} и Fe^{2+} — атомы железа железо-серных центров, Q — убихинон, QH_2 — убихинол и E — фермент.

Укажите для каждой из этих реакций, катализируемых NADH-дегидрогеназным комплексом: а) донор электронов, б) акцептор электронов, в) сопряженную окислительно-восстановительную пару, г) восстановитель, д) окислитель.

2. Все части молекулы убихинона выполняют определенную функцию. При переносе электронов по митохондриальной дыхательной цепи только хиноновая часть убихинона претерпевает окислительно-восстановительные превращения, а боковая изопреноидная цепь остается без изменений. Какова роль этой цепи в процессах переноса электронов?

3. При окислении сукцината акцептором электронов служит не NAD^+, а FAD. Для всех дегидрогеназ, участвующих в процессах гликолиза и в цикле лимонной кислоты, акцептором электронов служит NAD^+, E'° (NAD^+ / NADH) = –0,32 В. Единственное исключение — реакция, катализируемая сукцинатдегидрогеназой, использующей в качестве акцептора электронов ковалентно связанный с ней FAD; в комплексе с ферментом E'° (FAD/ $FADH_2$) = 0,050 В. Сравните E'° для NAD^+ / NADH и для FAD / $FADH_2$ в комплексе с ферментом со стандартным восстановительным потенциалом сопряженной пары фумарат / сукцинат (E'° = 0,031 В), и объясните, почему при дегидрировании сукцината FAD — более подходящий акцептор электронов, чем NAD^+.

4. Степень восстановления переносчиков электронов в дыхательной цепи. Степень восстановления каждого из переносчиков электронов в дыхательной цепи митохондрий определяется условиями, существующими в митохондриях. Если NADH и молекулярного кислорода достаточно, степень восстановления переносчиков электронов снижается при переходе электронов от субстрата на кислород. При блокировании переноса электронов переносчики, в дыхательной цепи занимающие место перед стадией блокирования, становятся более восстановленными, а те, которые располагаются после стадии блокирования, — более окисленными, как это показано на рис. 19-6. Укажите степени окисления убихинона, цитохромов b, c_1, c и $a + a_3$ для следующих четырех случаев:

а) достаточно NADH и O_2, но добавлен цианид;

б) достаточно NADH, но исчерпан запас O_2;

в) достаточно O_2, но исчерпан запас NADH;

г) достаточно NADH и O_2.

5. Влияние ротенона и антимицина А на перенос электронов. Ротенон — токсичное вещество, вырабатываемое одним из видов растений, резко подавляет активность митохондриальной NADH-дегидрогеназы у насекомых и рыб. Токсичный антибиотик антимицин А сильно ингибирует окисление убихинола.

а) Почему ротенон оказывается смертельным ядом для некоторых насекомых и рыб?

б) Почему антимицин — яд?

в) Предположим, что оба эти вещества блокируют соответствующие участки дыхательной цепи с одинаковой эффективностью. Какое из них будет при этом более мощным ядом?

6. Разобщающие агенты при окислительном фосфорилировании. В нормальных митохондриях скорость переноса электронов строго регулируется потребностями в АТР. Поэтому, если скорость использования АТР сравнительно невелика, небольшой оказывается и скорость переноса электронов. Если АТР расходуется с большой скоростью, скорость переноса электронов тоже высокая. В подобных условиях (при тесном сопряжении этих двух процессов) отношение Р/О, т. е. число образовавшихся молекул АТР в расчете на один атом потребленного кислорода, когда донором электронов служит NADH, составляет приблизительно 2,5.

а) Как должна повлиять относительно низкая и относительно высокая концентрация разобщающего агента на скорость переноса электронов и на величину Р/О?

б) Прием внутрь разобщающих агентов вызывает обильное потоотделение и повышение температуры тела. Дайте объяснение этому феномену на молекулярном уровне. Как изменяется отношение Р/О в присутствии разобщающих агентов?

в) Разобщающий агент 2,4-динитрофенол пытались использовать для борьбы с ожирением. На чем может быть основано подобное действие этого агента? В настоящее время разобщающие агенты такого рода не применяются в качестве лекарственных препаратов, поскольку известны случаи, когда они приводили к летальному исходу. Почему прием разобщающих агентов может вызвать смерть?

7. Влияние валиномицина на окислительное фосфорилирование. Если к суспензии активно дышащих митохондрий добавить антибиотик валиномицин, наблюдается уменьшение образования АТР и скорости поглощения кислорода, но происходит выделение тепла и увеличение трансмембранного градиента pH в митохондриях. Дайте объяснение этим фактам исходя из способности валиномицина переносить ионы K^+ через внутреннюю мембрану митохондрий.

8. Механизм действия дициклогексилкарбодиимида (ДЦКД). Если к суспензии активно дышащих митохондрий, в которых дыхание тесно сопряжено с фосфорилированием, добавить ДЦКД, наблюдается резкое уменьшение скорости переноса электронов (оценивают по количеству поглощенного кислорода) и скорости фосфорилирования (оценивают по образованию АТР). При добавлении к таким ингибированным митохондриальным препаратам 2,4-динитрофенола потребление кислорода возвращается к норме, но синтез АТР так и остается подавленным.

а) На какую стадию процесса переноса электронов или окислительного фосфорилирования влияет ДКЦД?

б) Почему ДКЦД нарушает потребление кислорода в митохондриях? Каков механизм действия 2,4-динитрофенола на препарат ингибированных митохондрий?

в) С каким из перечисленных ниже ингибиторов более всего сходен по своему действию ДКЦД: с антимицином А, ротеноном, олигомицином или арсенатом?

9. Компартментация компонентов цикла лимонной кислоты. Обнаружено, что в окислительно-восстановительных реакциях изоцитратдегидрогеназа находится только в митохондриях, а малатдегидрогеназа — и в цитозоле, и в митохондриях. Какова роль цитозольной малатдегидрогеназы в цикле лимонной кислоты?

10. Малат-α-кетоглутаратная транспортная система. Транспортная система, осуществляющая перенос малата и α-кетоглутарата через внутреннюю мембрану (см. рис. 19-27), блокируется *н*-бутилмалонатом. К аэробной суспензии клеток почек, использующих в качестве «топлива» только глюкозу, добавляют *н*-бутилмалонат. Какое влияние окажет этот ингибитор на процессы в клетках почки? А именно на следующие процессы:

а) гликолиз;

б) поглощение кислорода;

в) образование лактата;

г) синтез ATP.

11. Синтез ATP регулируется концентрацией ADP в клетках. Для синтеза ATP путем окислительного фосфорилирования требуются ADP и фосфат, но скорость синтеза зависит главным образом от концентрации ADP в клетках. Дайте аргументированное объяснение этому факту.

12. Временная шкала в регуляторных процессах в митохондриях. Сравните между собой промежутки времени, необходимые для регуляции скорости дыхания, при (а) повышении концентрации ADP и (б) снижении pO_2. В чем причина различий?

13. Эффект Пастера. Если в суспензию анаэробных клеток, потребляющих глюкозу с большой скоростью, ввести кислород, клетки начнут его поглощать и уровень потребления глюкозы резко понизится. Одновременно с этим прекратится накопление лактата. Этот эффект, характерный для клеток, способных и к аэробному, и к анаэробному потреблению глюкозы, впервые наблюдал Луи Пастер в 60-х гг. XIX в., и потому он был назван эффектом Пастера.

а) Почему при введении в клеточную суспензию кислорода прекращается накопление лактата?

б) Почему в присутствии кислорода снижается скорость потребления глюкозы?

в) Каким образом после начавшегося потребления кислорода понижается скорость потребления глюкозы? Объясните это на основе специфического действия ферментов.

14. Мутанты дрожжей с нарушением процесса дыхания клеток и образование спирта. Мутанты дрожжей с нарушением способности потреблять кислород (p^-, «*petites*») получены воздействием мутантных агентов на нормальные клетки дрожжей. Такие мутантные клетки дрожжей не способны синтезировать фермент цитохромоксидазу, в результате чего вызванные ими процессы брожения не подавляются кислородом, т. е. в них не проявляется эффект Пастера (см. задачу 13). Некоторые производители спирта используют мутантные дрожжи для получения спирта в больших количествах из древесных опилок. Объясните преимущества использования для этого мутантных дрожжей по сравнению с нормальными дрожжевыми клетками. Почему при отсутствии в клетках фермента цитохромоксидазы эффект Пастера не наблюдается?

15. Преимущества суперкомплексов при передаче электронов. Появляются новые доказательства того, что митохондриальные комплексы I, II, III и IV являются частью более крупного суперкомплекса. Каким преимуществом может обладать система, в которой все четыре комплекса собраны в единый суперкомплекс?

16. Сколько ионов H^+ содержится в одной митохондрии. Хемиосмотическая гипотеза предполагает, что в результате переноса электронов ионы H^+ «выталкиваются» из матрикса митохондрий наружу, вследствие чего между двумя сторонами митохондриальной мембраны возникает градиент pH, при котором наружная сторона оказывается более кислой, чем внутренняя. Способность ионов H^+ диффундировать в обратном направле-

нии — из окружающей среды в митохондриальный матрикс (где их концентрация ниже) — служит движущей силой синтеза АТР, катализируемого АТР-синтазой. В митохондриях, суспендированных в среде с pH 7,4, происходит окислительное фосфорилирование. Показано, что митохондриальный матрикс имеет pH 7,7.

а) Вычислите молярные концентрации ионов H^+ в окружающей среде и в матриксе для этих условий.

б) Определите отношение концентраций H^+ снаружи и внутри, что поможет оценить энергию, которая потенциально соответствует этой разности концентраций (см. уравнение 11-4, т. 1).

в) Определите число ионов H^+, приходящихся на одну дышащую митохондрию печени. При расчетах примите, что внутреннее пространство митохондрии представляет собой сферу диаметром 1,5 мкм.

г) Учитывая результаты ваших расчетов, ответьте, можно ли считать, что достаточно только одного этого градиента pH как источника энергии для синтеза АТР?

д) Если одного градиента pH не достаточно, то какой другой источник энергии, необходимой для синтеза АТР, вы могли бы указать?

17. Скорость превращения АТР в сердечной мышце крысы. Аэробные клетки сердечной мышцы крысы получают более 90% необходимого им количества АТР в процессе окислительного фосфорилирования, используя в качестве «топлива» глюкозу. Каждый грамм ткани сердечной мышцы крысы потребляет кислород со скоростью 10,0 мкмоль/мин.

а) Рассчитайте скорость потребления глюкозы и образования АТР в сердечной мышце крысы.

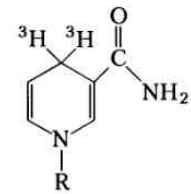
б) Рассчитайте, на сколько секунд хватит запаса АТР в клетке, если начальная концентрация АТР была равна 5,0 мкмоль на 1 г мышечной ткани. Что означает полученный результат, учитывая необходимость точного регулирования образования АТР в клетках? При расчетах принимайте во внимание, что концентрация выражается в мкмоль/г мышечной ткани (эта ткань состоит в основном из воды).

18. Скорость расщепления АТР в летательных мышцах. В летательных мышцах зеленой падальной мухи (*Lucilia sericata*) АТР образуется только в процессе окислительного фосфорилирования. Для поддержания во время полета концентрации АТР 7,0 мкмоль на 1 г мышцы насекомое должно потреблять кислород со скоростью 187 мл /ч на грамм своей массы. Рассчитайте скорость расходования АТР в летательных мышцах, если эти мышцы составляют 20% массы насекомого. В течение какого времени пул АТР может не пополняться за счет окислительного фосфорилирования? Предполагается, что восстановительные эквиваленты переносятся глицерин-3-фосфатной транспортной системой и что потребляемый кислород находится под давлением 101,3 кПа (1 атм) при температуре 25 °С.

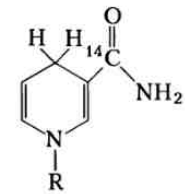
19. Дефекты митохондрий и рак. Мутации генов, кодирующих некоторые митохондриальные белки, связаны с повышением риска развития некоторых типов рака. Как дефекты митохондрий могут приводить к раку?

20. Вариабельность тяжести митохондриальных заболеваний. У людей с заболеваниями, вызванными определенным дефектом митохондриального генома, симптомы заболевания могут носить как умеренный, так и сильно выраженный характер. Объясните этот факт.

21. Перенос восстановительных эквивалентов через мембрану. В аэробных клетках внемитохондриальный NADH должен окисляться в дыхательных цепях митохондрий. При введении NADH, меченного радиоактивным изотопом водорода (4-^{3}H[NADH]) в препарат гепатоцитов крысы, содержащих митохондрии и все цитозольные ферменты, радиоактивность вскоре обнаруживалась в митохондриальном матриксе. При введении 7-^{14}C[NADH] матрикс оставался нерадиоактивным. Какие выводы о процессах окисления внемитохондриального NADH позволяют сделать эти наблюдения?



[4-^{3}H]NADH



[7-^{14}C]NADH

22. Высокий уровень аланина в крови связан с нарушением окислительного фосфорилирования. Выяснилось, что у большинства людей с нарушениями окислительного фосфорилирования концентрация аланина в крови довольно высокая. Объясните это наблюдение.

23. Функции запасенных NAD и дегидрогеназы. Для пируватдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы акцептором электронов служит NAD^+, хотя оба эти фермента локализуются в различных структурах эукариотических клеток. Объясните этот факт.

24. Диабет как следствие митохондриальных дефектов. Глюкокиназы играют важную роль в метаболизме глюкозы в β-клетках поджелудочной железы. У людей с двумя дефектными копиями гена глюкокиназы проявляется тяжелый врожденный диабет, а при дефектах только одной копии развивается заболевание гораздо меньшей степени тяжести (диабет зрелого типа у молодых, MODY2). Объясните это различие, учитывая свойства β-клеток.

25. Последствия мутаций в митохондриальном комплексе II. Замена одного-единственного нуклеотида в гене сукцинатдегидрогеназы (комплекс II) связана с возникновением карциномы средней части тонкого кишечника. Предложите механизм, объясняющий это наблюдение.

26. Фотохимическая эффективность света с различной длиной волны. При освещении зеленого растения светом с длиной волны 680 или 700 нм скорость фотосинтеза, измеряемая по выделению кислорода O_2, в первом случае оказывается выше. Однако одновременное освещение растения светом той и другой длины волны обеспечивает более высокую скорость фотосинтеза, чем освещение светом каждой длины волны. Объясните причину этого.

27. Расчет баланса фотосинтеза. В 1804 г. Теодор Соссюр показал, что суммарная масса кислорода, выделяемого растением в процессе фотосинтеза, и синтезированного вещества в сухом виде больше массы поглощенного углекислого газа. Объясните этот факт.

28. Роль H_2S у некоторых фотосинтезирующих бактерий. У пурпурных серных бактерий на свету в присутствии H_2O и $^{14}CO_2$ может идти фотосинтез, но только если имеется H_2S, а кислород отсутствует. В ходе фотосинтеза (скорость которого измеряют по образованию ^{14}C-глюкозы) H_2S превращается в элементную серу, а кислород не выделяется. Какую роль играет превращение H_2S в элементную серу? Почему не выделяется кислород?

29. Увеличение восстановительной силы фотосистемы I за счет энергии света. При поглощении фотосистемой I красного света с длиной волны 700 нм стандартный потенциал восстановления ее реакционного центра P700 меняется от 0,40 до –1,2 В. Какая доля поглощенного света запасается как восстановительная сила?

30. Поток электронов в фотосистемах I и II. Предскажите, каким образом ингибитор прохождения электронов через феофитин повлияет на перенос электронов через (а) ФСI и (б) ФСII. Объясните свои рассуждения.

31. Ограниченный синтез ATP в темноте. Если хлоропласты шпината освещать в отсутствие ATP и фосфата, а затем добавить ADP и фосфат в темноте — в течение короткого промежутка времени наблюдается синтез ATP. Объясните результаты этого эксперимента.

32. Механизм действия гербицида диурона. Если хлоропласты обработать таким гербицидом, как диурон, выделение кислорода и фотофосфорилирование прекращаются. Выделение кислорода (но не фотофосфорилирование) можно восстановить, добавив какой-нибудь внешний акцептор электронов, например реагент Хилла. Как действует этот гербицид, когда он убивает сорняки? В какой точке схемы, изображенной на рис. 19-56, может сказываться ингибирующее действие диурона? Дайте аргументированный ответ.

33. Влияние вентурицидина на превращения кислорода. Вентурицидин — мощный ингибитор ATP-синтазы; он взаимодействует с CF_o-компонентом фермента и блокирует прохождение протонов через комплекс CF_oCF_1. Как вентурицидин повлияет на превращения кис-

лорода в суспензии хорошо освещенных хлоропластов? Произойдут ли изменения, если эксперимент проводить в присутствии разобщающего агента, такого как 2,4-динитрофенол? Объясните свой ответ.

34. Биоэнергетика фотофосфорилирования. Стационарные концентрации ATP, ADP и фосфата в изолированных листьях шпината при полном освещении и pH 7 равны 120,0, 6,0 и 700 мкМ соответственно.

а) Сколько требуется свободной энергии для синтеза 1 моль ATP при этих условиях?

б) Энергию для синтеза ATP поставляет перенос электронов в хлоропластах, индуцированный светом. При какой минимальной разности потенциалов должен происходить перенос пары электронов в этих условиях для обеспечения синтеза ATP? (Можете воспользоваться уравнением 13-6, с. 47.)

35. Энергия света индуцирует окислительно-восстановительные реакции. Предположим, гипотетический фотосинтезирующий микроорганизм окисляет H_2S и переносит электроны к NAD^+. Какова должна быть длина волны поглощаемого света, чтобы его энергии хватило на отщепление электрона от H_2S и передачу его NAD^+ в стандартных условиях? Эффективность фотохимического процесса в рассматриваемом случае составляет 100%, а стандартные восстановительные потенциалы для H_2S и NAD^+ равны −243 и −320 мкВ соответственно. Примите во внимание схему на рис. 19-46.

36. Константы равновесия реакций расщепления воды. Кофермент $NADP^+$ — конечный акцептор электронов в хлоропластах, что можно записать в виде уравнения реакции:

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ \rightarrow 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2$$

Используя данные табл. 19-2, рассчитайте константы равновесия этой реакции при 25 °C. (Соотношения между K'_{eq} и $\Delta G'^{\circ}$ обсуждаются на с. 15.) За счет какой энергии протекает эта реакция в хлоропластах?

37. Энергетика фотопреобразований. В процессе фотосинтеза растений образование одной молекулы O_2 требует поглощения восьми квантов света.

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ + 8\ \text{фотонов} \rightarrow 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2$$

Рассчитайте для этой реакции изменение свободной энергии, если длина волны поглощаемого света 700 нм (красный) и эффективность фотосинтезирующего процесса 100%.

38. Перенос электронов к реагенту Хилла. Если к экстрактам хлоропластов шпината добавить феррицианид калия (реагент Хилла), а затем осветить эти препараты, будет выделяться кислород согласно уравнению

$$2\,H_2O + 4\,Fe^{3+} \rightarrow O_2 + 4\,H^+ + 4\,Fe^{2+}$$

где Fe^{3+} — феррицианид, Fe^{2+} — ферроцианид. Образуется ли в ходе этой реакции NADPH? Аргументируйте ответ.

39. Как часто молекула хлорофилла поглощает фотон? В листьях шпината хлорофилл (M_r = 892) содержится в количестве 20 мкг/см^2. В дневное время при средней освещенности 5,4 Дж/(см^2 · мин) листья поглощают около 50% солнечной энергии. Как часто одна молекула хлорофилла поглощает фотон? Рассчитайте долю молекул хлорофилла, одновременно переходящих в возбужденное состояние, если среднее время жизни возбужденной молекулы хлорофилла *in vivo* 1 нс.

40. Влияние монохроматического света на поток электронов. Степень окисления или восстановления переносчика электронов при фотосинтетическом переносе электронов в некоторых случаях можно определить из спектрофотометрических данных. Когда хлоропласты освещают светом с длиной волны 700 нм, цитохром *f*, пластоцианин и пластохинон окисляются. Однако если освещать хлоропласты светом с длиной волны 680 нм, эти переносчики электронов оказываются восстановленными. Объясните этот факт.

41. Функция циклического фотофосфорилирования. Когда отношение концентраций [NADPH] / [$NADP^+$] в хлоропласте высокое, происходит в основном циклическое фотофос-

форилирование (см. рис. 19-56). Участвует ли кислород в циклическом фотофосфорилировании? Образуется ли NADPH. Аргументируйте ответ. Какова главная функция циклического фотофосфорилирования?

Анализ экспериментальных данных

42. Фотофосфорилирование: открытие, отклонение гипотезы и повторное открытие. В 1930–1940-х гг. ученые начали понимать механизм процесса фотосинтеза. Тогда же стала проясняться роль «энергетически богатых фосфатных связей» (сегодня это АТР) в гликолизе и клеточном дыхании. Существовало много теорий, объяснявших механизм фотосинтеза, особенно это касалось роли света. Данная задача рассматривает процесс, который тогда называли «первичным фотохимическим процессом», т. е. первичное превращение энергии поглощенного света в фотосинтезирующей клетке. Интересно, что одна важная составная часть современной модели фотосинтеза была сформулирована достаточно рано, но потом отклонена, забыта на несколько лет и лишь затем принята вновь.

В 1944 г. Эмерсон, Стауффер и Умбрейт предположили, что «функция световой энергии в фотосинтезе заключается в образовании «энергетически богатых» фосфатных связей» (с. 107). В соответствии с их моделью (далее мы будем называть ее моделью Эмерсона) свободная энергия, необходимая как для фиксации, *так и* для восстановления CO_2, берется как раз из этих «энергетически богатых» фосфатных связей (т. е. из АТР), образующихся в результате поглощения света хлорофиллсодержащим белком.

Эта модель была опровергнута Рабиновичем (1945). Суммируя открытия Эмерсона с соавт., Рабинович заключил: «Пока не получено других данных, мы выдвигаем против данной гипотезы аргумент, вытекающий из энергетических соображений. Фотосинтез представляет собой процесс *накопления* энергии. Зачем нужно превращать квант света (даже красного света, энергия которого около 43 ккал/эйнштейн) в «фосфатный квант» с энергией всего лишь 10 ккал/моль? Это был бы шаг в ложном направлении — не к накоплению, а к рассеиванию энергии» (т. 1, с. 228). Этот аргумент, а также другие наблюдения привели к отклонению модели Эмерсона. Только в 1950-х гг. модель Эмерсона была признана верной, хотя и с некоторыми модификациями.

«Пройдитесь» по информации (см. ниже пункты *а–ж*), изложенной в статье Эмерсона с соавторами. Ответьте на три вопроса:

1. Каким образом эта информация обосновывает модель Эмерсона, в соответствии с которой энергия света напрямую используется хлорофиллом для *синтеза* АТР, а затем АТР обеспечивает энергию, необходимую для фиксации и восстановления CO_2?

2. Как бы мог Рабинович объяснить эту информацию на основании своей модели (и большинства существовавших тогда моделей), в которой световая энергия использовалась хлорофиллом напрямую *для синтеза восстанавливающих соединений*? Рабинович писал: «Теоретически, нет причин, по которым вся энергия электронов, содержащаяся в молекулах, возбужденных в результате поглощения света, не была бы доступна для процессов окисления и восстановления» (т. 1, с. 152). В этой модели восстанавливающие вещества далее использовались для фиксации CO_2, и его восстановления, а необходимая для этого энергия составляла всего лишь некоторую долю того большого количества свободной энергии, которое образуется при реакциях восстановления.

3. Как данная информация объясняется в свете наших современных представлений о процессе фотосинтеза?
   а) Хлорофилл содержит ион Mg^{2+}, который, как известно, является важным кофактором во многих ферментах, катализирующих реакции фосфорилирования и дефосфорилирования.
   б) Грубый препарат «хлорофиллового белка», выделенный из фотосинтезирующих клеток, обладал фосфорилирующей активностью.
   в) Фосфорилирующая активность «хлорофиллового белка» ингибировалась светом.

г) Уровень содержания некоторых фосфорилированных соединений в фотосинтезирующих клетках сильно изменялся на свету. (Эмерсону с соавт. не удалось идентифицировать соответствующие вещества).

Как выяснилось позднее, в какой-то степени были верны обе модели — и Эмерсона, и Рабиновича.

д) Объясните, каким образом эти две модели соотносятся с современной моделью фотосинтеза.

При опровержении модели Эмерсона Рабинович настаивал на следующем: «Проблема теории запасания фосфата наиболее отчетливо проявляется тогда, когда мы обратимся к тому факту, что при слабом освещении восьми или десяти квантов света достаточно для восстановления одной молекулы диоксида углерода. Если каждый квант должен произвести одну молекулу высокоэнергетического фосфата, будет накоплено лишь 80–100 ккал/эйнштейн, тогда как для фотосинтеза необходимо не менее 112 ккал/моль или более — ввиду потерь в необратимых частичных реакциях» (т. 1, с. 228).

е) Как расчеты Рабиновича (от 8 до 10 фотонов на молекулу восстановленного CO_2) соотносятся с принятым сегодня значением? За некоторой дополнительной информацией обратитесь к гл. 20.

ж) Как бы вы отклонили аргумент Рабиновича на основании наших сегодняшних знаний о процессе фотосинтеза?

Литература

Emerson, R. L., Stauffer, J. F., & Umbreit, W. W. (1944) Relationships between phosphorylation and photosynthesis in Chlorella. *Am. J. Botany* **31**, 107–120.

Rabinowitch, E. I. (1945) *Photosynthesis and Related Processes*, Interscience Publishers, New York.

...открытие Самуэлем Рубеном и Мартином Каменом в 1940 г. долгоживущего изотопа углерода ^{14}C дало идеальный метод для отслеживания маршрута, который совершает углекислый газ, проходя свой путь до углевода.

Мелвин Кальвин, Нобелевская речь, *1961*

20

Биосинтез углеводов у растений и бактерий

20.1. Фотосинтез углеводов 404

20.2. Фотодыхание, C_4- и CAM-пути 420

20.3. Биосинтез крахмала и сахарозы 426

20.4. Синтез полисахаридов клеточной стенки: целлюлоза растений и пептидогликан бактерий 431

20.5. Интеграция углеводного метаболизма в растительной клетке 435

Сейчас мы достигли поворотной точки в изучении клеточного метаболизма. До сих пор в этой части книги (часть II) мы описали, как углеводы, жирные кислоты и аминокислоты — главное метаболическое топливо — распадаются в сходящихся *катаболических* путях для того, чтобы попасть в цикл трикарбоновых кислот и передать свои электроны в дыхательную цепь; и как этот экзотермический поток электронов к кислороду сопряжен с эндотермическим синтезом ATP. Теперь рассмотрим *анаболические* пути, которые используют химическую энергию в форме ATP и NADH или NADPH для синтеза клеточных компонентов из простых молекул-предшественников. Анаболические пути в целом восстановительные, а не окислительные. Катаболизм и анаболизм происходят одновременно, поэтому в динамически устойчивом состоянии распад с выделением энергии соединений, содержащихся в клетке, уравновешен биосинтетическими процессами, которые создают и поддерживают упорядоченность живых клеток.

Растения должны быть самыми универсальными живыми системами в метаболизме углеводов по нескольким причинам. Во-первых, как автотрофы растения способны превращать неорганический углерод (такой, как CO_2) в органические соединения. Во-вторых, биосинтез происходит в основном в пластидах — ограниченных мембраной органеллах, свойственных растениям, а передвижение интермедиатов между компартаментами клетки — важный аспект метаболизма. В-третьих, растения неподвижны: они не могут передвигаться в поисках более доступной воды, солнечного света или нитратов. Они должны иметь достаточную метаболическую лабильность, которая позволила бы им адаптироваться к изменяющимся условиям того места, где они растут. Наконец, у растений многослойная клеточная стенка состоит из высокомолекулярных углеводов (природных биополимеров); она должна собираться с наружной стороны плазматической мембраны, причем на нее приходится значительная часть всех углеводов клетки.

Мы начнем главу с описания процессов, благодаря которым CO_2 превращается в триозы

и гексозы, затем рассмотрим фотодыхание — важную побочную реакцию в процессе фиксации CO_2, а также пути, по которым некоторые растения избегают этой побочной реакции. Затем мы посмотрим, как биосинтез сахарозы (для транспорта сахаров) и крахмала (для запасания энергии) совершается по механизмам, аналогичным тем, что животные используют при синтезе гликогена. Следующая обсуждаемая тема — синтез целлюлозы растительной клеточной стенки и пептидогликана бактериальной клеточной стенки — иллюстрирует проблемы энергетически зависимого биосинтеза с наружной стороны плазматической мембраны. В заключение, мы обсудим, как различные пути, использующие пулы общих интермедиатов, разделенных в пределах органелл, в итоге объединяются друг с другом.

20.1. Фотосинтез углеводов

Для синтеза углеводов в животной клетке всегда используются предшественники, имеющие хотя бы три атома углерода, которые окислены менее, чем углерод в CO_2. В отличие от этого, растения и фотосинтезирующие микроорганизмы могут синтезировать углеводы из CO_2 и воды, восстанавливая CO_2 с расходом энергии ATP и NADPH, получаемых в результате светозависимых реакций фотосинтеза (**рис. 20-1**). Растения (и другие автотрофы) могут использовать CO_2 в качестве единственного источника атомов углерода, необходимых для биосинтеза целлюлозы и крахмала, липидов, белков, и многих других органических компонентов растительной клетки. В отличие от них, гетеротрофы не могут осуществлять реакции восстановления CO_2 для синтеза глюкозы.

Зеленые растения содержат в своих хлоропластах уникальный ферментный комплекс, катализирующий превращение CO_2 в простые (восстановленные) органические соединения. Этот процесс называется **ассимиляцией CO_2, фиксацией CO_2** или **фиксацией углерода**. Мы будем использовать эти термины для специфической реакции, в которой CO_2 включается (фиксируется) в трехуглеродное — триозофосфат-3-фосфоглицерат. Этот простой продукт фотосинтеза — предшественник более сложных биомолекул (сахаров, полисахаридов и метаболитов), которые синтезируются в метаболических путях, похожих на аналогичные в животных тканях. Диоксид углерода CO_2 ассимилируется через циклический путь; его ключевые интермедиаты постоянно возобновляются. Этот путь был расшифрован в начале 1950-х гг. Мелвином Кальвином, Эндрю Бенсоном и Джеймсом А. Басшамом, и часто называется **циклом Кальвина** или, более описательно, **циклом фотосинтетического восстановления углерода**.

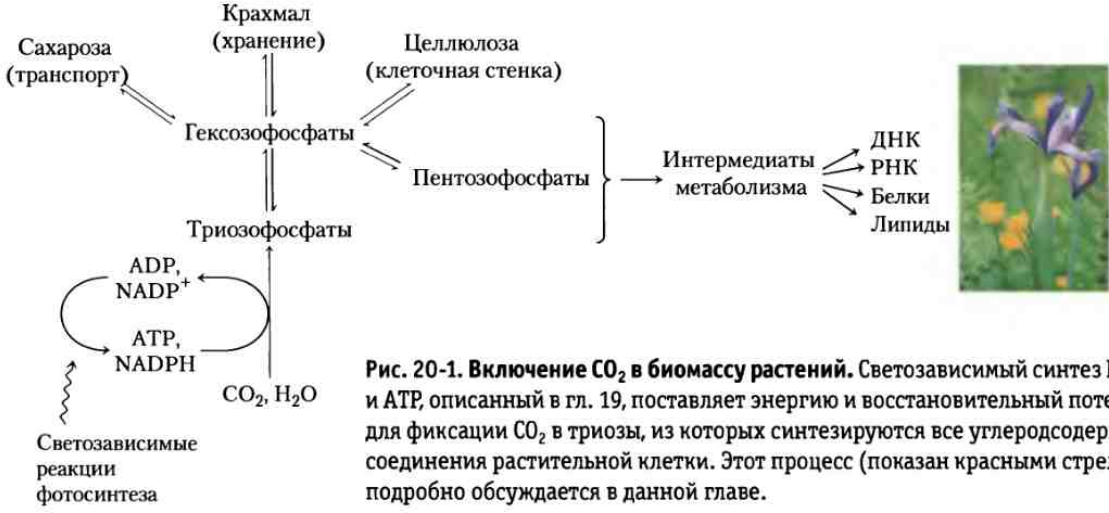


Рис. 20-1. Включение CO_2 в биомассу растений. Светозависимый синтез NADPH и ATP, описанный в гл. 19, поставляет энергию и восстановительный потенциал для фиксации CO_2 в триозы, из которых синтезируются все углеродсодержащие соединения растительной клетки. Этот процесс (показан красными стрелками) подробно обсуждается в данной главе.

Мелвин Кальвин, 1911–1997

Метаболизм углеводов в растительных клетках более сложен, чем в животных клетках или нефотосинтезирующих микроорганизмах. В дополнение к общим путям гликолиза и глюконеогенеза растения осуществляют уникальную последовательность реакций для восстановления CO_2 до триозофосфатов и связанный с ней восстановительный пентозофосфатный путь; все эти реакции должны согласованно регулироваться с целью правильного распределения атомов углерода между реакциями, продуцирующими энергию, и реакциями синтеза крахмала и сахарозы. Как мы увидим, ключевые ферменты регулируются (1) путем восстановления дисульфидных связей электронами, поступающими из фотосистемы I и (2) путем изменения pH и концентрации ионов магния, что происходит под действием света. Если посмотреть на другие аспекты метаболизма углеводов у растений, мы также найдем ферменты, которые управляются (3) путем обычного аллостерического регулирования одним или более метаболическими интермедиатами и (4) путем ковалентной модификации (фосфорилированием).

Пластиды — уникальные органеллы растительных клеток и водорослей

Большинство процессов биосинтеза растений (включая ассимиляцию CO_2) происходит в **пластидах** — семействе самовоспроизводящихся органелл, ограниченных двойной мембраной и содержащих небольшой геном, который кодирует некоторые белки пластид. Белки, предназначенные для пластид, как правило, закодированы в ядерных генах, которые транскрибируются и транслируются, как другие ядерные гены; затем эти белки транспортируются в пластиды. Пластиды воспроизводятся делением надвое, реплицируя свой геном (единственную циклическую молекулу ДНК) и используя свои собственные ферменты и рибосомы для синтеза белков, кодированных в этом геноме. **Хлоропласты** (см. рис. 19-45) служат центрами ассимиляции CO_2. Белки, необходимые для этого процесса, содержатся в строме — растворимой фазе, ограниченной внутренней мембраной хлоропласта. **Амилопласты** — это неокрашенные пластиды (в них нет хлорофилла и других пигментов, найденных в хлоропластах). У них нет внутренних мембранных аналогов фотосинтетических мембран (тилакоидов) хлоропластов, и в растительных тканях, богатых крахмалом, эти пластиды наполнены крахмальными зернами (**рис. 20-2**). Хлоропласты могут терять внутренние мембраны и хлорофилл и превращаться в **пропластиды**, а пропластиды могут переходить в амилопласты (**рис. 20-3**). В свою очередь и амилопласты, и пропластиды могут преобразоваться в хлоропласты. Относительное содержание пластид зависит от типа растительной ткани и интенсивности освещения. Клетки зеленых листьев богаты хлоропластами, а в нефотосинтезирующих тканях, таких как картофельные клубни, доминируют амилопласты, которые содержат большое количество крахмала.

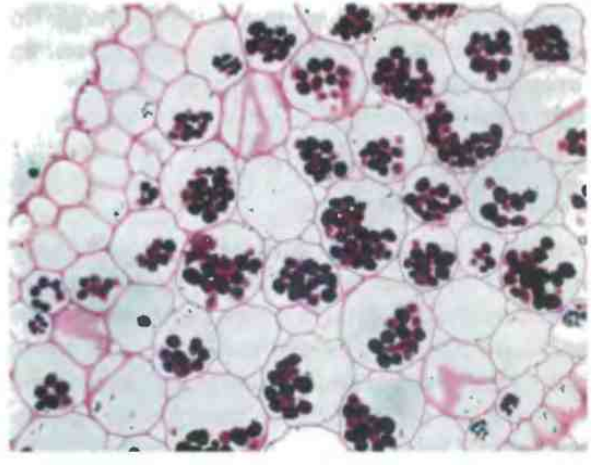


Рис. 20-2. Крахмал (темные гранулы), окрашенный иодом, в амилопластах клеток корня лютика (*Ranunculus*). Диаметр гранул крахмала в различных клетках варьирует от 1 до 100 мкм.

Рис. 20-3. Пластиды: происхождение и взаимопревращение. Пластиды всех типов ограничены двойной мембраной, а некоторые (особенно зрелые хлоропласты) несут дополнительные внутренние мембраны. Внутренние мембраны могут теряться (когда зрелый хлоропласт переходит в пропластиду) и синтезироваться вновь (как в пропластиде, которая становится прегранальной пластидой, а затем зрелым хлоропластом). Пропластиды в нефотосинтезирующих тканях (таких, как корень) превращаются в амилопласты, которые накапливают большое количество крахмала. Все растения содержат пластиды; в этих органеллах проходят такие важные процессы, как синтез аминокислот, тиамина, пиридоксальфосфата, флавинов и витаминов A, C, E и K.

Внутренняя мембрана всех типов пластид непроницаема для полярных и заряженных молекул. Перенос через мембрану управляется набором специфических транспортеров.

Ассимиляция углекислого газа происходит в три стадии

Первая стадия ассимиляции CO_2 в биомолекулы (**рис. 20-4**) — **реакция фиксации углерода**: конденсация CO_2 с пятиуглеродным акцептором **рибулозо-1,5-бисфосфатом** с образованием двух молекул **3-фосфоглицерата**. На второй стадии 3-фосфоглицерат восстанавливается до триозофосфатов. Вито гетри молекулы CO_2 фиксируются в трех молекулах рибулозо-1,5-бисфосфатов, образуются шесть молекул глицеральдегид-3-фосфата (18 атомов углерода) в равновесии с дигидроксиацетонфосфатом. На третьей стадии пять из шести молекул триозофосфата (15 атомов углерода) используются для восстановления трех молекул рибулозо-1,5-бисфосфата (15 атомов), стартового соединения. Шестая молекула триозофосфата, конечного продукта фотосинтеза, может использоваться в синтезе гексоз — топливных и строительных материалов, сахарозы — для транспорта в нефотосинтезирующие ткани или крахмала — для запасания. Таким образом, весь процесс циклический, с постоянным превращением CO_2 в триозо- или гексозофосфаты. Фруктозо-6-фосфат — ключевой интермедиат на третьей стадии ассимиляции CO_2; он находится в точке разветвления, ведущей либо к регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата, либо к синтезу крахмала. Путь от гексозофосфата до пентозобисфосфата включает множество тех же самых реакций, которые используются в животных клетках для превращения пентозофосфатов в гексозофосфаты в неокислительной стадии **пентозофосфатного пути** (см. рис. 14-22). При фотосинтетической ассимиляции CO_2 многие реакции идут в обратном направлении, превращая гексозофосфаты в пентозофосфаты. Этот **восстановительный пентозофосфатный путь** использует те же ферменты, что и окислительный путь, и несколько других ферментов, которые делают восстановительный цикл необратимым. Все 13 ферментов этого пути находятся в строме хлоропласта.

Стадия 1. *Фиксация CO_2 на 3-фосфоглицерате.* Главный секрет природы механизмов ассимиляции CO_2 в фотосинтетических организмах был разгадан в конце 1940-х гг. Кальвин и его коллеги освещали суспензию зеленых водорослей в присутствии радиоактивно меченного диоксида углерода ($^{14}CO_2$) всего несколько секунд, затем быстро разрушали клетки, выделяли их содержимое, и хроматографическими методами определяли метаболиты, в которых впервые появлялся меченый углерод. Первым соединением, в котором обнаруживалась радиоактивная метка, был **3-фосфоглицерат**, главным образом с ^{14}C-карбоксилом. Эти эксперименты убедительно показывали, что именно 3-фосфоглицерат оказывается одним из первых интермедиатов в фотосинтезе. Растения, в которых это трехуглеродное соединение — первый интермедиат, называют **C_3-растениями**, чтобы отличить их от C_4-растений, которые описаны ниже.

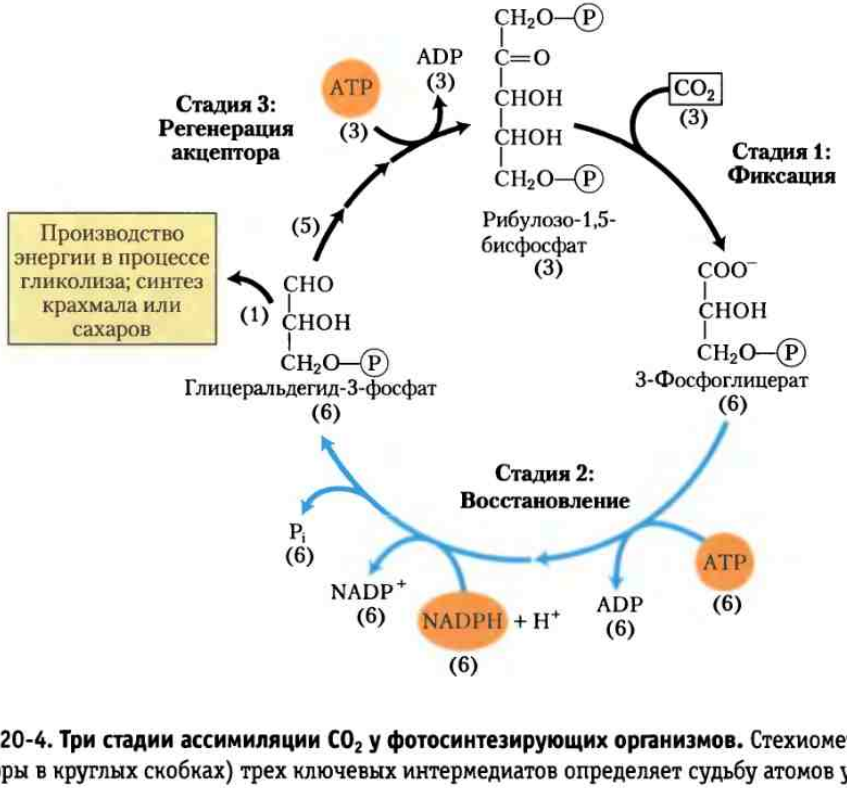


Рис. 20-4. Три стадии ассимиляции CO_2 у фотосинтезирующих организмов. Стехиометрия (цифры в круглых скобках) трех ключевых интермедиатов определяет судьбу атомов углерода, которые входят в цикл и покидают его: три молекулы CO_2 включены в углеродную цепь одной молекулы глицеральдегид-3-фосфата. Этот цикл называется циклом фотосинтетического восстановления углерода, или циклом Кальвина.

Включение CO_2 в органические соединения катализирует фермент **рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа**, сокращенно **рубиско**. Как карбоксилаза, рубиско катализирует ковалентное присоединение CO_2 к пятиуглеродному сахару рибулозо-1,5-бисфосфату и расщепляет нестабильный шестиуглеродный интермедиат с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата, одна из которых несет углерод, введенный как CO_2 в карбоксигруппу (рис. 20-4). Оксигеназная активность фермента обсуждается в разд. 20.2.

Существуют две разные формы рубиско. Форму I содержат сосудистые растения, водоросли и цианобактерии, а форма II есть только у фотосинтезирующих бактерий. Рубиско растений — ключевой фермент при образовании биомассы из CO_2, он представлен формой I (**рис. 20-5, *а***) — восемь идентичных больших субъединиц (M_r = 53 000; закодированы в геноме хлоропластов, или пластоме; каждая субъединица содержит каталитический центр) и восемь одинаковых малых субъединиц (M_r = 14 000; закодированы в ядерном геноме) с неопределенной функцией. Форма II рубиско фотосинтезирующих бактерий устроена проще; она содержит две субъединицы, которые во многом напоминают большие субъединицы растительного фермента (рис. 20-5, *б*). Это сходство согласуется с эндобиосинтетической гипотезой происхождения хлоропластов (с. 59, т. 1). Особенность этого растительного фермента — низкое число оборотов: только три молекулы CO_2 в секунду фиксируются рубиско при 25 °C. Для достижения высокой скорости фиксации CO_2 растения нуждаются в большом количестве этого фермента. Рубиско составляет почти 50% растворимых белков в хлоропластах, и, вероятно, это один из самых распространенных белков в биосфере.

В предполагаемом механизме с участием растительного рубиско центральную роль играет карбамоилированная боковая цепь Lys и связанный с ней Mg^{2+}. Ион Mg^{2+} способствует правильной ориентации реагентов в активном цен-

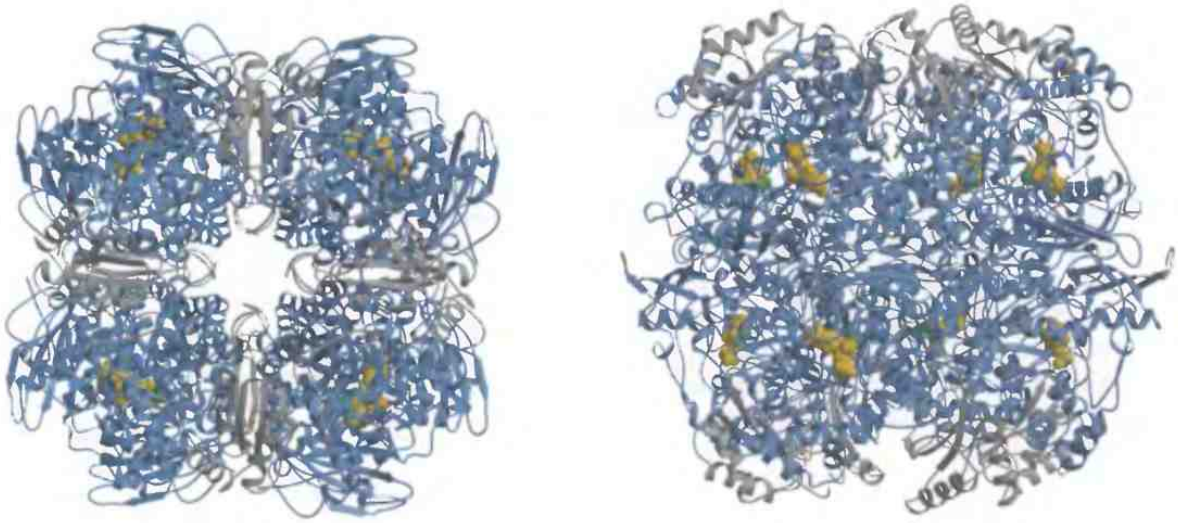


Рис 20-5. Структура рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы (рубиско). *а* — вид сверху и сбоку ленточной модели формы I рубиско из шпината (PDB ID 8RUC). Фермент содержит восемь больших субъединиц (синие) и восемь малых субъединиц (серые), компактно упакованных в структуру с M_r = 550 000. Концентрация рубиско в строме хлоропластов около 250 мг/мл, что соответствует необычно высокой концентрации активных центров (~4 мМ). Аминокислотные остатки активного центра показаны желтым, ионы Mg^{2+} — зеленым. *б* — ленточная модель формы II рубиско из бактерии *Rhodospirillum rubrum* (PDB ID 9RUB). Субъединицы показаны серым и синим. Остаток Lys в активном центре, который у активного фермента карбоксилирован до карбамата (показан красным). Субстрат — рибулозо-1,5-бисфосфат выделен желтым, ионы магния — зеленым.

тре (**рис. 20-6**) и поляризует CO_2, открывая его для нуклеофильной атаки пятиуглеродным ендиолатным активным интермедиатом, образующимся на ферменте (**рис. 20-7**). Получающееся шестиуглеродное промежуточное соединение распадается с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата.

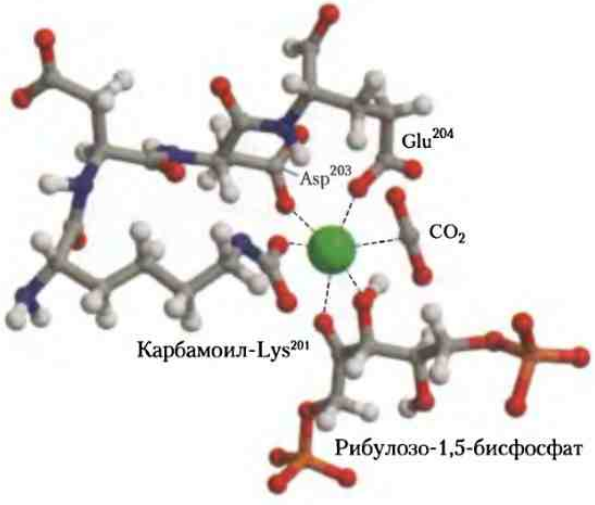


Рис. 20-6. Центральная роль иона Mg^{2+} в каталитическом механизме с участием рубиско (из PDB, ID 1RXO). Mg^{2+} координирован шестью атомами кислорода, находящимися в вершинах октаэдрического комплекса: кислород карбамата Lys^{201}, два атома кислорода карбоксильных групп Glu^{204} и Asp^{203}, два кислорода на атомах С-2 и С-3 субстрата рибулозо-1,5-бисфосфата и один атом кислорода второго субстрата — CO_2. В этой кристаллической структуре в CO_2-связывающем центре находится молекула воды. (Номера остатков соответствуют ферменту из шпината.)

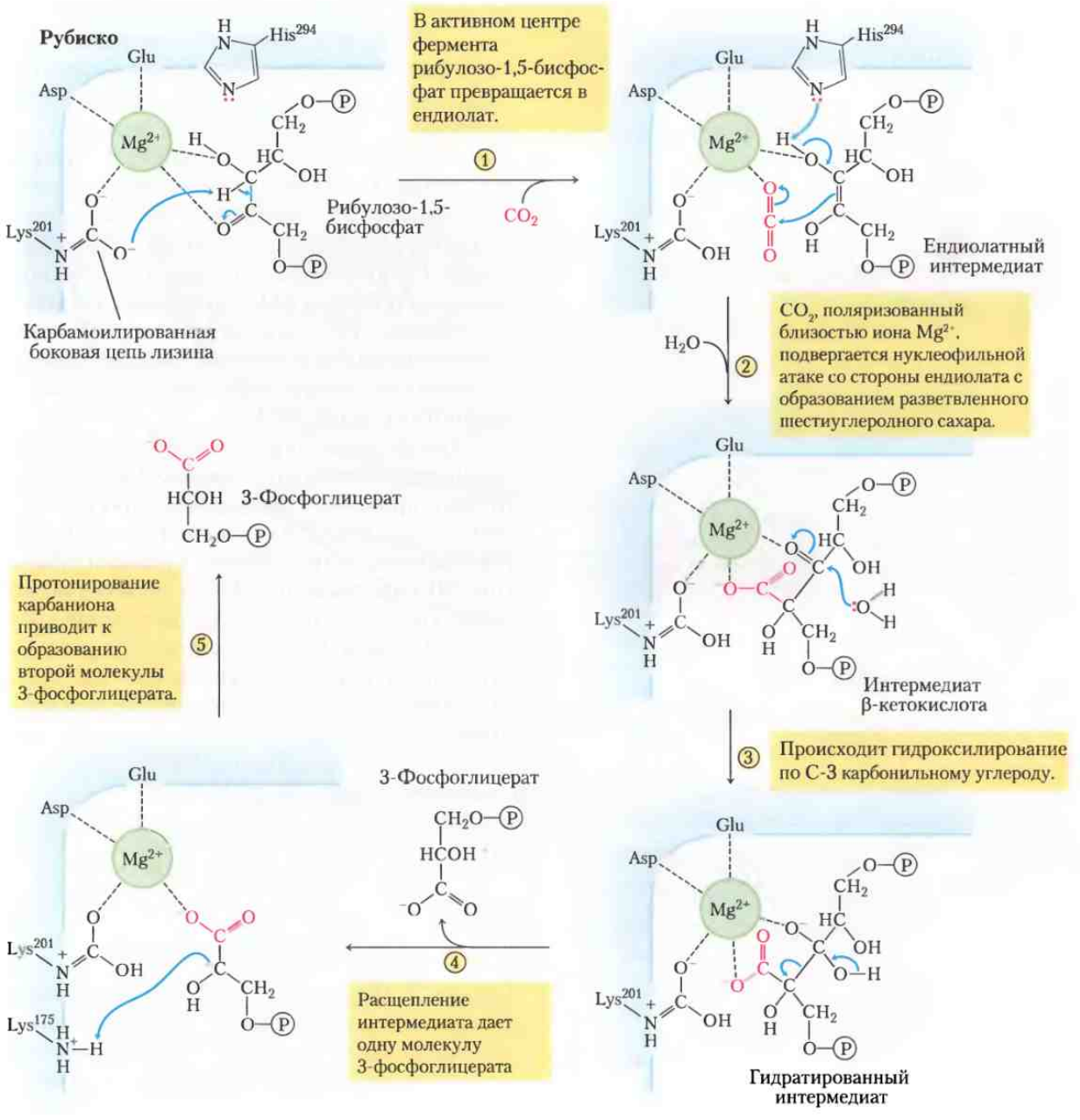


Рис. 20-7. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Первая стадия ассимиляции CO_2: карбоксилазная активность рубиско. Реакция фиксации CO_2 катализируется рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой/оксигеназой (рубиско): одна молекула CO_2 соединяется с одной молекулой рибулозо-1,5-бисфосфата и образуются две молекулы 3-фосфоглицерата, одна из которых содержит атом углерода CO_2 (красный). Дополнительная передача протона (не показана) задействует Lys^{201}, Lys^{175} и His^{294} и проходит в несколько стадий. ● **Механизм работы рубиско**

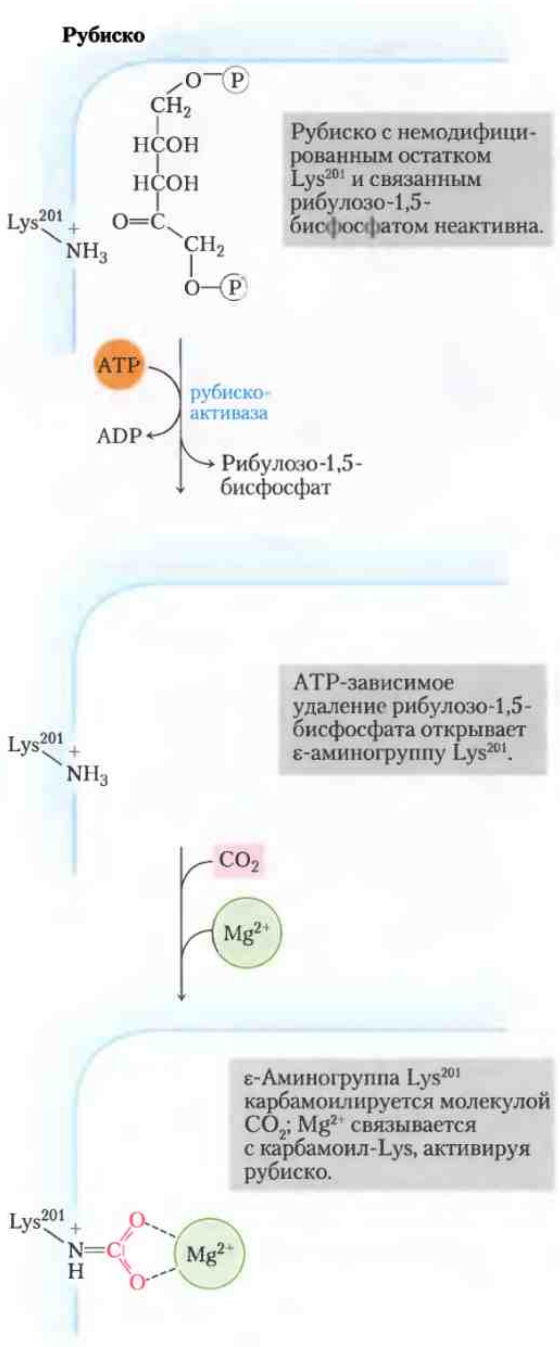
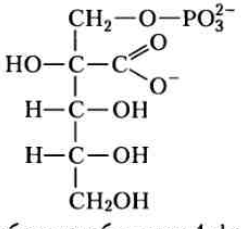


Рис. 20-8. Роль рубиско-активазы в карбамоилировании остатка Lys^{201} активного центра рубиско. Когда субстрат рибулозо-1,5-бисфосфат связан с активным сайтом, Lys^{201} не доступен. Рубиско-активаза гидролизует ATP и выталкивает сахаробисфосфат, таким образом экспонируя Lys^{201} наружу; этот остаток Lys теперь может быть карбамоилирован молекулой CO_2 (по-видимому, неферментативная реакция). Ион Mg^{2+} притягивается к отрицательно заряженному карбамоил-Lys и связывается с ним, что приводит к активации фермента.

Как катализатор первой стадии фотосинтетической ассимиляции CO_2 рубиско выступает главной мишенью для регуляции. Фермент неактивен, пока ε-группа Lys^{201} некарбамоилирована (**рис. 20-8**). Рибулозо-1,5-бисфосфат ингибирует карбамоилирование, прочно связываясь с активным центром и блокируя фермент в «закрытой» конформации, в которой Lys^{201} недоступен. **Рубиско-активаза** снимает ингибирование посредством ATP-зависимого высвобождения рибулозо-1,5-бисфосфата, экспонируя аминогруппу Lys для неферментативного карбамоилирования с помощью CO_2; этот процесс следует за связыванием Mg^{2+}, которое активирует рубиско. У некоторых видов рубиско-активаза активируется светом по окислительно-восстановительному механизму (см. рис. 20-19).

Другой регуляторный механизм вовлекает «темновой ингибитор» 2-карбоксирабинитол-1-фосфат, природный аналог переходного состояния (см. доп. 6-3, т. 1) со структурой, похожей на β-кетокислоту — интермедиат в реакции рубиско (рис. 20-7; см. также рис. 20-20). Это соединение, синтезирующееся некоторыми растениями в темноте, — мощный ингибитор карбамоилированной рубиско. Оно либо распадается при освещении, либо вытесняется рубиско-активазой, активируя рубиско.



2-Карбоксиарабинитол-1-фосфат

Стадия 2. *Превращение 3-фосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат.* 3-Фосфоглицерат, образовавшийся на первой стадии, превращается в глицеральдегид-3-фосфат в две стадии, которые по сути есть обратные реакции соответствующих стадий гликолиза с одним отличием: в качестве нуклеотидного кофактора для восстановления 1,3-бисфосфоглицерата вместо NADH используется NADPH (см. **рис. 20-9**). Строма хлоропласта содержит все гликолитические ферменты, кроме фосфоглицератмутазы. Стромальные и цитозольные ферменты — изозимы: оба набора ферментов катализируют одинаковые реакции, но продуцируются разными генами.

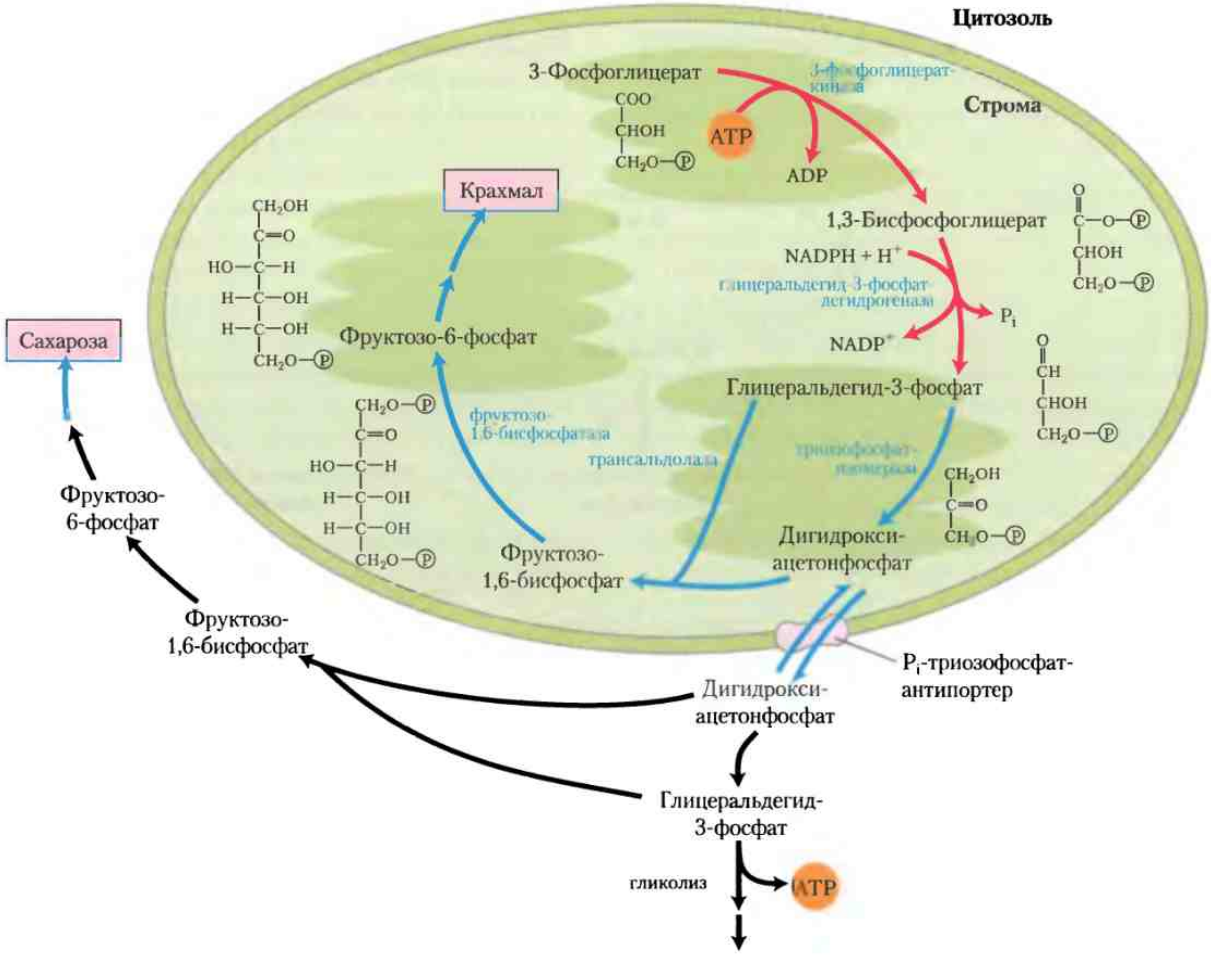


Рис. 20-9. Вторая стадия ассимиляции CO_2. 3-Фосфоглицерат превращается в глицеральдегид-3-фосфат (красные стрелки). Показаны также альтернативные пути, в которых участвует фиксированный углерод глицеральдегид-3-фосфата (синие стрелки). Глицеральдегид-3-фосфат в основном превращается обратно в рибулозо-1,5-бисфосфат, как показано на рис. 20-10. Небольшие количества «дополнительного» глицеральдегид-3-фосфата может быть немедленно использована в качестве источника энергии, но весь остальной глицеральдегид-3-фосфат превращается в сахарозу для транспорта или запасается в хлоропластах в виде крахмала. В последнем случае он конденсируется в строме с дигидроксиацетонфосфатом, образуя фруктозо-1,6-бисфосфат, предшественник крахмала. В других ситуациях глицеральдегид-3-фосфат превращается в дигидроксиацетонфосфат, который покидает хлоропласт через специфический транспортер (см. рис. 20-15) и может с высвобождением энергии расщепляться в процессе гликолиза в цитозоле или использоваться для образования фруктозо-6-фосфата и, следовательно, сахарозы.

В первой реакции второй стадии стромальный фермент **3-фосфоглицераткиназа** катализирует перенос фосфорильной группы с АТР на 3-фосфоглицерат, превращая его в 1,3-бисфосфоглицерат. Затем, хлоропласт-специфичный изозим **глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа** восстанавливает 1,3-бисфосфат, окисляя NADPH, с образованием глицеральдегид-3-фосфата и фосфата P_i. Триозофосфатизомераза осуществляет взаимопревращение глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата. Большинство молекул триозофосфата, которые получаются таким образом, затем используется для регенерации рибулозо-1,5-

бисфосфата; остальные либо превращаются в крахмал в хлоропластах и хранятся для дальнейшего использования, либо немедленно экспортируются в цитозоль и превращаются в сахарозу для транспорта к растущим органам растения. В развивающихся листьях значительная доля триозофосфата может расщепляться в гликолизе, высвобождая энергию.

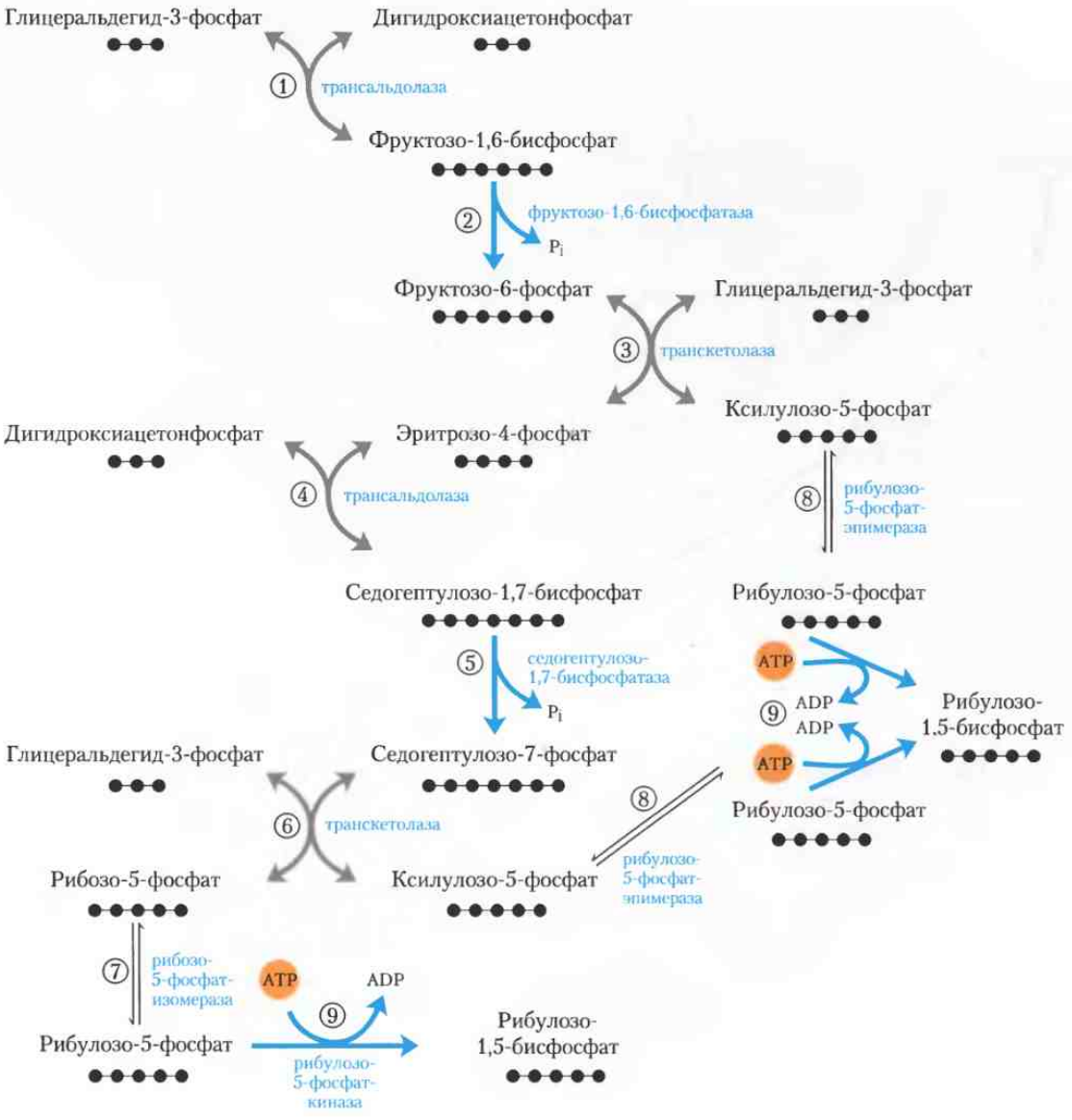
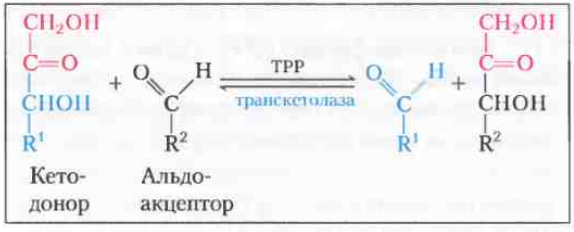


Рис. 20-10. Третья стадия ассимиляции CO_2. Показано взаимопревращение триозофосфатов и пентозофосфатов. Черными точками обозначены атомы углерода. Исходными веществами служат глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат. Реакции синтеза пентозофосфатов катализируются трансальдолазой (① и ④), транскетолазой (③ и ⑥), затем образуется рибулозо-1,5-бисфосфат из рибозо-5-фосфата под действием рибозо-5-фосфатизомеразы (⑦) и из ксилулозо-5-фосфата под действием рибулозо-5-фосфат-эпимеразы (⑧). На стадии ⑨ рибулозо-5-фосфат фосфорилируется и образуется рибулозо-1,5-бисфосфат. Реакции, изображенные синими стрелками (стадии ② фруктозо-1,6-бисфосфатазы, ⑤ седогептулозо-бисфосфатазы и ⑨ рибулозо-5-фосфаткиназы), эндотермические, поэтому весь процесс в целом необратим.

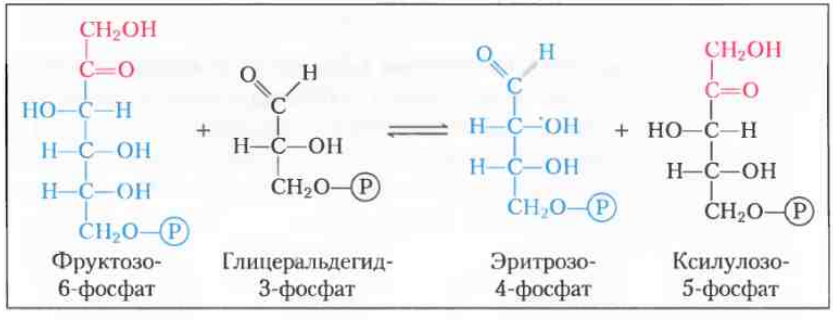
Стадия 3. *Регенерация рибулозо-1,5-бисфосфата из триозофосфатов.* В результате первой реакции ассимиляции CO_2 в триозофосфаты расходуется рибулозо-1,5-бисфосфат, и для непрерывного превращения CO_2 в углеводы рибулозо-1,5-бисфосфат должен постоянно регенерироваться. Это выполняется в серии реакций (**рис. 20-10**), что вместе со стадиями ① и ② составляет циклический путь, показанный на рис. 20-4. Продукт первой реакции (3-фосфоглицерат) процесса ассимиляции подвергается различным превращениям, в результате которых образуется рибулозо-1,5-бисфосфат. Интермедиаты этого пути представляют собой трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродные сахара. В последующем обсуждении номера стадий соответствуют рис. 20-10.

Стадии ① и ④ катализируются одним и тем же ферментом — **альдолазой**. Сначала этот фермент катализирует обратимую конденсацию глицеральдегид-3-фосфата с дигидроксиацетонфосфатом, образуя фруктозо-1,6-бисфосфат; на стадии ② это соединение расщепляется фруктозо-1,6-бисфосфатазой (ФБФаза-1) на фруктозо-6-фосфат и P_i. Эта реакция сильно экзотермична и по сути необратима. Стадия ③ катализируется **транскетолазой**, которая содержит тиаминпирофосфат (TPP) в качестве простетической группы (см. рис. 14-14, *а*) и для функционирования которой требуется Mg^{2+}. Транскетолаза катализирует обратимый перенос двухуглеродной кетольной группы ($CH_2OH–CO–$) с кетозофосфатного донора фруктозо-6-фосфата на альдозофосфатный акцептор глицеральдегид-3-фосфат (**рис. 20-11, *а*, *б***), образуя пентозу ксилулозо-5-фосфат и тетрозу эритрозо-4-фосфат. На стадии ④ снова действует трансальдолаза, конденсируя эритрозо-4-фосфат с

а



б



в

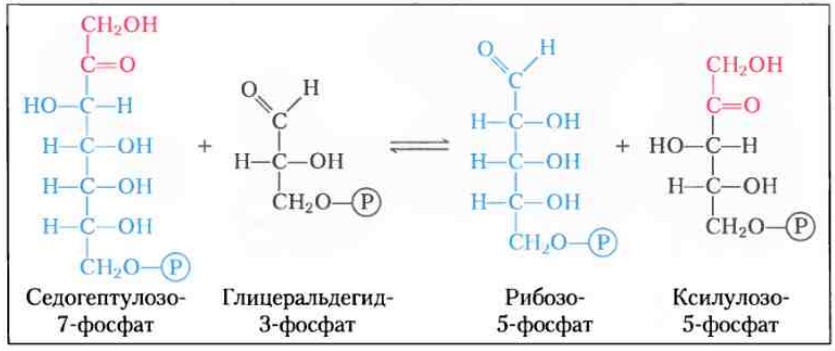


Рис. 20-11. Реакции цикла Кальвина, катализируемые транскетолазой. *а* — реакция, катализируемая транскетолазой; происходит перенос двухуглеродной группы, которую временно несет связанный с ферментом TPP, от кетодонора к альдоакцептору. *б* — превращение гексозы и триозы в четырехуглеродный и пятиуглеродный сахар (стадия ③ на рис. 20-10). *в* — превращение семиуглеродного и трехуглеродного сахара в пентозы (стадия ⑥ на рис. 20-10).

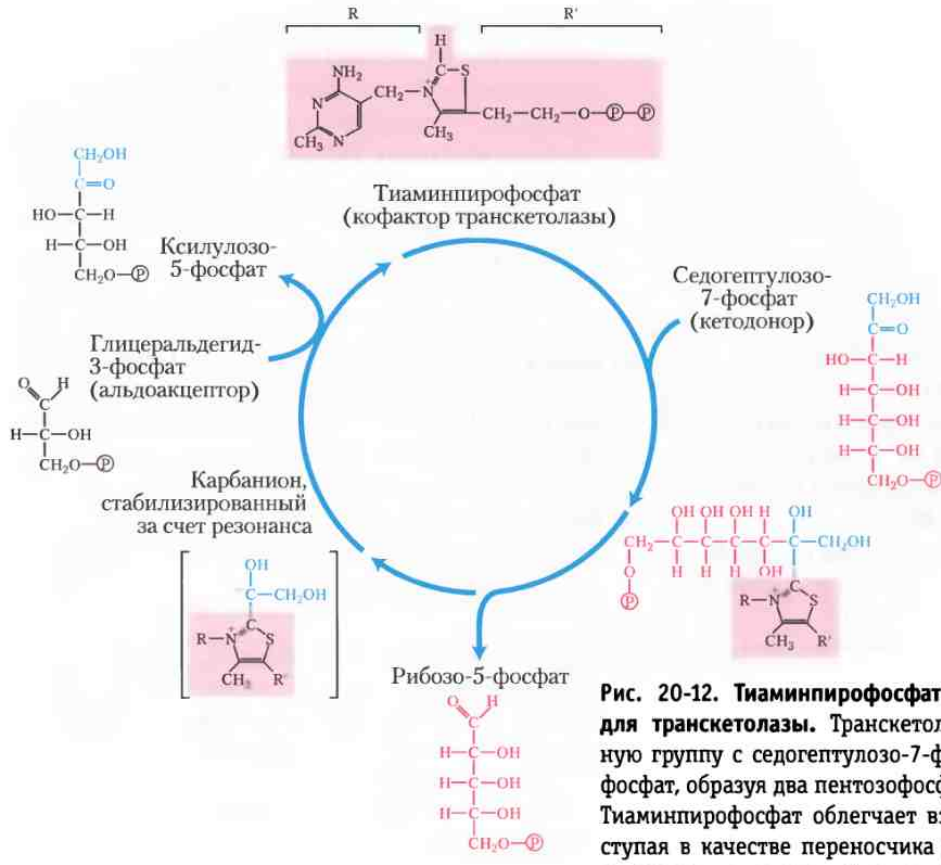


Рис. 20-12. Тиаминпирофосфат (TPP) служит кофактором для транскетолазы. Транскетолаза переносит двухуглеродную группу с седогептулозо-7-фосфата на глицеральдегид-3-фосфат, образуя два пентозофосфата (стадия ⑥ на рис. 20-10). Тиаминпирофосфат облегчает взаимодействие, временно выступая в качестве переносчика двухуглеродной структуры и стабилизируя электрон (см. рис. 14-14).

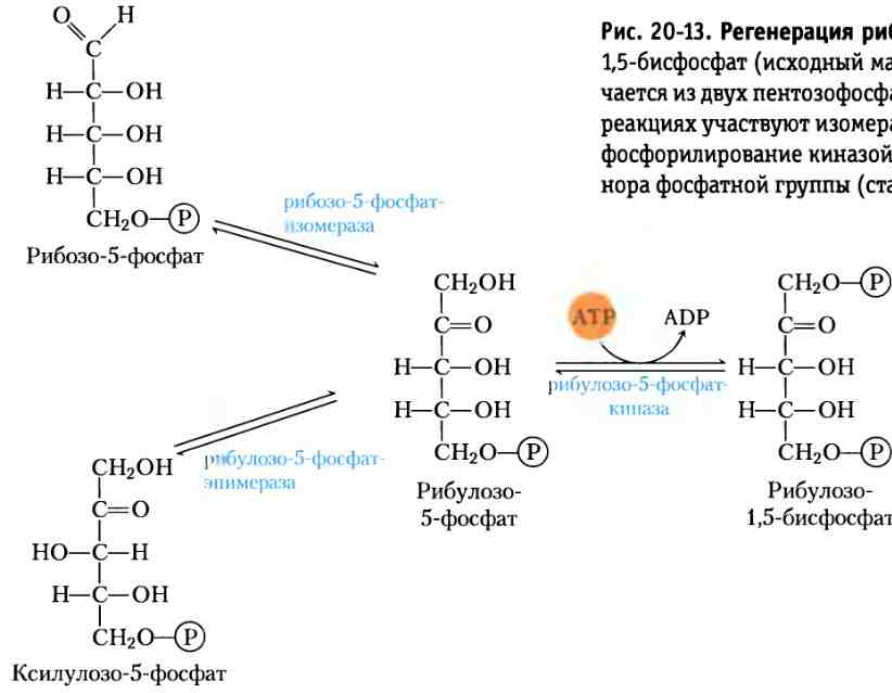


Рис. 20-13. Регенерация рибулозо-1,5-бисфосфата. Рибулозо-1,5-бисфосфат (исходный материал для цикла Кальвина) получается из двух пентозофосфатов, образующихся в цикле. В этих реакциях участвуют изомеразы и эпимеразы, затем происходит фосфорилирование киназой, а ATP используется в качестве донора фосфатной группы (стадии ⑦, ⑧ и ⑨ на рис. 20-10).

дигидроксиацетонфосфатом с образованием семиуглеродного сахара **седогептулозо-1,7-бисфосфата**. Фермент, седогептулозо-1,7-бисфосфатаза, уникальный для пластид, превращает этот бисфосфат в седогептулозо-7-фосфат (стадия ⑤); в данном пути это вторая необратимая реакция. Теперь снова работает транскетолаза, превращая на стадии ⑥ (рис. 20-11, *в*) седогептулозо-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат в два пентозофосфата. На **рис. 20-12** показано, как на стадии ⑥ двухуглеродный фрагмент временно переносится на транскетолазный кофактор ТРР и конденсируется с тремя атомами углерода глицеральдегид-3-фосфата.

Пентозофосфаты рибозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат, образованные в транскетолазных реакциях, переходят в **рибулозо-5-фосфат** (стадии ⑦ и ⑧), который на последней стадии цикла (⑨) фосфорилируется до рибулозо-1,5-бисфосфата рибулозо-5-фосфаткиназой (**рис. 20-13**). Это третья экзотермическая реакция данного пути, поскольку происходит «замена» высокоэнергетической фосфоангидридной связи АТР на фосфоэфирную связь в рибулозо-1,5-бисфосфате.

Синтез каждого триозофосфата из CO_2 требует шесть NADPH и девять ATP

В результате трех оборотов циклов Кальвина из трех молекул CO_2 и одной молекулы фосфата образуется одна молекула триозофосфата. Стехиометрия полного пути от CO_2 до триозофосфата с регенерацией рибулозо-1,5-бисфосфата показана на **рис. 20-14**. Три молекулы рибулозо-1,5-бисфосфата (всего 15 атомов углерода) конденсируются с тремя молекулами CO_2 (три атома углерода) с образованием шести молекул 3-фосфоглицерата (18 атомов углерода). Эти шесть молекул 3-фосфоглицерата восстанавливаются до шести молекул глицеральдегид-3-фосфата (или дигидроксиацетонфосфата) с расходом шести ATP (при синтезе 1,3-бисфосфоглицерата) и шести NADPH (при восстановлении 1,3-бисфосфоглицерата до глицеральдегид-3-фосфата). Изозим глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, присутствующий в хлоропластах, может использовать $NADP^+$ в качестве переносчика электронов и обычно функционирует в направлении восстановления 1,3-бисфосфоглицерата. Цитозольный изозим использует NAD^+ как гликолитический фер-

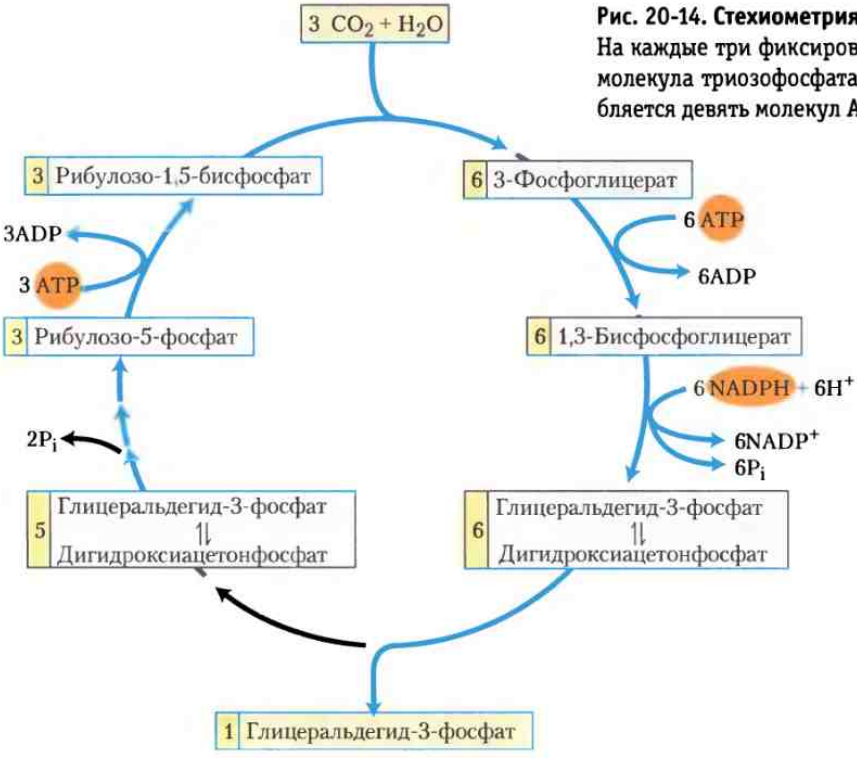


Рис. 20-14. Стехиометрия ассимиляции CO_2 в цикле Кальвина. На каждые три фиксированные молекулы CO_2 образуется одна молекула триозофосфата (глицеральдегид-3-фосфат) и потребляется девять молекул ATP и шесть молекул NADPH.

мент у животных и других эукариот — в темноте этот изозим работает в гликолизе, окисляя глицеральдегид-3-фосфат. Оба изозима глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, как все ферменты, катализируют реакцию в обоих направлениях.

Одна молекула глицеральдегид-3-фосфата является итоговым продуктом пути ассимиляции углерода. Другие пять молекул триозофосфата (15 атомов углерода) перегруппировываются (изображено на стадиях ①–⑨ рис. 20-10) с образованием трех молекул рибулозо-1,5-бисфосфата (15 атомов углерода). Последняя стадия требует одну молекулу ATP на одну молекулу рибулозо-1,5-бисфосфат, т. е. всего 3 ATP. В итоге, на каждую молекулу триозофосфата, полученную при фотосинтетической ассимиляции CO_2, приходится шесть NADPH и девять ATP.

NADPH и ATP производятся в светозависимых реакциях фотосинтеза примерно в том же соотношении (2 : 3), в котором они потребляются в цикле Кальвина. Девять молекул ATP превращаются в ADP и фосфат при синтезе молекулы триозофосфата; восемь фосфатов высвобождаются в виде P_i и конденсируются с восемью молекулами ADP, регенерируя ATP. Девятый фосфат включается в триозофосфат. Для превращения девятой молекулы ADP в ATP, как мы увидим дальше, фосфат должен быть импортирован из цитозоля.

В темноте синтез ATP и NADPH фотофосфорилированием, а также включение CO_2 в триозофосфаты (так называемые темновые реакции) прекращаются. «Темновые реакции» фотосинтеза были так названы для того, чтобы отличать их от *первичных* светоиндуцированных реакций электронного переноса к $NADP^+$ и синтеза ATP (см. гл. 19). Фактически, в темноте их скорости не значимы, таким образом, более подходящее название для них — **реакции ассимиляции углерода**. Позднее в этом разделе мы опишем регуляторные механизмы, которые включают ассимиляцию углерода на свету и выключают ее в темноте.

Строма хлоропластов содержит все ферменты, необходимые для превращения триозофосфатов (глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата), получающихся при ассимиляции CO_2 в крахмал, который временно хранится в хлоропласте в виде нерастворимых гранул. Альдолаза конденсирует триозы до фруктозо-1,6-бисфосфата; фруктозо-1,6-бисфосфатаза синтезирует фруктозо-6-фосфат; фосфогексозоизомераза образует глюкозо-6-фосфат; а фосфоглюко-

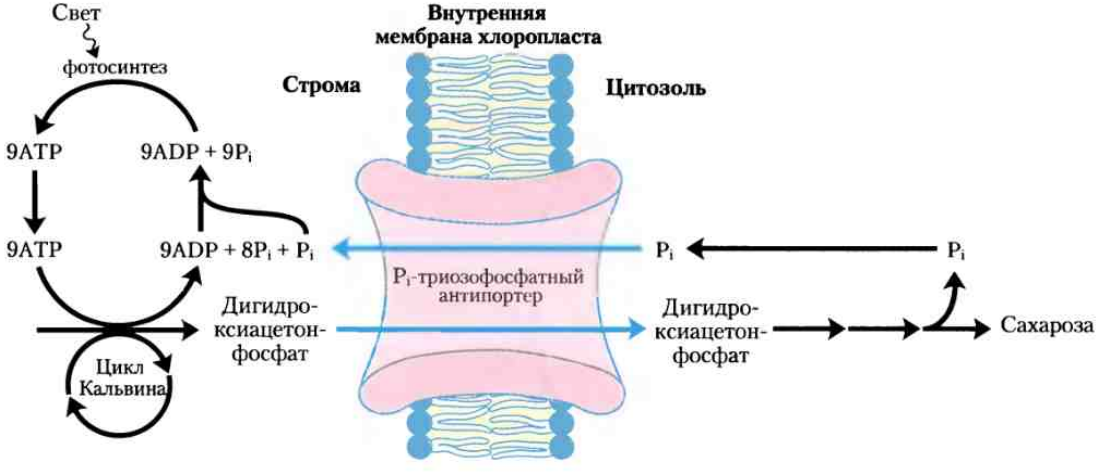


Рис. 20-15. P_i-триозофосфатная антипортерная система внутренней мембраны хлоропластов. Этот транспортер способствует обмену P_i из цитозоля на дигидроксиацетонфосфат стромы. Продукты фотосинтетической ассимиляции углерода перемещаются в цитозоль, где служат исходными веществами для биосинтеза сахарозы, а P_i, необходимый для фотофосфорилирования, перемещается в строму. Этот же антипортер может транспортировать 3-фосфоглицерат и участвовать в экспорте ATP и восстановительных эквивалентов (см. рис. 20-16).

мутаза производит глюкозо-1-фосфат, исходный материал в синтезе крахмала (см. разд. 20.3).

Все реакции цикла Кальвина, кроме катализируемых рубиско, седогептулозо-1,7-бисфосфатазой и рибулозо-5-фосфаткиназой, также происходят в животных тканях. Но без этих трех ферментов животные не могут осуществлять цепь превращений из CO_2 в глюкозу.

Транспортная система выводит триозофосфаты из хлоропласта и импортирует фосфат

Внутренняя мембрана хлоропластов не проницаема для многих фосфорилированных соединений, включая фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат и фруктозо-1,6-бисфосфат. Она содержит, однако, специфический антипортер, катализирующий обмен P_i с триозофосфатом дигидроксиацетонфосфатом или фосфоглицератом (**рис. 20-15**, см. также рис. 20-9). Этот антипортер одновременно перемещает фосфат в хлоропласт, где он используется в фотофосфорилировании, а триозофосфат в цитозоль, где он может идти на синтез сахарозы (именно в этой форме фиксированный углерод транспортируется в удаленные растительные ткани).

Синтез сахарозы в цитозоле и синтез крахмала в хлоропласте — главные пути, в которых потребляется избыток триозофосфата, получающийся при фотосинтезе. Синтез сахарозы (описанный ниже) высвобождает четыре фосфата P_i

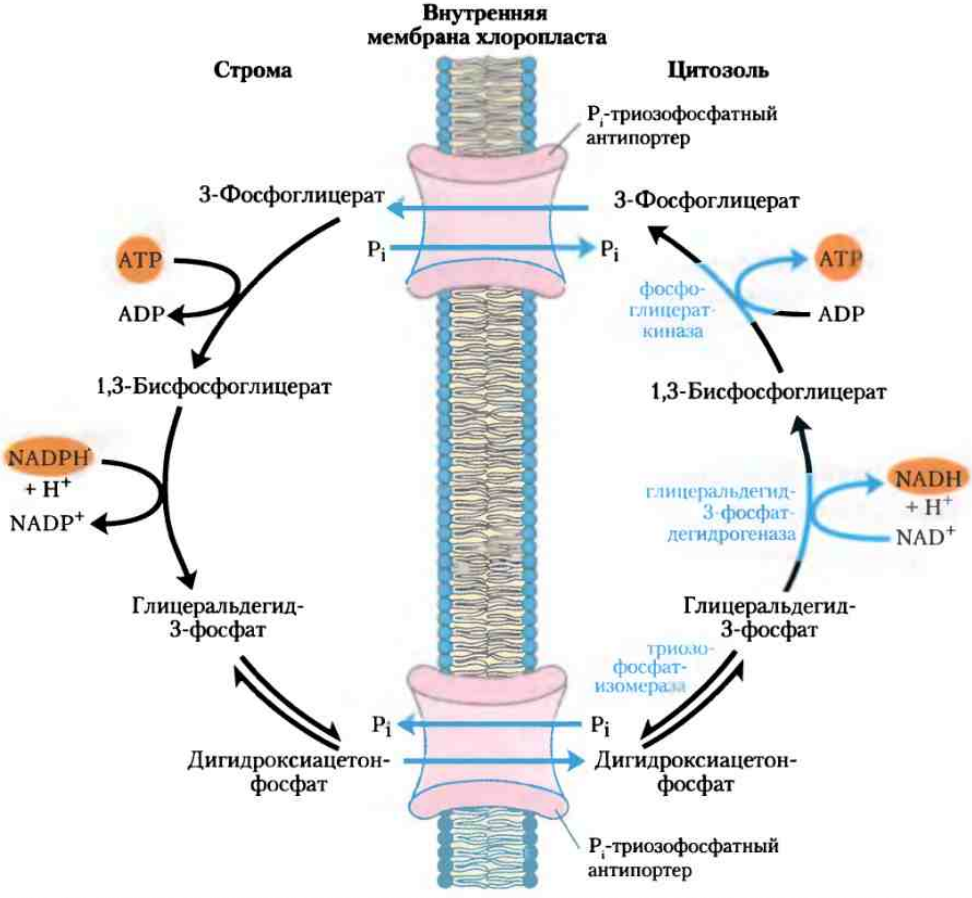


Рис. 20-16. Роль P_i-триозофосфатного антипортера в транспорте ATP и восстановительных эквивалентов. Дигидроксиацетонфосфат покидает хлоропласт и в цитозоле превращается в глицеральдегид-3-фосфат. Затем в результате проходящих в цитозоле глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной и фосфоглицераткиназной реакций образуются NADH, ATP и 3-фосфоглицерат. Возвращение 3-фосфоглицерата в хлоропласт и его восстановление до дигидроксиацетонфосфата завершают цикл, эффективно перемещающий ATP и восстановительные эквиваленты (NADH/NADPH) из хлоропласта в цитозоль.

из четырех триозофосфатов, необходимых для синтеза одной молекулы сахарозы. На каждую молекулу удаляемого триозофосфата в хлоропласт транспортируется один фосфат P_i, обеспечивая при регенерации АТР девятый P_i (упоминавшийся ранее). Если этот обмен блокировать, синтез триозофосфата быстро исчерпает доступный фосфат в хлоропласте, замедлив синтез АТР и подавив включение CO_2 в крахмал.

Эта P_i-триозофосфат-антипортерная система обладает дополнительной функцией. Для различных синтетических и энергозависимых реакций в цитозоле необходимы АТР и восстановительные эквиваленты. Пока еще неясно, в какой степени митохондрии пополняют этот запас, но второй потенциальный ресурс энергии — это АТР и NADPH, которые продуцируются в световых реакциях в строме хлоропласта. Однако ни АТР, ни NADPH не могут пересекать мембрану хлоропластов. На процессы транспорта влияет P_i-триозофосфат-антипортерная система, обеспечивая передвижение АТР и восстановительных эквивалентов из хлоропласта в цитозоль **(рис. 20-16)**. Дигидроксиацетонфосфат, синтезированный в строме, транспортируется в цитозоль, где гликолитическими ферментами превращается в 3-фосфоглицерат, в результате чего образуются АТР и NADH. 3-Фосфоглицерат возвращается в хлоропласт, замыкая цикл.

Четыре фермента цикла Кальвина косвенно активируются светом

Восстановительная ассимиляция CO_2 требует большого количества АТР и NADPH, и при освещении хлоропластов их концентрация в строме увеличивается **(рис. 20-17)**. Индуцированный светом транспорт протонов через тилакоидную мембрану (гл. 19) также увеличивает pH стромы от 7 до ~8, и это сопровождается утечкой Mg^{2+} из тилакоидного пространства в строму, увеличивая концентрацию Mg^{2+} от 1–3 мМ до 3–6 мМ. Эволюция некоторых стромальных ферментов привела к тому, что они активируются при освещении, когда АТР и NADPH легко доступны. Ферменты также более активны в щелочной среде и при высокой концентрации Mg^{2+}. Например, активация рубиско благодаря образованию карбамоиллизина происходит быстрее при щелочном pH, а высокая стромальная концентрация Mg^{2+} благоприятствует образованию ферментативно активного магниевого комплекса. Фруктозо-1,6-бисфосфатаза требует наличия Mg^{2+} и сильно зависит от pH **(рис. 20-18)**; ее активность увеличивается более чем в 100 раз, когда pH и концентрация Mg^{2+} возрастают при освещении хлоропластов.

Четыре фермента цикла Кальвина являются предметом особого типа регуляции светом. Рибулозо-5-фосфаткиназа, фруктозо-1,6-бисфосфатаза, седогептулозо-1,7-бисфосфатаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа активируются путем восстановления дисульфидных связей между двумя остатками Cys, что необходимо для их каталитической активности, наступающей при освещении. Когда остатки Cys связаны дисульфидной связью (окислены), ферменты неактивны; так обычно происходит в темноте. При освещении электроны транспортируются из фотосистемы I к ферредоксину (см. рис. 19-56),

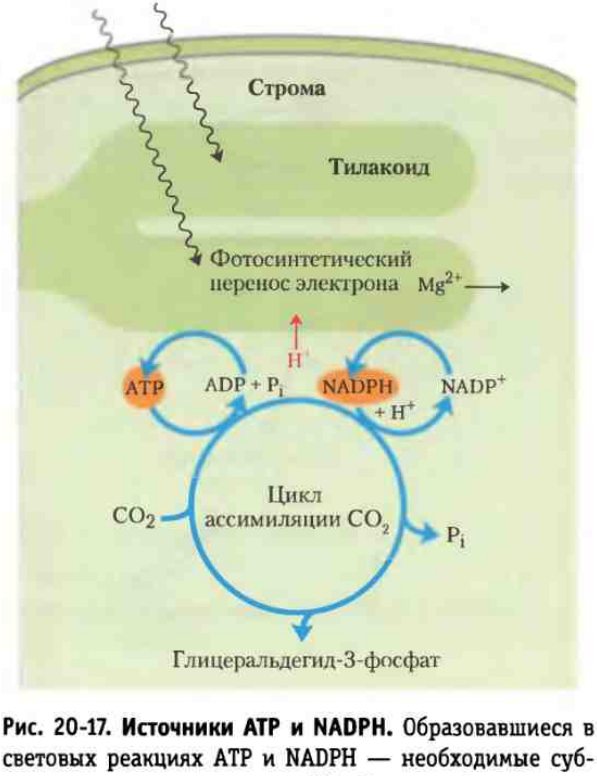


Рис. 20-17. Источники АТР и NADPH. Образовавшиеся в световых реакциях АТР и NADPH — необходимые субстраты для восстановления CO_2. Реакции фотосинтеза, в результате которых образуются АТР и NADPH, сопровождаются переносом протонов (показаны красным) из стромы в тилакоид, создавая в строме щелочные условия. Ионы магния проходят из тилакоида в строму, увеличивая в строме концентрацию Mg^{2+}.

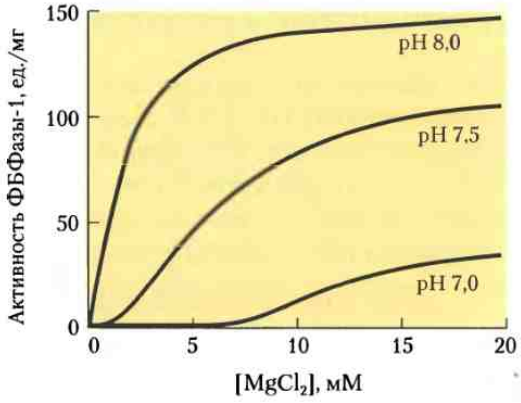


Рис. 20-18. Активация фруктозо-1,6-бисфосфатазы хлоропластов. Неактивная фруктозо-1,6-бисфосфатаза (ФБФаза-1) активируется светом при высоких значениях pH и высокой концентрации Mg^{2+} в строме, которые возрастают при освещении.

который передает электроны на небольшой, водорастворимый, содержащий дисульфидные связи белок, называемый **тиоредоксином (рис. 20-19)**, в реакции, катализируемой **ферредоксин-тиоредоксинредуктазой**. Восстановленный тиоредоксин переносит электроны на дисульфидные связи светоактивируемых ферментов, и эти восстановительные реакции разрыва связей сопряжены с конформационными изменениями, в результате которых увеличиваются активности ферментов. В сумеречных условиях остатки Cys этих четырех ферментов снова окисляются до дисульфидных форм и ферменты инактивируются, а АТР не тратится в ассимиляции CO_2. Вместо этого крахмал, синтезированный и запасенный в дневное время суток, расщепляется на мономеры, которые ночью служат топливом в гликолизе.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, первый фермент в *окислительном* пентозофосфатном пути, также регулируется этим управляемым светом механизмом, но в обратную сторону. В течение дня, когда в процессе фотосинтеза производится много NADPH, этот фермент не нужен для образования NADPH. Фермент инактивирует восстановление ключевой дисульфидной связи электронами от ферредоксина.

Краткое содержание раздела 20.1 ФОТОСИНТЕЗ УГЛЕВОДОВ

- У сосудистых растений фотосинтез происходит в хлоропластах. В реакциях ассимиляции CO_2 (цикле Кальвина) АТР и NADPH используются для восстановления CO_2 до триозофосфатов. Эти реакции происходят в три стадии: собственно реакция фиксации, катализируемая рубиско; восстановление образовавшегося 3-фосфоглицерата до глицеральдегид-3-фосфата; и регенерация рибулозо-1,5-бисфосфата из триозофосфатов.

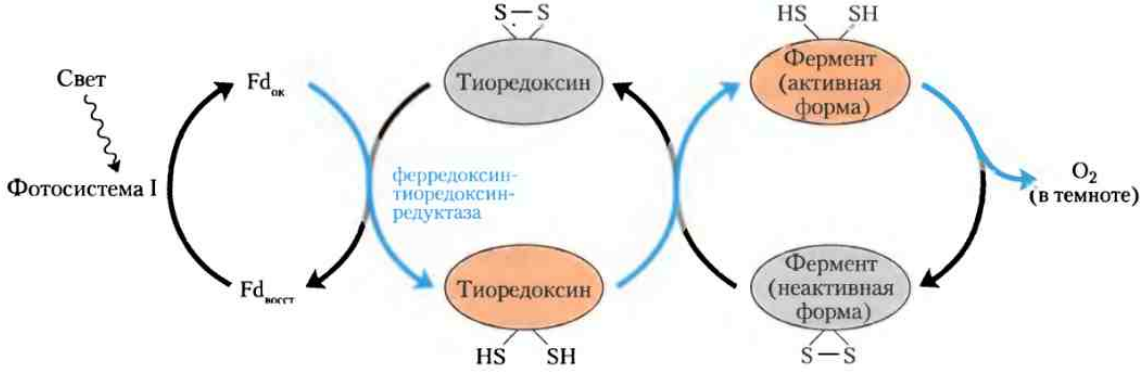


Рис. 20-19. Световая активация некоторых ферментов цикла Кальвина. Световая активация опосредуется тиоредоксином, небольшим белком, содержащим дисульфидные связи. На свету тиоредоксин восстанавливается электронами, движущимися из фотосистемы I через ферредоксин (Fd) (синие стрелки), затем тиоредоксин восстанавливает ключевые дисульфидные связи каждого из ферментов: седогептулозо-1,7-бисфосфатазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, рибулозо-5-фосфаткиназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, активируя эти ферменты. В темноте –SH-группы вновь подвергаются окислению до дисульфидных связей, что инактивирует ферменты.

- Рубиско конденсирует CO_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом, образуя неустойчивый гексозобисфосфат, который распадается на две молекулы 3-фосфоглицерата. Рубиско активируется путем ковалентной модификации (карбамоилированием Lys^{201}), катализируемой рубиско-активазой, и ингибируется природным аналогом переходного состояния, концентрация которого возрастает в темноте и уменьшается в дневное время суток.

- Стромальные изозимы гликолитических ферментов катализируют восстановление 3-фосфоглицерата до глицеральдегид-3-фосфата; на восстановление каждой молекулы 3-фосфоглицерата тратится одна молекула ATP и одна молекула NADPH.

- Стромальные ферменты, включая транскетолазу и трансальдолазу, перестраивают углеродный скелет триозофосфатов, синтезируя интермедиаты из трех, четырех, пяти, шести и семи атомов углерода, и в итоге образуют пентозофосфаты. Пентозофосфаты превращаются в рибулозо-5-фосфат, который затем фосфорилируется до рибулозо-1,5-бисфосфат для завершения цикла Кальвина.

- «Стоимость» трех фиксированных в триозофосфате CO_2 — девять молекул ATP и шесть молекул NADPH, которые синтезируются в световых реакциях фотосинтеза.

- Антипортер во внутренней мембране хлоропласта обменивает P_i из цитозоля на 3-фосфоглицерат или дигидроксиацетонфосфат, образующиеся в строме в процессе ассимиляции CO_2. При окислении дигидроксиацетонфосфата в цитозоле образуются ATP и NADH; таким образом, ATP и восстановительные эквиваленты из хлоропласта перемещаются в цитозоль.

- Четыре фермента цикла Кальвина косвенно активируются светом; они неактивны в темноте, поэтому синтез гексоз не конкурирует с гликолизом, который необходим для получения энергии в темноте.

20.2. Фотодыхание, C_4- и CAM-пути

Как мы видели, в фотосинтезирующих клетках в световых реакциях (гл. 19) образуется O_2 (из H_2O), а в светонезависимых реакциях потребляется CO_2, поэтому при фотосинтезе происходит изменение газового состава окружающей среды — поглощение CO_2 и высвобождение O_2.

$$CO_2 + H_2O \rightarrow O_2 + (CH_2O)$$

В темноте растения осуществляют также **митохондриальное дыхание** — окисление субстратов до CO_2 и восстановление O_2 до H_2O. Однако у растений происходит и другой процесс, при котором, как и при митохондриальном дыхании, потребляется O_2 и выделяется CO_2, и который, как фотосинтез, управляется светом. Этот процесс **фотодыхания** — дорогостоящая реакция фотосинтеза по причине недостаточной специфичности фермента рубиско. В следующем разделе мы опишем эту побочную реакцию и стратегии, которые используются растениями для минимизации ее метаболических последствий.

Фотодыхание — следствие оксигеназной активности рубиско

Рубиско не имеет абсолютной специфичности в отношении CO_2 как субстрата. Молекулярный кислород (O_2) конкурирует с CO_2 за активный центр, и через каждые три–четыре оборота рубиско катализирует одну конденсацию O_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием 3-фосфоглицерата и **2-фосфогликолата (рис. 20-20)**, метаболически бесполезного продукта. В этом и проявляется оксигеназная активность этого фермента, которая отражена в его полном названии: рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа. В результате реакции с O_2 не происходит фиксации углерода, и в итоге такая реакция оказывается обузой для клетки; усвоение атомов углерода из 2-фосфогликолата требует от клетки много энергии и высвобождает некоторое количество ранее фиксированного углекислого газа.

Если реакция с кислородом вредна для организма, то почему же в ходе эволюции активный центр рубиско не «научился» различать O_2 и CO_2? Возможно, большинство эволюционных изменений фермента произошла около 2,5 млрд лет

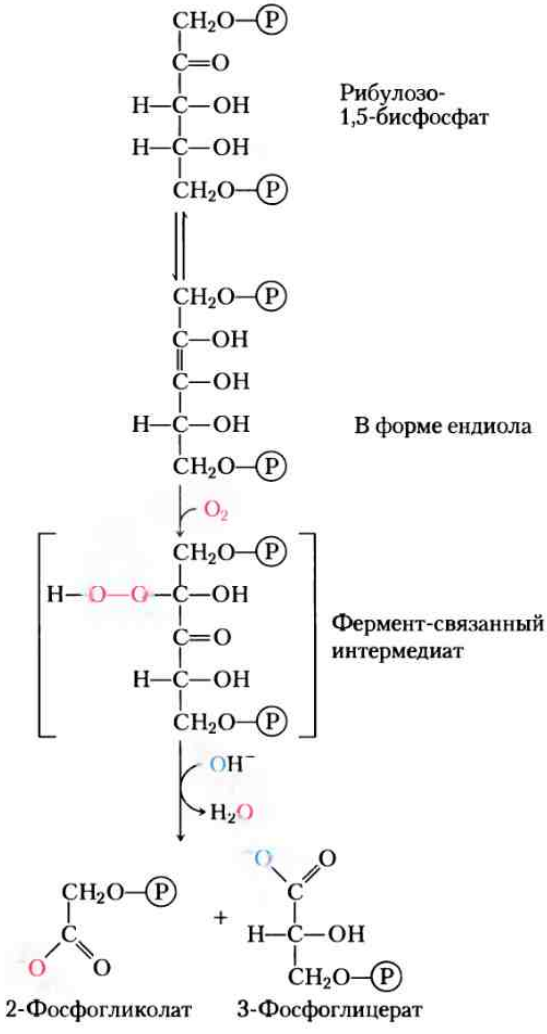


Рис. 20-20. Оксигеназная активность рубиско. Рубиско может включать O_2 вместо CO_2 в рибулозо-1,5-бисфосфат. Образующийся нестабильный интермедиат распадается на 2-фосфогликолат (он перерабатывается, как показано на рис. 20-21) и 3-фосфоглицерат, который может включаться в цикл Кальвина.

назад, еще до того времени, как фотосинтезирующие организмы начали повышать содержание кислорода в атмосфере, т. е. это было тогда, когда рубиско не требовалось различать O_2 и CO_2. Для CO_2 константа Михаэлиса $K_M \approx 9$ мкМ, для O_2 $K_M \approx 350$ мкМ. В нашей атмосфере около 20% O_2 и только 0,04% CO_2, в воде, находящейся в равновесии с атмосферным воздухом при комнатной температуре, концентрации этих газов составляют ~250 мкМ O_2 и ~11 мкМ CO_2; такие концентрации способствуют «фиксации» O_2 с помощью рубиско и, следовательно, вызывает значительные затраты энергии. Температурная зависимость относительной растворимости O_2 и CO_2 ($[O_2] / [CO_2]$) круто возрастает при высоких температурах. Кроме того, сродство рубиско к CO_2 уменьшается с увеличением температуры, усиливая вероятность катализа расточительной оксигеназной реакции. А так как CO_2 потребляется в реакциях ассимиляции, соотношение между O_2 и CO_2 в воздушном пространстве, которое окружает листья, увеличивается, что еще больше способствует оксигеназной реакции.

Усвоение фосфоглицерата обходится клетке весьма дорого

Гликолатный путь осуществляет превращение двух молекул 2-фосфогликолата в молекулу серина (3 атома углерода) и молекулу CO_2 **(рис. 20-21)**. В хлоропласте фосфатаза переводит 2-фосфогликолат в гликолат, который экспортируется в пероксисому. Там гликолат окисляется молекулярным кислородом, и получившийся альдегид (глиоксилат) подвергается трансаминированию с образованием глицина. В качестве побочного продукта реакции окисления гликолата образуется пероксид водорода, который распадается под действием пероксидазы пероксисомы. Глицин транспортируется из пероксисомы в митохондрию, где подвергается окислительному декарбоксилированию под действием глициндекарбоксилазного комплекса. Этот фермент похож по структуре и механизму действия на митохондриальные ферменты, с которыми мы уже сталкивались: пируватдегидрогеназный и α-кетоглутаратдегидрогеназный комплексы (гл. 16). **Глициндекарбоксилазный комплекс** окисляет глицин до CO_2 и NH_3 с одновременным восстановлением NAD^+ до NADH и переносом оставшегося атома углерода от глицина на кофактор тетрагидрофолат **(рис. 20-22)**. Получившаяся одноуглеродная единица затем переносится серин-гидроксиметилтрансферазой, синтезирующей серин, с тетрагидрофолата на второй глицин. Итоговая реакция, катализируемая глициндекарбоксилазным комплексом и серин-гидроксиметилтрансферазой приведена ниже.

$$2\ \text{Глицин} + NAD^+ + H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{серин} + CO_2 + NH_3 + NADH + H^+$$

Затем серин превращается в гидроксипируват, далее в глицерат и в конце концов в 3-фосфоглицерат, который используется для регенерации

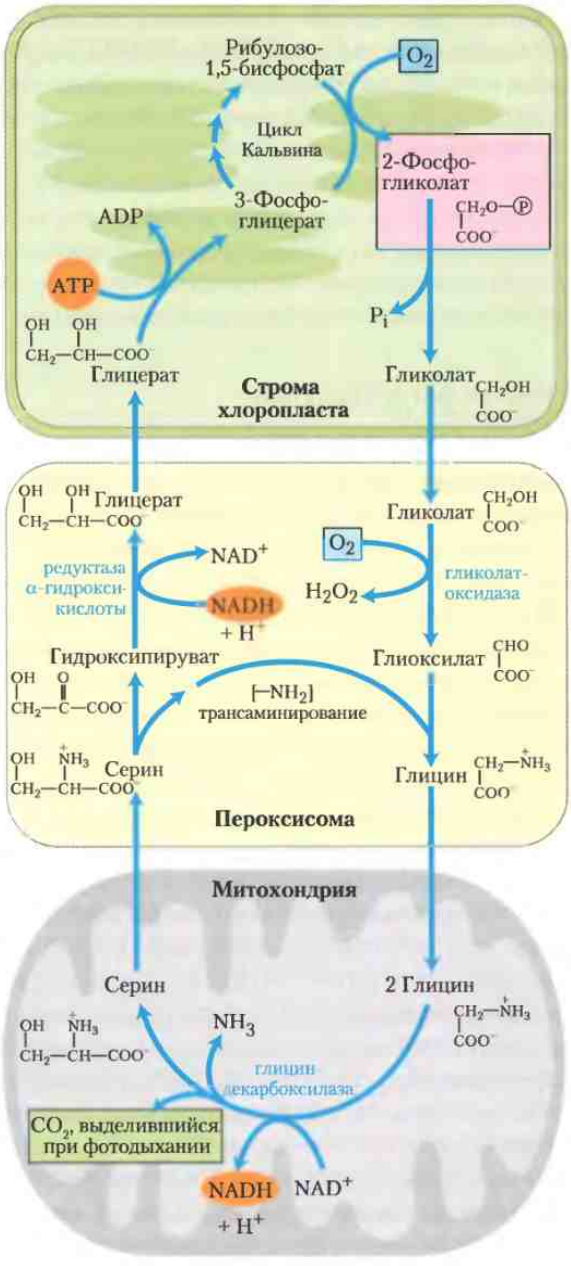


Рис. 20-21. Гликолатный путь. Путь усвоения 2-фосфоглицерата (выделен розовым) через его превращение в серин и в конечном счете в 3-фосфоглицерат, в котором участвуют три компартмента клетки. Гликолат, образующийся при дефосфорилировании 2-фосфогликолата в хлоропластах, окисляется в пероксисомах до глиоксилата и затем трансаминируется до глицина. В митохондриях две молекулы глицина конденсируются с образованием серина, и CO_2 высвобождается в процессе фотодыхания (выделен зеленым). Эта реакция катализируется глициндекарбоксилазой, ферментом, присутствующим в высоких концентрациях в митохондриях C_3-растений (см. текст). Серин превращается в гидроксипируват и затем в глицерат в пероксисомах; глицерат попадает в хлоропласты, фосфорилируется и включается в цикл Кальвина. Кислород (окрашен голубым) потребляется в процессе фотодыхания в две стадии.

рибулозо-1,5-бисфосфата, завершая этот длинный «дорогой» цикл (рис. 20-21).

При ярком солнечном свете утечка через гликолатный путь может быть очень высокой. Растение производит таким способом в 5 раз больше CO_2, чем обычно образуется в результате всех окислительных реакций в цикле трикарбоновых кислот. Для обеспечения этого потока митохондрии растений содержат потрясающе огромное количество глициндекарбоксилазного комплекса: в листьях гороха и шпината четыре белка этого комплекса составляют *половину* всех белков митохондриального матрикса! В нефотосинтезирующих частях растения, таких как картофельные клубни, митохондрии содержат глициндекарбоксилазный комплекс в очень низкой концентрации.

Совместная активность рубиско-оксигеназы и гликолатного пути потребляет O_2 и производит CO_2 — откуда и название **фотодыхание**. Возможно, этот путь лучше назвать **цикл фотосинтетического окисления углерода** или **C_2-путь**; эти названия не вызывают ассоциации с дыханием в митохондрии. В отличие от митохондриального дыхания фотодыхание не сохраняет энергию и может ингибировать образование чистой биомассы почти на 50%. Эта неэффективность ведет к эволюционным адаптациям, особенно у растений, которые развиваются в теплом климате.

У C_4-растений фиксация CO_2 и активность рубиско пространственно разделены

У многих растений, которые растут в тропиках, а также теплолюбивых культур, происходящих из тропиков, таких как кукуруза, сахарный тростник и сорго, развился механизм, благодаря которому они избегают проблемы невыгодного фотодыхания. Стадии включения CO_2 в трехуглеродный 3-фосфоглицерат предшествует несколько стадий, в том числе временная фиксация CO_2 в четырехуглерод-

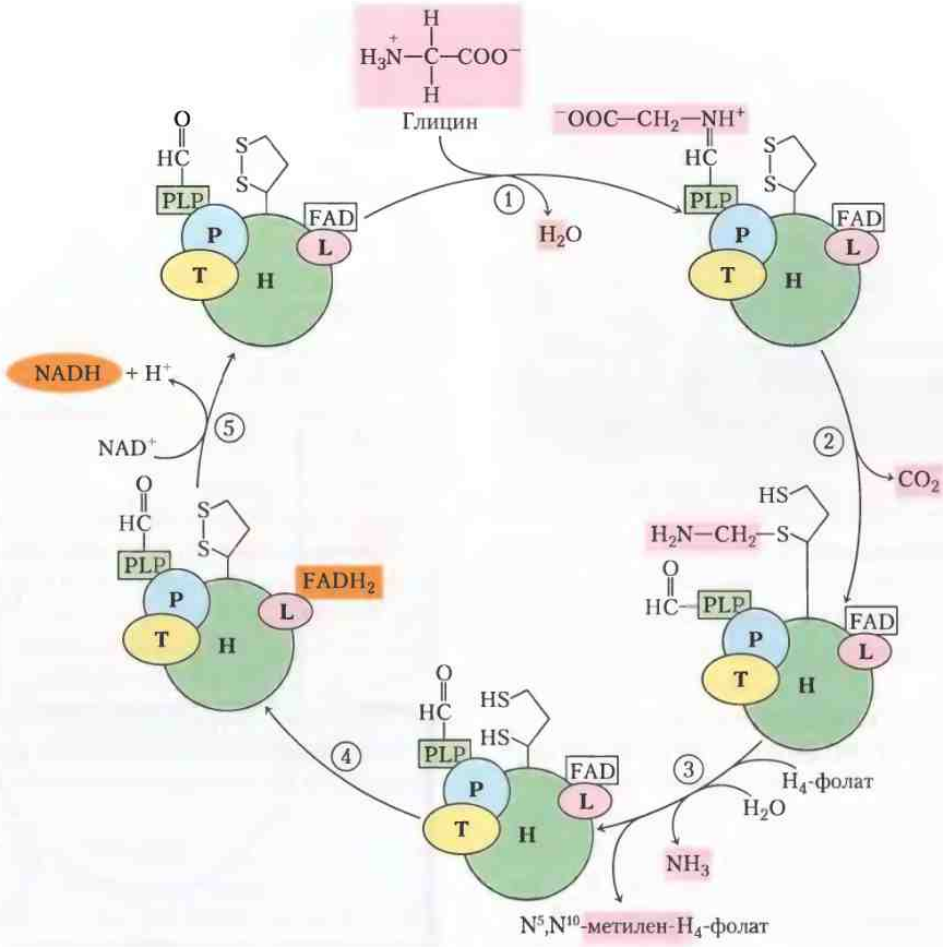
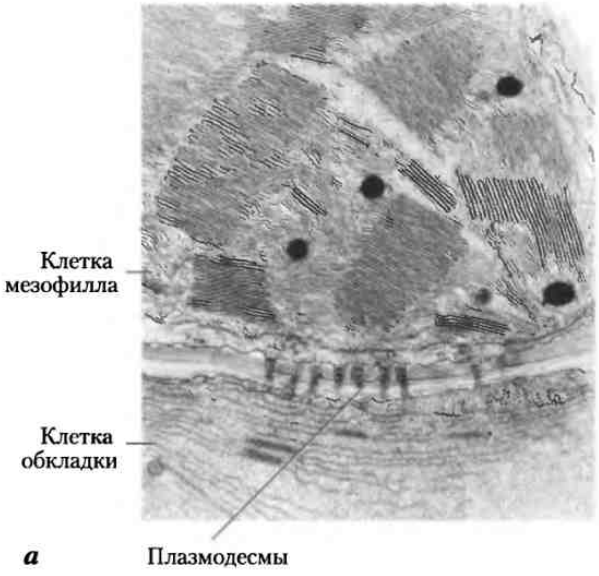


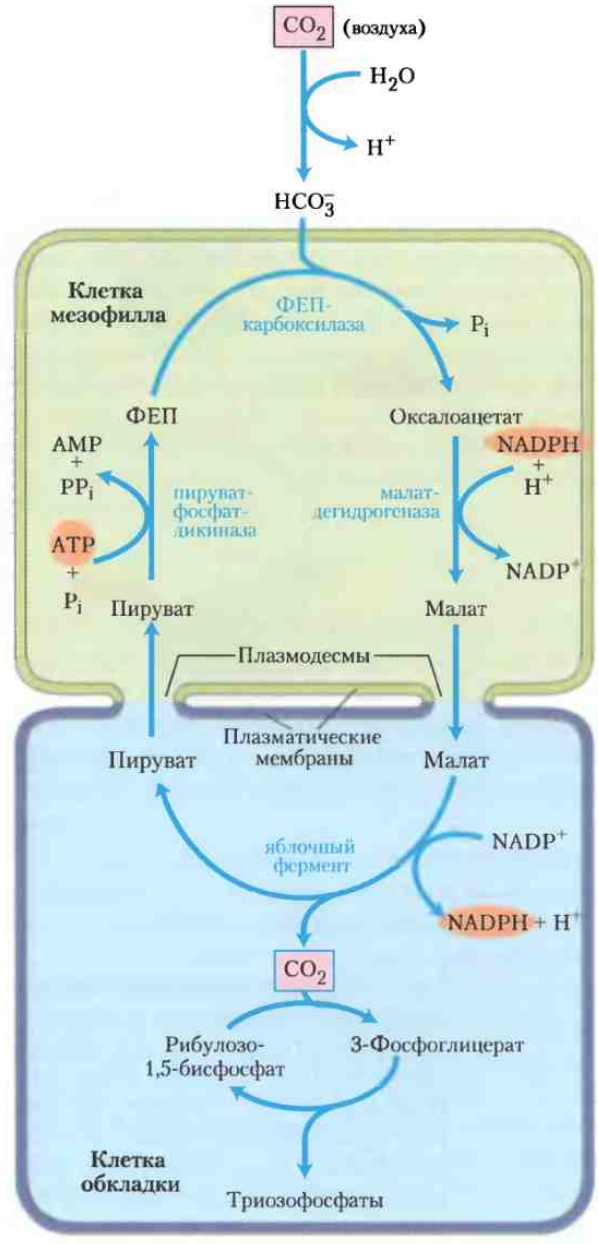
Рис. 20-22. Глициндекарбоксилазная система. Глициндекарбоксилаза митохондрий растений представляет собой комплекс из четырех типов субъединиц со стехиометрией $P_4H_{27}T_9L_2$. С белком H ковалентно связан остаток липоевой кислоты, которая может подвергаться обратимому окислению. ① — образование шиффова основания между пиридоксальфосфатом (PLP от англ. *pyridoxal phosphate*) и глицином, катализируемое белком P (названным так потому, что он образует связь с PLP). ② — белок P катализирует окислительное декарбоксилирование глицина, высвобождая CO_2; оставшаяся группа метиламина связана с одной из –SH-групп восстановленной липоевой кислоты. ③ — белок T (который использует тетрагидрофолат (H_4F) в качестве кофактора) высвобождает NH_3 из метиламина и переносит оставшийся одноуглеродный фрагмент на тетрагидрофолат, образуя N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат. ④ — белок L окисляет две –SH-группы липоевой кислоты до дисульфидной связи, ⑤ передавая электроны через FAD на NAD^+ и завершая таким образом цикл. N^5,N^{10}-Метилентетрагидрофолат, образованный в этом процессе, используется серин-гидроксиметилтрансферазой для превращения молекулы глицина в серин, в результате регенерируется тетрагидрофолат, необходимый для реакции, катализируемой белком T. L-Субъединица глициндекарбоксилазы идентична дигидролипоилдегидрогеназе (E_3) пируватдегидрогеназы и α-кетоглутаратдегидрогеназы (см. рис. 16-6).

ное соединение. Растения, использующие этот путь, называются **C_4-растениями**, а сам процесс ассимиляции — **C_4-метаболизмом**, или **C_4-путем**. Растения, которые фиксируют CO_2 по пути, где на *первой стадии происходит* реакция конденсация CO_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием 3-фосфоглицерата, называются **C_3-растениями**.

C_4-Растения обычно развиваются при большой интенсивности света и высокой температу-



а



б

Рис. 20-23. Ассимиляция углерода у C_4-растений. В растениях тропических районов преобладает C_4-путь, проходящий в клетках мезофилла и клетках обкладки. *а* — электронная микрофотография, показывающая хлоропласты мезофилла и прилегающих клеток обкладки. Клетки обкладки содержат гранулы крахмала. Видны плазмодесмы, соединяющие две клетки. *б* — C_4-путь ассимиляции CO_2, который происходит с участием четырехуглеродного интермедиата.

ре. Их отличает несколько важных характеристик: высокая скорость фотосинтеза, большая скорость роста, низкий уровень фотодыхания, малая скорость потери влаги и специализированная структура листа. В листьях C_4-растений в фотосинтезе участвуют два типа клеток: мезофилл и клетки обкладки (**рис. 20-23, *а***). Существуют три варианта C_4-метаболизма, расшифрованные в 1960-х гг. Маршаллом Хэтчем и Роджером Слэком (рис. 20-23, *б*).

У тропических растений первый интермедиат, в который включается $^{14}CO_2$, — четырехуглеродное соединение оксалоацетат. Эта реакция происходит в цитозоле клеток мезофилла листьев и катализируется **фосфоенолпируват-карбоксилазой**, субстратом для которой служит

HCO_3^-, а не CO_2. Затем оксалоацетат либо восстанавливается до малата с расходом NADPH (см. рис. 20-26, *б*), либо превращается в аспартат в реакции трансаминирования:

Оксалоацетат + α-аминокислота →
→ L-аспартат + α-кетокислота

Малат или аспартат, синтезированный в клетках мезофилла, проникает в соседние клетки обкладки через плазмодесмы — образованные белками каналы, которые соединяют две растительные клетки и осуществляют движение метаболитов и даже малых белков между клетками. В клетках обкладки малат окисляется и декарбоксилируется с образованием пирувата и CO_2 под действием **NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы** (иногда называемой **малик-ферментом**, или **яблочным ферментом**) с восстановлением $NADP^+$. У растений, использующих аспартат в качестве переносчика CO_2, аспартат, поступивший в клетки обкладки, трансаминируется с образованием оксалоацетата и восстанавливается до малата, после чего CO_2 высвобождается малатдегидрогеназой или ФЕП-карбоксикиназой. Как показали эксперименты с образцами, меченными ^{14}C, молекула CO_2, высвобождающаяся в клетках обкладки, — это та же самая молекула CO_2, которая изначально находилась в оксалоацетате в клетках мезофилла. Эта молекула CO_2 снова фиксируется, теперь с помощью рубиско, в той же самой реакции, которая происходит у C_3-растениях: происходит включение CO_2 в положение C-1 молекулы 3-фосфоглицерата.

Пируват, образовавшийся при декарбоксилировании малата в клетках обкладки, транспортируется обратно, в клетки мезофилла, где превращается в фосфоенолпируват в необычной реакции, катализируемой **пируват-фосфатдикиназой** (рис. 20-23, *б*). Этот фермент называется дикиназой, потому что он, используя одну молекулу АТР, одновременно фосфорилирует две разные молекулы: пируват до фосфоенолпирувата и фосфат до пирофосфата. Впоследствии пирофосфат гидролизуется до фосфата, поэтому получается, что для регенерации фосфоенолпирувата используются две высокоэнергетические фосфатные группы АТР. Теперь этот фосфоенолпируват готов для включения следующей молекулы CO_2 в клетки мезофилла.

ФЕП-карбоксилаза имеет высокое сродство к HCO_3^- (который в водном окружении образуется из CO_2) и фиксирует CO_2 более эффективно, чем рубиско. В отличие от рубиско этот фермент не использует O_2 в качестве альтернативного субстрата, поэтому в этой реакции нет конкуренции между CO_2 и O_2. Таким образом, ФЕП-карбоксилазная реакция служит для фиксации CO_2 в форме малата. Высвобождением CO_2 из малата в клетках обкладки достигается высокая локальная концентрация углекислого газа для функционирования рубиско с почти максимальной скоростью и подавления ее оксигеназной активности.

В клетках обкладки CO_2 включается в 3-фосфоглицерат, поэтому другие реакции цикла Кальвина происходят так, как было описано ранее. Таким образом, у C_4-растений клетки мезофилла осуществляют ассимиляцию CO_2 по C_4-пути, а клетки обкладки синтезируют крахмал и сахарозу по C_3-пути.

В C_4-пути три фермента, которые регулируются светом, становятся более активными в дневное время суток. Малатдегидрогеназа активируется через тиоредоксин-зависимый восстановительный механизм, показанный на рис. 20-19; ФЕП-карбоксилаза активируется фосфорилированием серинового остатка; а пируват-фосфатдикиназа активируется дефосфорилированием. В последних двух случаях детали инициации светом процессов фосфорилирования или дефосфорилирования неизвестны.

У C_4-растений путь ассимиляции CO_2 энергетически более дорогой, чем у C_3-растений. На каждую молекулу CO_2, ассимилированную в C_4-пути, должна регенерироваться молекула ФЕП с затратой двух высокоэнергетических фосфатных групп АТР. Таким образом, C_4-растениям необходимо пять молекул АТР на ассимиляцию одной молекулы CO_2, в то время как C_3-растениям надо только три молекулы АТР (девять АТР на один триозофосфат). Однако при увеличении температуры (и уменьшении сродства рубиско к CO_2, как было замечено ранее) достигаются условия (около 28–30 °C), при которых выгода устранения фотодыхания значительно превосходит энергетические траты. C_4-Растения (например, сорняк росичка кровяная) в течение лета обгоняет в росте большинство C_3-растений, что может подтвердить любой опытный садовод.

У САМ-растений фиксация CO_2 и активность рубиско разделены во времени

Суккулентные растения, такие как кактусы и ананас, которые в природе произрастают в очень жарком и очень засушливом климате, осуществляют другой вариант фотосинтетической фиксации CO_2, уменьшающий потери воды через устьица, через которые CO_2 и O_2 должны попадать в ткань листа. Вместо пространственного разделения процессов начального захвата CO_2 и его фиксации рубиско (как это делают C_4-растения) они разобщают эти процессы во времени. Ночью, когда воздух холоднее и более влажный, устьица открыты и пропускают CO_2, который затем фиксируется на оксалоацетате ФЕП-карбоксилазой. Оксалоацетат восстанавливается до малата и запасается в вакуолях с целью защиты ферментов цитозоля и пластид от низких значений pH, возникающих из-за диссоциации яблочной кислоты. В дневное время устьица закрыты, что предотвращает потерю воды, которая происходила бы из-за высоких дневных температур, и углерод, включенный ночью в малат, высвобождается NADP-зависимой малатдегидрогеназой в виде CO_2. Этот CO_2 далее вовлекается ферментом рубиско в цикл Кальвина. Так как этот метод фиксации CO_2 впервые был открыт в многолетних толстянковых растениях из семейства *Crassulaceae*, он был назван ***c**rassulacean **a**cid **m**etabolism* (САМ-метаболизм), а соответствующие растения названы **САМ-растениями**.

Краткое содержание раздела 20.2 ФОТОДЫХАНИЕ, C_4- и САМ-ПУТИ

- Когда рубиско использует в качестве субстрата O_2, а не CO_2, образующийся 2-фосфогликолат распадается по кислород-зависимому пути. В результате увеличивается расход O_2 — фотодыхание, или, более правильно, цикл фотосинтетического окисления углерода или C_2-путь. 2-Фосфогликолат превращается в глиоксилат, затем в глицин, а после этого в серин под действием ферментов стромы хлоропластов, пероксисом и митохондрий.
- У C_4-растений путь ассимиляции углерода сводит к минимуму возможность фотодыхания: в клетках мезофилла CO_2 включается в четырехуглеродное соединение, которое попадает в клетки обкладки и высвобождает CO_2 в высоких концентрациях. Свободный CO_2 фиксируется рубиско и другие реакции цикла Кальвина происходят так же, как и у C_3-растений.
- У САМ-растений в темноте CO_2 соединяется с малатом и хранится в вакуолях до наступления дня, когда устьица закрыты (для уменьшения потери влаги), и малат становится источником CO_2 для рубиско.

20.3. Биосинтез крахмала и сахарозы

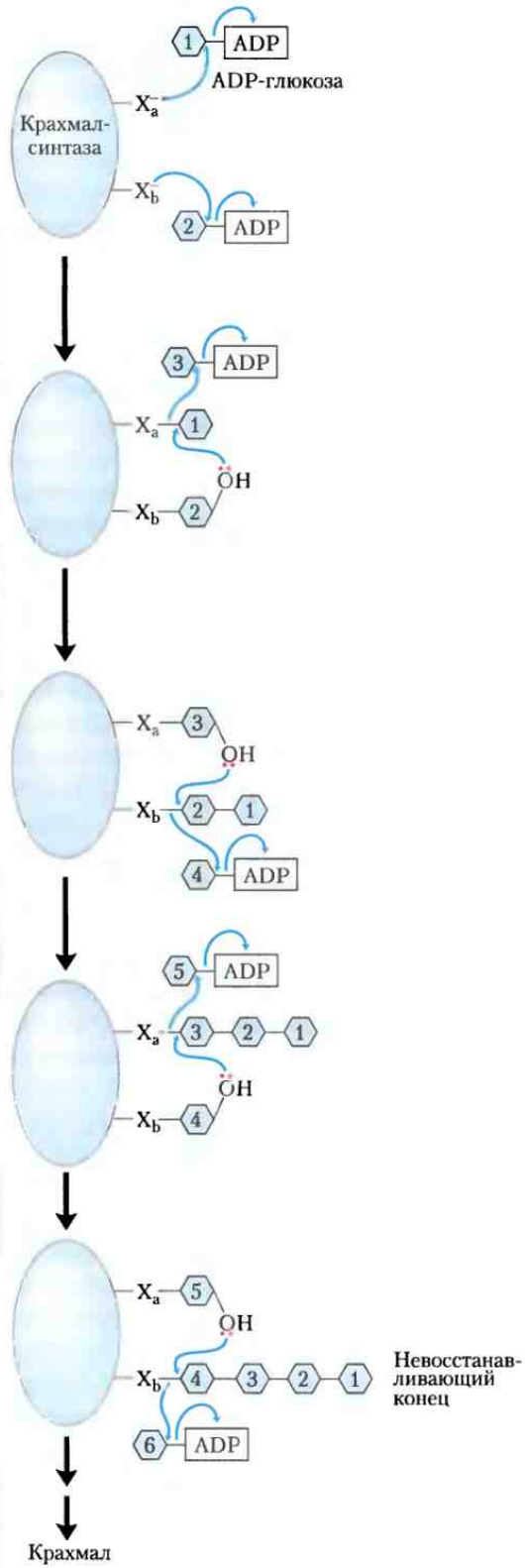
При активном фотосинтезе на ярком свете в листьях растений синтезируется больше углеводов (триозофосфатов), чем нужно для получения энергии или предшественников в реакциях синтеза. Излишек превращается в сахарозу и транспортируется в другие части растения для использования в качестве топлива или для хранения. У большинства растений крахмал — главное запасаемое вещество, но у некоторых растений, таких как сахарная свекла или сахарный тростник, главным запасаемым веществом служит сахароза. Синтез сахарозы и крахмала происходит в разных отделах клетки (в цитозоле и пластидах соответственно), и эти процессы управляются различными регуляторными механизмами, которые чувствительны к изменениям интенсивности света и скорости фотосинтеза.

ADP-глюкоза — субстрат для синтеза крахмала в пластидах растений и гликогена у бактерий

Крахмал, как и гликоген, — высокомолекулярный полимер D-глюкозы с $\alpha(1\rightarrow4)$-связью. В качестве одного из стабильных конечных продуктов фотосинтеза он синтезируется для временного хранения в хлоропластах, а для запасания (на длительные сроки) он производится в нефотосинтезирующих частях растения — семенах, корнях и клубнях (подземных стеблях).

Механизм вовлечения глюкозы в синтез крахмала похож на аналогичный механизм при синтезе гликогена. В результате конденсации глюкозо-1-фосфата с ATP в реакции, равновесие в которой в присутствии неоргани-

Рис. 20-24. Синтез крахмала. Согласно представленной модели, синтез крахмала происходит с участием двух активных центров и ADP-глюкозы в качестве донора гликозила. Два идентичных активных центра в крахмалсинтазе по очереди присоединяют единицы глюкозы к растущей цепи по восстанавливающему концу.



Оба активных центра (X_a, X_b) крахмалсинтазы нуклеофильно атакуют молекулу ADP-глюкозы, отщепляют ADP и образуют ковалентные связи с С-1 глюкозных остатков.

Связь, образованная первым глюкозным остатком с X_a, подвергается нуклеофильной атаке гидроксилом –OH при С-4 второго глюкозного остатка, находящегося в X_b. Образуется α(1→4)-дисахарид — связь с центром X_b. Освободившийся центр X_a реагирует со следующей молекулой ADP-глюкозы, присоединяя третий остаток глюкозы.

Гидроксил при С-4 третьего остатка глюкозы реагирует с X_b на связи с дисахаридом — образующийся трисахарид связан теперь с X_a. Свободный X_a присоединяет четвертый остаток глюкозы.

Гидроксил при С-4 четвертого остатка глюкозы реагирует с X_a, образуя тетрасахарид, который ковалентно связан с X_b своим восстанавливающим концом.

При многократном повторении этой последовательности реакций образуется длинный олигосахарид, рост цепи которого происходит при восстанавливающем конце, присоединяющемся по очереди то к X_a, то к X_b. Цепь отщепляется от крахмалсинтазы, когда достигает необходимой длины.

ческой пирофосфатазы сильно сдвинута вправо (с. 38), образуется активированный **сахаронуклеотид**, в данном случае **ADP-глюкоза**. Затем **крахмалсинтаза** переносит остаток глюкозы с ADP-глюкозы на уже существующую молекулу крахмала. Хотя ранее считалось, что глюкоза присоединяется к *невосстанавливающему* концу крахмала, как и в синтезе гликогена (см. рис. 15-30), сейчас появились данные о том, что крахмалсинтаза имеет два эквивалентных активных центра, которые по очереди присоединяют гликозильный остаток к *восстанавливающему* концу крахмала. Этот конец остается ковалентно связанным с ферментом, сначала в одном активном центре, потом в другом (**рис. 20-24**). Присоединение гликозильного остатка к одному активному центру эффективно активирует восстанавливающий конец растущей цепи крахмала. За этим следует нуклеофильное отщепление от фермента путем атаки гидроксила при С-4 атоме остатка глюкозы, связанного с другим активным центром, после чего образуется α(1→4)-связь, характерная для крахмала.

Амилоза крахмала не разветвлена, но амилопектин имеет многочисленные α(1→6)-связанные ветви (см. рис. 7-14). Хлоропласты содержат разветвляющий фермент, похожий на гликоген-разветвляющий фермент (см. рис. 15-31), который вставляет α(1→6)-ветви амилопектина. С учетом гидролиза пирофосфата PP_i, выделяющегося в процессе синтеза ADP-глюкозы неорганической пирофосфатазой, реакция образования крахмала из глюкозо-1-фосфата можно записать следующим образом:

$$\text{Крахмал}_n + \text{глюкозо-1-фосфат} + \text{ATP} \rightarrow \text{крахмал}_{n+1} + \text{ADP} + 2\text{P}_\text{i}$$

$$\Delta G'^\circ = -50 \text{ кДж/моль}$$

Синтез крахмала регулируется скоростью образования ADP-глюкозы, как будет показано ниже.

Большинство бактерий запасают углеводы в виде гликогена (похож на крахмал, только сильно разветвленный), который они синтезируют в реакции, аналогичной гликогенсинтазной реакции у животных. Бактерии, как и пластиды растений, используют ADP-глюкозу как активированную форму глюкозы, в то время как животные клетки используют UDP-глюкозу. И снова сходство между метаболизмом пластид и бактерий подтверждает эндосимбиотическую гипотезу происхождения органелл (см. с. 59, т. 1).

UDP-глюкоза является субстратом для синтеза сахарозы в цитозоле клеток листьев

Основное количество триозофосфатов, полученных при фиксации CO_2 растениями, превращается в сахарозу (**рис. 20-25**) или крахмал. В процессе эволюции сахароза могла быть выбрана в качестве транспортера углерода из-за наличия в ее молекуле необычной связи между аномерным атомом С-1 глюкозы и аномерным атомом С-2 фруктозы. Эта связь не гидролизуется амилазами или другими обычными разрезающими углеводы ферментами, а недоступность аномерных атомов углерода препятствует неферментативным реакциям сахарозы с аминокислотами и белками (в которые может вступать глюкоза).

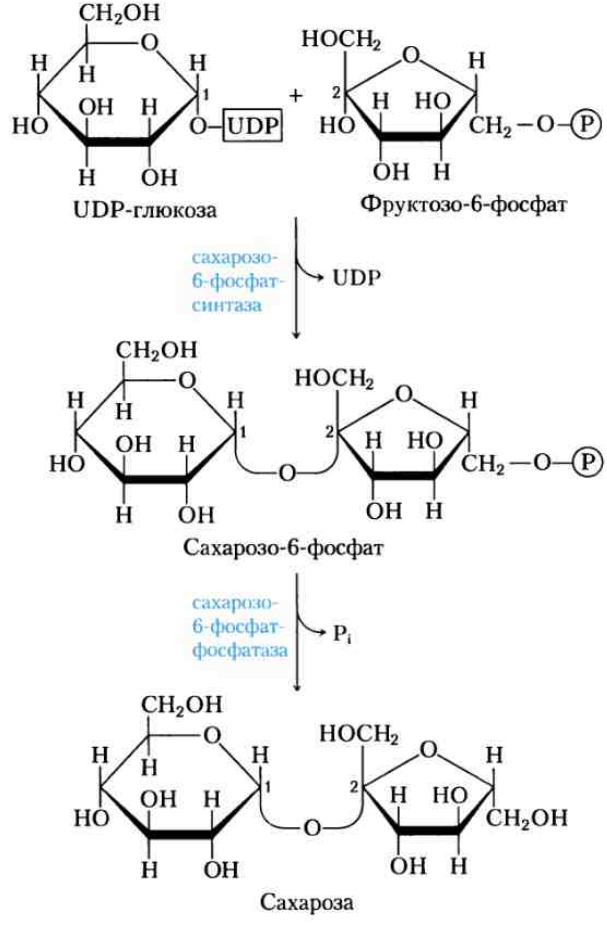


Рис. 20-25. Синтез сахарозы. Сахароза синтезируется из UDP-глюкозы и фруктозо-6-фосфата, которые образуются из триозофосфатов в цитозоле растительной клетки по путям, изображенным на рис. 15-29 и 20-9. У большинства видов растений сахарозо-6-фосфатсинтаза аллостерически регулируется глюкозо-6-фосфатом и фосфатом P_i.

Синтез сахарозы происходит в цитозоле и начинается с транспорта дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата из хлоропластов. После конденсации двух триозофосфатов с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата (катализируется альдолазой) происходит гидролиз фруктозо-1,6-бисфосфата с образованием фруктозо-6-фосфата. Затем **сахарозо-6-фосфатсинтаза** катализирует реакцию фруктозо-6-фосфата с **UDP-глюкозой** с образованием **сахарозо-6-фосфата** (рис. 20-25). В конце концов **сахарозо-6-фосфатфосфатаза** отщепляет фосфатную группу, в результате сахароза становится доступной для экспорта в другие ткани. Реакция, катализируемая сахарозо-6-фосфатсинтазой, — низкоэнергетический процесс ($\Delta G'^{\circ}$ = –5,7 кДж/моль), но гидролиз сахарозо-6-фосфата до сахарозы достаточно экзотермичен ($\Delta G'^{\circ}$ = –16,5 кДж/моль), что делает весь синтез сахарозы необратимым. Синтез сахарозы регулируется и хорошо согласован с синтезом крахмала, как мы увидим в дальнейшем.

Отличие между клетками растений и животных всего одно, и оно заключается в отсутствии в цитозоле клеток растений фермента неорганической пирофосфатазы, которая катализирует реакцию:

$$PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i \qquad \Delta G'^{\circ} = -19{,}2 \text{ кДж/моль}$$

Для многих реакций биосинтеза, в которых высвобождается пирофосфат PP_i, пирофосфатазная активность делает эту реакцию энергетически более выгодной, что обеспечивает ее необратимость. У растений этот фермент присутствует в пластидах, но отсутствует в цитозоле. В результате в цитозоле клеток листьев содержится значительная концентрация пирофосфата (~0,3 мМ) для того, чтобы сделать реакции, такие как катализируемая UDP-глюкозопирофосфорилазой (рис. 15-29), легко обратимыми. Вспомним из гл. 14 (с. 73), что у растений цитозольный изозим фосфофруктокиназы использует в качестве донора фосфата PP_i, а не ATP.

Превращение триозофосфатов в сахарозу и крахмал жестко регулируется

Как мы уже отмечали, триозофосфаты, полученные в цикле Кальвина при ярком дневном свете, могут быть временно запасены в хлоропластах в виде крахмала или превращаться в сахарозу для экспорта в нефотосинтезирующие части растения, или и то, и другое. Баланс между этими двумя процессами строго регулируется, а также координируется со скоростью фиксации углерода. Пять из шести молекул триозофосфатов, образованных в цикле Кальвина, должны быть превращены в рибулозо-1,5-бисфосфат (рис. 20-14); если же для синтеза сахарозы или крахмала из цикла выведется больше, чем одна из шести молекул триозофосфатов, цикл замедлится или остановится. Однако *недостаточное* превращение триозофосфатов в крахмал или сахарозу происходит, когда хлоропласт, дефицитный по P_i, теряет также фосфаты, которые необходимы для цикла Кальвина.

Скорость включения триозофосфатов в сахарозу регулируется активностью фруктозо-1,6-бисфосфатазой (ФБФаза-1) и ферментом, который эффективно осуществляет противоположное действие — пирофосфат-зависимой фосфофруктокиназой (ПФ-ФФК-1; с. 73). Эти ферменты ключевые для определения судьбы триозофосфатов, получающихся в фотосинтезе. Оба фермента регулируются **фруктозо-2,6-бисфосфатом (Ф2,6БФ)**, который ингибирует ФБФазу-1 и стимулирует ПФ-ФФК-1. У сосудистых растений концентрация Ф2,6БФ обратно пропорциональна скорости фотосинтеза (**рис. 20-26**). Фосфофруктокиназа-2 (ФФК-2), ответственная за синтез Ф2,6БФ, ингибируется дигидроксиацетонфосфатом или 3-фосфоглицератом и стимулируется фруктозо-6-фосфатом и P_i. При активном фотосинтезе концентрация дигидроксиацетонфосфата увеличивается, а концентрация P_i уменьшается, в результате ФФК-2 ингибируется и концентрация Ф2,6БФ снижается. Это обеспечивает увеличение скорости вовлечения триозофосфатов в процесс образования фруктозо-6-фосфата и в синтез сахарозы. С такой системой регуляции синтез сахарозы происходит, когда уровень триозофосфатов, получающихся в цикле Кальвина, значительно превышает уровень, необходимый для поддержания работы цикла.

Синтез сахарозы тоже регулируется уровнем сахарозо-6-фосфатсинтазы, которая аллостерически активируется глюкозо-6-фосфатом и ингибируется фосфатом P_i. Этот фермент также регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием; протеинкиназа фосфорилирует его по специфическому остатку Ser, что делает сахарозо-

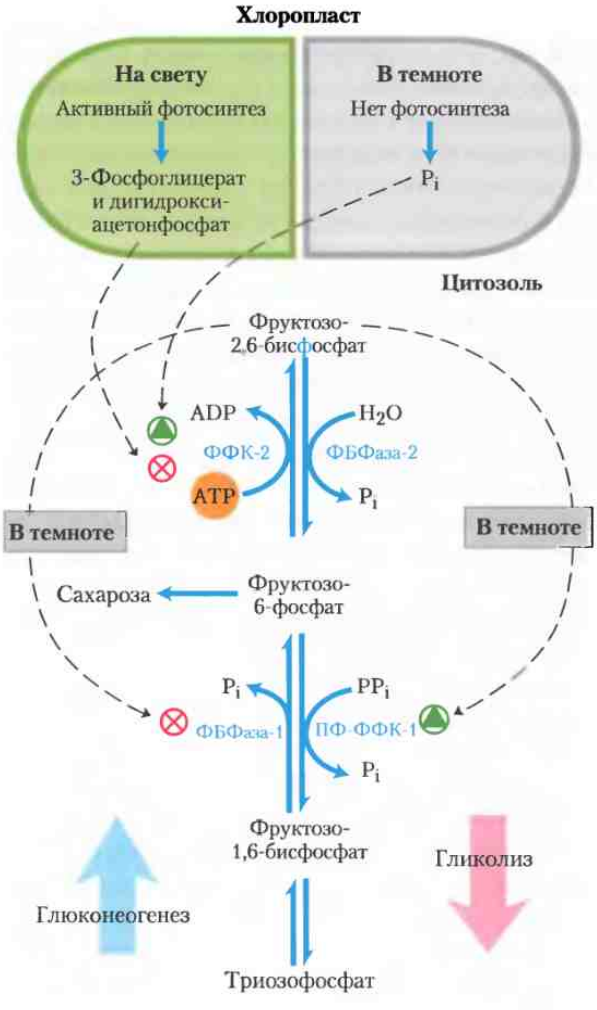


Рис. 20-26. Фруктозо-2,6-бисфосфат — регулятор синтеза сахарозы. Концентрация аллостерического регулятора фруктозо-2,6-бисфосфата в растительной клетке регулируется продуктами фотосинтетической ассимиляции углерода и P_i. Дигидроксиацетонфосфат и 3-фосфоглицерат, образующиеся при ассимиляции CO_2, ингибируют фосфофруктокиназу-2 (ФФК-2), фермент, который синтезирует регулятор; P_i стимулирует ФФК-2. Поэтому концентрация регулятора обратно пропорциональна скорости фотосинтеза. В темноте концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата возрастает, что стимулирует фермент гликолиза PP_i-зависимую фосфофруктокиназу-1 (ПФ-ФФК-1), в то время как фермент глюконеогенеза фруктозо-1,6-бисфосфатаза (ФБФаза-1) ингибируется. Когда активно происходит фотосинтез (на свету), концентрация регулятора падает, и стимулируется синтез фруктозо-6-фосфата и сахарозы.

6-фосфатсинтазу менее активной, а фосфатаза снимает это ингибирование удалением фосфата (**рис. 20-27**). Ингибирование киназы глюкозо-6-фосфатом, а фосфатазы фосфатом усиливает влияние двух этих соединений на синтез сахарозы. При излишке гексозофосфатов сахарозо-6-фосфатсинтаза активируется глюкозо-6-фосфатом; когда же повышается уровень фосфата P_i (а значит, уменьшается скорость фотосинтеза), синтез сахарозы замедляется. В процессе активного фотосинтеза триозофосфаты превращаются в фруктозо-6-фосфат, который под действием фермента фосфогексозоизомеразы в обратимой реакции быстро превращается в глюкозо-6-фосфат. Равновесие сильно сдвинуто в сторону глюкозо-6-фосфата, поэтому, как только накапливается фруктозо-6-фосфат, уровень глюкозо-6-фосфата увеличивается, что стимулирует синтез сахарозы.

Ключевой регуляторный фермент в синтезе крахмала — это **ADP-глюкозопирофосфорилаза (рис. 20-28)**; она активируется 3-фосфоглицератом (накапливается при активном фотосинтезе) и ингибируется фосфатом P_i (который накапливается, когда светозависимая конденсация фосфата с ADP ослабляется). Когда синтез сахарозы замедляется, накапливается 3-фосфоглицерат, получающийся при фиксации CO_2; он активирует фермент и стимулирует синтез крахмала.

Краткое содержание раздела 20.3 БИОСИНТЕЗ КРАХМАЛА И САХАРОЗЫ

- Крахмалсинтаза в хлоропластах и амилопластах катализирует присоединение по одному остатку глюкозы из ADP-глюкозы к восстанавливающему концу растущей молекулы на двух активных центрах. За ветвление амилопектина отвечает второй фермент.

- Сахароза синтезируется в цитозоле из UDP-глюкозы и фруктозо-1-фосфата в две стадии.

- Распределение триозофосфатов между синтезом сахарозы и синтезом крахмала регулируется фруктозо-2,6-бисфосфатом (Ф2,6БФ) — аллостерическим эффектором фермента, который определяет уровень фруктозо-6-фосфата. Концентрация Ф2,6БФ обратно пропорциональна скорости фотосинтеза, и Ф2,6БФ ингибирует синтез фруктозо-6-фосфата, предшественника сахарозы.

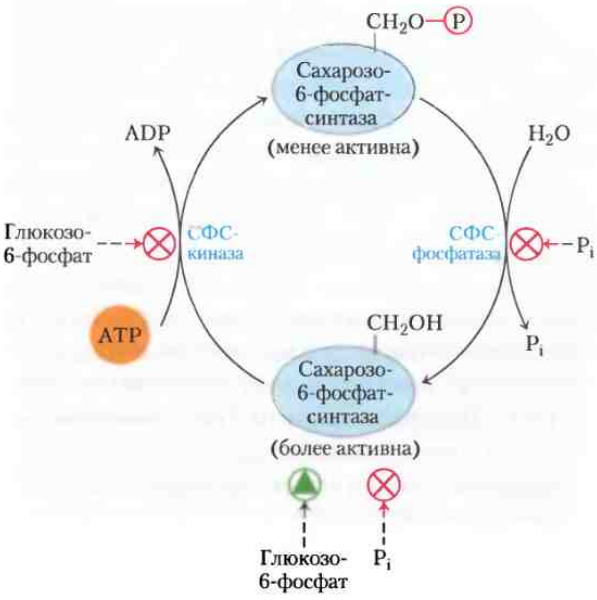


Рис. 20-27. Регуляция сахарозофосфатсинтазы фосфорилированием. Протеинкиназа (СФС-киназа), специфичная для сахарозофосфатсинтазы (СФС), фосфорилирует остаток Ser в СФС, инактивируя ее; а специфичная фосфатаза (СФС-фосфатаза) снимает это ингибирование. Киназа аллостерически ингибируется глюкозо-6-фосфатом, который также аллостерически активирует СФС. Фосфатаза ингибируется P_i, непосредственно ингибирующий также СФС. Таким образом, когда в результате активного фотосинтеза концентрация глюкозо-6-фосфата высокая, СФС активируется и синтезирует сахарозофосфат. При высокой концентрации P_i, которая повышается при низкой скорости превращения ADP в ATP в ходе фотосинтеза, синтез сахарозофосфата ингибируется.

Рис. 20-28. Регуляция ADP-глюкозофосфорилазы 3-фосфоглицератом и P_i. Этот фермент синтезирует предшественник крахмала и является лимитирующим при его синтезе. Он аллостерически стимулируется 3-фосфоглицератом (3-ФГК) и ингибируется P_i; отношение [3-ФГК]/[P_i], которое возрастает с увеличением скорости фотосинтеза, оказывается ключевым для этой стадии синтеза крахмала.

20.4. Синтез полисахаридов клеточной стенки: целлюлоза растений и пептидогликан бактерий

Целлюлоза — главный компонент растительной клеточной стенки, который обеспечивает ее прочность, жесткость и предохраняет клетку от набухания, а также предотвращает разрывы цитоплазматической мембраны, которые могут произойти, если под действием осмотического давления внутрь клетки войдет слишком много воды. Ежегодно на Земле растения синтезируют более 10^{11} т целлюлозы, что делает ее одним из самых распространенных соединений в биосфере. Целлюлоза имеет простое строение; ее линейная полимерная цепь состоит из тысяч остатков D-глюкозы, соединенных β(1→4)-связями; полимерные цепи объединены в пучки из ~36 параллельных друг другу нитей, которые образуют микрофибриллы (**рис. 20-29**).

Биосинтез целлюлозы изучен в меньшей степени, чем синтез гликогена или крахмала. Как

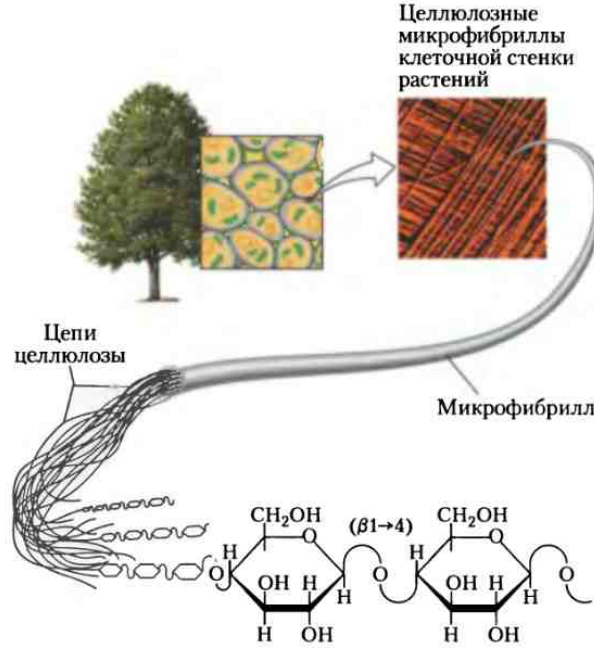


Рис. 20-29. Строение целлюлозы. Клеточная стенка растительной клетки состоит из молекул целлюлозы, параллельные тяжи которой уложены в микрофибриллы. Большие пучки микрофибрилл, собранных из целлюлозных волокон, видны в сканирующий электронный микроскоп как нити диаметром от 5 до 12 нм, образующие на поверхности клетки несколько слоев, различимых из-за разных ориентаций волокон.

главный компонент растительной стенки целлюлоза должна синтезироваться из внутриклеточных предшественников, но откладываться и собираться на внешней стороне плазматической мембраны. Ферментативные комплексы для инициации, удлинения и экспорта цепей целлюлозы сложнее, чем для синтеза крахмала или гликогена (которые не экспортируются). Бактерии сталкиваются с похожими проблемами при синтезе комплекса полисахаридов, из которых сделана их клеточная стенка, поэтому, скорее всего, они используют те же механизмы для решения этих проблем.

Целлюлоза синтезируется надмолекулярными структурами в плазматической мембране

Сложные ферментные комплексы, которые собирают цепи целлюлозы, пронизывают плазматическую мембрану; одним концом эти комплексы связываются с субстратом UDP-глюкозой в цитозоле, а другой их конец, который отвечает за удлинение молекул целлюлозы и их кристаллизацию, выступают наружу, во внеклеточное пространство. Электронные микрофотографии, полученные методом замораживания–скалывания, показывают, что эти **терминальные комплексы**, также называемые **розетками**, состоят из шести больших частиц, образующих правильные шестиугольники (**рис. 20-30**). Терминальный комплекс составляют несколько белков, включая каталитическую субъединицу **целлюлозосинтазы**. Недавние успехи в изучении синтеза целлюлозы в основном обязаны генетическим и молекулярно-генетическим исследованиям растения *Arabidopsis thaliana*, которое подвергли тщательному генетическому анализу, в результате геном этого растения был расшифрован. Было клонировано семейство генов, ответственных за синтез целлюлозы; выяснилось, что эти гены кодируют белки с восемью трансмембранными фрагментами и центральным доменом на цитозольной стороне плазматической мембраны, часть последовательности которого соответствует последовательности гликозилтрансферазы (рис. 20-30).

Согласно одной из принятых моделей, описывающих синтез целлюлозы, синтез новых цепей целлюлозы инициируется образованием интермедиатов, содержащих связанные липиды, что

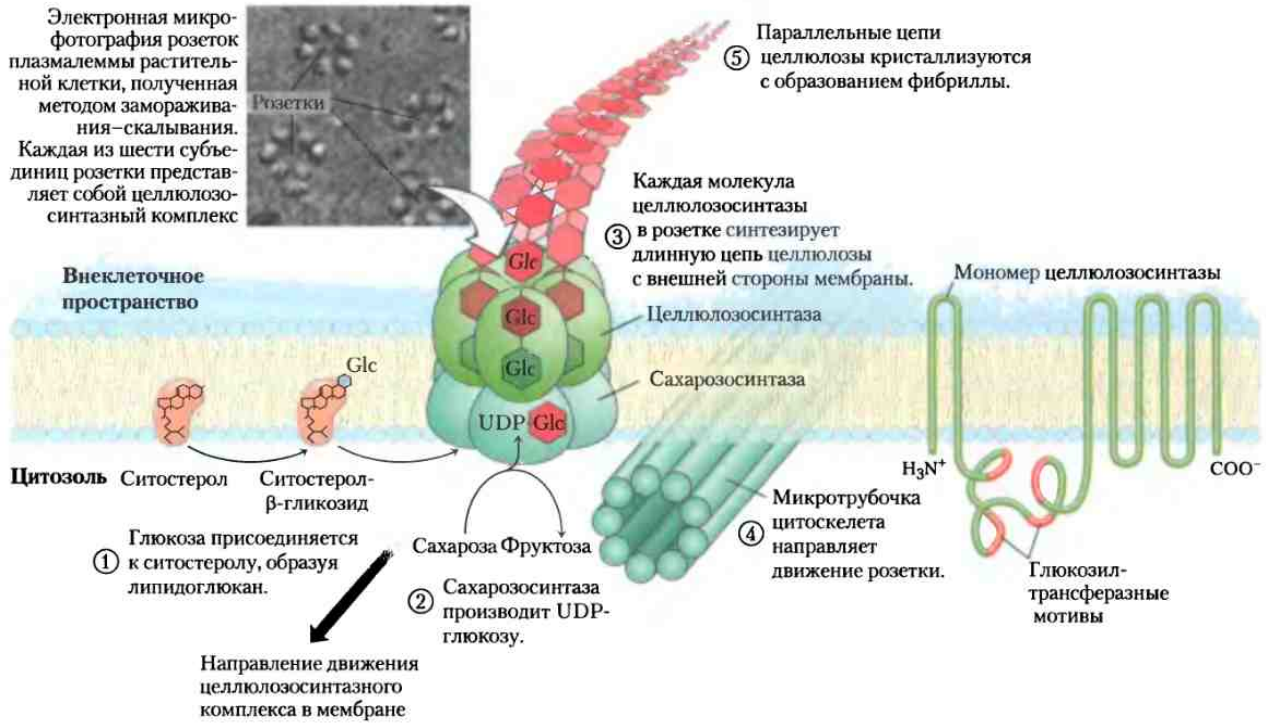


Рис. 20-30. Одна из моделей, описывающих синтез целлюлозы у сосудистых растений. Данная схема построена на основании комбинации генетических и биохимических данных, полученных для *Arabidopsis thaliana* и для других сосудистых растений.

отличает синтез целлюлозы от синтеза крахмала или гликогена. Как показано на рис. 20-30 (стадия ①), глюкоза переносится от UDP-глюкозы на мембранный липид, возможно, на растительный стерин ситостерол на внутренней стороне плазматической мембраны. Здесь внутриклеточная целлюлозосинтаза присоединяет несколько остатков глюкозы к первому остатку глюкозы β(1→4)-связью, образуя короткую олигосахаридную цепь, соединенную со ситостеролом (ситостеролдекстрином). Затем ситостеролдекстрин переворачивается, пересекает мембрану поперек и на наружной стороне клетки связывается с другой формой целлюлозосинтазы.

② Для синтеза целлюлозы используется UDP-глюкоза, которая образуется из сахарозы, синтезируемой при фотосинтезе в реакции, катализируемой сахарозосинтазой (названа по обратной реакции):

$$\text{Сахароза} + \text{UDP} \rightarrow \text{UDP-глюкоза} + \text{фруктоза}$$

Целлюлозосинтаза пересекает плазматическую мембрану и использует цитоплазматическую UDP-глюкозу, полученную из сахарозы в качестве предшественника для синтеза внеклеточной целлюлозы. Одна форма сахаросинтазы — мембраносвязанная сахарозосинтаза — образует комплекс с целлюлозосинтазой, поставляя UDP-глюкозу из сахарозы в синтез клеточной стенки.

③ Другая форма целлюлозосинтазы синтезирует полимер из 500–15 000 остатков глюкозы на поверхности клетки. Работа фермента продолжается довольно долго: одна молекула фермента способна добавить большое количество остатков глюкозы, прежде чем появится растущая цепь целлюлозы. Направление роста цепи (т. е. куда присоединяется остаток глюкозы — на восстанавливающий или на невосстанавливающий конец) пока не установлено.

Каждая из шести глобул розетки состоит из многих белковых субъединиц, которые вместе синтезируют шесть цепей целлюлозы. Крупный ферментный комплекс, катализирующий этот процесс, продвигается вдоль плазматической мембраны, следуя направлению микротрубочек кортекса — цитоплазматического слоя, расположенного непосредственно под мембраной. Поскольку микротрубочки лежат в перпендикулярном направлении к оси роста растения, микрофибриллы целлюлозы укладываются перпендикулярно оси роста. Считается, что передвижение целлюлозосинтазного комплекса осуществляется за счет энергии, высвобождающейся в реакции полимеризации, а не за счет действия молекулярного мотора кинезина.

Молекулы целлюлозы собраны в кристаллические микрофибриллы (рис. 20-29), в каждой содержится 36 параллельных целлюлозных нитей с одинаковой ориентацией восстанавливающих и невосстанавливающих концов. По-видимому, каждая частица в розетке синтезирует по шесть целлюлозных цепей, поэтому на внешней поверхности клетки появляются одновременно 36 длинных полимерных молекул, которые ⑤ готовы к кристаллизации в микрофибриллы клеточной стенки. Когда 36 целлюлозных цепей достигают некоторой критической длины, их синтез прерывается по неизвестному механизму, затем следует кристаллизация в микрофибриллы.

В активированном предшественнике целлюлозы (в UDP-глюкозе) глюкоза образует α-связь с нуклеотидом, а в продукте (в целлюлозе) остатки глюкозы соединены β(1→4)-связью, поэтому аномерный атом углерода (C-1) претерпевает инверсию конфигурации и образуется гликозидная связь. Гликозилтрансферазы, которые изменяют конфигурацию, используют механизм мономолекулярного замещения с нуклеофильной атакой на акцептор донором (UDP-глюкозой).

Некоторые бактерии (рр. *Acetobacter, Agrobacteria, Rhizobia* и *Sarcina*) и многие простые эукариоты также осуществляют синтез целлюлозы, очевидно, по похожему механизму. Но если для начала новой цепи бактерия использует мембранный липид, это не может быть стерол — бактерии не содержат стеролы.

Олигосахариды, которые связаны с липидами, — предшественники бактериальной клеточной стенки

Как и растения, многие бактерии имеют прочную и толстую клеточную стенку, которая защищает их от осмотического лизиса. **Пептидогликан**, который придает бактериальной оболочке прочность и жесткость, представляет собой линейный сополимер из чередующихся звеньев N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и N-ацетилмурамовой кислоты (Mur2Ac), связанных β(1→4)-гликозидной связью; цепи в этом сополимере (поперечно) сшиты между собой короткими пептидами, присоединен-

ными к Mur2Ac (**рис. 20-31**). В процессе сборки этой сложной макромолекулы и GlcNAc, и Mur2Ac активируются путем присоединения к аномерному атому углерода уридинового нуклеотида. Сначала GlcNAc-1-фосфат вступает в реакцию конденсации с UTP, в результате образуется UDP-GlcNAc (**рис. 20-32**, стадия ①), который далее с фосфоенолпируватом дает UDP-Mur2Ac (стадия ②); затем присоединяется пять аминокислот (стадия ③). Mur2Ac-пентапептид переносится на мембранный липид долихол (длинноцепочечный изопреноидный спирт, см. рис. 10-22, *е*) (стадия ④), после чего к Mur2Ac присоединяется GlcNAc (стадия ⑤). У многих бактерий к аминогруппе остатка Lys пентапептида через пептидную связь присоединяется пять молекул глицина (стадия ⑥). Наконец, этот дисахаридный декапептид присоединяется к невосстанавливающему концу молекулы-праймера — пептидогликану (стадия ⑦). Соседние цепи полисахаридов поперечно сшиваются в транспептидазной реакции (стадия ⑧), в результате вокруг бактериальной клетки образуется прочная стенка (оболочка). Большинство эффективных антибиотиков, которые сейчас используются, ингибируют реакции синтеза пептидогликана.

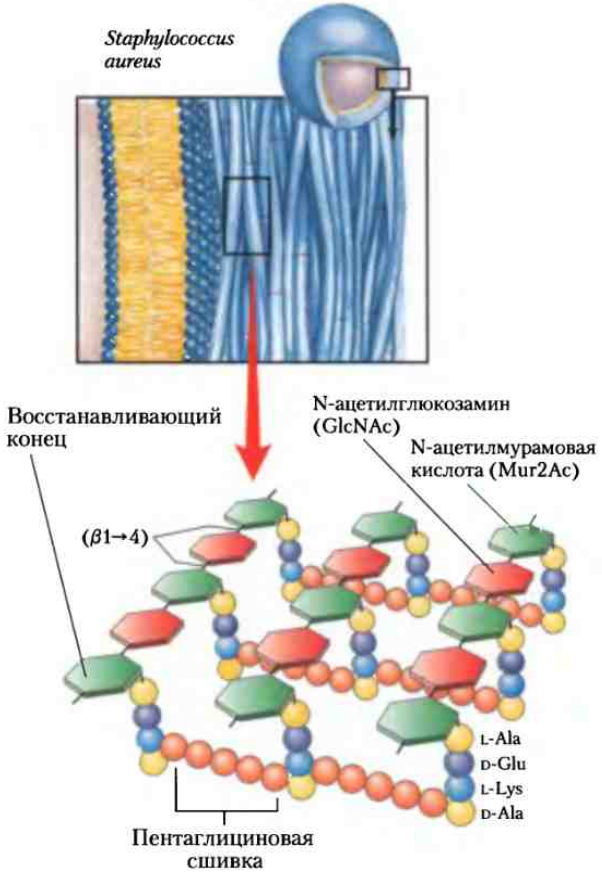


Рис. 20-31. Структура пептидогликана. Показан пептидогликан клеточной стенки грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus*. Пептиды (последовательность из раскрашенных сфер) ковалентно связаны с остатком N-ацетилмурамовой кислоты соседней полисахаридной цепи. Обратите внимание на то, что пептиды образованы из смеси L- и D-аминокислот. Грамположительные бактерии, такие как *S. aureus*, сшиты пентаглициновыми цепочками. Грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*, не содержат пентаглицинов; вместо этого терминальный остаток D-Ala тетрапептида присоединен прямо к соседнему тетрапептиду либо через L-Lys, либо через похожую на лизин диаминопимелиновую кислоту. Образование пептидной связи с остатком глутамата здесь происходит необычно — через карбоксильную группу боковой цепи.

Многие другие олигосахариды и полисахариды синтезируются по похожему механизму, в котором сахара активируются, присоединяя нуклеотиды в последовательных реакциях. Например, в гликозилировании белков (см., например, рис. 27-39, т. 3) предшественники углеводной части белковой молекулы включают нуклеотидсахара и липидсвязанные олигосахариды.

Краткое содержание раздела 20.4 СИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ: ЦЕЛЛЮЛОЗА РАСТЕНИЙ И ПЕПТИДОГЛИКАН БАКТЕРИЙ

- Синтез целлюлозы происходит в терминальных комплексах (розетках) на плазматической мембране. Сначала цепи целлюлозы внутри клетки превращаются в декстрин (стерин). Затем они переворачиваются так, что олигосахаридная часть оказывается вне клетки; она переносится на целлюлозосинтазу в розетке, где потом и удлиняется. На каждой розетке одновременно образуется 36 целлюлозных цепочек с параллельной ориентацией. Цепи целлюлозы кристаллизуются в микрофибриллы, которые образуют клеточную стенку.

- В синтезе пептидогликана бактериальной клеточной стенки также участвуют связанные с липидами олигосахариды, которые образуются внутри клетки, но потом уже в мембране макромолекула поворачивается и олигосахаридные хвосты оказываются вне клетки.

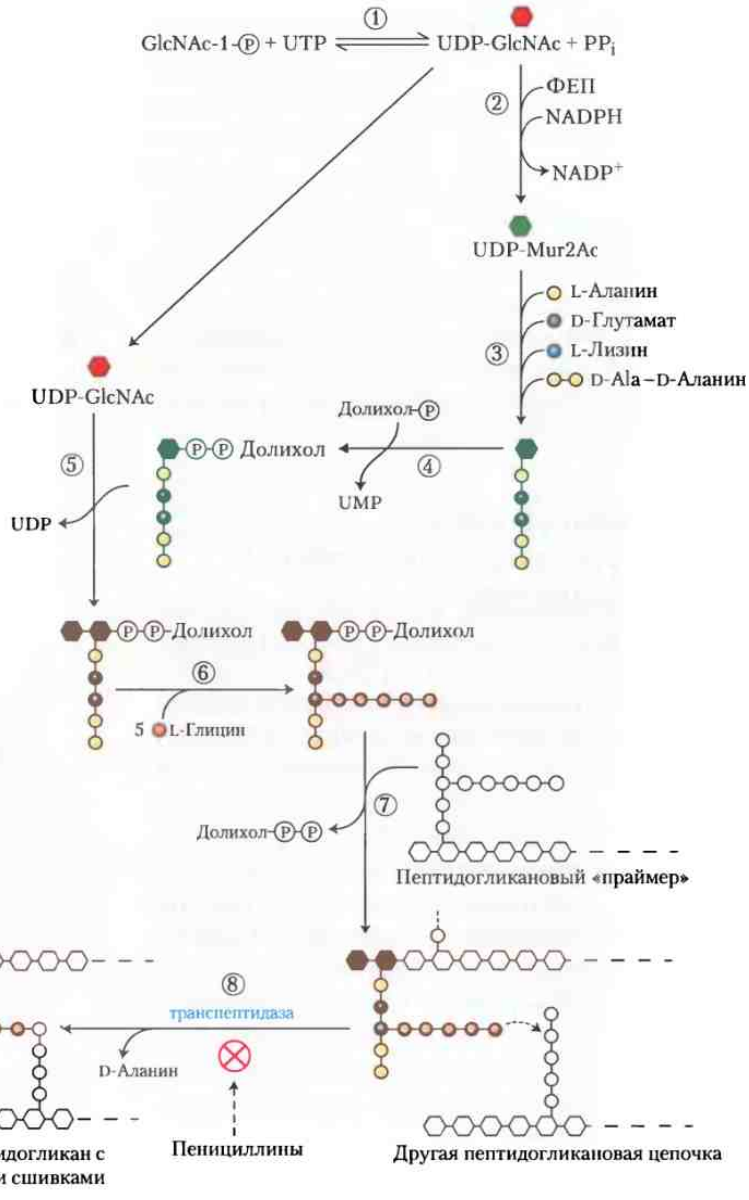


Рис. 20-32. Синтез бактериального пептидогликана. На ранних стадиях этого пути (с ① по ④) N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилмурамовая кислота (Mur2Ac) активируются присоединением уридинового нуклеотида (UDP) к аномерному атому углерода, а в случае Mur2Ac длинноцепочечного изопреноидного спирта (долихола), через фосфодиэфирную связь. Эти активирующие группы участвуют в образовании гликозидных связей; они служат в качестве превосходных уходящих групп. После этого происходит (⑤, ⑥) ассоциация дисахарида с боковой пептидной цепью (10 аминокислотных остатков), ⑦ этот предшественник переносится на невосстанавливающий конец существующей пептидогликановой цепочки, которая служит праймером для реакции полимеризации. Наконец, ⑧ в транспептидазной реакции между боковыми пептидными цепями двух соседних молекул пептидогликана остаток Gly на конце одной цепи замещается D-Ala другой цепи, образуя поперечные сшивки. Транспептидазная реакция ингибируется пенициллинами, которые убивают бактерии, разрушая их клеточную стенку.

20.5. Интеграция углеводного метаболизма в растительной клетке

Углеводный метаболизм в типичной растительной клетке более сложный, чем у типичной животной клетки. В растительной клетке идут те же процессы, которые производят энергию в животных клетках (гликолиз, цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование); в ней синтезируются гексозы из трех- или четырехуглеродных соединений путем глюконеогенеза; окисляются гексозофосфаты с образованием NADPH (окислительный пентозофосфатный путь); и она способна создавать полимерные цепи крахмала из остатков глюкозы, соединенных α(1→4)-связями, и расщеплять их до гексоз. Но помимо этих реакций с углеводами, которые присущи также животным клеткам, фотосинтезирующая растительная клетка может фиксировать CO_2, включая углерод в органические соединения (ферментативная реакция под действием рубиско); использовать продукты фотосинтеза для образования триоз, гексоз и пентоз (цикл Кальвина); и превращать ацетил-CoA, образованный

при распаде жирных кислот, в четырехуглеродные соединения, а последние — в гексозы (глиоксилатный цикл и глюконеогенез соответственно). Эти уникальные процессы в растительной клетке, которые не найдены в животных клетках, разделены между несколькими компартментами: в глиоксисомах происходит глиоксилатный цикл, в хлоропластах — цикл Кальвина, в амилопластах — синтез крахмала, в вакуолях — хранение органических кислот. Интеграция событий в этих различных компартментах требует специфических транспортеров в мембране каждой органеллы, для передвижения продуктов из одной органеллы в другую или в цитозоль.

В прорастающих семенах жиры и белки превращаются в глюкозу в ходе глюконеогенеза

Многие растения запасают в семенах липиды и белки, которые необходимы при прорастании в качестве источника энергии и предшественников биосинтеза до того, как разовьется аппарат фотосинтеза. При активном глюконеогенезе в прорастающих семенах глюкоза используется для синтеза сахарозы, полисахаридов и многих метаболитов, образующихся из гексоз. В семенах растений основные количества химической энергии, необходимой для начального роста, образуется при распаде сахарозы.

Мы отмечали ранее (гл. 14), что животные клетки могут осуществлять глюконеогенез из трех- и четырехуглеродных предшественников, но не из ацетил-CoA. Так как пируватдегидрогеназная реакция необратима (с. 182–183), клетки животных не способны превращать ацетил-CoA в пируват или оксалоацетат. В отличие от животных, растения и ряд микроорганизмов *могут* превращать ацетил-CoA, полученный при окислении жирных кислот, в глюкозу (**рис. 20-33**). Некоторые из ферментов, необходимых для этого превращения, изолированы в глиоксисомах, где специфичный для глиоксисом изозим β-окисления расщепляет жирные кислоты до ацетил-CoA (см. рис. 16-22). Физическое разделение глиоксилатного цикла и ферментов β-окисления от митохондриальных ферментов цикла трикарбоновых кислот предотвращает дальнейшее окисление ацетил-CoA до CO_2. Вместо этого ацетил-CoA превращается в сук-

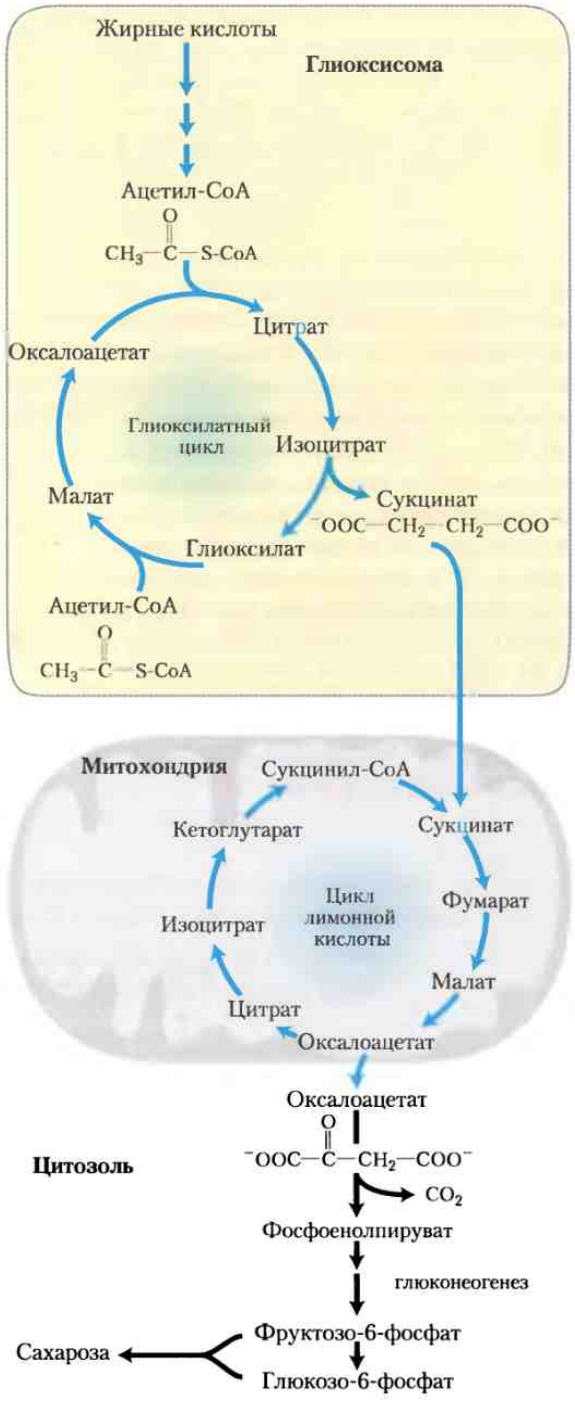


Рис. 20-33. Превращение запасенных жирных кислот в сахарозу в прорастающих семенах. Этот путь начинается в глиоксисомах. Образуется сукцинат, который затем экспортируется в митохондрии, где он превращается в оксалоацетат под действием ферментов цикла трикарбоновых кислот. Оксалоацетат выходит в цитозоль и служит в качестве исходного вещества для глюконеогенеза и для синтеза сахарозы — транспортной формы углерода в растениях.

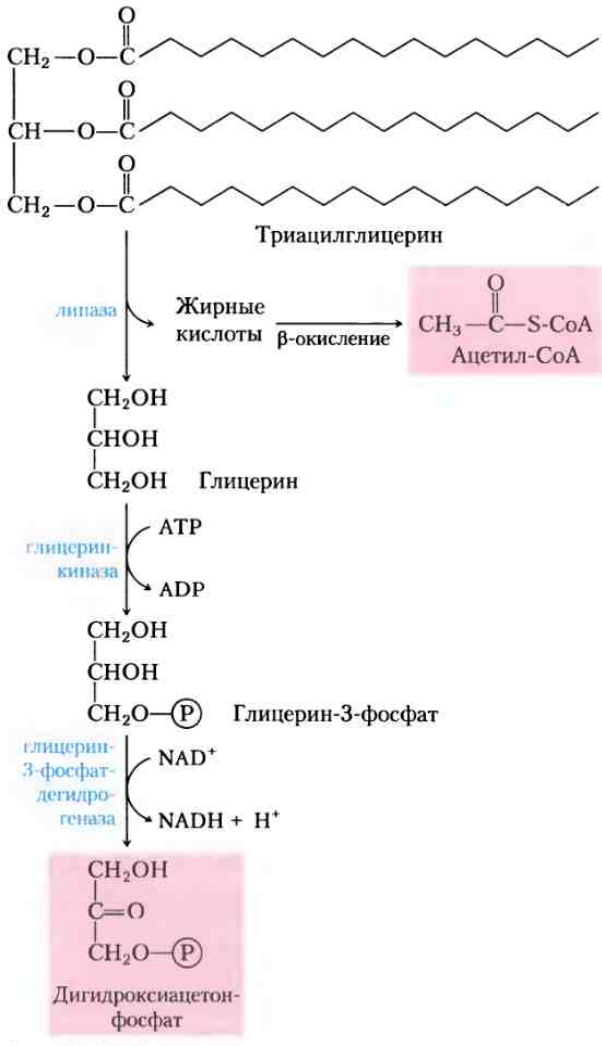


Рис. 20-34. Превращение глицериновых остатков триацилглицеринов в сахарозу в прорастающих семенах. Глицерин триацилглицеринов окисляется в дигидроксиацетонфосфат, который входит в глюконеогенез в реакции изомеризации триозофосфата.

цинат в глиоксилатном цикле (см. рис. 16-20). Сукцинат проходит в матрикс митохондрий, где он под действием ферментов цикла трикарбоновых кислот превращается в оксалоацетат, который перемещается в цитозоль. В цитозоле в процессе глюконеогенеза оксалоацетат превращается в фруктозо-6-фосфат, предшественник сахарозы. Таким образом, для образования фруктозо-6-фосфата или сахарозы из запасенных липидов требуется интеграция последовательных реакций. Из-за того что при превращениях оксалоацетата цитозоля в гексозу используются только три из четырех атомов углерода, около 75% углерода жирных кислот, запасенного в липидах семян, превращается в углеводы по комбинированным путям (рис. 20-33). Другие 25% теряются в виде CO_2 при превращении оксалоацетата в фосфоенолпируват. При гидролизе запасенных триацилглицеринов образуется глицерин-3-фосфат, который может войти в путь глюконеогенеза после его окисления до дигидроксиацетонфосфата **(рис. 20-34)**.

Глюкогенные аминокислоты (см. табл. 14-4) при распаде запасных белков семян также образуют молекулы-предшественники для глюконеогенеза в реакциях трансаминирования и окисления до сукцинил-CoA, пирувата, оксалоацетата, фумарата и α-кетоглутарата (гл. 18) — это все хороший стартовый материал для глюконеогенеза.

Метаболические пути в различных органеллах связывают пулы общих интермедиатов

Итак, мы описали отдельные реакционные цепочки метаболических превращений в растительных клетках. Однако эти реакции на самом деле взаимосвязаны, поэтому вместо последовательности реакций мы должны рассматривать пулы метаболических интермедиатов, совместно используемых метаболическими путями и связанных легкообратимыми реакциями **(рис. 20-35)**. Один из таких **пулов метаболитов** включает гексозофосфаты: глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат; второй пул — 5-фосфаты пентоз: рибозы, рибулозы и ксилулозы; третий — триозофосфаты: дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат. Величина и направление потоков метаболитов через эти пулы меняются в ответ на изменение внешних условий, в которых находится растение, кроме того, они различны в разных типах тканей. Трансмембранные транспортеры каждой органеллы перемещают специфические соединения внутрь и наружу; регуляция этих транспортеров, возможно, влияет на обмен между пулами.

В дневное время суток триозофосфаты, образующиеся в тканях листьев в цикле Кальвина, покидают хлоропласт и попадают в гексозофосфатный пул цитозоля, где они превращаются в сахарозу для транспорта в нефотосинтезирующие ткани. В этих тканях сахароза запасается в виде крахмала и используется в качестве источ-

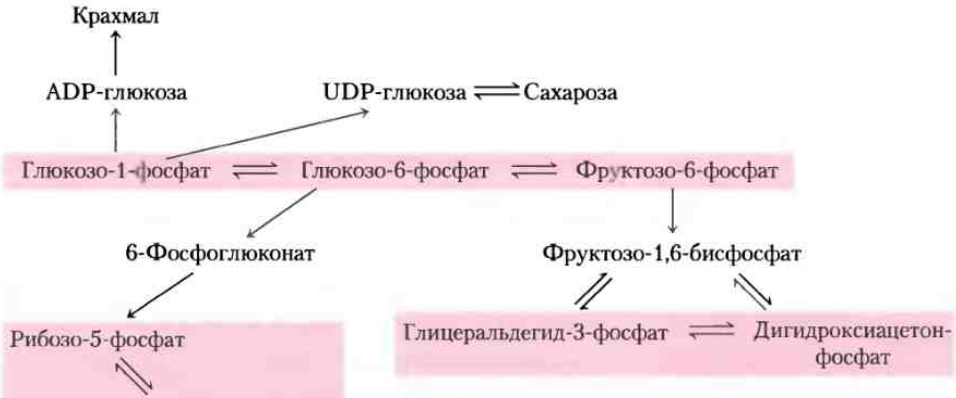


Рис. 20-35. Гексозофосфатный, пентозофосфатный и триозофосфатный пулы. Соединения в каждом пуле соединения легко взаимопревращаются, причем соответствующие реакции характеризуются очень небольшим изменением стандартной свободной энергии. Когда один из компонентов пула временно исчерпан, для его пополнения быстро устанавливается новое равновесие. Передвижение сахарофосфатов между компартментами клетки ограничено: в мембране органелл должны присутствовать специальные транспортеры.

ника энергии в процессе гликолиза. В растущих растениях гексозофосфаты из пула расходуются и на синтез клеточной стенки. Ночью крахмал распадается и используется для получения энергии в гликолизе. Это происходит в принципе так же, как у нефотосинтезирующих организмов: образуются NADPH и рибозо-5-фосфат по окислительному пентозофосфатному пути.

Краткое содержание раздела 20.5 ИНТЕГРАЦИЯ УГЛЕВОДНОГО МЕТАБОЛИЗМА В РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКЕ

- Растения могут синтезировать сахара из ацетил-CoA, продукта распада жирных кислот, комбинированным действием глиоксилатного цикла и глюконеогенеза.

- Различные пути углеводного метаболизма в растительной клетке сильно перекрываются; они используют пулы общих интермедиатов, включая гексозофосфаты, пентозофосфаты и триозофосфаты. Транспортеры в мембранах хлоропластов, митохондрий, амилопластов и пероксисом управляют передвижением сахарофосфатов между органеллами. Направления потоков метаболитов через пулы днем и ночью различны.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

2-фосфогликолат 420
3-фосфоглицерат 406
ADP-глюкоза 428
ADP-глюкозопирофосфорилаза 430
альдолаза 413
амилопласт 405
восстановительный пентозофосфатный цикл 406
гликолатный путь 421
малатдегидрогеназа 425
пентозофосфатный путь 406
пептидогликан 433
пируват-фосфатдикиназа 425
пластиды 405
пулы метаболитов 438
реакции ассимиляции углерода 416
реакция фиксации углерода 406
рибулозо-1,5-бисфосфат 406
рибулозо-1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа (рубиско) 407
рибулозо-5-фосфат 415
рубиско-активаза 410
C_3-растения 406
C_4-растения 423
CAM-растения 426
сахарозо-6-фосфатсинтаза 429
сахаронуклеотид 428
седогептулозо-1,7-бисфосфат 415
синтез крахмала 428
тиоредоксин 419
транскетолаза 413
ферредоксин-тиоредоксин-редуктаза 419
фосфоенолпируваткарбоксилаза 424
фотодыхание 420
фруктозо-2,6-бисфосфат 429
хлоропласт 405
целлюлозосинтаза 432
цикл Кальвина 404
цикл фотосинтетического окисления углерода (C_2-цикл) 422

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Blankenship, R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*, Blackwell Science, Oxford.

Очень доступное, хорошо иллюстрированное изложение всех аспектов фотосинтеза, в том числе и углеводного метаболизма, рассмотренного в этой главе, и светозависимых реакций, описанных в гл. 19. Средний уровень сложности.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (eds). (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiology, Rockville, MD.

Эта прекрасная книга авторитетных исследователей освещает все аспекты биохимии и молекулярной биологии растений. Следующие главы посвящены в основном синтезу углеводов: **Malkin, R. & Niyogi, K.,** Chapter 12, Photosynthesis (pp. 568–629); **Dennis, D. T. & Blakeley, S. D.,** Chapter 13, Carbohydrate Metabolism (pp. 630–675); **Siedow, J. N. & Day, D. A.,** Chapter 14, Respiration and Photorespiration (pp. 676–729).

Carpita, N. & McCann, M. (2002) The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W., & Jones, R., eds), pp. 52–108, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Heldt, H.-W. (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, Oxford (русское издание: Хелдт Г.-В. Биохимия растений. —М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011).

Еще один отличный учебник по биохимии растений. Особенно полезны глава 6 «Фотосинтетическая ассимиляция CO_2 в цикле Кальвина»; глава 7 «Фотодыхание» и глава 9 «Полисахариды».

Фотосинтез углеводов

Anderson, L. E., Gatla, N., & Caro, A. A. (2005) Enzyme colocalization in pea leaf chloroplasts: glyceraldehyde-3-P dehydrogenase, triose-P isomerase, aldolase and sedoheptulose bisphosphatase. *Photosynth. Res.* **83**, 317–328.

Andersson, I., Knight, S., Schneider, G., Lindqvist, Y., Lundqvist, T., Brändén, C.-I., & Lorimer, G. H. (1989) Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Nature* **337**, 229–234.

Bassham, J. A. (2003) Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective. *Photosynth. Res.* **76**, 35–52.

Benson, A. A. (2002) Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story—history of photosynthesis. *Photosynth. Res.* **73**, 31–49.

Calvin, M. (1989) Forty years of photosynthesis and related activities. *Photosynth. Res.* **21**, 3–16.

Cleland, W. W., Andrews, T. J., Gutteridge, S., Hartman, F. C., & Lorimer, G. H. (1998) Mechanism of rubisco – the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549–561.

Обзор, где особое внимание уделено карбамату в активном центре.

Dietz, K. J., Link, G., Pistorius, E. K., & Scheibe, R. (2002) Redox regulation in oxygenic photosynthesis. *Prog. Botany* **63**, 207–245.

Flügge, U.-I. (1999) Phosphate translocaters in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 27–45.

Обзор транспортеров P_i и различных сахарофосфатов через мембраны пластид.

Fridlyand, L. E. & Scheibe R. (1999) Homeostatic regulation upon changes of enzyme activities in the Calvin cycle as an example for general mechanisms of flux control: what can we expect from transgenic plants? *Photosynth. Res.* **61**, 227–239.

Gontero, B., Cardenas, M. L., & Ricard, J. (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *Eur. J. Biochem.* **173**, 437–443.

Hartman, F. C. & Harpel, M. R. (1994) Structure, function, regulation and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 197–234.

Horecker, B. L. (2002) The pentose phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47 965–47 971.

Portis, A. R., Jr. (2003) Rubisco activase: rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* **75**, 11–27.

Структура, регуляция механизма действия и роль рубиско-активазы.

Portis, A. R., Jr. & Parry, M. A. J. (2007) Discoveries in rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase): a historical perspective. *Photosynth. Res.* **94**, 121–143.

Raven, J. A. & Girard-Bascou, J. (2001) Algal model systems and the elucidation of photosynthetic metabolism. *J. Phycol.* **37**, 943–950.

Короткий обзор среднего уровня сложности.

Schneider, G., Lindqvist, Y., Brändén, C.-I., & Lorimer, G. (1986) Three-dimensional structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from Rhodospirillum rubrum at 2.9 Å resolution. *EMBO J.* **5**, 3409–3415.

Smith, A. M., Denyer, K., & Martin, C. (1997) The synthesis of the starch granule. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 67–87.

Обзор роли ADP-глюкозопирофосфорилазы в синтезе амилозы и амилопектина в гранулах крахмала.

Spreitzer, R. J. & Salvucci, M. E. (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 449–475.

Подробный обзор, посвященный рубиско и рубиско-активазе.

Stitt, M. (1995) Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 341–368.

Обзор генетических методов определения реперных точек регуляции *in vivo*.

Tabita, F. R. (1999) Microbial ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspective. *Photosynth. Res.* **60**, 1–28.

Обсуждение работ по биохимии и генетике микробной рубиско и сравнение с растительным ферментом.

Winkel, B. S. J. (2004) Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 85–107.

Wolosiuk, R., Ballicora, M., & Hagelin, K. (1993) The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* **7**, 622–637.

Фотодыхание, C_4- и CAM-пути

Ainsworth, E. A. & Long, S. P. (2005) What have we learned from 15 years of free-air CO_2 enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the response of photosynthesis, canopy properties, and plant production to rising CO_2. *New Phytol.* **165**, 351–372.

Black, C. C. & Osmond, C. B. (2003) Crassulacean acid metabolism and photosynthesis: working the night shift. *Photosynth. Res.* **76**, 329–341.

Douce, R., Bourguignon, J., Neuburger, M., & Rébeillé, F. (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends Plant Sci.* **6**, 167–176.

Описание строения и механизма работы фермента. Средний уровень сложности.

Douce, R. & Neuberger, M. (1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 214–222.

Hatch, M. C. (1987) C_4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 81–106.

Обзор написан одним из тех, кто открыл C_4-путь. Средний уровень сложности.

Sage, R. F. & Kubien, D. S. (2007) The temperature response of C_3 and C_4 plants. *Plant Cell Environ.* **30**, 1086–1106.

Tolbert, N. E. (1997) The C_2 oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 1–25.

Очень интересный взгляд по поводу принятых представлений о процессе фотодыхания. Автор статьи — ученый, который сыграл главную роль в развитии этих представлений.

Биосинтез крахмала и сахарозы

Ball, S. G., van de Wal, M. H. B. J., & Visser, R. G. F. (1998) Progress in understanding the biosynthesis of amylose. *Trends Plant Sci.* **3**, 462–467.

Delmer, D. P. (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245–276.

Doblin, M. S., Kurek, I., Javob-Wilk, D., & Delmer, D. P. (2002) Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1407–1420.

Errington, J., Daniel, R. A., & Scheffers, D. J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52–65.

Fernie, A. R., Willmitzer, L., & Trethewey, R. N. (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. *Trends Plant Sci.* **7**, 35–41.

Обзор посвящен генам и белкам, задействованным в синтезе крахмала в клубнях растений. Средний уровень сложности.

Huber, S. C. & Huber, J. L. (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 431–444.

Краткий обзор факторов регуляции этого важнейшего фермента.

Leloir, L. F. (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* **172**, 1299–1303.

Нобелевская речь Лелуара, в которой прозвучало обсуждение роли сахаронуклеотидов в метаболизме.

Mukerjea, R., Yu, L., & Robyt, J. F. (2002) Starch biosynthesis: mechanism for the elongation of starch chains. *Carbohydrate Res.* **337**, 1015–1022.

Недавно полученное доказательство того, что цепи крахмала удлиняются с восстанавливающего конца.

Синтез целлюлозы и пептидогликана

Delmer, D. P. (1999) Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 245–276.

Dhugga, K. S. (2001) Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 488–493.

Joshi, C. P. & Mansfield, S. D. (2007) The cellulose paradox — simple molecule, complex biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 220–226.

Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P., & Delmer, D. (2002) Sitosterol-β-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* **295**, 147–150.

Недавно полученное доказательство наличия липидо-олигосахаридного интермедиата при синтезе целлюлозы.

Reid, J. S. G. (2000) Cementing the wall: cell wall polysaccharide synthesising enzymes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 512–516.

Saxena, I. M. & Brown, R. M., Jr. (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann. Bot.* **96**, 9–21.

Scheible, W.-R. & Pauly, M. (2004) Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 285–296.

Taylor, N. G., Laurie, S., & Turner, S. R. (2000) Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2529–2540.

Williamson, R. E., Burn, J. E., & Hocart, C. H. (2002) Towards the mechanism of cellulose synthesis. Trends Plant Sci. 7, 461–467.

Вопросы и задачи

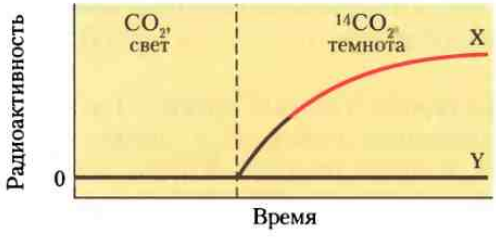
1. Разделение метаболизма в органеллах. Какие преимущества дает растительной клетке наличие разных органелл, где осуществляются разные последовательности реакций, в которых совместно используются общие интермедиаты?

2. Стадии фотосинтеза. Когда суспензию зеленых водорослей освещают в отсутствие CO_2 и затем в темноте инкубируют с $^{14}CO_2$, $^{14}CO_2$ за короткое время превращается в [^{14}C]глюкозу. Какое значение имеют эти наблюдения для по-

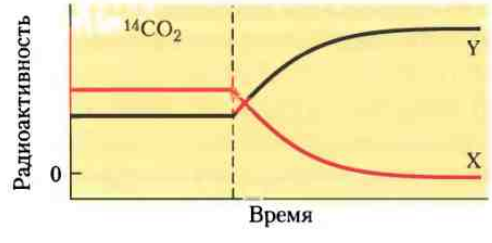
нимания процессов ассимиляции CO_2? Как это связано со световыми реакциями фотосинтеза? Почему превращение $^{14}CO_2$ в [^{14}C]глюкозу останавливается через короткий промежуток времени?

3. Определение ключевых интермедиатов в ассимиляции CO_2. Кальвин и его коллеги для изучения фотосинтетических реакций ассимиляции углерода использовали одноклеточную зеленую водоросль *Chlorella*. Они инкубировали $^{14}CO_2$ с освещенной суспензией водорослей и следили за временно́й зависимостью появления ^{14}C в двух соединениях X и Y при двух наборах различных условий. На основе цикла Кальвина предположите, какие это соединения X и Y.

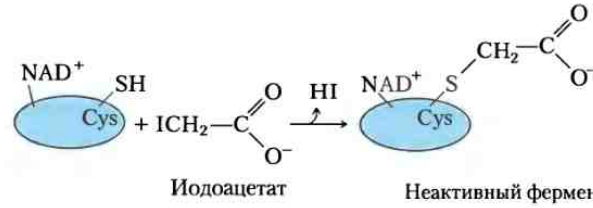
а) *Chlorella* росла при освещении в присутствии немеченого CO_2. Затем свет выключили и добавили $^{14}CO_2$ (вертикальная пунктирная линия на графике). При этих условиях X был первым соединением, которое становилось меченым; Y оставался немеченым.



б) Клетки *Chlorella* выращивали в присутствии $^{14}CO_2$. Клетки освещали до тех пор, пока не исчерпывался весь $^{14}CO_2$ (вертикальная пунктирная линия на графике). При этих условиях X становился меченым, но быстро терял свою радиоактивность, в то время как Y со временем становился более радиоактивным.



4. Регуляция цикла Кальвина. Иодоацетат обратимо взаимодействует со свободными группами –SH остатков цистеина в белках. Какие ферменты цикла Кальвина ингибируются иодоацетатом? Объясните, почему.



5. Тиоредоксин в регуляции ферментов цикла Кальвина. Мотохаши с коллегами* использовали тиоредоксин в качестве ловушки для выявления в растительных экстрактах белков, активируемых тиоредоксином. Для этого они синтезировали модификацию тиоредоксина, в котором один из остатков Cys был замещен на Ser. Объясните, зачем для экспериментов была необходима такая модификация.

6. Сравнение восстановительного и окислительного пентозофосфатных путей. В *восстановительном* пентозофосфатном пути образуются лишь некоторые интермедиаты, идентичные тем, что есть в *окислительном* пентозофосфатном пути (гл. 14). Какова роль каждого пути в клетках, где он происходит?

7. Фотодыхание и митохондриальное дыхание. Сравните цикл фотосинтетического окисления углерода (C_2-цикл), также называемый *фотодыханием*, с *митохондриальным дыханием* – движущей силой синтеза АТР. Почему названия обоих процессов имеют отношение к дыханию? Где они происходят в клетке и при каких условиях? Каков путь потока электронов в каждом случае?

8. Рубиско и состав атмосферы. Толберт** утверждал, что двойственная специфичность рубиско для CO_2 и O_2 не просто возникла как следствие эволюции фермента при низком содер-

---

* **Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., & Hisabori, T.** (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11 224–11 229.

** **Tolbert, N. E.** (1994) The role of photosynthesis and photorespiration in regulating atmospheric CO_2 and O_2. In *Regulation of Atmospheric CO_2 and O_2 by Photosynthetic Carbon Metabolism* (Tolbert, N. E. & Preiss, J., eds), pp. 8–33, Oxford University Press, New York.

жании кислорода. При этом он предполагал, что соотношение карбоксилазной и оксигеназной активностей рубиско на самом деле урегулировало, а теперь и поддерживает соотношение CO_2 и O_2 в атмосфере Земли. Обсудите все «за» и «против» этой гипотезы в молекулярных и общих терминах. Каким образом существование C_4-организмов вытекает из этой гипотезы?

9. Роль седогептулозо-1,7-бисфосфатазы. Какое влияние на клетку и на организм человека мог бы оказать дефект седогептулозо-1,7-бисфосфатазы (а) в гепатоците? (б) В листе зеленого растения?

10. Путь ассимиляции CO_2 у кукурузы. Если растения кукурузы освещать в присутствии $^{14}CO_2$, примерно через секунду более чем 90% радиоактивности, включенной в клетку, окажется в положениях С-4 малата, аспартата и оксалоацетата. Только через 60 с ^{14}C появится в 3-фосфоглицерате в положении С-1. Объясните, почему.

11. Идентификация САМ-растений. Имея немного $^{14}CO_2$ и все инструменты, обычные для биохимической исследовательской лаборатории, какой бы вы поставили простой эксперимент для определения, является ли данное растение типичным C_4- или САМ-растением?

12. Химия малатдегидрогеназы. Малатдегидрогеназа, найденная в клетках обкладки C_4-растений, осуществляет реакцию, которая имеет аналог в цикле трикарбоновых кислот. Что это за реакция? Обоснуйте свой выбор.

13. Цена хранения глюкозы в виде крахмала. Напишите последовательность стадий и итоговую реакцию, необходимую для расчета «стоимости» (в молекулах ATP) превращения цитозольного глюкозо-6-фосфата в крахмал и обратно в глюкозо-6-фосфат. Какую долю от максимального числа молекул ATP, доступного при полном катаболизме глюкозо-6-фосфат до CO_2 и H_2O, представляет эта «цена»?

14. Неорганическая пирофосфатаза. Фермент неорганическая пирофосфатаза делает многие биосинтетические реакции, в которых образуется неорганический пирофосфат, практически необратимыми. Поддерживая концентрацию PP_i очень низкой, фермент «толкает» эту реакцию в сторону образования PP_i. Синтез ADP-глюкозы в хлоропластах является одной из реакций, которые сдвинуты таким механизмом в сторону образования ADP-глюкозы. Однако синтез UDP-глюкозы в цитозоле растительной клетки, в результате которого образуется PP_i, *in vivo* легко обратим. Как вы объясните противоречивость этих фактов?

15. Регуляция синтеза крахмала и сахарозы. Синтез сахарозы происходит в цитозоле, а синтез крахмала — в строме хлоропласта, но тем не менее эти два процесса сложно сбалансированы. Какие факторы сдвигают реакции в сторону (а) синтеза крахмала и (б) синтеза сахарозы?

16. Регуляция синтеза сахарозы. В регуляции синтеза сахарозы из триозофосфатов, образованных при фотосинтезе, ключевые роли играют 3-фосфоглицерат и P_i (см. рис. 20-26). Объясните, почему о скорости фотосинтеза можно судить по концентрации этих двух регуляторов.

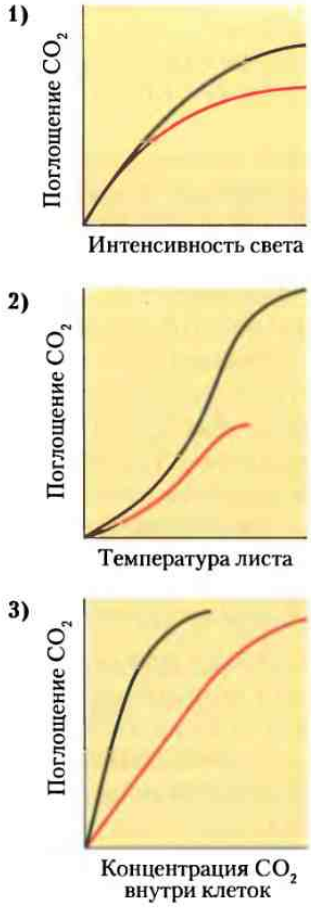
17. Сахароза и кариес зубов. Наиболее распространенная инфекция у людей — кариес зубов, который появляется из-за колонизации и разрушения зубной эмали различными подкисляющими среду микроорганизмами. Эти микроорганизмы живут в так называемых зубных пятнах, которые образуют на зубах не растворимые в воде сетчатые полимеры декстраны, состоящие из $\alpha(1\rightarrow6)$-связанных глюкозных единиц и имеющие множество точек $\alpha(1\rightarrow3)$-ветвления. Для полимеризации декстрана требуется сахароза пищи; реакция катализируется бактериальным ферментом декстрансахарозоглюкозилтрансферазой.

а) Напишите полную реакцию полимеризации декстрана.

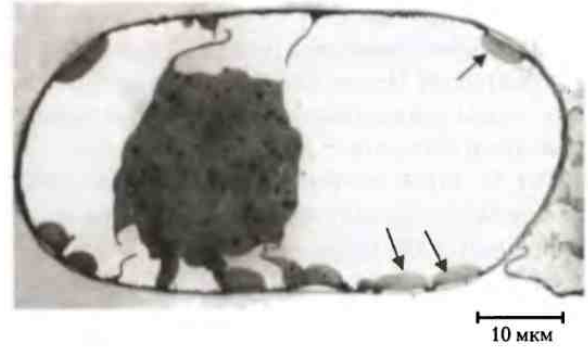
б) Кроме того, что сахар служит субстратом при образовании зубных пятен, каким образом сахароза пищи обеспечивает бактерии, обитающие в ротовой полости, обильным источником метаболической энергии?

18. Различия между C_3- и C_4-растениями. Род растений *Artiplex* включает несколько C_3- и несколько C_4-растений. Пользуясь графиками

(вид 1, черная кривая; вид 2, красная кривая) идентифицируйте, какое из растений является C_3-растением, а какое — C_4-растением. Аргументируйте ответ, согласуя свои рассуждения с графическими данными.



19. C_4-путь в одной клетке. У типичных C_4-растений начальный захват CO_2 происходит в одном типе клеток, а цикл Кальвина — в другом (см. рис. 20-23). Вознесенская с коллегами* описали растение *Bienertia cycloptera*, которое растет на почвах слабой засоленности в полупустынях Центральной Азии. Растение проявляет биохимические свойства C_4-растения, но в отличие от типичных C_4-растений не разделяет реакции фиксации CO_2 в двух типах клеток. ФЕП-карбоксилаза и рубиско присутствуют у этого растения в одной и той же клетке. Однако под микроскопом видно, что в клетке два типа хлоропластов, которые локализованы в разных ее частях. Один тип содержит относительно мало гран (тилакоидов) и расположен по периферии, а типичные хлоропласты отделены от периферических хлоропластов большими вакуолями. Через вакуоли проходят тонкие цитозольные мостики, соединяя периферическую и центральную цитозоль.



Где вы ожидаете найти у этого растения (а) ФЕП-карбоксилазу, (б) рубиско; (в) гранулы крахмала? Объясните ответы на основе способа фиксации CO_2 в этих C_4-клетках.

Анализ экспериментальных данных

20. Рубиско из бактерий-эндосимбионтов, выделенных из животных, населяющих гидротермальные источники. Подводные гидротермальные источники — местообитание, где складываются удивительные экосистемы. На больших глубинах, где нет света, необходимого для фотосинтеза, обнаружены процветающие сообщества организмов. Их существование обеспечивает хемосинтез, осуществляемый бактериями-симбионтами, населяющими специфические органы (трофосомы) некоторых глубоководных животных.

Хемосинтез таких бактерий практически идентичен фотосинтезу. Диоксид углерода CO_2 фиксируется ферментом рубиско (рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазой) и восстанавливается до глюкозы, а необходимые количества ATP и NADPH образуются в процессе переноса электронов, сходном с тем, что происходит при световых реакциях фотосинтеза. Основное различие

* **Voznesenskaya, E. V., Fraceschi, V. R., Kiirats, O., Artyusheva, E. G., Freitag, H., & Edwards, G. E.** (2002) Proof of C4 photosynthesis without Kranz anatomy in Bienertia cycloptera (Chenopodiaceae). *Plant J.* **31**, 649–662.

состоит в том, что при хемосинтезе энергия, необходимая для перемещения электронов, берется из экзергонических химических реакций, а не из света. Для своих целей разные хемосинтезирующие бактерии используют различные реакции. Бактерии, обнаруженные в животных из гидротермальных источников, обычно используют окисление H_2S (которого много в глубоководных источниках) с помощью O_2, в результате чего образуется элементная сера. Эти бактерии также используют превращение H_2S в серу как источник электронов для восстановления CO_2.

а) Какова суммарная реакция хемосинтеза у этих бактерий? Нет необходимости подводить баланс в этом уравнении, лишь назовите исходные вещества и продукты.

б) В итоге энергия, используемая этими бактериями-эндосимбионтами, происходит от солнечного света. Объясните это утверждение.

Робинсон с коллегами (2003) использовали свойства рубиско из бактерии-симбионта, поселяющегося в гигантских трубчатых червях *Riftia pachyptila*. Рубиско из любого источника катализирует реакцию CO_2 (рис. 20-7) или O_2 (рис. 20-20) с рибулозо-1,5-бисфосфатом. Обычно рубиско легче реагирует с CO_2, чем с O_2. Степень селективности (Ω) можно выразить следующим образом:

$$V_{\text{карбоксилирование}} / V_{\text{оксигенирование}} = \Omega\,([CO_2]/[O_2])$$

где V — скорость реакции.

Робинсон с коллегами определили значение Ω для рубиско из бактерий-эндосимбионтов. Они очистили фермент из трофосом трубчатого червя, провели реакции со смесью O_2 и CO_2, взятых в разных соотношениях, в присутствии [1-^{3}H]рибулозо-1,5-бисфосфата и измерили отношение концентраций [^{3}H]фосфоглицерата и [^{3}H]фосфогликолата.

в) Измеренное отношение концентраций [^{3}H]фосфоглицерата и [^{3}H]фосфогликолата равно отношению $V_{\text{карбоксилирование}} / V_{\text{оксигенирование}}$. Объясните, почему.

г) Почему [5-^{3}H]рибулозо-1,5-бисфосфат — неподходящий субстрат для данного исследования?

Для рубиско из эндосимбионта $\Omega = 8{,}6 \pm 0{,}9$.

д) В атмосферном воздухе содержание молекул O_2 составляет 20%, а CO_2 — около 380 ppm (частей на миллион). Если бы эндосимбионты могли осуществлять реакции хемосинтеза при атмосферных условиях, определите отношение скоростей реакции $V_{\text{карбоксилирование}} / V_{\text{оксигенирование}}$?

е) Основываясь на своем ответе на предыдущее задание, оцените Ω для рубиско из наземных растений: $\Omega > 8{,}6$, $\Omega < 8{,}6$ или $\Omega = 8{,}6$. Поясните ответ.

В природе встречаются два стабильных изотопа углерода: преобладает изотоп ^{12}C, меньшую распространенность имеет ^{13}C. Катализируемые рубиско реакции фиксации $^{12}CO_2$ протекают быстрее, чем реакции фиксации $^{13}CO_2$. В результате молекула глюкозы немного обогащена ^{12}C по сравнению с изотопным составом CO_2 в окружающей среде. Предпочтительное использование $^{12}CO_2$ объясняется целым рядом факторов, в частности, физическими свойствами газов. Температура газа связана с кинетической энергией его молекул. Кинетическая энергия равна $^1/_2\,mv^2$, где m — молекулярная масса, а v — скорость молекул. Таким образом, при одинаковой температуре (одинаковой кинетической энергии) молекулы более легкого газа движутся быстрее молекул более тяжелого газа.

ж) Как этот факт связан с тем, что рубиско «предпочитает» $^{12}CO_2$ по сравнению с $^{13}CO_2$?

Одним из первых доказательств того, что трубчатые черви получают фиксированный углерод от эндосимбионтов, был тот факт, что в организме этих животных отношение $^{13}C/^{12}C$ гораздо ближе к соответствующему значению у бактерий, чем у других морских животных.

з) Почему это является более убедительным доказательством симбиоза, чем более ранние исследования, просто показавшие наличие рубиско у бактерий из трофосом?

Литература

Robinson, J. J., Scott, K. M., Swanson, S. T., O'Leary, M. H., Horken, K., Tabita, F. R., & Cavanaugh, C. M. (2003) Kinetic isotope effect and characterization of form II RubisCO from the chemoautotrophic endosymbionts of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Limnol. Oceanogr.* **48**, 48–54.

Не помню, как возникло «разделение труда». Возможно, мы тянули жребий. Во всяком случае Дэвид Шемин «вытянул» метаболизм аминокислот, что привело к его классической работе по биосинтезу гема. Дэвиду Ритенбургу выпало продолжать удовлетворение своего интереса к синтезу и обмену белков, а липиды достались на мою долю.

Конрад Блох, о том, как судьба привела его к проблемам липидного метаболизма после смерти его руководителя Рудольфа Шёнхеймера; *статья в* Annual Review of Biochemistry, *1987*

21

Биосинтез липидов

21.1. Биосинтез жирных кислот и эйкозаноидов 445

21.2. Биосинтез триацилглицеринов 464

21.3. Биосинтез мембранных фосфолипидов 470

21.4. Биосинтез холестерина, стероидов и изопреноидов 479

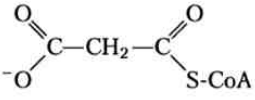
Липиды играют в клетке множество ролей, и о некоторых из этих ролей (функций) стало известно совсем недавно. У большинства организмов липиды — главная форма запасания энергии, а также преобладающий компонент клеточных мембран. Специализированные липиды служат пигментами (ретиналь, каротин), кофакторами (витамин K), детергентами (желчные соли), транспортерами (долихолы), гормонами (производные витамина D, половые гормоны), межклеточными и внутриклеточными мессенджерами (эйкозаноиды, производные фосфатидилинозита) и якорями для мембранных белков (ковалентно связанные жирные кислоты, пренильные группы и фосфатидилинозит). Способность синтезировать множество липидов жизненно необходима всем организмам. В этой главе описаны пути биосинтеза некоторых из наиболее распространенных клеточных липидов, показаны алгоритмы, используемые для сборки этих нерастворимых в воде продуктов из водорастворимых предшественников, таких как ацетат. Подобно другим биосинтетическим путям, эти последовательности реакций происходят эндергонически и по своей сути они восстановительные. Они используют ATP в качестве источника метаболической энергии и восстановленные переносчики электрона (обычно NADPH) в качестве восстановителей.

Сначала мы опишем биосинтез жирных кислот (первичных компонентов триацилглицеринов) и фосфолипидов, затем исследуем сборку (с участием жирных кислот) триацилглицеринов и более простых мембранных фосфолипидов. Наконец, мы рассмотрим синтез холестерина, компонента некоторых мембран и предшественника стероидов, таких как желчные кислоты, половые гормоны и гормоны надпочечников.

21.1. Биосинтез жирных кислот и эйкозаноидов

После открытия, что окисление жирных кислот происходит путем последовательного окислительного отщепления двухуглеродных (ацетил-CoA) фрагментов (см. рис. 17-8), биохимики предположили, что биосинтез жирных кислот,

вероятно, происходит просто в обратных реакциях тех же самых ферментативных стадий. Однако, как удалось обнаружить, биосинтез и распад жирных кислот протекают по различным путям, катализируются разными наборами ферментов и идут в разных частях клетки. Более того, биосинтез требует участия трехуглеродного промежуточного соединения **малонил-CoA**, который не задействован в распаде жирных кислот.



Малонил-CoA

Прежде всего мы сосредоточимся на реакциях синтеза жирных кислот, затем переключимся на регуляцию этого метаболического пути и на биосинтез длинноцепочечных жирных кислот, ненасыщенных жирных кислот и их производных — эйкозаноидов.

Малонил-CoA образуется из ацетил-CoA и гидрокарбоната

Образование малонил-CoA из ацетил-CoA — необратимый процесс, который катализируется **ацетил-CoA-карбоксилазой**. Бактериальный фермент состоит из трех полипептидных субъединиц (**рис. 21-1**); в животных клетках ферментативную активность обеспечивает один полифункциональный полипептид. Растительные клетки содержат оба типа ацетил-CoA-карбоксилазы. Фермент с биотином как простетической группой всегда ковалентно связан амидной связью с ε-аминогруппой остатка Lys одной из трех полипептидных субъединиц или одного из доменов полифункционального фермента. Двухстадийная реакция, катализируемая этим ферментом, очень похожа на другие био тин-зависимые реакции карбоксилирования, например катализируемые пируваткарбоксилазой (рис. 16-16) и пропионил-CoA-карбоксилазой (рис. 17-11).

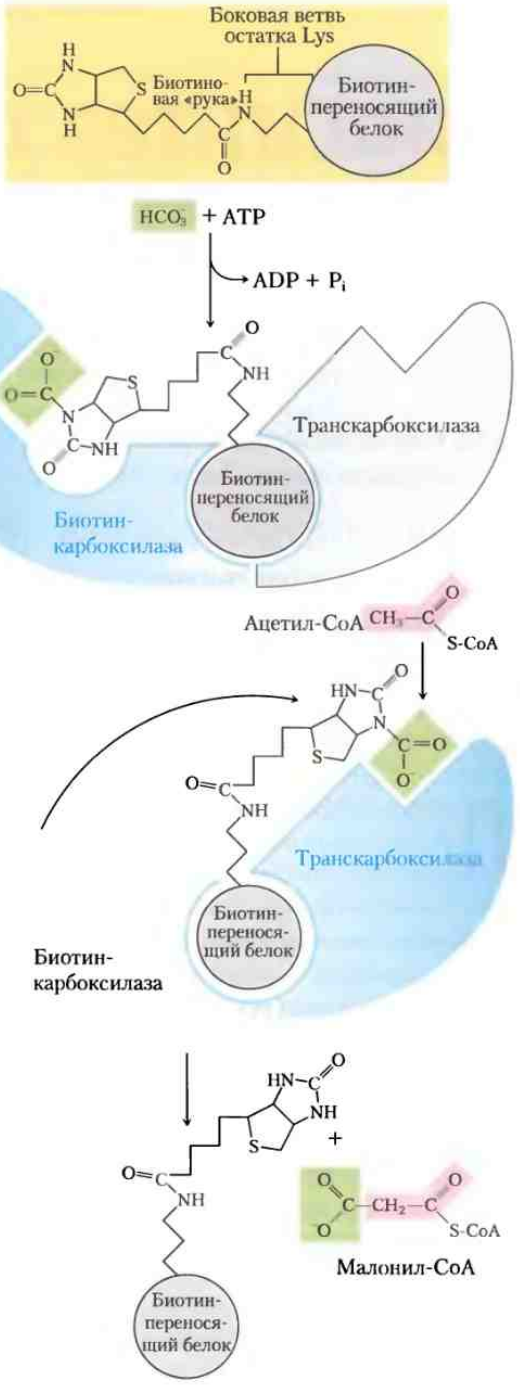


Рис. 21-1. Реакция ацетил-CoA-карбоксилазы. Ацетил-CoA-карбоксилаза имеет три функциональные области: биотин-переносящий белок (серый); биотинкарбоксилазу, которая активирует CO_2, присоединяя его к азоту в биотиновом кольце путем АТР-зависимой реакции (см. рис. 16-16), и транскарбоксилазу, которая переносит активированный CO_2 (выделен зеленым) с биотина на ацетил-CoA, образуя малонил-CoA. Длинная подвижная биотиновая «рука» переносит активированный CO_2 от биотинкарбоксилазы на активный центр транскарбоксилазы. Активный фермент в каждой стадии выделен голубым.

Карбоксильная группа, получающаяся из гидрокарбоната (HCO_3^-), первой переносится на биотин в АТР-зависимой реакции. Биотинильная группа служит временным переносчиком CO_2, во второй стадии передавая его на ацетил-CoA с образованием малонил-CoA.

Синтез жирных кислот происходит в повторяющихся реакционных циклах

У всех организмов длинные углеродные цепи жирных кислот собираются в ходе четырехстадийной последовательности реакций (**рис. 21-2**), которая катализируется ферментативной системой, называемой **синтазой жирных кислот** (СЖК).

Насыщенная ацильная группа, получающаяся в этих реакциях, становится субстратом для последующей конденсации с активированной малонильной группой. При каждом обороте цикла длина жирнокислотной цепи увеличивается на два углерода.

В восстановительной анаболической последовательности реакций и переносящий электроны кофактор, и активирующие группы отличаются от участвующих в окислительном катаболическом процессе. Вспомним, что в β-окислении акцепторами электрона служат NAD^+ и FAD, а активирующей группой — тиольная (–SH) группа кофермента А (см. рис. 17-8). В противоположность этому восстанавливающий агент в последовательности реакций биосинтеза — это NADPH, а активирующими группами являются, как будет описано в следующем разделе, две связанные с ферментом группы –SH.

Существуют два основных типа синтазы жирных кислот (СЖК): синтаза типа I обнару-

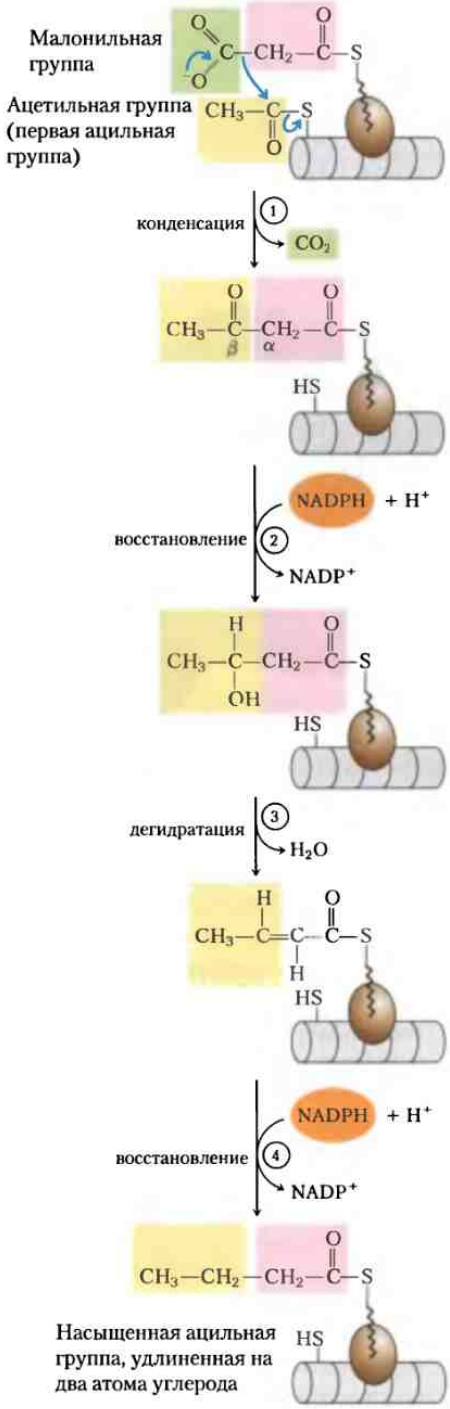


Рис. 21-2. Присоединение двух атомов углерода к ацилу жирной кислоты: четыре стадии. Любой ацил (малонил, ацетил или более длинный ацил) активируются путем присоединения к синтазе жирных кислот тиоэфирной связью. ① Ацильная цепь удлиняется на два атома углерода за счет конденсации активированного ацила (ацетил из ацетил-CoA начинает ряд ацилов) и двух атомов углерода из малонил-CoA, при этом CO_2 из малонильной группы удаляется. Чтобы проиллюстрировать роль декарбоксилирования в облегчении конденсации, приведен механизм первой стадии этой реакции. β-Кетопродукт этой конденсации затем восстанавливается еще в трех стадиях (почти идентичных реакциям β-окисления, но в обратной последовательности): ② β-кетогруппа восстанавливается до спиртовой, ③ удаление H_2O создает двойную связь и ④ двойная связь восстанавливается с образованием соответствующего насыщенного ацила жирной кислоты.

жена у позвоночных и грибов, а синтаза типа II — у растений и бактерий. Фермент позвоночных состоит из одной полифункциональной полипептидной цепи (M_r = 240 000). Прототип такого фермента — СЖК млекопитающих. Семь активных центров фермента, предназначенные для осуществления разных реакций, расположены в отдельных доменах (**рис. 21-3, *а***). Полипептид из клеток млекопитающих функционирует в виде гомодимера (M_r = 480 000). По-видимому, субъединицы фермента работают независимо друг от друга. Если в результате мутации инактивируются все активные центры на одной из субъединиц, синтез жирных кислот хотя и ослабевает, но совсем незначительно. У пекарских дрожжей и грибов других видов обнаружена другая синтаза типа I, состоящая из двух полифункциональных полипептидных цепей. Этот ферментативный комплекс отличается от фермента позвоночных (рис. 21-3, *б*): из семи активных центров три располагаются на α-субъединице, а четыре других — на β-субъединице.

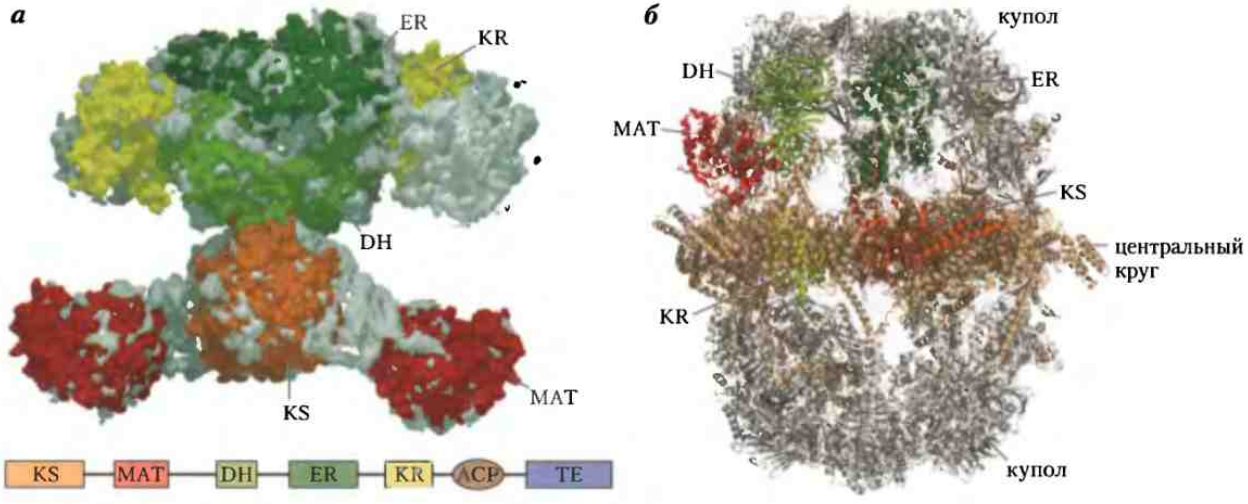


Рис. 21-3. Структура синтазы жирных кислот типа I. Приведены структуры СЖК, полученные с низким разрешением, из клеток (*а*) млекопитающих (свинья; по PDB ID 2CF2) и (*б*) грибов (по PDB ID 2UV9, 2UVA, 2UVB и 2UVC). *а* — в ферментной системе млекопитающих все активности находятся в разных доменах одной большой полипептидной цепи. Присутствуют следующие ферментативные активности: 3-кетоацил-[ACP]-синтаза (KS), [ACP]-S-малонил/ацетилтрансфераза (MAT), 3-гидроксиацил-[ACP]-дегидратаза (DH), еноил-[ACP]-редуктаза (ER) и 3-кетоацил-[ACP]-редуктаза (KR), где ACP — ацилпереносящий белок. Под структурой показано расположение доменов в этом полипептиде. Седьмой домен — это тиоэстераза (TE), отщепляющая пальмитат от ACP при завершении синтеза. Домены ACP и TE при кристаллизации разрушаются, поэтому они здесь не показаны. *б* — в структуре синтазы жирных кислот типа I из гриба *Thermomyces lanuginosus* присутствуют те же активные центры, но они распределены между двумя полифункциональными полипептидными цепями, действующими совместно. В 12-доменном ферментном комплексе обнаружены по шесть копий с каждого полипептида; шесть α-субъединиц, содержащих ACP и активности KS и KR располагаются в центре комплекса по кругу: три субъединицы с одной стороной, три — с другой. Вверху и внизу этот круг венчают «купола», построенные из тримеров β-субъединиц с активностями ER и DH. Домены субъединиц каждого типа окрашены в те же цвета, что и соответствующие активные центры в ферментативной системе млекопитающих на рисунке (*а*).

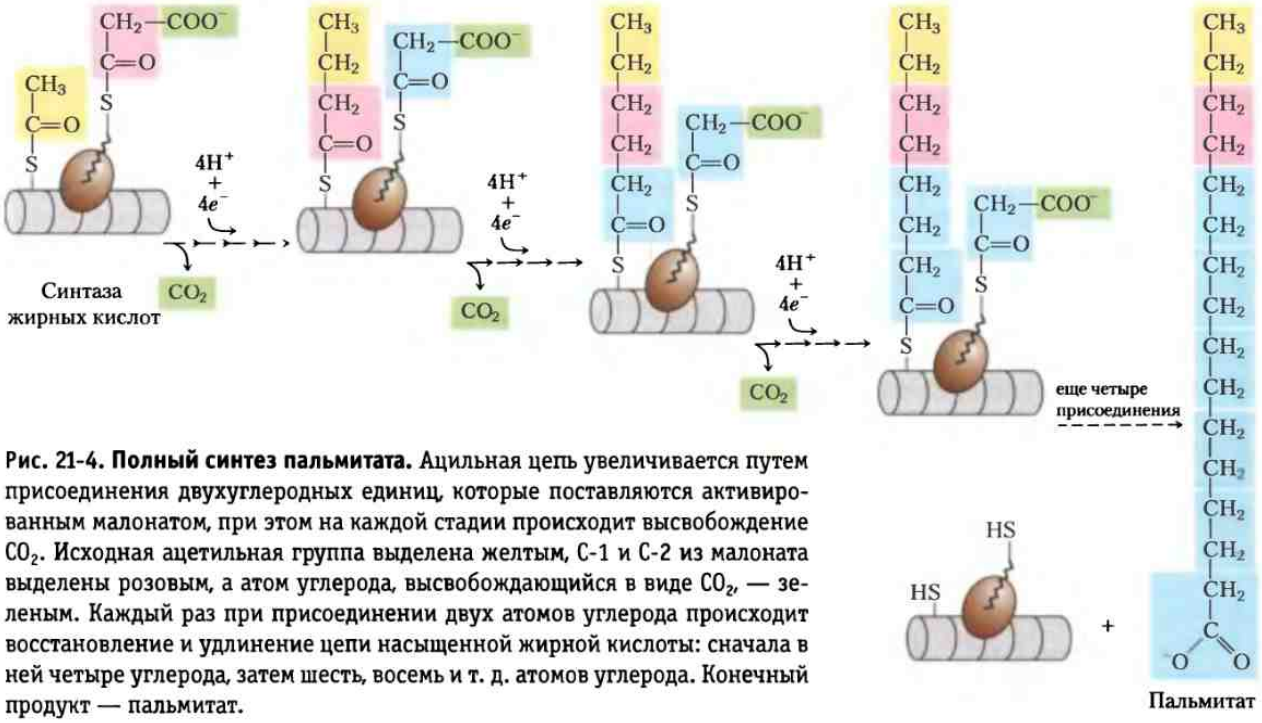


Рис. 21-4. Полный синтез пальмитата. Ацильная цепь увеличивается путем присоединения двухуглеродных единиц, которые поставляются активированным малонатом, при этом на каждой стадии происходит высвобождение CO_2. Исходная ацетильная группа выделена желтым, С-1 и С-2 из малоната выделены розовым, а атом углерода, высвобождающийся в виде CO_2, — зеленым. Каждый раз при присоединении двух атомов углерода происходит восстановление и удлинение цепи насыщенной жирной кислоты: сначала в ней четыре углерода, затем шесть, восемь и т. д. атомов углерода. Конечный продукт — пальмитат.

При синтезе жирных кислот с помощью СЖК типа I происходит образование единственного продукта без высвобождения промежуточных продуктов. Когда длина цепи достигает 16 атомов углерода, продукт (пальмитат, 16:0, см. табл. 10-1) покидает цикл. В молекуле пальмитата атомы С-16 и С-15 происходят из метильного и карбоксильного углеродов ацетил-CoA, который участвует в самой первой стадии (**рис. 21-4**); остальные атомы углерода приходят от малонил-CoA.

У растений и бактерий СЖК типа II действует по-другому: каждую стадию синтеза катализирует отдельный и свободно диффундирующий фермент. Промежуточные продукты биосинтеза также могут диффундировать и участвовать в других путях биосинтеза (например, в синтезе липоевой кислоты). В отличие от СЖК типа I, СЖК типа II генерирует несколько продуктов, включая насыщенные жирные кислоты с разной длиной цепи, а также ненасыщенные разветвленные жирные кислоты и гидроксикислоты. Синтаза жирных кислот типа II обнаружена также в митохондриях позвоночных. Ниже мы остановимся подробнее на СЖК типа I из клеток млекопитающих.

Синтаза жирных кислот млекопитающих содержит несколько активных центров

Домены синтазы жирных кислот типа I из клеток млекопитающих действуют как отдельные, но связанные между собой ферменты. Активные центры находятся в разных доменах полипептидной цепи фермента.

Промежуточные продукты синтеза ацилов жирных кислот ковалентно связаны тиоэфирной связью с одной или двумя тиольными группами синтазного комплекса вплоть до финальной стадии этой ферментативной реакции. Присоединение происходит по –SH-группе остатка Cys в одном из семи доменов синтазы (например, в β-кетоацил-ACP-синтазе; KS) и по –SH-группе в ACP, другого домена этого же полипептида. Гидролиз тиоэфиров экзергоничен; высвобождающаяся энергия делает термодинамически выгодными две стадии синтеза жирных кислот (① и ⑤ на рис. 21-6).

Ацилпереносящий белок (ACP) — это челнок, связывающий между собой отдельные участки ферментного комплекса. ACP из клеток *Escherichia coli* — это небольшой белок (M_r = 8860), содержащий простетическую группу

4′-фосфопантатеин (рис. 21-5; сравните с пантотеновой кислотой и β-меркаптоэтиламиновым фрагментом кофермента А на рис. 8-38, т. 1). Считается, что 4′-фосфопантатеиновая простетическая группа ACP служит гибким манипулятором, присоединяющим растущую жирноацильную цепь к поверхности комплекса синтазы жирных кислот при переносе промежуточных продуктов реакции от активного центра одного фермента к следующему. ACP из клеток млекопитающих выполняет похожую функцию и содержит ту же простетическую группу. Однако, как мы видели, он является доменом гораздо более крупного полифункционального полипептида.

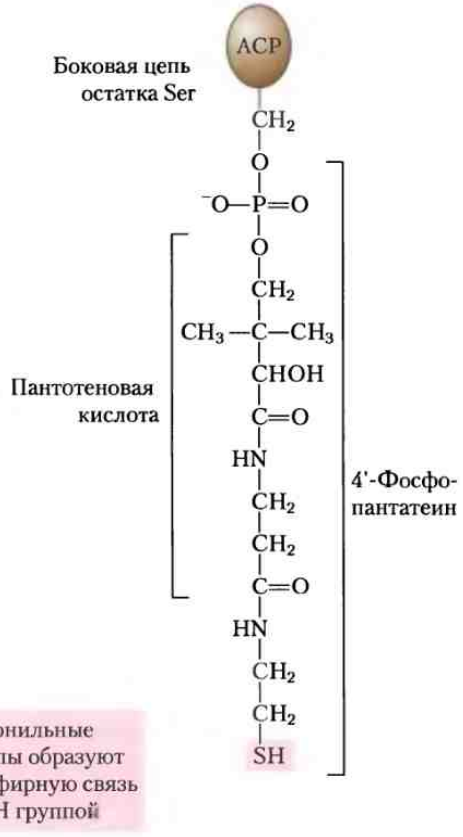


Рис. 21-5. Ацилпереносящий белок (ACP). Простетической группой является 4′-фосфопантатеин, который ковалентно связывается с гидроксильной группой остатка Ser в ACP. Фосфопантотеин содержит пантотеновую кислоту (витамин B_5), входящую также в состав молекулы кофермента А. При синтезе жирных кислот малонильные группы вводятся по –SH-группе фосфопантатеина.

Синтаза жирных кислот присоединяет ацетильную и малонильную группы

Прежде чем могут начаться реакции конденсации, которые достраивают жирнокислотную цепь, на двух тиольных группах в ферментном комплексе должны быть созданы заряды с помощью ионизованных ацильных групп (**рис. 21-6**, *вверху*). В первую очередь в реакции, катализируемой **малонил/ацетил-CoA-ACP-трансферазой** (этот фермент обозначен как MAT на рис. 21-6 и образует отдельный домен полифункционального полипептида), ацетильная группа ацетил-CoA переносится на ACP. Затем ацетильная группа переносится на –SH-группу цистеина **β-кетоацил-ACP-синтазы** (KS). Вторая реакция — перенос малонильной группы от малонил-CoA на –SH-группу ACP — также катализируется малонил/ацетил-CoA-ACP-трансферазой. В ионизованном синтазном комплексе ацетильная и малонильная группы находятся очень близко друг к другу и, чтобы произошло удлинение цепи, они должны быть просто активированы. Первые четыре стадии этого процесса мы сейчас рассмотрим довольно подробно; номера стадий соответствуют номерам на рис. 21-6.

Стадия ①. Конденсация. При образовании жирнокислотной цепи первой реакций формально является конденсация Кляйзена с участием активированных ацетильной и малонильной групп, в результате чего получается **ацетоацетил-ACP**, где ацетоацетильная группа связана с ACP через –SH-группу фосфопантатеина; одновременно высвобождается молекула CO_2. В этой реакции, катализируемой β-кетоацил-ACP-синтазой (KS), ацетил переносится от –SH-группы на цистеине в молекуле фермента к малонилу на –SH в ACP и становится двухуглеродной единицей новой ацетоацетильной группы с метилом на конце.

Углеродный атом CO_2, образующегося в этой реакции, — это тот самый атом углерода, который был первоначально введен в малонил-CoA из HCO_3^- путем карбоксилазной реакции (рис. 21-1). Таким образом, при биосинтезе жирных кислот CO_2 связан ковалентно и только на время; он удаляется по мере добавления каждой двухуглеродной единицы.

Почему же клетки, которые «трудились», чтобы присоединить CO_2 и создать малонильную группу из ацетильной, теперь теряют CO_2, образуя ацетоацетат? Вспомним, что при

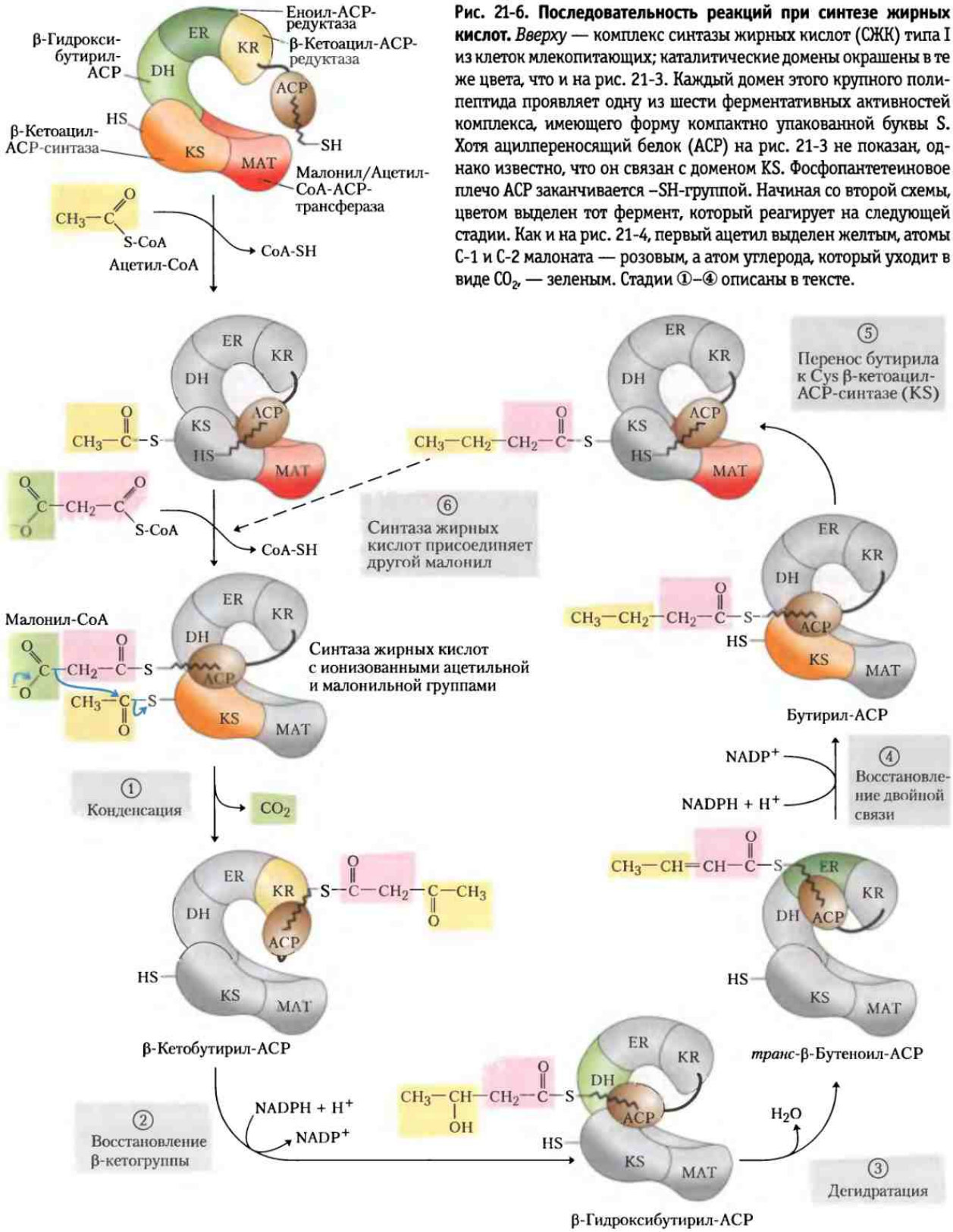


Рис. 21-6. Последовательность реакций при синтезе жирных кислот. *Вверху* — комплекс синтазы жирных кислот (СЖК) типа I из клеток млекопитающих; каталитические домены окрашены в те же цвета, что и на рис. 21-3. Каждый домен этого крупного полипептида проявляет одну из шести ферментативных активностей комплекса, имеющего форму компактно упакованной буквы S. Хотя ацилпереносящий белок (ACP) на рис. 21-3 не показан, однако известно, что он связан с доменом KS. Фосфопантетеиновое плечо ACP заканчивается –SH-группой. Начиная со второй схемы, цветом выделен тот фермент, который реагирует на следующей стадии. Как и на рис. 21-4, первый ацетил выделен желтым, атомы C-1 и C-2 малоната — розовым, а атом углерода, который уходит в виде CO_2, — зеленым. Стадии ①–④ описаны в тексте.

β-окислении жирных кислот (см. рис. 17-8) расщепление связи между двумя ацилами (отщепление ацетила от ацильной цепи) очень экзергонично, так что простая конденсация двух ацилов (например, двух молекул ацетил-CoA) — в высшей степени эндергоничная реакция. Именно использование активированного малонила, а не ацетила делает реакции конденсации термодинамически выгодными. Метиленовый углерод (C-2) малонильной группы, находящийся между карбонильным и карбоксильным атомами углерода, как в сэндвиче, удобен в качестве хорошего нуклеофила. На стадии конденсации (стадия ①) декарбоксилирование малонильной группы облегчает нуклеофильную атаку метиленового углерода тиоэфира, связывающего ацетил с β-кетоацил-ACP-синтазой, перемещая –SH-группу фермента. Сопряжение конденсации с декарбоксилированием малонила делает весь процесс в высокой степени экзергоничным. Похожие последовательные реакции карбоксилирования–декарбоксилирования облегчают образование фосфоенолпирувата из пирувата при глюконеогенезе (см. рис. 14-17).

Используя активированные малонилы в синтезе жирных кислот и активированный ацетат в их деградации, клетка делает оба процесса энергетически благоприятными, хотя по результату они противоположны. Дополнительную энергию, необходимую для того, чтобы сделать синтез жирных кислот энергетически выгодным, предоставляет ATP, который участвует в синтезе малонил-CoA из ацетил-CoA и HCO_3^- (рис. 21-1).

Стадия ②. Восстановление карбонильной группы. Карбонильная группа на C-3 ацетоацетила-ACP, образованного на стадии конденсации, восстанавливается до D-β-гидроксибутирил-ACP. Эта реакция катализируется **β-кетоацил-ACP-редуктазой** (KR), а донором электронов служит NADPH. Заметим, что геометрия D-β-гидроксибутирильной группы не такая, как у L-β-гидроксиацильного интермедиата при окислении жирных кислот (см. рис. 17-8).

Стадия ③. Дегидратация. От C-2 и C-3 в D-β-гидроксибутирил-ACP удаляется молекула воды с образованием двойной связи в продукте реакции ***транс*-Δ^2-бутеноил-ACP**. Эту дегидратацию катализирует фермент **β-гидроксиацил-ACP-дегидратаза** (HD).

Стадия ④. Восстановление двойной связи. Наконец, двойная связь *транс*-Δ^2-бутеноил-ACP восстанавливается – под действием **еноил-ACP-редуктазы** (ER) образуется **бутирил-ACP**; причем донором электрона вновь служит NADPH.

Реакции, катализируемые синтазой жирных кислот, повторяются до образования пальмитата

Образование ACP, содержащего насыщенный жирный ацил, завершает один проход через комплекс синтазы жирных кислот. Бутирил переносится теперь от –SH фосфопантатеина в ACP на –SH-группу цистеина в β-кетоацил-ACP-синтазе, которая первоначально несла ацетил (рис. 21-6). Чтобы начать следующий цикл из четырех реакций, удлиняющий цепь еще на два атома углерода, к незанятой в этот момент –SH-группе фосфопантатеина в ACP присоединяется другой малонил **(рис. 21-7)**. Происходит конденсация – бутирил, как ацетил в первом цикле, связывает два атома углерода малонил-ACP с одновременным высвобождением CO_2. Продуктом этой конденсации является шестиуглеродный ацил, ковалентно связанная с –SH-группой фосфопантатеина. В следующих трех реакциях синтазного цикла β-кетогруппа восстанавливается и, как и в первой стадии, образуется шестиуглеродный продукт.

Семь циклов конденсации–восстановления производят 16-углеродную насыщенную пальмитоильную группу, пока еще связанную с ACP. По недостаточно пока понятной причине элонгация цепи синтазным комплексом в этот момент прекращается, и свободный пальмитат под действием гидролитического компонента комплекса (тиоэстеразы; TE) отщепляется от ACP.

Можно считать, что полная реакция синтеза пальмитата из ацетил-CoA состоит из двух стадий. Первая стадия — это образование семи молекул малонил-CoA:

$$7\ \text{Ацетил-CoA} + 7\ CO_2 + 7\ \text{ATP} \rightarrow 7\ \text{малонил-CoA} + 7\ \text{ADP} + 7\ P_i \quad (21\text{-}1)$$

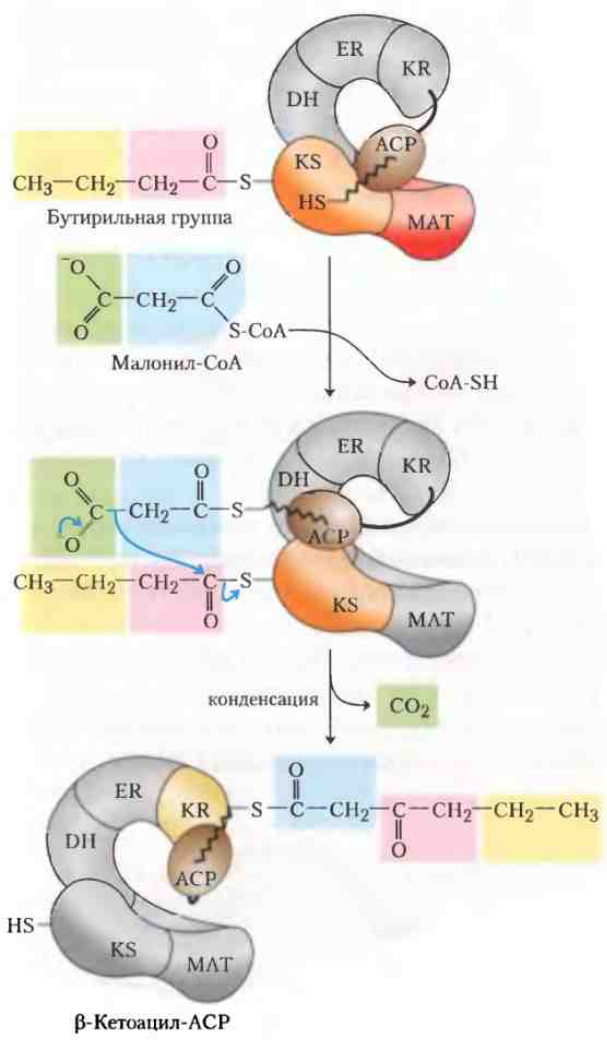


Рис. 21-7. Начало второй стадии цикла синтеза жирных кислот. Бутирил находится на –SH-группе Cys. Приходящий малонил присоединяется сначала к фосфопантетеиновой –SH-группе. Затем на стадии конденсации вся бутирильная группа на Cys–SH заменяется на карбоксильную группу малонильного остатка, часть которого уходит в виде CO_2 (зеленый цвет). Эта стадия аналогична стадии ① на рис. 21-6. Продукт, шестиуглеродная β-кетоацильная группа, содержит теперь четыре углерода из малонил-CoA и два углерода из ацетил-CoA, который начинал реакцию. β-Кетоацильная группа затем проходит через стадии ②–④ (рис. 21-6).

Затем происходят семь циклов конденсации–восстановления:

$$\text{Ацетил-CoA} + 7\ \text{малонил-CoA} + 14\ \text{NADPH} + 14\ \text{H}^+ \rightarrow \text{пальмитат} + 7\ \text{CO}_2 + 8\ \text{CoA} + 14\ \text{NADP}^+ + 6\ \text{H}_2\text{O} \quad (21\text{-}2)$$

Обратите внимание, в итоге образуется шесть молекул воды, поскольку одна молекула расходуется для гидролиза тиоэфирной связи между пальмитатом (продуктом реакции) и ферментом. Суммарная реакция (уравнения 21-1 и 21-2):

$$8\ \text{Ацетил-CoA} + 7\ \text{ATP} + 14\ \text{NADPH} + 14\ \text{H}^+ \rightarrow \text{пальмитат} + 8\ \text{CoA} + 7\ \text{ADP} + 7\ \text{P}_i + 14\ \text{NADP}^+ + 6\ \text{H}_2\text{O} \quad (21\text{-}3)$$

Таким образом, биосинтез жирных кислот, таких как пальмитат, нуждается в ацетил-CoA и в поступлении химической энергии в двух формах: энергии переноса группы ATP и восстановительного потенциала NADPH. Для присоединения CO_2 к ацетил-CoA с образованием малонил-CoA необходим ATP; NADPH требуется для восстановления двойных связей.

У нефотосинтезирующих эукариот синтез жирных кислот требует дополнительных затрат, поскольку образующийся в митохондриях ацетил-CoA должен быть перенесен в цитозоль. Как мы увидим далее, при этом на перенос одной молекулы ацетил-CoA затрачиваются две молекулы ATP, что увеличивает энергетические затраты в синтезе жирных кислот до трех молекул ATP на один двухуглеродный фрагмент.

Синтез жирных кислот у многих организмов происходит в цитозоле, а у растений — в хлоропластах

У большинства высших эукариот комплекс синтазы жирных кислот находится исключительно в цитозоле (**рис. 21-8**), как и ферменты биосинтеза нуклеотидов, аминокислот и глюкозы. Такая локализация обеспечивает изоляцию реакций биосинтеза от катаболических реакций, многие из ко-

торых протекают в митохондриальном матриксе. Существует и соответствующая сегрегация (изоляция) электрон-переносящих кофакторов, используемых в анаболизме (в основном в реакциях восстановления), и кофакторов, используемых в катаболизме (в основном в реакциях окисления).

Обычно NADPH служит переносчиком электронов в анаболических, а NAD^+ — в катаболических реакциях. В гепатоцитах очень высокое отношение $[NADPH]/[NADP^+] \approx 75$, что обеспечивает сильное восстанавливающее окружение для восстановительного синтеза жирных кислот и других биомолекул. Цитозольное отношение $[NADPH]/[NAD^+]$ гораздо ниже, $\sim 8 \cdot 10^{-4}$, так что NAD^+-зависимый окислительный катаболизм глюкозы может происходить в том же компартменте и в то же самое время, что и синтез жирных кислот. В митохондриях отношение $[NADPH]/[NAD^+]$ немного выше, чем в цитозоле, что обусловлено потоком электронов к NAD^+ при окислении жирных кислот, аминокислот, пирувата и ацетил-CoA. В митохондриях высокое отношение $[NADPH]/[NAD^+]$ благоприятствует восстановлению кислорода в дыхательной цепи.

В гепатоцитах и адипоцитах цитозольный NADPH образуется главным образом в пентозофосфатном цикле (см. рис. 14-21) с участием **яблочного фермента** (малатдегидрогеназы, или малик-фермента; **рис. 21-9, *а***). Катализирующая образование NADP малатдегидрогеназа, обеспечивающая ассимиляцию углерода у C_4-растений (см. рис. 20-23), выполняет и другую функцию. Пируват, образующийся в реакции, показанной на рис. 21-9, *а*, возвращается в митохондрии. Необходимый для биосинтеза жирных кислот NADPH поставляется в гепатоциты и в молочные железы млекопитающих из пентозофосфатного пути (рис. 21-9, *б*).

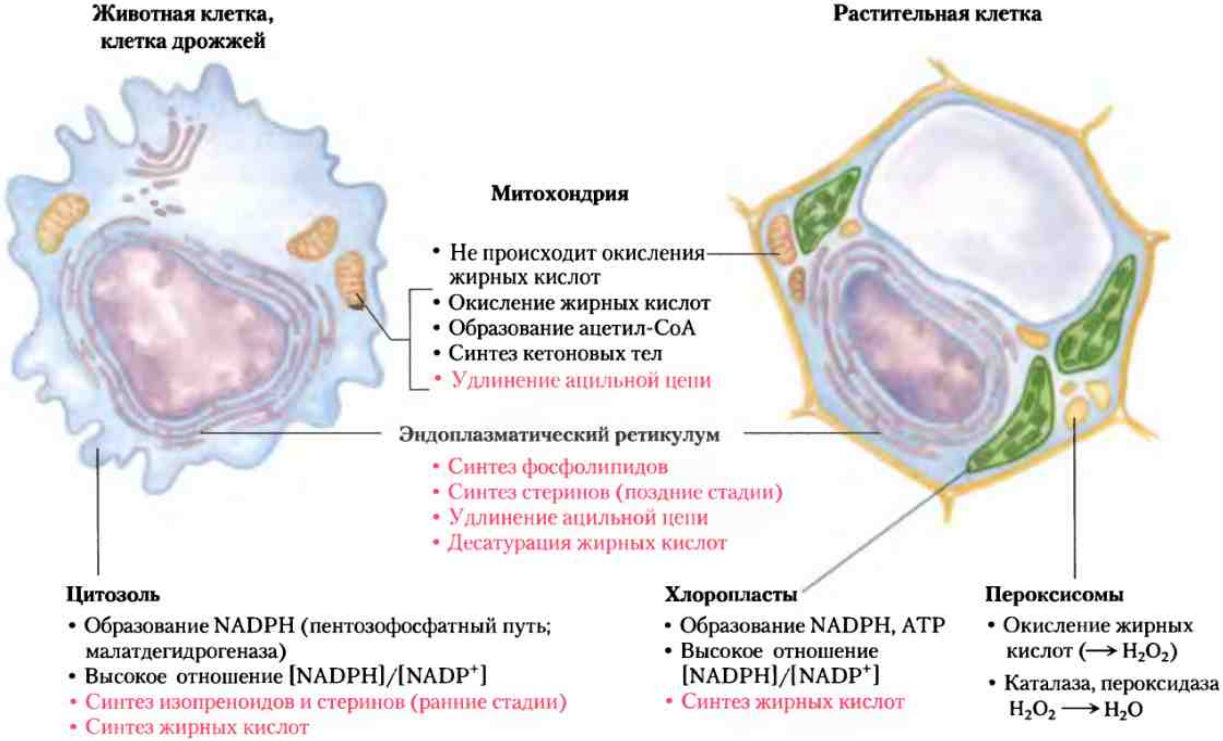


Рис. 21-8. Внутриклеточная локализация метаболизма липидов. Клетки дрожжей и позвоночных отличаются от клеток высших растений по компартментализации липидного метаболизма. Синтез жирных кислот происходит в компартменте, где NADPH доступен для восстановительного синтеза (т. е. где отношение $[NADPH/NADP^+]$ высокое). Красным шрифтом даны названия процессов, описанных в данной главе.

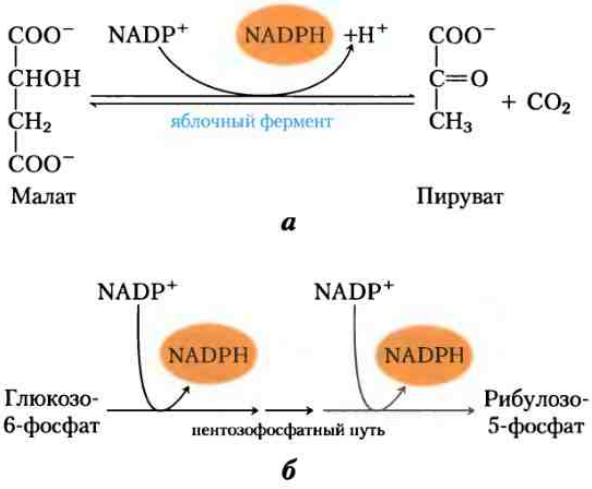


Рис. 21-9. Образование NADPH. Два пути образования NADPH: *а* — катализ яблочным ферментом и *б* — пентозофосфатный путь.

В фотосинтезирующих клетках растений синтез жирных кислот происходит не в цитозоле, а в строме хлоропласта (рис. 21-8). Это объясняется тем, что NADPH образуется в хлоропластах в ходе световых реакций фотосинтеза:

$$H_2O + NADP^+ \xrightarrow{\text{Свет}} \tfrac{1}{2}O_2 + NADPH + H^+$$

Ацетат выводится из митохондрий в виде цитрата

У нефотосинтезирующих эукариот почти весь ацетил-CoA, используемый в синтезе жирных кислот, образуется в митохондриях в результате окисления пирувата и катаболизма углеродных остовов аминокислот. Ацетил-CoA, образующийся при окислении жирных кислот, не вносит существенного вклада в биосинтез жирных кислот у животных, поскольку два этих пути взаиморегулируются, как описано ниже.

Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-CoA, поэтому ацетильные эквиваленты переносит через внутреннюю мембрану дополнительный челнок (**рис. 21-10**). Внутримитохондриальный ацетил-CoA сначала реагирует с оксалоацетатом в цикле лимонной кислоты, образуя цитрат по реакции, катализируемой **цитратсинтазой** (см. рис. 16-7).

Затем цитрат проходит через внутреннюю мембрану на **цитратный транспортер**. В цитозоле при расщеплении цитрата цитратлиазой в результате АТР-зависимой реакции регенерируется ацетил-CoA. Оксалоацетат не может вернуться непосредственно в митохондриальный матрикс, поскольку для него нет переносчика. Вместо этого цитозольная малатдегидрогеназа восстанавливает оксалоацетат до малата, который возвращается в митохондриальный матрикс с помощью малат-α-кетоглутаратного транспортера в обмен на цитрат. В матриксе малат повторно окисляется до оксалоацетата, завершая челночный цикл. Однако основные количества малата, образующегося в цитозоле, используются для производства цитозольного NADPH с помощью яблочного фермента (рис. 21-9, *а*). Образующийся пируват переносится в митохондрии специализированным переносчиком (рис. 21-10) и в матриксе превращается обратно в оксалоацетат при участии пируваткарбоксилазы. На этот цикл расходуется две молекулы АТР (одна нужна в цитратлиазной реакции, другая — пируваткарбоксилазной) на молекулу ацетил-CoA. После отщепления цитрата с образованием ацетил-CoA происходит превращение четырех оставшихся атомов углерода в молекулы пирувата и CO_2 при участии яблочного фермента, что сопровождается образованием приблизительно половины того количества NADPH, которое необходимо для синтеза жирных кислот. Остальной NADPH поступает из пентозофосфатного пути.

Биосинтез жирных кислот жестко регулируется

Когда у клетки или организма метаболической энергии больше, чем нужно для удовлетворения ее энергетических потребностей, этот избыток обычно конвертируется в жирные кислоты и сохраняется в виде липидов (триацилглицеринов). Реакция, катализируемая ацетил-CoA-карбоксилазой, является лимитирующей скорость стадией в биосинтезе жирных кислот, и этот фермент играет важную роль в регуляции. У позвоночных пальмитоил-CoA, главный продукт синтеза жирных кислот, действует по принципу обратной связи как ингибитор фермента; цитрат служит аллостерическим активатором (**рис. 21-11, *а***), увеличивающим V_{max}. Цитрат играет центральную роль в переключении клеточного метаболизма с потребления (окисления) метаболиче-

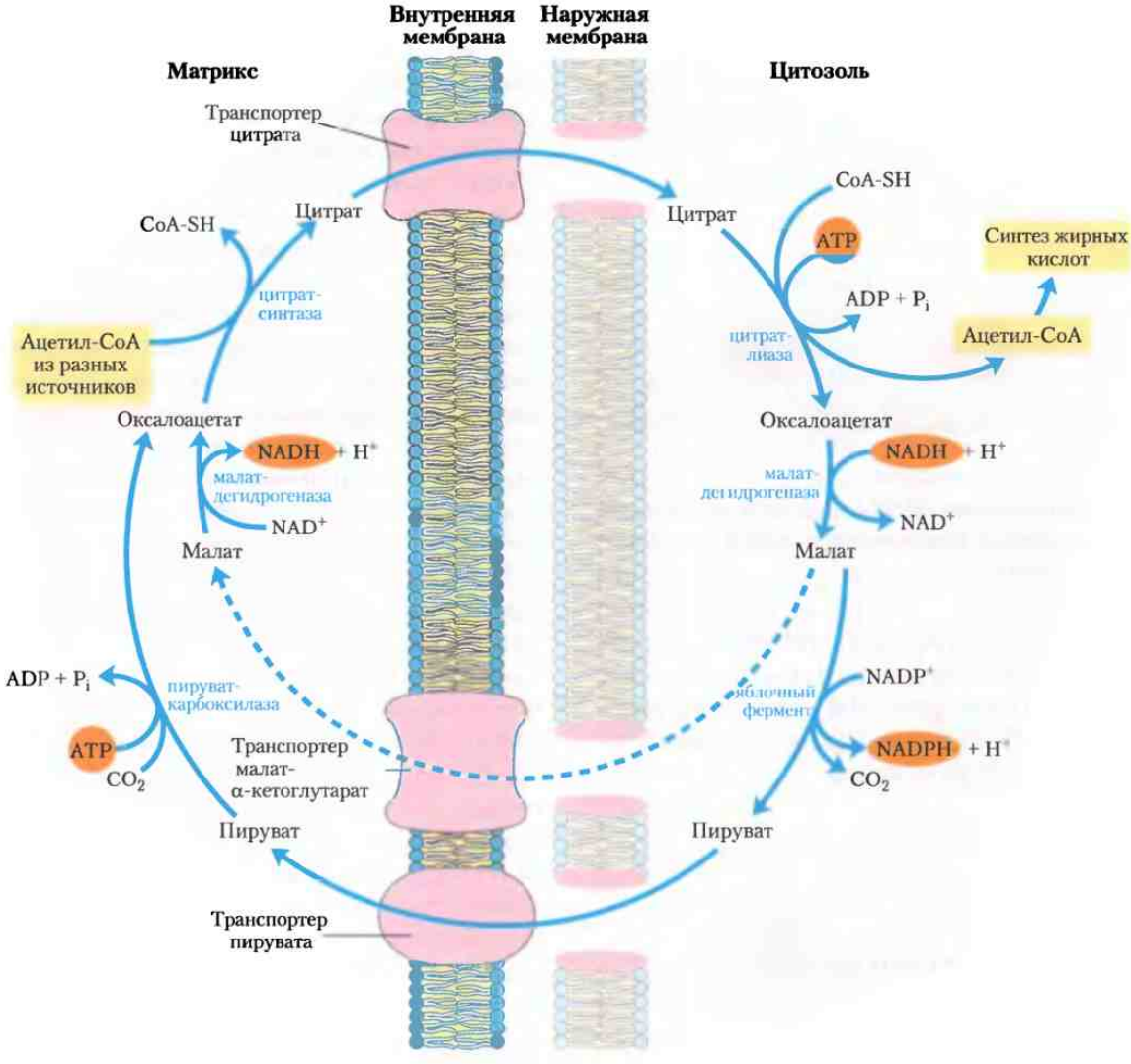


Рис. 21-10. Челнок для переноса ацетильных групп из митохондрий в цитозоль. Наружная митохондриальная мембрана легко проницаема для всех упомянутых компонентов. Пируват, образующийся при катаболизме аминокислот в митохондриальном матриксе или из глюкозы при гликолизе в цитозоле, превращается в ацетил-CoA в матриксе. Ацетильные группы выходят из митохондрии в виде цитрата; в цитозоль они доставляются для синтеза жирных кислот в виде ацетил-CoA. Оксалоацетат восстанавливается до малата, который возвращается в митохондриальный матрикс и превращается в оксалоацетат. Малат в цитозоле окисляется яблочным ферментом с образованием NADPH, который остается в цитозоле, а пируват возвращается в митохондриальный матрикс.

ского топлива на хранение его в виде жирных кислот. Когда концентрации митохондриальных ацетил-CoA и ATP увеличиваются, цитрат выводится из митохондрий; он становится и предшественником цитозольного ацетил-CoA, и аллостерическим сигналом для активации ацетил-CoA-карбоксилазы. Цитрат же ингибирует активность фосфофруктокиназы-1 (см. рис. 15-14), уменьшая обмен углерода в гликолизе.

Ацетил-CoA-карбоксилаза регулируется также путем ковалентной модификации. Фосфорилирование, приводимое в действие гормонами глюкагоном и адреналином, инактивирует фермент и уменьшает его чувствительность к активации цитратом, тем самым замедляя синтез жирных кислот. В активной (дефосфорилированной) форме ацетил-CoA-карбоксилаза полимеризуется, образуя длинные филаменты (рис. 21-11, *б*); фосфорилирование сопровождается диссоциацией на мономерные субъединицы и потерей активности.

Ацетил-CoA-карбоксилаза растений и бактерий не регулируется цитратом или циклом фосфорилирование–дефосфорилирование. Фермент растений активируется при увеличении pH и концентрации Mg^{2+} в строме, которое происходит при освещении растения (см. рис. 20-17). Бактерии не используют триацилглицерины как форму хранения энергии. У *E. coli* главная роль синтеза жирных кислот заключается в получении предшественников для синтеза мембранных липидов; этот процесс имеет сложную регуляцию при участии гуаниннуклеотидов (таких как ppGpp), которые координируют рост клетки и образование мембраны (см. рис. 8-39, т. 1; 28-24, т. 3).

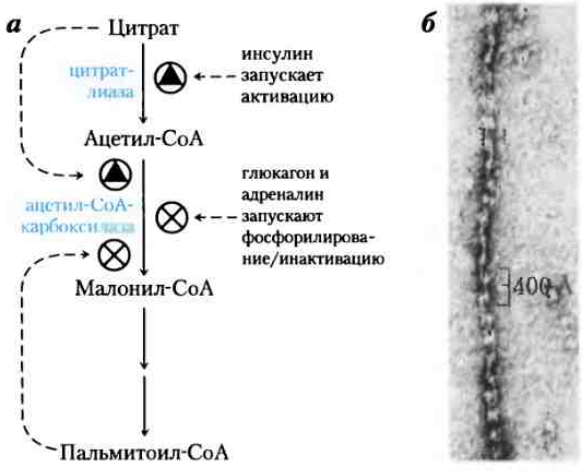


Рис. 21-11. Регуляция синтеза жирных кислот. *а* — в клетках позвоночных и аллостерическая регуляция, и гормонзависимая ковалентная модификация влияют на образование малонил-CoA из предшественников. У растений ацетил-CoA-карбоксилаза активируется изменениями концентрации Mg^{2+} и pH, которые происходят при освещении (не показано). *б* — филаменты ацетил-CoA-карбоксилазы (активная дефосфорилированная форма) в электронном микроскопе.

Наряду с регуляцией ферментативной активности эти метаболические пути дополнительно имеют регуляцию на уровне экспрессии генов. Например, когда животные переваривают избыточное количество некоторых полиненасыщенных жирных кислот, экспрессия генов, кодирующих целый ряд производящих липиды ферментов в печени, подавляется. Детальный механизм регуляции этих генов пока неясен.

Если бы синтез жирных кислот и β-окисление протекали одновременно, эти два процесса работали бы как бесполезный цикл с напрасной затратой энергии. Ранее мы отмечали (см. рис. 17-12), что β-окисление блокируется под действием малонил-CoA, который ингибирует карнитинацилтрансферазу I. При этом образование первого промежуточного продукта синтеза жирных кислот малонил-CoA останавливает β-окисление на уровне транспортной системы во внутренней мембране митохондрий. Этот регуляторный механизм иллюстрирует еще одно преимущество изоляции (сегрегации) процессов синтеза и распада в разных клеточных компартментах.

Длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты синтезируются из пальмитата

В животных клетках пальмитат, главный продукт системы синтазы жирных кислот, является предшественником других длинноцепочечных жирных кислот (**рис. 21-12**). Его можно удлинить до стеарата (18:0) или даже до более длинных насыщенных жирных кислот путем последовательного добавления ацетильных групп. Это происходит с помощью работы **системы элонгации жирных кислот**, которая находится в гладком эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях. Более активная система эндоплазматического ретикулума (ЭР) удлиняет 16-углеродную цепь пальмитоил-CoA на два атома углерода, образуя стеароил-CoA. Механизм элонгации в ЭР в остальном идентичен механизму синтеза пальмитата, хотя в них участвуют разные ферментные системы и более вероятным переносчиком ацила в этой реакции является кофермент A, а не ACP. Отщепление двух атомов углерода от малонил-CoA тоже происходит в ЭР, далее следует восстановление, дегидратация и восстановление до насыщенной 18-углеродной цепи, стеароил-CoA.

Рис. 21-12. Пути синтеза других жирных кислот. Пальмитат — предшественник стеарата и более длинноцепочечных насыщенных жирных кислот, а также мононенасыщенных кислот пальмитоолеата и олеата. Млекопитающие не могут превращать олеат в линолеат или линоленат (выделены розовым цветом), поэтому эти вещества должны присутствовать в пище; это незаменимые жирные кислоты. Схематически изображено превращение линолеата в другие полиненасыщенные жирные кислоты и эйкозаноиды. В названиях ненасыщенных жирных кислот указывают число углеродных атомов и положение двойных связей, как показано в табл. 10-1, т. 1.

Для десатурации жирных кислот требуются оксидазы со смешанной функцией

Пальмитат и стеарат служат предшественниками двух наиболее распространенных в животных тканях мононенасыщенных жирных кислот: пальмитоолеата, 16:1 (Δ^9) и олеата 18:1 (Δ^9); обе эти жирные кислоты содержат одну двойную связь в *цис*-положении между С-9 и С-10 (см. табл. 10-1). Двойная связь вводится в цепь жирной кислоты в окислительной реакции, катализируемой **ацил-CoA-десатуразой (рис. 21-13), оксидазой со смешанной функцией** (доп. 21-1).

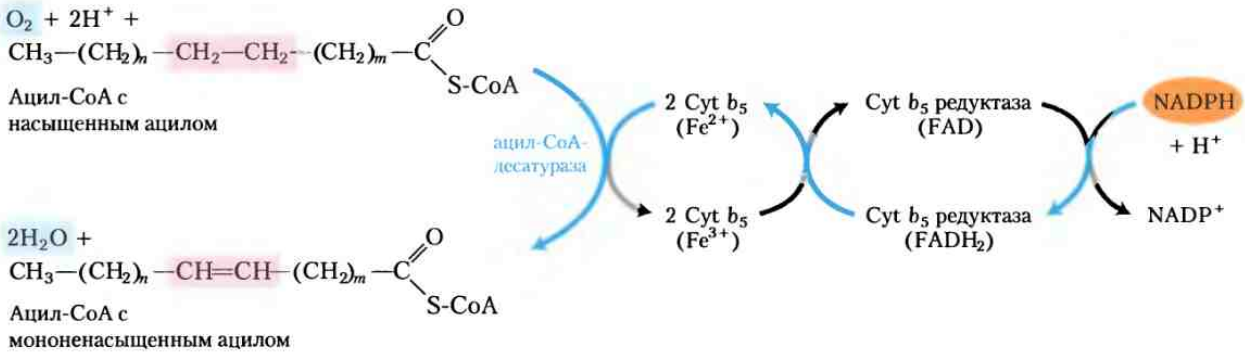


Рис. 21-13. Перенос электронов при десатурации жирных кислот у позвоночных. Голубые стрелки показывают путь электронов при окислении молекулярным кислородом двух субстратов: ацил-CoA и NADPH. Эти реакции происходят на внутренней поверхности гладкого ЭР. Похожий путь, но с участием других переносчиков электронов есть и у растений.

Два разных субстрата — жирная кислота и NADH или NADPH — одновременно подвергаются двухэлектронному окислению. Путь электронов проходит через цитохром (цитохром b_5,) и флавопротеин (цитохром-b_5-редуктазу). Оба этих компонента, как и ацил-CoA-десатураза, находятся в гладком ЭР. У бактерий две цитохром-b_5-редуктазы: NADH-зависимая и NADPH-зависимая. Какая из них выступает главным донором электронов *in vivo* — неясно. У растений олеат образуется в строме хлоропластов с помощью стеароил-ACP-десатуразы, которая в качестве донора электронов использует восстановленный ферредоксин.

Гепатоциты млекопитающих способны легко вводить двойные связи в положение Δ^9 жирных кислот, но не способны вводить дополнительные двойные связи между C-10 и концевой метильной группой. Таким образом, млекопитающие не могут синтезировать линолеат 18:2($\Delta^{9,12}$) или α-линоленат 18:3($\Delta^{9,12,15}$). Однако в растениях возможен синтез обоих этих веществ; десатуразы, которые вводят двойные связи в положения Δ^{12} или Δ^{15}, локализованы в ЭР и хлоропластах. Ферменты ЭР действуют не только на свободные жирные кислоты, но и на фосфолипид фосфатидилхолин, который содержит, по крайней мере, одну молекулу олеата, связанную с глицерином **(рис. 21-14)**. И растения, и бактерии должны синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты для обеспечения необходимой текучести мембран при пониженных температурах.

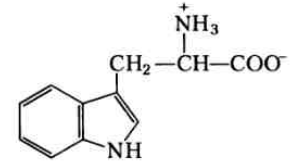
Поскольку линолеат и линоленат необходимы как предшественники для синтеза других продуктов, для млекопитающих они являются **незаменимыми жирными кислотами**. Млеко-

Дополнение 21-1 Оксидазы со смешанной функцией, оксигеназы и цитохром P-450

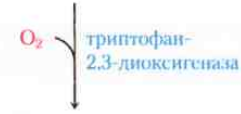
В этой главе мы говорили о нескольких ферментах, осуществляющих окислительно-восстановительные реакции с участием молекулярного кислорода. Одна из таких реакций — образование двойной связи в цепи жирной кислоты (см. рис. 21-13).

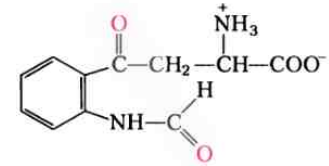
Номенклатура ферментов, которые катализируют реакции этого типа, часто сбивает с толку студентов в отношении механизма этих реакций. **Оксидазы** — это общее название ферментов, катализирующих реакции окисления, в которых молекулярный кислород служит акцептором электронов, но атомы кислорода в окисленном продукте не присутствуют (однако, как мы увидим, из этого «правила» есть исключение!). Оксидаза этого типа — фермент, который создает двойную связь в остатке жирной кислоты ацил-CoA при окислении жирных кислот в пероксисомах (см. рис. 17-13); второй пример — цитохромоксидаза электронно-транспортной цепи митохондрий (см. рис. 19-14). В первом случае перенос двух электронов на H_2O дает пероксид водорода; во втором — два электрона восстанавливают ½ O_2 до H_2O. Многие, но не все, оксидазы являются флавопротеинами.

Оксигеназы катализируют окислительные реакции, в которых атомы кислорода непосредственно включаются в молекулу субстрата, образуя, например, новую гидроксильную или карбоксильную группу. **Диоксигеназы** катализируют реакции, в которых оба кислородных атома O_2 включаются в молекулу органического субстрата. Пример диоксигеназы — триптофан-2,3-диоксигеназа, катализирующая раскрытие пятичленного кольца триптофана при катаболизме этой аминокислоты. Когда эта реакция протекает в присутствии $^{18}O_2$, меченые атомы кислорода обнаруживаются в двух карбонильных группах продукта (выделены красным цветом).



Триптофан





N-Формилкинуренин

Продолжение на следующей странице

Дополнение 21-1 Оксидазы со смешанной функцией, оксигеназы и цитохром Р-450 (*продолжение*)

Монооксигеназы более многочисленны и более сложные по своему действию. Они катализируют реакции, в которых только один из двух кислородных атомов молекулы O_2 включается в органический субстрат, второй кислород восстанавливается до H_2O. Монооксигеназам требуются два субстрата для восстановления двух кислородных атомов O_2. Главный субстрат принимает один из двух кислородных атомов, а косубстрат предоставляет атомы водорода для восстановления второго атома кислорода до H_2O. Общее уравнение реакции для монооксигеназ выглядит следующим образом:

$$AH + BH_2 + O{-}O \rightarrow A{-}OH + B + H_2O$$

где AH — главный субстрат, а BH_2 — косубстрат. Поскольку большинство монооксигеназ катализирует реакции, в которых главный субстрат гидроксилируется, их называют также **гидроксилазами**. Иногда их называют **оксидазами со смешанной функцией** или **оксигеназами со смешанной функцией**, чтобы показать, что они окисляют одновременно два разных субстрата. (Заметим, что использование здесь слова «оксидаза» — отклонение от общепринятого значения этого термина, о котором говорилось выше.)

Существуют различные классы монооксигеназ в зависимости от природы косубстрата. Некоторые монооксигеназы используют флавиннуклеотиды ($FMNH_2$ или $FADH_2$), другие — NADH или NADPH, а третьи — α-кетоглутарат в качестве косубстрата. Фермент, который гидроксилирует фенильное кольцо фенилаланина с образованием тирозина, — это монооксигеназа, косубстратом для которой служит тетрагидробиоптерин (см. рис. 18-23). При развитии у человека генетического заболевания фенилкетонурии этот фермент поврежден.

Самые многочисленные и наиболее сложные монооксигеназные реакции используют один из гемопротеинов — **цитохром Р-450**. Этот цитохром присутствует обычно в гладком ЭР, а не в митохондриях. Подобно митохондриальной цитохромоксидазе, цитохром Р-450 может реагировать с O_2 и связывать монооксид углерода CO, но его можно отличить от цитохромоксидазы, поскольку комплекс его восстановленной формы с монооксидом углерода поглощает свет строго при 450 нм — отсюда и название Р-450.

Цитохром Р-450 катализирует реакции гидроксилирования, при которых органический субстрат RH гидроксилируется до R–OH, т. е. включает в свой состав один кислород из молекулы O_2; а другой кислород восстанавливается до H_2O с помощью восстановительных эквивалентов, которые предоставляются NADH или NADPH, но передаются на цитохром Р-450 обычно посредством железо-серного белка. На рис. 1 представлена упрощенная схема работы цитохрома Р-450, в которой есть пока еще не до конца понятные промежуточные стадии.

Цитохром Р-450 представлен на самом деле целым семейством похожих белков; известны несколько сотен белков этого семейства, и каждый из них имеет отличную от других субстратную специфичность. Например, в коре надпочечников специфический цитохром Р-450 участвует в гидроксилировании стероидов с образованием гормонов (см. рис. 21-46). Цитохром Р-450 играет важную роль в гидроксилировании многих лекарств, таких как барбитураты, а также других ксенобиотиков (чужеродных для организма веществ), особенно если это гидрофобные вещества, практически не растворимые в воде. Присутствующий в окружающей среде канцероген бензо[а]пирен (обнаруженный в дыме сигарет) для детоксикации подвергается гидроксилированию с помощью цитохрома Р-450. Гидроксилирование ксенобиотиков делает их более растворимыми в воде, и таким образом становится возможным их выведение с мочой. К сожалению, гидроксилирование некоторых соединений превращает их в токсичные вещества, которые разрушают систему детоксикации.

Реакции, катализируемые оксидазами со смешанной функцией, описанные в данной главе, относятся к путям десатурации ацил-CoA жирных кислот (рис. 21-13); эти реакции встречаются при синтезе лейкотриенов (рис. 21-16), синтезе плазмалогенов (рис. 21-30), при превращениях сквалена в холестерин (рис. 21-37) и при синтезе стероидных гормонов (рис. 21-46).

Рис. 1.

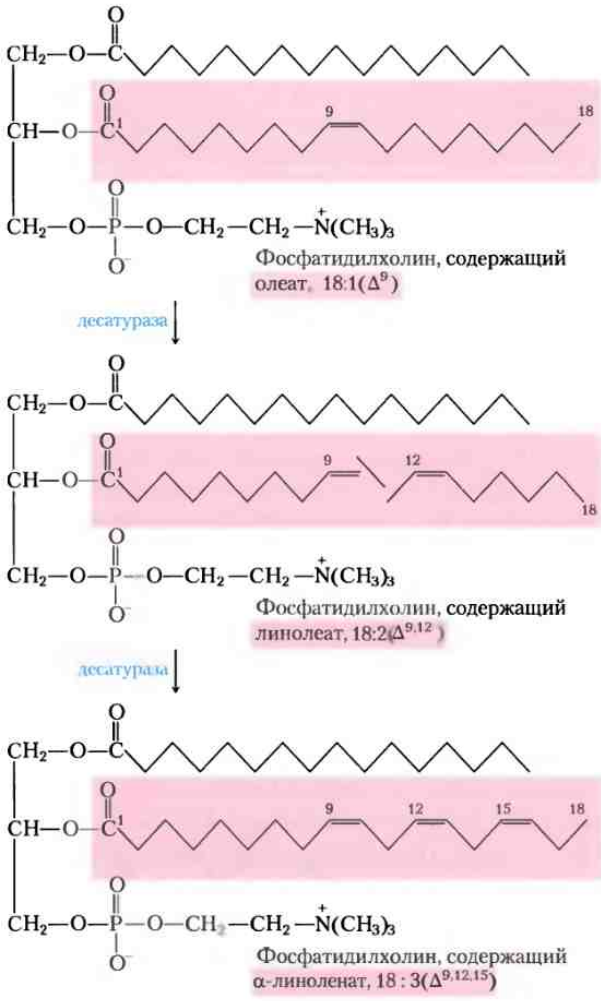


Рис. 21-14. Работа растительных десатураз. Десатуразы растений окисляют связанный в составе фосфатидилхолина олеат с образованием полиненасыщенных жирных кислот; некоторые продукты высвобождаются из фосфатидилхолина путем гидролиза.

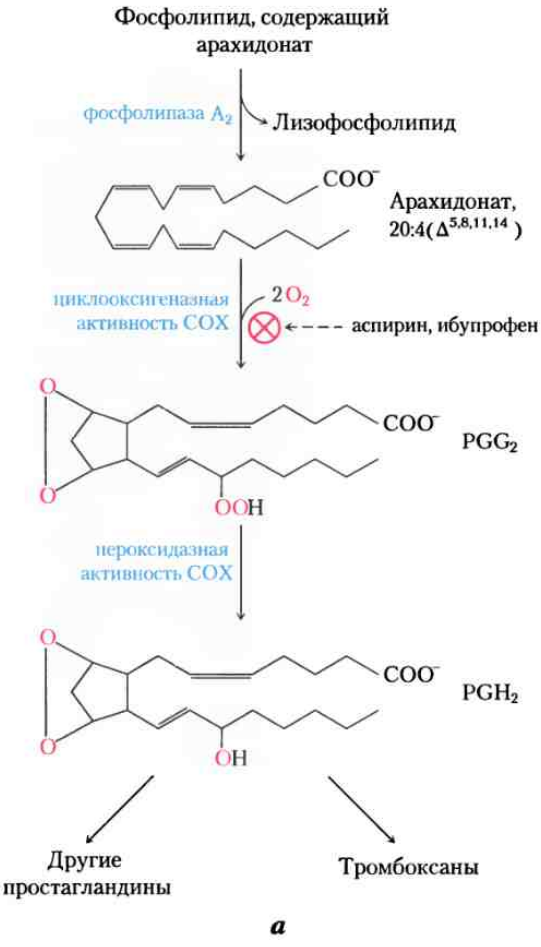
питающие получают их с растительной пищей. Поступивший внутрь линолеат может превращаться в некоторые другие полиненасыщенные кислоты, в частности γ-линоленат, эйкозатриеноат и арахидонат (эйкозатетраеноат). Все эти кислоты могут производиться только из линолеата (рис. 21-12). Арахидонат 20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$) — необходимый предшественник регуляторных липидов — эйкозаноидов. В реакциях элонгации жирных кислот, аналогичных реакциям, описанным на с. 457, из линолеата (и линолената) синтезируются 20-углеродные жирные кислоты.

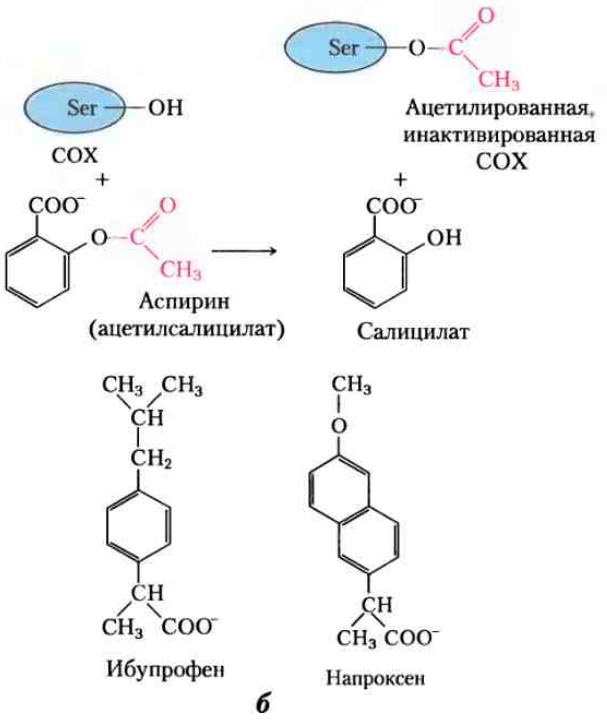
Эйкозаноиды образуются из содержащих 20 углеродных атомов полиненасыщенных жирных кислот

Эйкозаноиды — семейство очень мощных сигнальных биомолекул, которые работают как мессенджеры ближнего действия, влияя на ткани, находящиеся вблизи тех клеток, в которых эти биомолекулы продуцируются. В ответ на гормональные или иные стимулы фосфолипаза А2, присутствующая в большинстве клеток млекопитающих, атакует мембранные фосфолипиды, при этом отщепляется арахидонат, находящийся у среднего атома глицерина. Затем ферменты гладкого ЭР превращают арахидонат в **простагландины**, начиная с образования простагландина H_2 (PGH_2) — непосредственного предшественника многих других простагландинов и тромбоксанов (**рис. 21-15, *а***). Две реакции биосинтеза PGH_2 катализируются бифункциональным ферментом **циклооксигеназой (COX)**, называемой также **синтазой простагландина H_2**. В первой реакции в результате циклооксигеназной активности вводится молекулярный кислород, превращая арахидонат в PGG_2. На второй — в результате пероксидазной активности COX PGG_2 превращается в PGH_2.

У млекопитающих существуют два изофермента синтазы простагландина H_2 — COX-1 и COX-2. У них разные функции, но очень похожие последовательности аминокислот (идентичность почти 60%) и механизмы реакции на обоих каталитических центрах. COX-1 отвечает за синтез простагландинов, регулирующих секрецию желудочного муцина, а COX-2 — за синтез простагландинов, которые являются медиаторами воспаления, боли и лихорадочного состояния.

Боли можно облегчить, ингибируя COX-2. Первым лекарственным препаратом, широко применяемым для этой цели, стал аспирин (ацетилсалицилат; рис. 21-15, *б*). Торговое название «аспирин» (*а* от ацетила и *spir* от *Spirsaüre*, немецкого названия салициловой кислоты, получаемой из лабазника вязолистного *Spiraea ulmaria*) появилось в 1899 г., когда это лекарство стало производиться фирмой Bayer. Аспирин почти одинаково ингибирует циклооксигеназную активность обеих изоферментов COX, ацетилируя остатки серина и блокируя активные центры каждого из этих ферментов. Тем самым ингибируется также синтез простагландинов и тромбоксанов. Эту пару ферментов ингибирует также ибупрофен и другие широко





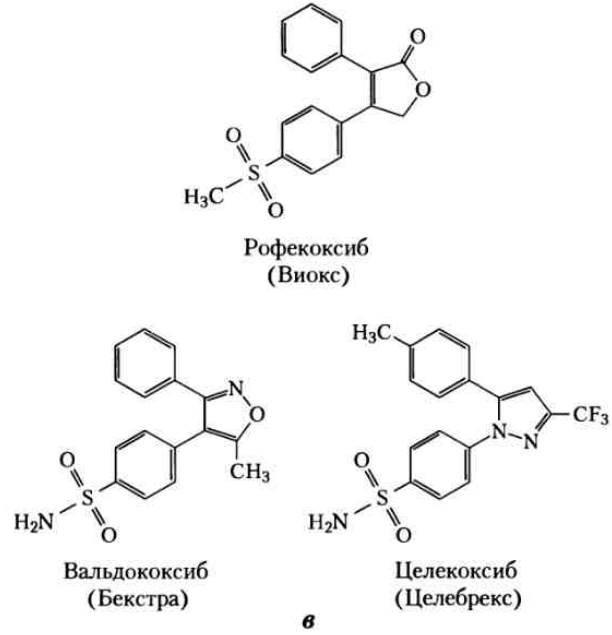


Рис. 21-15. «Циклический» путь от арахидоната до простагландинов и тромбоксанов. *а* — после того как арахидонат высвобождается из фосфолипидов под действием фосфолипазы A_2, циклооксигеназная и пероксидазная активности COX (синтазы простагландина H_2) катализируют образование PGH_2, предшественника других простагландинов и тромбоксанов. *б* — аспирин ингибирует первую реакцию, ацетилируя самый главный (незаменимый) остаток Ser в ферменте. Ибупрофен и напроксен ингибируют ту же самую реакцию, вероятно, имитируя структуру субстрата или промежуточного продукта реакции. *в* — специфические ингибиторы COX-2, которые получили применение как болеутоляющие (см. текст).

используемые *н*естероидные *п*ротиво*в*оспалительные *п*репараты (НПВП; рис. 21-15, *б*). Но ингибирование COX-1 может приводить к неприятным побочным эффектам, включая раздражение желудка и более серьезные последствия. В 1990-х гг. после определения кристаллических структур COX-1 и COX-2 были созданы соединения, которые проявляют гораздо большую специфичность в отношении COX-2. Эти вещества эффективно облегчают боли разного генезиса. Наиболее широко стали применяться три препарата – рофекоксиб (Виокс), вальдекоксиб (Бекстра) и целекоксиб (Целебрекс) (рис. 21-15, *в*). Они были разработаны в конце 1990-х гг. и сразу привлекли внимание

фармацевтических компаний. Однако по мере накопления отчетов о клинических испытаниях энтузиазма поубавилось, так как было доказано, что эти лекарства увеличивают риск инфаркта миокарда и инсульта. Причины таких побочных эффектов до сих пор неизвестны, но некоторые исследователи предполагают, что ингибиторы COX-2 нарушают «хрупкое» равновесие между гормоном простациклином, который расширяет просвет кровеносных сосудов, препятствует свертыванию крови и чье действие снимают ингибиторы COX-2, и тромбоксанами, синтезирующимися с участием COX-1 и играющими роль в свертывании крови. Виокс был снят с производства и изъят из продажи в 2004 г., вскоре последовал и запрещение на Бекстру. Целебрекс пока используется (2013 г.), но с повышенной осторожностью.

В тромбоцитах крови присутствует **тромбоксансинтаза**, превращающая PGH_2 в тромбоксан A_2, от которого происходят и другие **тромбоксаны** (рис. 21-15, *а*). Тромбоксаны вызывают сокращение кровеносных сосудов и агрегацию тромбоцитов на ранних стадиях свертывания крови. Малые дозы аспирина, принимаемые регулярно, уменьшают вероятность сердечных приступов и инсультов, снижая выделение тромбоксанов. ■

Тромбоксаны, как и простагландины, содержат кольцо из пяти или шести атомов; путь от арахидоната до соединений этих двух классов иногда называют «циклическим» путем, чтобы отличать его от «линейного» пути от арахидоната до **лейкотриенов**, соединений с линейной углеродной цепью (**рис. 21-16**). Синтез лейкотриенов начинается с действия нескольких липоксигеназ, которые катализируют включение молекулярного кислорода в арахидонат. Эти ферменты, обнаруженные в лейкоцитах, сердце, головном мозге, легких и селезенке, относятся к оксидазам со смешанной функцией; наиболее распространенная оксидаза со смешанной функцией — цитохром P-450 (доп. 21-1). Разные лейкотриены отличаются положением пероксидной группы, вводимой липоксигеназами. «Линейный» путь от арахидоната, в отличие от «циклического» пути, не ингибируется аспирином или другими НПВП.

Растения тоже производят важные сигнальные молекулы из жирных кислот. Как и у животных, на ключевой стадии инициации сигнального пути происходит активация специфической фосфолипазы. У растений высвобождающийся жирнокислотный субстрат — это α-линолеат. Затем на первой стадии пути липоксигеназа катализирует превращение линолеата в жасмонат. Известно, что жасмонат (см. рис. 12-32 в т. 1) выполняет сигнальные функции при защите от насекомых, обеспечении устойчивости к патогенам грибного происхождения и при созревании пыльцы. Кроме того, он влияет на прорастание семян, рост корня, развитие плодов и семян.

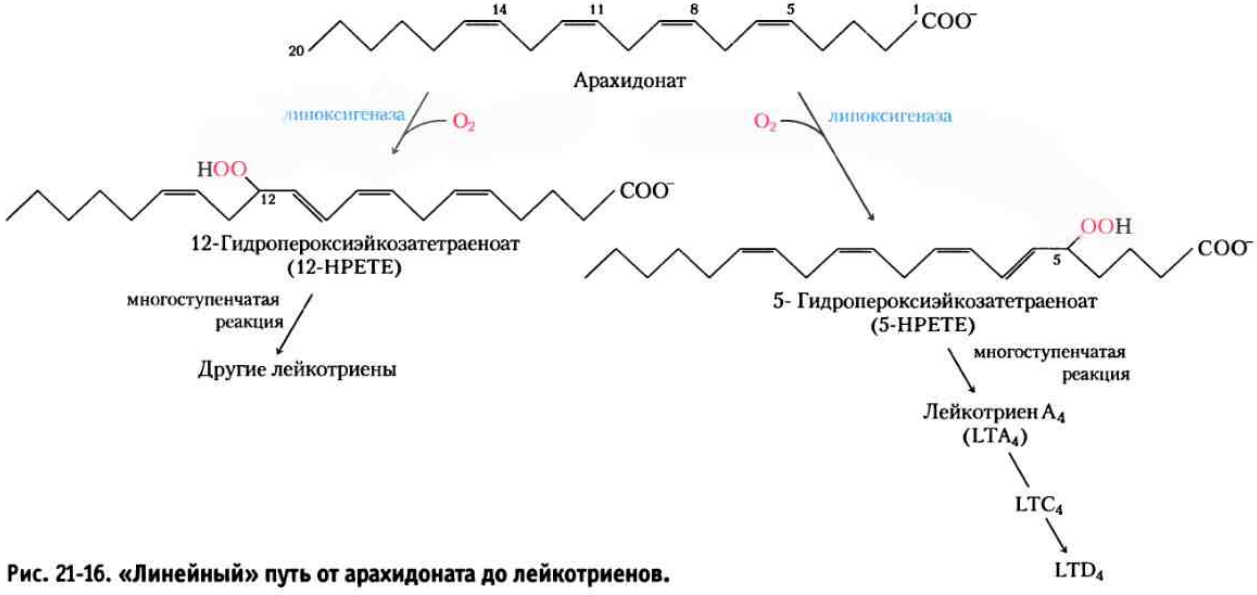


Рис. 21-16. «Линейный» путь от арахидоната до лейкотриенов.

Краткое содержание раздела 21.1 БИОСИНТЕЗ ЖИРНЫХ КИСЛОТ И ЭЙКОЗАНОИДОВ

- Длинноцепочечные жирные кислоты синтезируются из ацетил-CoA с помощью цитозольного ферментного комплекса (шесть активных центров) и ацилпереносящего белка (ACP). Существует два типа синтазы жирных кислот. СЖК типа I обнаружена у позвоночных и у грибов; она состоит из полифункциональных полипептидов. СЖК типа II представлена комплексом из отдельных белков; она обнаружена у бактерий и растений. Эти две синтазы содержат разные –SH-группы (от фосфопантатеина из ACP и от остатка Cys β-кетоацил-ACP-синтазы), которые функционируют как переносчики содержащих жирные ацилы интермедиатов.
- Малонил-ACP, образованный из ацетил-CoA («челнок» митохондрий) и CO_2, конденсируется с ацетилом, связанным с Cys–SH, образуя ацетоацетил-ACP и CO_2. За этим следует восстановление до D-β-гидроксипроизводного, дегидратация с получением *транс*-Δ^2-ненасыщенного ацил-ACP и восстановление до бутирил-ACP. Донором электронов для обоих реакций восстановления служит NADPH. Синтез жирной кислоты регулируется на уровне образования малонил-CoA.
- Еще шесть молекул малонил-ACP успешно вступают в реакцию, присоединяясь на карбоксильном конце растущей жирнокислотной цепи, образуя конечный продукт реакции синтазы жирных кислот — пальмитоил-ACP. Пальмитат высвобождается путем гидролиза.
- Пальмитат может быть удлинен до 18-углеродного стеарата. Пальмитат и стеарат могут десатурироваться под действием оксидаз со смешанной функцией с образованием пальмитоолеата и олеата соответственно.
- Млекопитающие не могут вырабатывать линолеат и должны получать его из растительных источников; они превращают экзогенный линолеат в арахидонат — исходное соединение для биосинтеза эйкозаноидов (простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов — семейство очень мощных сигнальных молекул). Синтез простагландинов и тромбоксанов ингибируют НПВС, которые действуют на активность синтазы простагландина H_2.

21.2. Биосинтез триацилглицеринов

Основные количества синтезируемых или усваиваемых организмом жирных кислот имеют две возможные судьбы: включение в триацилглицерины для сохранения метаболической энергии или образование фосфолипидных компонентов мембран. Выбор между этими альтернативными путями зависит от текущих потребностей организма. Во время быстрого роста синтез новых мембран требует производства мембранных фосфолипидов; когда организм получает обильное питание, но активно не растет, он направляет большую часть своих жирных кислот в жировые депо (сохраняемые жиры). Оба пути начинаются с одного и того же — образования эфиров глицерина и жирных кислот. В следующем разделе мы рассмотрим ход образования триацилглицеринов и его регуляцию, и образование глицерин-3-фосфата в процессе глицеронеогенеза.

Триацилглицерины и глицерофосфолипиды синтезируются из одних и тех же предшественников

Животные могут синтезировать и сохранять огромные количества триацилглицеринов для последующего использования в качестве топлива (см. доп. 17-1). В печени и мышцах человека может накапливаться только несколько сотен граммов гликогена, и этого едва хватает для удовлетворения энергетических потребностей организма в течение 12 часов. В то же время в теле мужчины среднего телосложения массой ~70 кг имеется около 15 кг триацилглицеринов, и этого достаточно для удовлетворения основных энергетических нужд организма в течение 12 недель (см. табл. 23-5). В триацилглицеринах заключено более 38 кДж/г энергии, чем в других питательных веществах. Всякий раз, когда происходит всасывание углеводов в количестве, превышающем способность организма депонировать гликоген, их избыток превращается в триацилглицерины и хранится в жировой ткани. Растения также производят триацилглицерины, богатые энергией топливные молекулы, и накапливают их главным образом в сочных плодах, орехах и семенах.

В животных тканях у триацилглицеринов и глицерофосфолипидов, например фосфатидил-

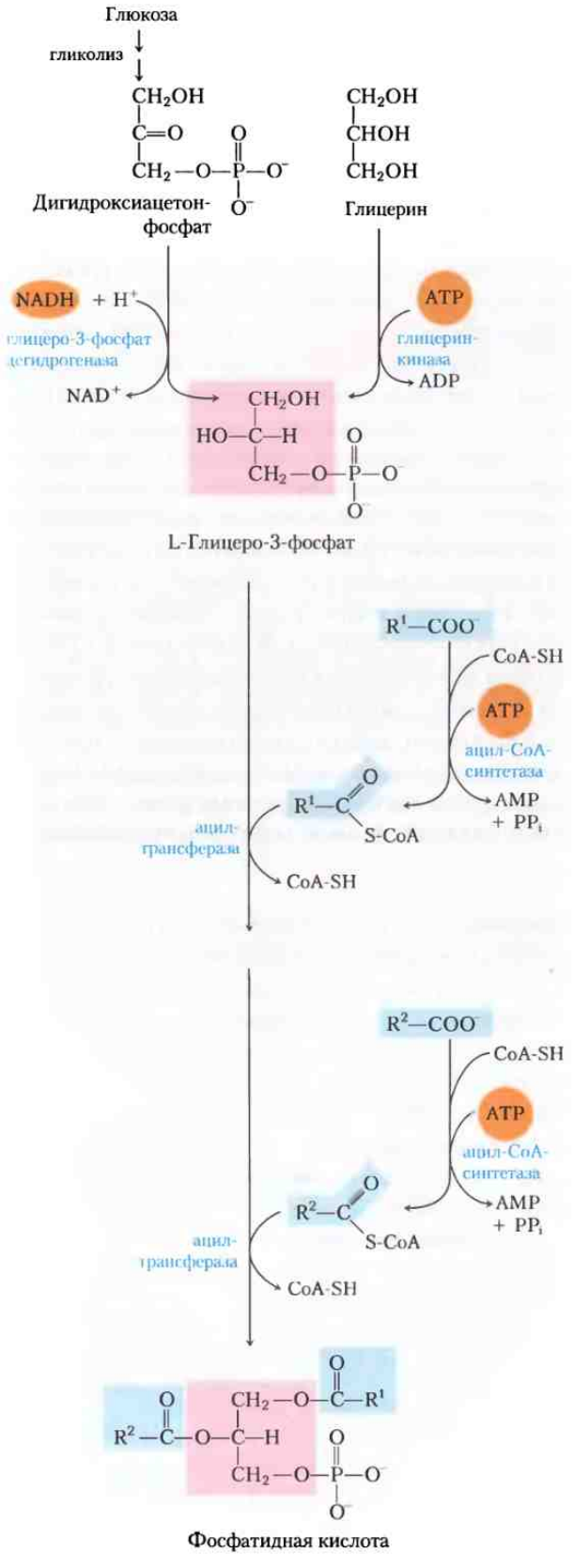


Рис. 21-17. Биосинтез фосфатидной кислоты. Ацил жирной кислоты активируется путем образования ацил-CoA, затем переносится к сложноэфирной связи в L-глицеринтрифосфате, образованном по одному из двух представленных здесь путей. Фосфатидная кислота изображена здесь в правильной конфигурации при C-2 молекулы глицерина.

этаноламина, два общих предшественника (ацил-CoA жирных кислот и L-глицерин-3-фосфат); они образуются в нескольких реакциях биосинтеза. Основные количества глицерин-3-фосфата получаются из промежуточного продукта гликолиза дигидроксиацетонфосфата под действием связанной с NAD **глицерин-3-фосфат-дегидрогеназы**; в печени и почках образуются небольшие количества глицерин-3-фосфата также из глицерина под действием **глицеринкиназы (рис. 21-17)**. Другие предшественники триацилглицеринов — это ацил-CoA, образующиеся из жирных кислот под действием **ацил-CoA-синтаз,** тех же ферментов, которые отвечают за активацию жирных кислот при β-окислении (см. рис. 17-5).

Первая стадия в биосинтезе триацлглицеринов — ацилирование двух свободных гидроксильных групп L-глицерин-3-фосфата двумя молекулами ацил-CoA с образованием **диацилглицерин-3-фосфата**, который чаще называют **фосфатидной кислотой** или фосфатидатом (рис. 21-17). Фосфатидная кислота присутствует в клетках только в следовых количествах, но является центральным интермедиатом в биосинтезе липидов — она может превращаться либо в триацилглицерин, либо в глицерофосфолипид. На пути образования триацилглицеринов фосфатидная кислота гидролизуется **фосфатазой фосфатидной кислоты** с образованием 1,2-диацилглицерина **(рис. 21-18)**. Затем диацилглицерины путем трансэтерификации третьей молекулой ацил-CoA превращаются в триацилглицерины.

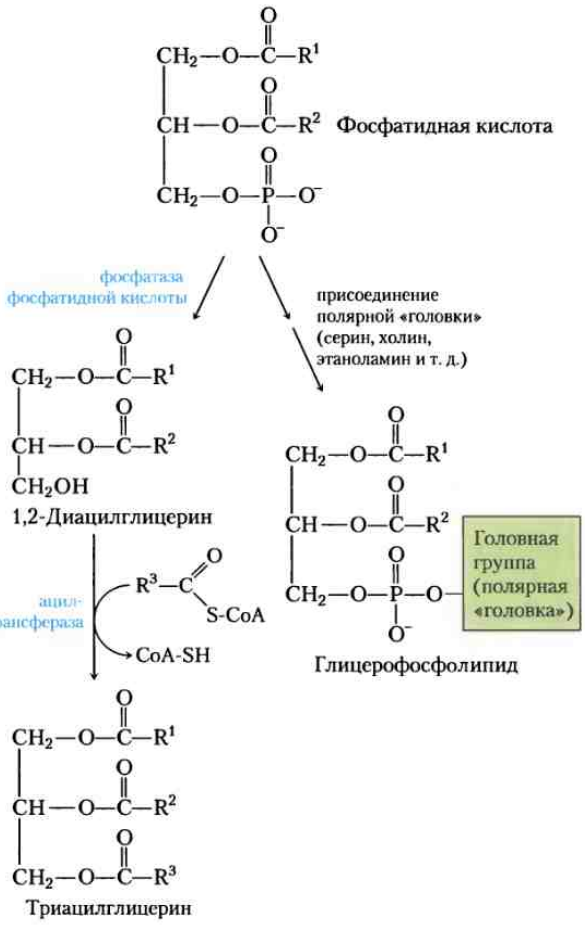


Рис. 21-18. Фосфатидная кислота в биосинтезе липидов. Фосфатидная кислота — предшественник и триацилглицеринов и глицерофосфолипидов. Механизмы присоединения полярной «головки» при синтезе фосфолипидов описываются далее.

Биосинтез триацилглицеринов у животных регулируется гормонами

У человека количество жира в организме остается относительно постоянным в течение длительных периодов времени, хотя возможны незначительные кратковременные изменения из-за потребления пищи разной калорийности. Углеводороды, жиры или белки, поглощенные в количестве, превышающем энергетические потребности, сохраняются в форме триацилглицеринов. Этот запас энергии помогает организму выдержать периоды голодания.

Пути биосинтеза и деградации триацилглицеринов зависят от метаболических ресурсов и потребностей организма в данное время. Скорость биосинтеза триацилглицеринов очень сильно меняется при действии некоторых гормонов. Например, инсулин облегчает превращение углеводов в триацилглицерины (**рис. 21-19**). Больные с тяжелыми формами сахарного диабета из-за недостатка секреции инсулина или отсутствия его действия не только не способны должным образом использовать глюкозу, поступающую с пищей, но не могут также синтезировать жирные кислоты из углеводов или аминокислот. В отсутствие лечения у больных диабетом наблюдается увеличение скорости окисления жиров и образования кетоновых тел (гл. 17), а следовательно, потеря массы тела. ■

Баланс между биосинтезом и деградацией триацилглицеринов обусловлен тем, что примерно 75% всех жирных кислот, высвобождаемых при липолизе, снова этерифицируются, образуя триацилглицерины, а не используются в качестве топлива. Такое соотношение сохраняется даже в условиях истощения, когда энергетический метаболизм переключается с использования углеводов на окисление жирных кислот. Такое повторное использование жирных кислот частично протекает в жировой ткани, а трансэтерификация происходит перед выходом в кровяное русло. Частично это происходит в цикле, охватывающем весь орга-

Рис. 21-19. Регуляция синтеза триацилглицеринов инсулином. Инсулин стимулирует превращение углеводов и белков пищи в жиры. У людей, страдающих сахарным диабетом, не хватает инсулина, и если болезнь не лечить, синтез жирных кислот уменьшается и вместо этого ацетил-CoA из катаболизма углеводов и белков идет на синтез кетоновых тел. Люди с сильным кетозом пахнут ацетоном, поэтому их иногда путают с пьяными (с. 605).

Рис. 21-20. Триацилглицериновый цикл. У млекопитающих при истощении организма молекулы триацилглицерина разрушаются и ресинтезируются в триацилглицериновом цикле. Некоторые жирные кислоты, высвобождаемые путем липолиза триацилглицеринов жировой ткани, попадают в кровоток, и их остатки используются в ресинтезе триацилглицеринов. Жирные кислоты крови служат для получения энергии (например, в мышцах) или же поступают в печень для синтеза триацилглицеринов. Триацилглицерины, образующиеся в печени, транспортируются кровью обратно в жировую ткань, где под действием внеклеточной липопротеинлипазы высвобождаются жирные кислоты, которые в адипоцитах реэтерифицируются с образованием триацилглицеринов.

низм, — свободные жирные кислоты транспортируются в печень, превращаются там в триацилглицерины, снова экспортируются в кровь (транспорт липидов в крови обсуждается в разд. 21.4) и после высвобождения из триацилглицеринов с помощью внеклеточной липопротеинлипазы опять включается в жировую ткань (**рис. 21-20**; см. также рис. 17-1). Поток веществ **триацилглицеринового цикла** между жировой тканью и печенью может быть не очень значительным в случае, когда доступно другое топливо и высвобождение жирных кислот из жировой ткани ограничено. Но, как отмечалось выше, относительное количество высвобождаемых жирных кислот, которые трансэтерифицируются, остается постоянными и при любых условиях метаболизма составляет примерно 75%. Следовательно, уровень свободных жирных кислот в крови отражает как скорость высвобождения жирных кислот, так и баланс между синтезом и распадом триацилглицеринов в жировой ткани и в печени.

Когда требуется мобилизация жирных кислот на энергетические потребности, гормоны глюкагон и адреналин стимулируют их высвобождение из жировой ткани (см. рис. 17-3, 17-12). Одновременно эти гормональные сигналы уменьшают скорость гликолиза и увеличивают скорость глюконеогенеза в печени (производя глюкозу для мозга; подробно об этом см. в гл. 23). Высвобождаемые жирные кислоты захватываются разными тканями, в том числе мышцами, где они окисляются, производя энергию. Основные количества жирных кислот, поглощенных печенью, не окисляются, а повторно используются с образованием триацилглицеринов и возвращаются в жировую ткань.

Зачем нужен этот явно холостой триацилглицериновый цикл (холостые циклы обсуждаются в гл. 15), не совсем понятно. Однако по мере того, как мы больше узнаем об обеспечении триацилглицеринового цикла за счет метаболизма и о координированной регуляции в двух разных органах, открываются и возможности его дальнейшего изучения. Например, триацилглицериновый цикл (в котором жирные кислоты скорее всего вновь превращаются в триацилглицерины, а окисляются как топливные молекулы) может при голодании дополнительно производить энергетический резерв в кровяном русле, который при чрезвычайных обстоятельствах можно гораздо быстрее мобилизовать, а не сохранять в виде триацилглицерина.

Постоянный кругооборот триацилглицеринов в жировой ткани при истощении вызывает еще один вопрос. Что служит источником глицерин-3-фосфата, необходимого для этого процесса? Как отмечалось выше, гликолиз в этих условиях подавляется действием глюкагона или адреналина, поэтому дигидроксиацетонфосфат мало доступен, а глицерин, высвобождаемый в процессе липолиза, не может прямо превращаться в глицерин-3-фосфат в жировой ткани, так как там недостаточно глицеринкиназы (рис. 21-17). Как же производится достаточное количество глицерин-3-фосфата? Ответ кроется в метаболическом пути, открытом более чем три десятилетия тому назад. До недавних пор этому уделялось мало внимания. Этот путь близко связан с триацилглицериновым циклом и, в более широком смысле, с балансом между метаболизмом жирных кислот и метаболизмом углеводов.

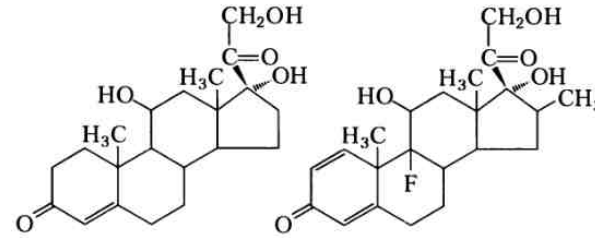
Жировая ткань генерирует глицерин-3-фосфат путем глицеронеогенеза

Глицеронеогенез — укороченный путь глюконеогенеза от пирувата до дигидроксиацетонфосфата (см. рис. 14-16), после чего происходит превращение дигидроксиацетонфосфата в глицерин-3-фосфат с помощью цитозольной связанной с NAD глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (**рис. 21-21**). Глицерин-3-фосфат используется далее в синтезе триацилглицеринов. Глицеронеогенез был открыт в 1960-х гг. Леа Решеф, Ричардом Хансоном и Джоном Баллардом, а также одновременно Элеазаром Шафриром и его сотрудниками, которые были заинтригованы присутствием двух ферментов глюконеогенеза пируваткарбоксилазы и фосфоенолпируват (ФЕП)-карбоксикиназы в жировой ткани, где глюкоза не синтезируется. После длительного периода невнимания к столь странному факту интерес к этому метаболическому пути возобновился, при это удалось выявить связь между глицеронеогенезом и поздним диабетом II типа.

Рис. 21-21. Глицеронеогенез. Этот метаболический путь является по существу сокращенной версией глюконеогенеза от пирувата до дигидроксиацетонфосфата, после чего происходит превращение последнего в глицерин-3-фосфат, который используется для синтеза триацилглицеринов.

У глицеронеогенеза множество функций. В жировой ткани глицеронеогенез, сопряженный с переэтерификацией жирных кислот, контролирует скорость высвобождения жирных кислот в кровь. В буром жире этот метаболический путь может регулировать скорость, с которой жирные кислоты доставляются в митохондрии для использования в термогенезе (см. рис. 19-34). А у голодающих людей глицеронеогенез в одной только печени обеспечивает синтез глицерин-3-фосфата в количестве, достаточном для того, чтобы до 65% жирных кислот заново этерифицировались с образованием триацилглицеринов.

Прохождение по триацилглицериновому циклу между печенью и жировой тканью контролируется в большой степени ФЕП-карбоксилазой, которая ограничивает скорости и глюконеогенеза, и глицеронеогенеза. Глюкокортикоидные гормоны, такие как кортизол (природный стероид, происходящий от холестерина; см. рис. 21-45) и дексаметазон (синтетический глюкокортикоид), регулируют уровни ФЕП-карбоксикиназы в печени и поэтому и в жировой ткани. Действуя через глюкокортикоидный рецептор, эти стероидные гормоны увеличивают экспрессию гена, кодирующего ФЕП-карбоксикиназу в печени, усиливая тем самым глюконеогенез и глицеронеогенез (**рис. 21-22**).



Стимуляция глицеронеогенеза приводит к увеличению синтеза триацилглицеринов в печени и их поступления в кровь. В то же самое время глюкокортикоиды подавляют экспрессию гена, кодирующего ФЕП-карбоксикиназу в жировой ткани. Это приводит к ослаблению глицеронеогенеза в жировой ткани; в результате уменьшается повторное использование жирных кислот, и в кровь высвобождается большее их количество. Таким образом, глицеронеогенез согласованно регулируется в печени и жировой ткани, что вли-

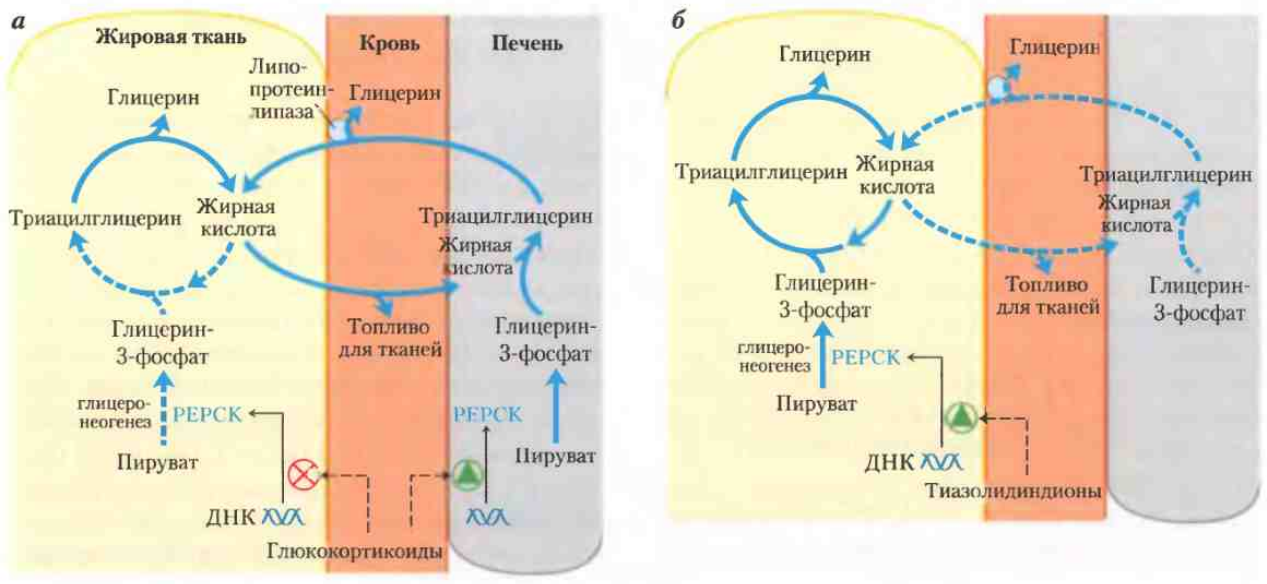


Рис. 21-22. Регуляция глицеронеогенеза. *а* — глюкокортикоидные гормоны стимулируют глицеронеогенез и глюконеогенез в печени, в то же время подавляя глицеронеогенез в жировой ткани (посредством реципрокной регуляции экспрессии гена ФЕП-карбоксикиназы (PEPCK) в двух тканях); в результате увеличивается поток через триацилглицериновый цикл. Глицерин, образовавшийся при распаде триацилглицеринов в жировой ткани, выделяется в кровь и транспортируется в печень, где он с помощью глицеринкиназы превращается главным образом в глюкозу, хотя частично конвертируется в глицерин-3-фосфат. *б* — класс лекарств, называемых тиазолидиндионами, применяется в настоящее время для лечения диабета II типа. При этом заболевании высокий уровень жирных кислот в крови препятствует усвоению глюкозы в мышцах и вызывает резистентность к инсулину. Тиазолидиндионы активируют ядерные рецепторы (с помощью пролифератора пероксисомы — γ(PPARγ)), что индуцирует активность ФЕП-карбоксикиназы. Терапевтический эффект обусловлен тем, что тиазолидиндионы увеличивают скорость глицеронеогенеза, усиливая тем самым повторный синтез триацилглицеринов в жировой ткани и уменьшая количество свободных жирных кислот в крови.

яет на липидный метаболизм противоположным образом: более низкая скорость глицеронеогенеза в жировой ткани ведет к большему высвобождению жирных кислот (не допуская их повторного использования), в то время как повышенная скорость этого процесса в печени вызывает более производительный их синтез и экспорт триацилглицеринов. Суммарный результат заключается в увеличении потока через триацилглицериновый цикл. Когда действие глюкокортикоидов снимается, поток через цикл уменьшается по мере того, как экспрессия ФЕП-карбоксикиназы увеличивается в жировой ткани и уменьшается в печени.

Тиазолидиндионы применяют при диабете II типа для увеличения глицеронеогенеза

Недавно привлеченное к глицеронеогенезу внимание отчасти обусловлено связью между этим метаболическим путем и диабетом. Высокий уровень свободных жирных кислот в крови мешает усвоению глюкозы в мышцах и вызывает индиферентность к инсулину, что приводит к диабету II типа. Оказалось, что лекарства нового поколения **тиазолидиндионы** понижают уровень жирных кислот в крови и увеличивают чувствительность к инсулину. Тиазолидиндионы связываются с ядерными рецепторами этого

гормона (активируется пролифератором пероксисомы — γ(PPARγ)) и активируют его, индуцируя ФЕП-карбоксикиназу в жировой ткани (рис. 21-22); повышенная активность ФЕП-карбоксикиназы затем приводит к усиленному синтезу предшественников глицеронеогенеза. Таким образом, терапевтический эффект тиазолидиндионов, по крайней мере частично, обусловлен увеличением глицеронеогенеза, что в свою

Тиазолидиндионы

очередь усиливает повторный синтез триацилглицеринов в жировой ткани и уменьшает высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани в кровь. Преимущества приема одного из таких препаратов розиглитазона (Авандия), к сожалению, несколько уменьшаются в связи с повышением риска инфаркта миокарда. Причины такого побочного эффекта пока неясны, и изучение действия препарата продолжается. ■

Краткое содержание раздела 21.2 БИОСИНТЕЗ ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНОВ

- Триацилглицерины образуются при взаимодействии двух молекул ацил-CoA жирных кислот с глицерин-3-фосфатом с выделением фосфатидной кислоты; этот продукт дефосфорилируется, давая диацилглицерин, который затем ацилируется третьей молекулой ацил-CoA с образованием триацилглицеринов.
- Синтез и деградация триацилглицеринов регулируются гормонами.
- Путем мобилизации и повторного использования триацилглицеринов возникает триацилглицериновый цикл. Триацилглицерины вновь синтезируются из свободных жирных кислот и глицерин-3-фосфата даже в состоянии истощения организма. Дигидроксиацетонфосфат — предшественник глицерин-3-фосфата — производится из пирувата путем глицеронеогенеза.

21.3. Биосинтез мембранных фосфолипидов

В гл. 10 мы представили два главных класса мембранных фосфолипидов: глицерофосфолипиды и сфинголипиды. Можно сконструировать множество различных молекул фосфолипидов, комбинируя разные жирные кислоты и полярные головные группы (полярные «головки») с глицериновой или сфингозиновой основой (см. рис. 10-9, 10-13). Все пути биосинтеза следуют нескольким основным шаблонам. В целом, сборка фосфолипидов из основных предшественников требует (1) синтеза основополагающей (скелетной) молекулы (глицерин или сфингозин); (2) присоединения жирной кислоты (кислот) к скелету через сложноэфирную или амидную связь; (3) присоединения к скелету гидрофильной «головки» фосфодиэфирной связью; и, наконец, в некоторых случаях (4) изменения или замены полярной «головки» с образованием конечного продукта — фосфолипида.

В клетках эукариот синтез фосфолипидов происходит прежде всего на поверхности гладкого эндоплазматического ретикулума и на внутренней мембране митохондрий. Часть вновь синтезированных фосфолипидов остается в месте синтеза, но большинство предназначено для других отделов клетки. Процесс, при котором нерастворимые в воде фосфолипиды передвигаются от места синтеза к месту их последующего функционирования, не вполне понятен, но мы завершим этот раздел обсуждением некоторых механизмов, выясненных в последние годы.

Клетки используют две стратегии присоединения полярных «головок» фосфолипидов

Первые стадии синтеза глицерофосфолипидов те же, что при синтезе триацилглицеринов (рис. 21-17): два остатка жирной кислоты образуют сложноэфирные связи при атомах C-1 и C-2 L-глицерин-3-фосфата, давая фосфатидную кислоту. Обычно считают, что при C-1 — насыщенная жирная кислота, а при C-2 — ненасыщенная. Второй путь, приводящий к фосфатидной кислоте, — фосфорилирование диацилглицеринов специфической киназой.

Полярная «головка» глицерофосфолипидов присоединяется фосфодиэфирной связью, при

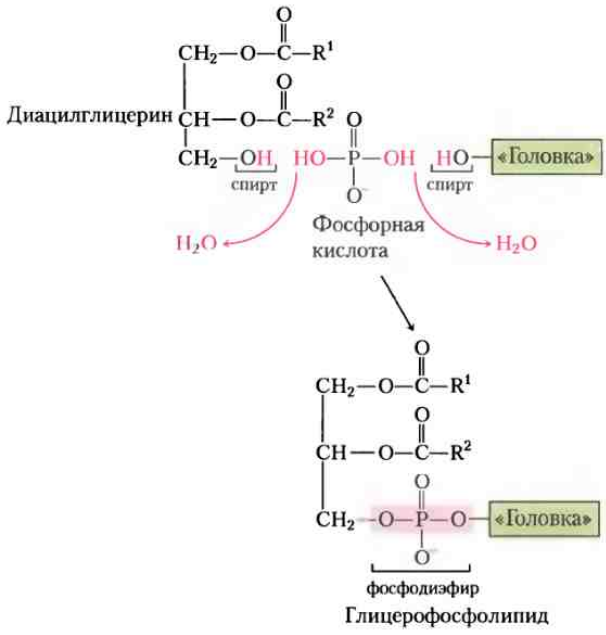


Рис. 21-23. Присоединение полярной «головки». Полярная «головка» в фосфолипиде присоединяет диацилглицерин фосфодиэфирной связью при конденсации фосфорной кислоты с двумя спиртовыми группами (две молекулы H_2O отщепляются).

образовании которой каждый из двух спиртовых гидроксилов (один на полярной «головке», а другой на С-3 глицерина) образует сложный эфир с фосфорной кислотой (**рис. 21-23**). Сначала один из гидроксилов активируется присоединением нуклеотидцитидиндифосфата (CDP). Затем при нуклеофильной атаке другим гидроксилом цитидинмонофосфат (CMP) замещается (**рис. 21-24**). CDP присоединяется либо к диацилглицерину, образуя активированную фосфатидную кислоту и **CDP-диацилглицерин** (*стратегия 1*), либо

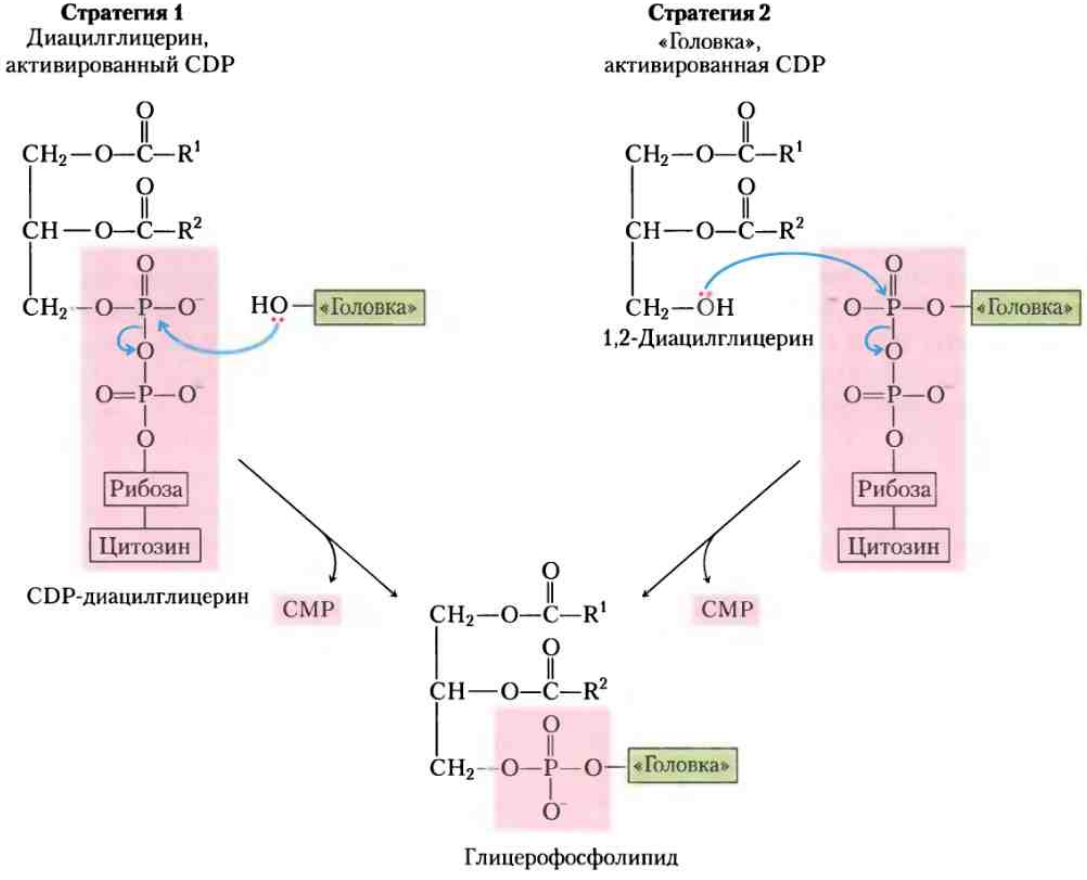


Рис. 21-24. Две главные стратегии образования фосфодиэфирной связи в фосфолипидах. В обеих стратегиях фосфатную группу для фосфодиэфирной связи предоставляет CDP.

Юджин П. Кеннеди

к гидроксилу «головки» (*стратегия 2*). Клетки эукариот используют обе стратегии, в то время как прокариоты используют только стратегию 1. Ведущая роль цитидиннуклеотидов в биосинтезе липидов была открыта Юджином Кеннеди в начале 1960-х гг.

Для синтеза фосфолипидов у *E. coli* служат CDP-диацилглицерины

Первую стратегию присоединения полярной «головки» иллюстрирует синтез фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерина у *E. coli*. Диацилглицерин активируется при конденсации фосфатидной кислоты цитидинтрифосфатом (CTP) с образованием CDP-диацилглицерина, при этом отщепляется пирофосфат (рис. 21-25). Замещение CMP путем нуклеофильной атаки гидроксильной группой серина или гидроксильной группой при C-1 глицерин-3-фосфата дает **фосфатидилсерин** или фосфатидилглицерин-3-фосфат соответственно. Продукт подвергается дальнейшему превращению путем расщепления фосфатного моноэфира (с высвобождением P_i), образуя **фосфатидилглицерин**.

Фосфатидилсерин и фосфатидилглицерин могут служить предшественниками других мембранных липидов у бактерий (рис. 21-25). Декарбоксилирование серинового остатка фосфатидилсерина, катализируемое фосфатидилсериндекарбоксилазой, приводит к **фосфатидилэтаноламину**. У *E. coli* конденсация двух молекул фосфатидилглицерина, сопровождаемая отщеплением глицерина, дает кардиолипин, в котором два диацилглицерина соединены через общую полярную «головку».

Эукариоты синтезируют анионные фосфолипиды из CDP-диацилглицеринов

У эукариот фосфатидилглицерин, кардиолипин и фосфатидилинозит (все анионные фосфолипиды; см. рис. 10-9, т. 1) синтезируются по той же стратегии, по которой осуществляется синтез фосфолипидов у бактерий. Фосфатидилглицерин образуется в точности так же, как у бактерий. Синтез **кардиолипина** у эукариот слегка отличается: фосфатидилглицерин конденсируется с CDP-диацилглицерином (**рис. 21-26**), а не с другой молекулой фосфатидилглицерина, как в случае *E. coli* (рис. 21-25).

Фосфатидилинозит синтезируется путем конденсации CDP-диацилглицерина с инозитом (рис. 21-26). Специфические фосфатидилинозиткиназы затем превращают фосфатидилинозит в его фосфорилированные производные (см. рис. 10-17, т. 1). Фосфатидилинозит и его фосфорилированные продукты в плазматической мембране эукариот играют центральную роль в передаче сигналов (см. рис. 12-10, 12-16, т. 1).

У эукариот метаболические пути образования фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина взаимосвязаны

Дрожжи, подобно бактериям, могут производить фосфатидилсерин путем конденсации CDP-диацилглицерина и серина, а также могут синтезировать фосфатидилэтаноламин из фосфатидилсерина по реакции, катализируемой фосфатидилсериндекарбоксилазой (**рис. 21-27**). В клетках млекопитающих альтернативным путем образования фосфатидилсерина являются обменные реакции полярной «головки», когда свободный серин замещает этаноламин. Фосфатидилэтаноламин может также превращаться в **фосфатидилхолин** (лецитин) путем присоединения трех метильных групп к аминогруппе; донором метильных групп для всех трех реакций метилирования служит S-аденозилметионин (см. рис. 18-18). Это основные пути получения фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина в клетках эукариот.

У млекопитающих фосфатидилсерин синтезируется не из CDP-диацилглицерина — он получается из фосфатидилэтаноламина в об-

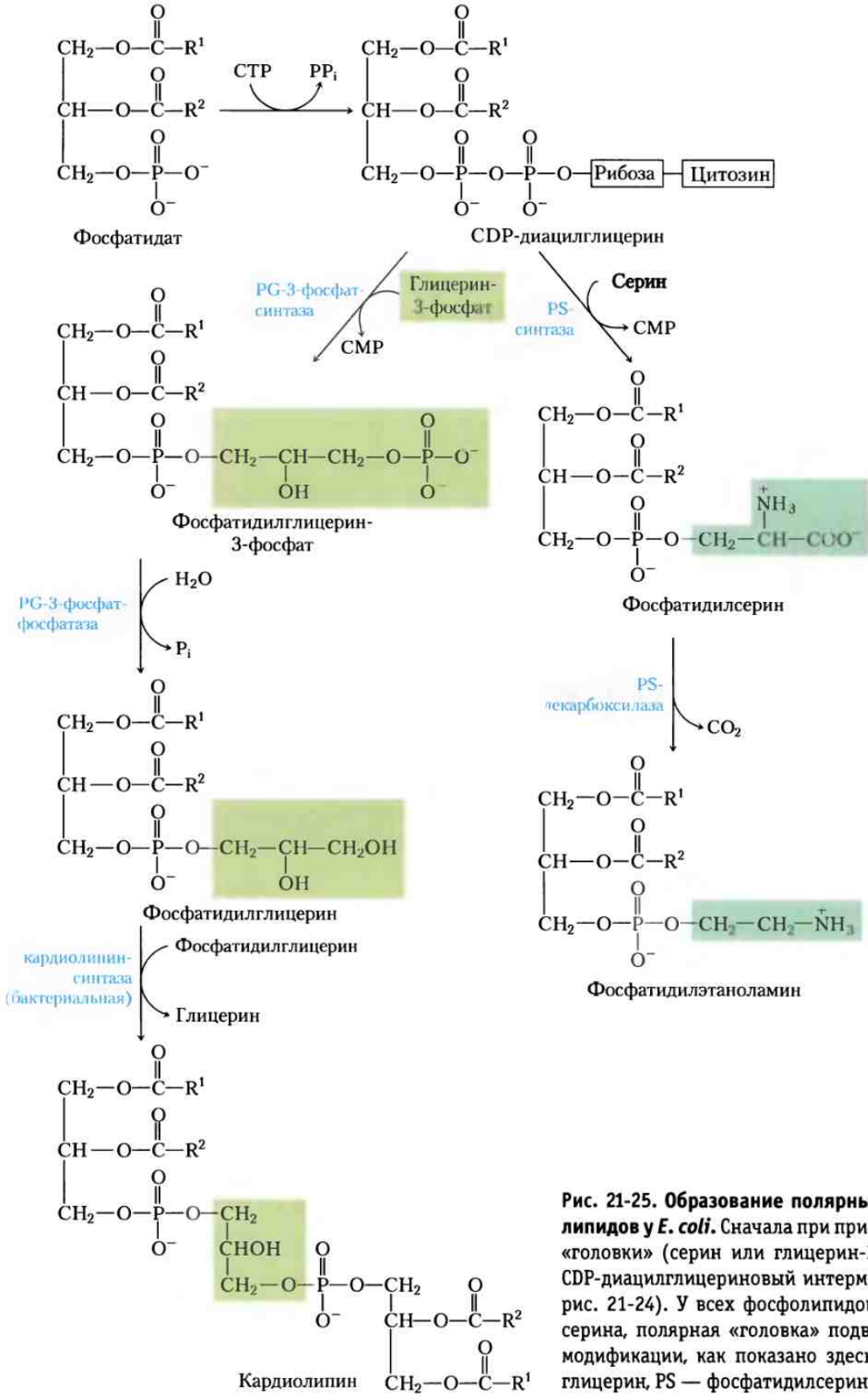


Рис. 21-25. Образование полярных «головок» фосфолипидов у *E. coli*. Сначала при присоединении полярной «головки» (серин или глицерин-3-фосфат) образуется CDP-диацилглицериновый интермедиат (стратегия 1 на рис. 21-24). У всех фосфолипидов, кроме фосфатидилсерина, полярная «головка» подвергается дальнейшей модификации, как показано здесь. PG — фосфатидилглицерин, PS — фосфатидилсерин.

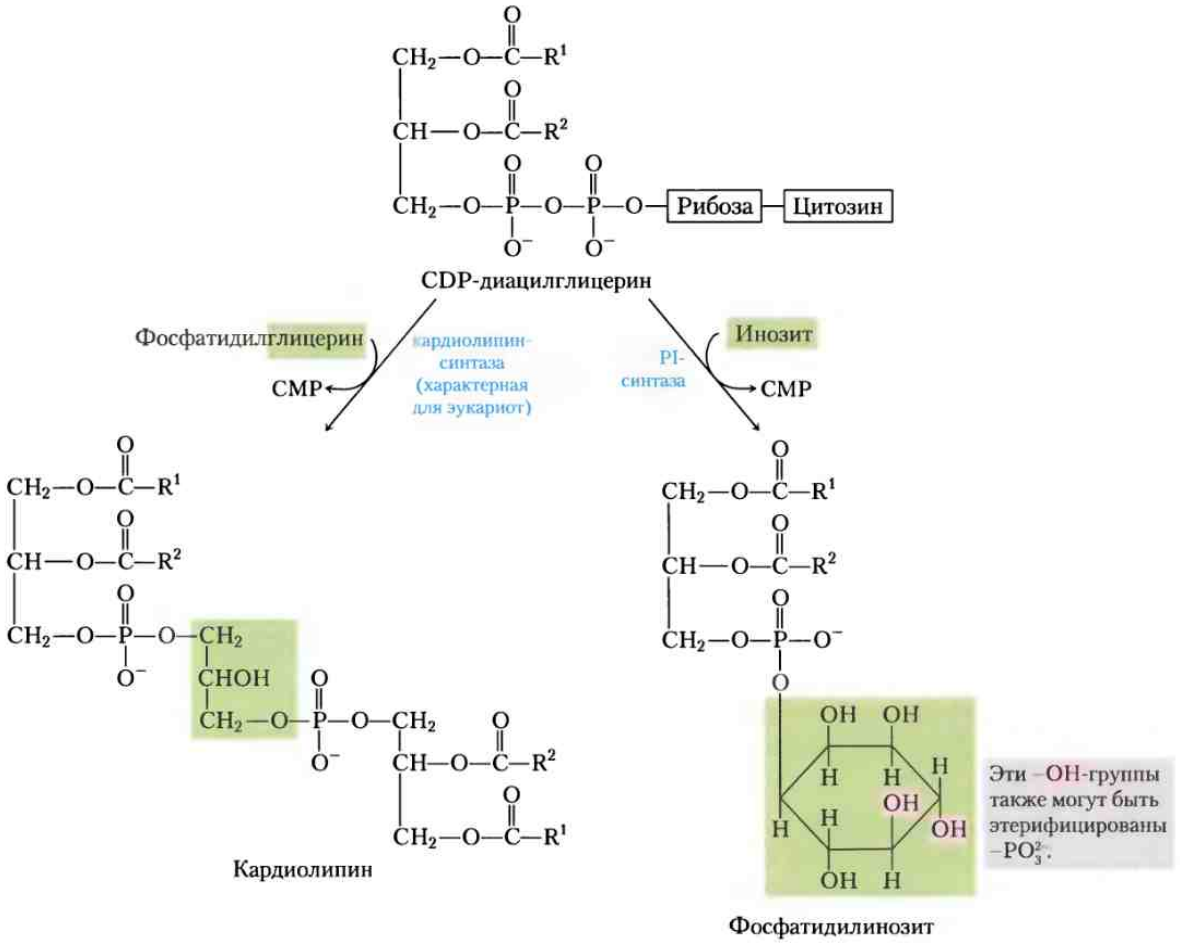


Рис. 21-26. Синтез кардиолипина и фосфатидилинозита у эукариот. Эти глицерофосфолипиды синтезируются по стратегии 1 (рис. 21-24). Фосфатидилглицерин синтезируется так же, как у бактерий (см. рис. 21-25). PI — фосфатидилинозит.

менной реакции (**рис. 21-28, *а***). Синтез фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина у млекопитающих происходит по стратегии 2 (рис. 21-24): фосфорилирование и активация головной группы, после чего следует конденсация с диацилглицерином. Например, холин вновь используется («реутилизируется») благодаря фосфорилированию и последующему превращению в CDP-холин путем конденсации с CTP. Диацилглицерин вытесняет CMP из CDP-холина, продуцируя фосфатидилхолин (рис. 21-28, *б*). Аналогичный метаболический путь реутилизации превращает этаноламин, полученный с пищей, в фосфатидилэтаноламин. Фосфатидилхолин образуется в печени также при метилировании фосфатидилэтаноламина (с помощью S-аденозилметионина, как было описано выше), но во всех других тканях — только при конденсации диацилглицерина и CDP-холина. Метаболические пути образования фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина у разных организмов обобщены на **рис. 21-29**.

Пока не до конца понятно, каково влияние липидного состава на функции мембран, однако установлено, что этот фактор может оказывать серьезные эффекты. Исследователи получили плодовых мушек с мутациями в гене, который кодирует этаноламинкиназу (аналогична

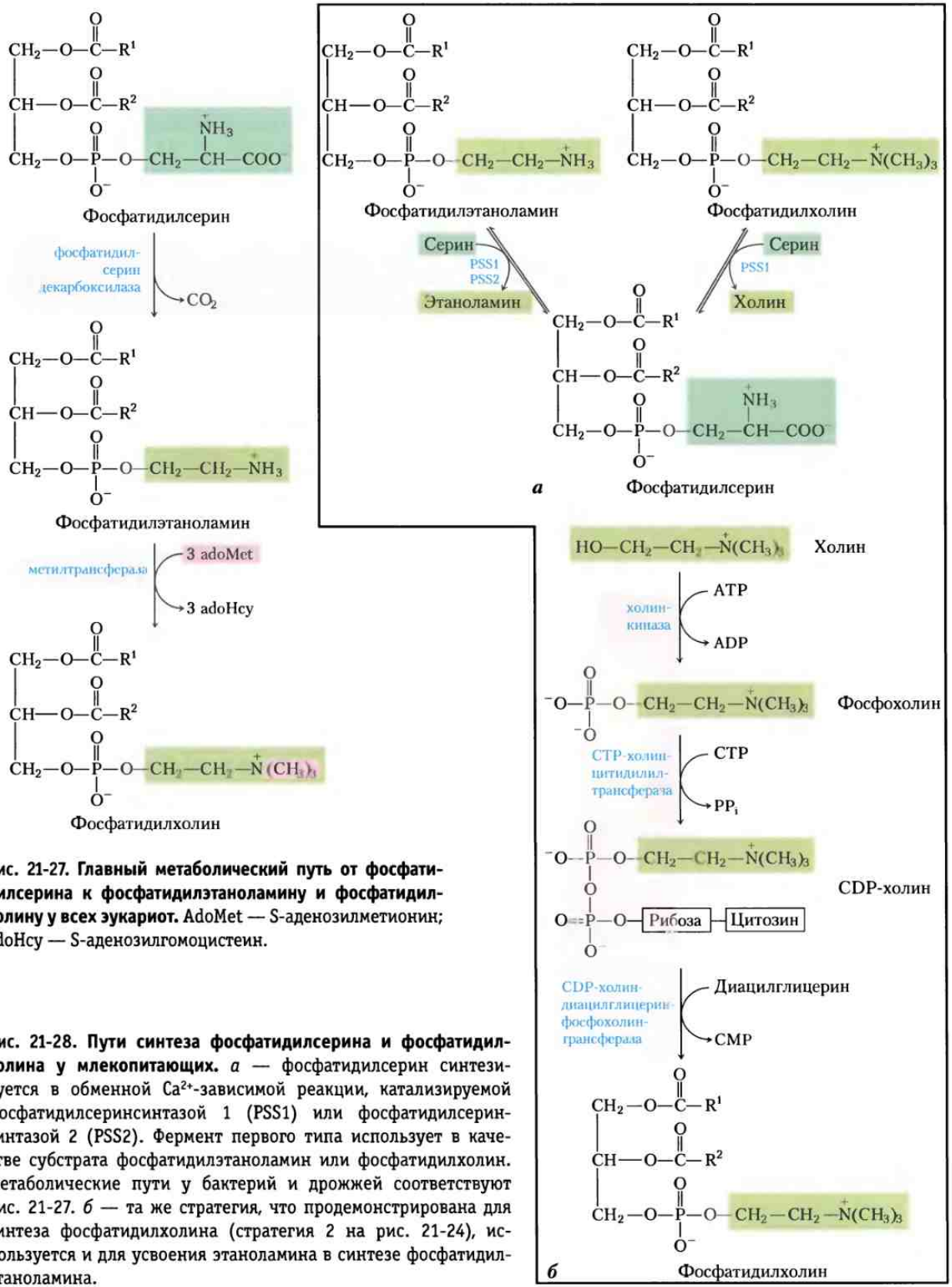


Рис. 21-27. Главный метаболический путь от фосфатидилсерина к фосфатидилэтаноламину и фосфатидилхолину у всех эукариот. AdoMet — S-аденозилметионин; adoHcy — S-аденозилгомоцистеин.

Рис. 21-28. Пути синтеза фосфатидилсерина и фосфатидилхолина у млекопитающих. *а* — фосфатидилсерин синтезируется в обменной Ca^{2+}-зависимой реакции, катализируемой фосфатидилсериносинтазой 1 (PSS1) или фосфатидилсериносинтазой 2 (PSS2). Фермент первого типа использует в качестве субстрата фосфатидилэтаноламин или фосфатидилхолин. Метаболические пути у бактерий и дрожжей соответствуют рис. 21-27. *б* — та же стратегия, что продемонстрирована для синтеза фосфатидилхолина (стратегия 2 на рис. 21-24), используется и для усвоения этаноламина в синтезе фосфатидилэтаноламина.

холинкиназе; рис. 21-28, *б*). Недостаток этого фермента выключает один из путей синтеза фосфатидилэтаноламина, уменьшая таким образом количество этого липида в клеточных мембранах. У мушек с такой мутацией (легко стрессируемый генотип) наблюдается временный паралич после электрической стимуляции или механического шока, хотя эти воздействия на дикий тип не влияют.

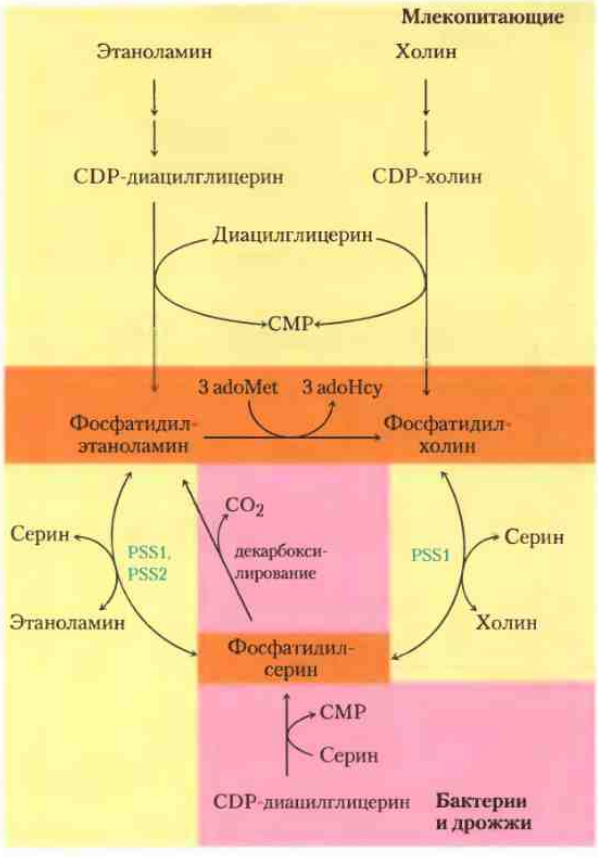


Рис. 21-29. Общая схема путей синтеза основных фосфолипидов. У организмов различных классов метаболические пути синтеза фосфолипидов различаются. Метаболические пути млекопитающих выделены желтым цветом, а те, что используются бактериями и дрожжами, выделены розовым. Оранжевым обозначены зоны перекрывания путей. У млекопитающих фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин синтезируются из диацилглицеринов и подходящей группы CDP-производного «головки». Превращение фосфатидилэтаноламина в фосфатидилхолин у млекопитающих происходит исключительно в печени. Пути синтеза фосфатидилсерина у организмов различных классов подробно проиллюстрированы на рис. 21-27 и 21-28.

Синтез плазмалогенов требует образования связанного простой эфирной связью жирного спирта

Метаболический путь биосинтеза эфирных липидов, в том числе **плазмалогенов** и **фактора активации тромбоцитов** (см. рис. 10-10, т. 1), включает замещение этерифицированной жирноацильной группы на длинноцепочечный спирт с образованием простой эфирной связи **(рис. 21-30)**. За этим следует присоединение головной группы по механизму, очень похожему на механизм образования обычных фосфолипидов со сложноэфирной связью. Наконец, характерная двойная связь в плазмалогенах (выделена голубым на рис. 21-30) вводится действием оксидазы со смешанной функцией, сходной с оксидазой десатурации жирных кислот (рис. 21-13). Пероксисомы являются главным участком синтеза плазмалогенов.

В синтезах сфинголипидов и глицерофосфолипидов некоторые предшественники и некоторые механизмы общие

Биосинтез сфинголипидов происходит в четыре стадии: (1) синтез 18-углеродного амина **сфинганина** из пальмитоил-CoA и серина; (2) присоединение жирной кислоты через амидную связь с образованием **N-ацилсфинганина**; (3) десатурация сфинганиновой части с образованием **N-ацилсфингозина** (церамида); и (4) присоединение «головки» с образованием сфинголипида **цереброзида** или **сфингомиелина (рис. 21-31)**. Первые стадии происходят в эндоплазматическом ретикулуме, а прикрепление «головки» (стадия 4) — в аппарате Гольджи.

Этот метаболический путь имеет несколько особенностей, как и пути, ведущие к синтезу глицерофосфолипидов: восстанавливающую способность обеспечивает NADPH, а жирные кислоты вводятся в виде активированных CoA-производных. При образовании цереброзида сахара вводятся в виде активированных нуклеотидных производных. Выявлено несколько новых аспектов присоединения полярной «головки» при синтезе сфинголипидов. Скорее всего, фосфатидилхолин, а не CDP-холин служит донором фосфохолина при синтезе сфингомиелина.

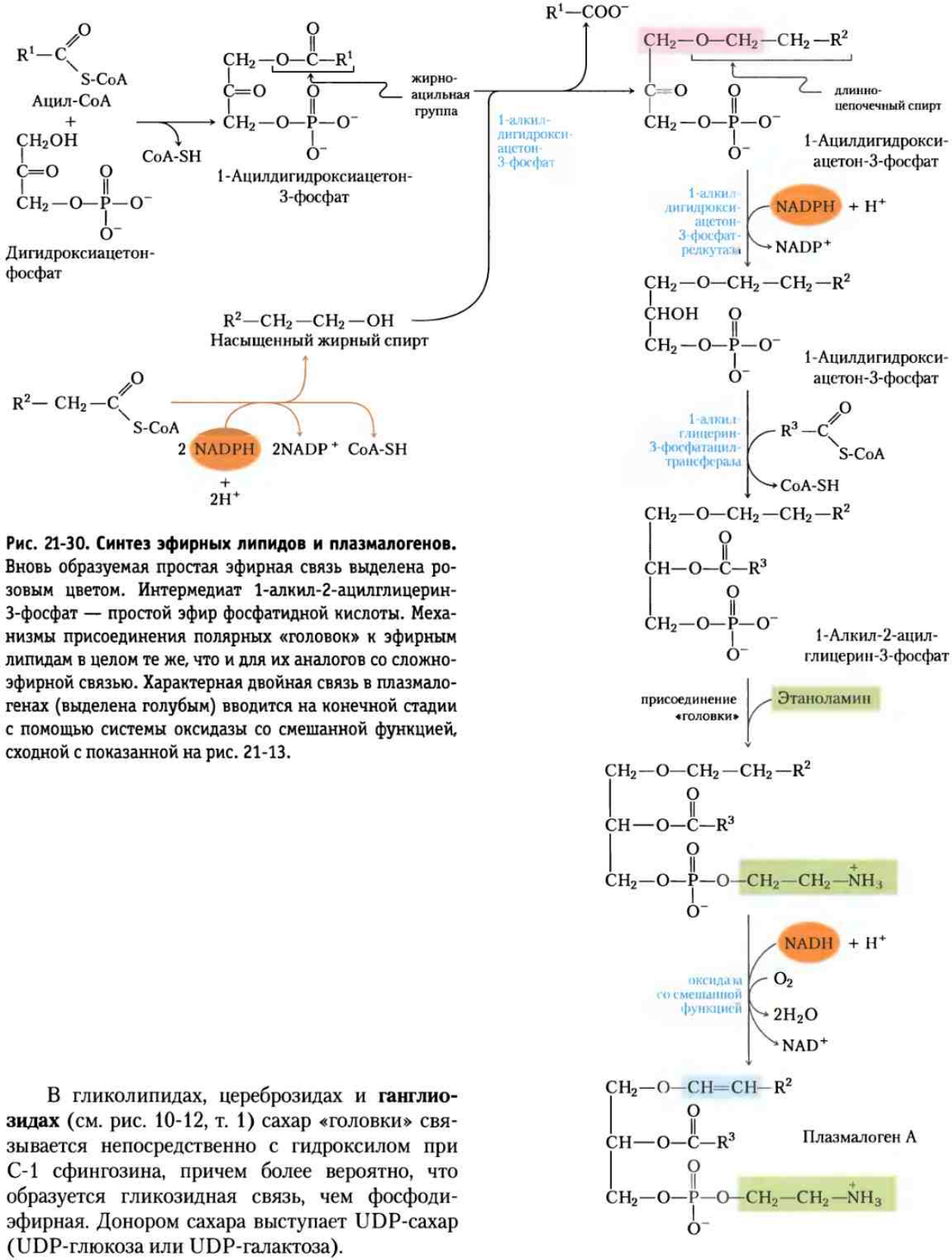
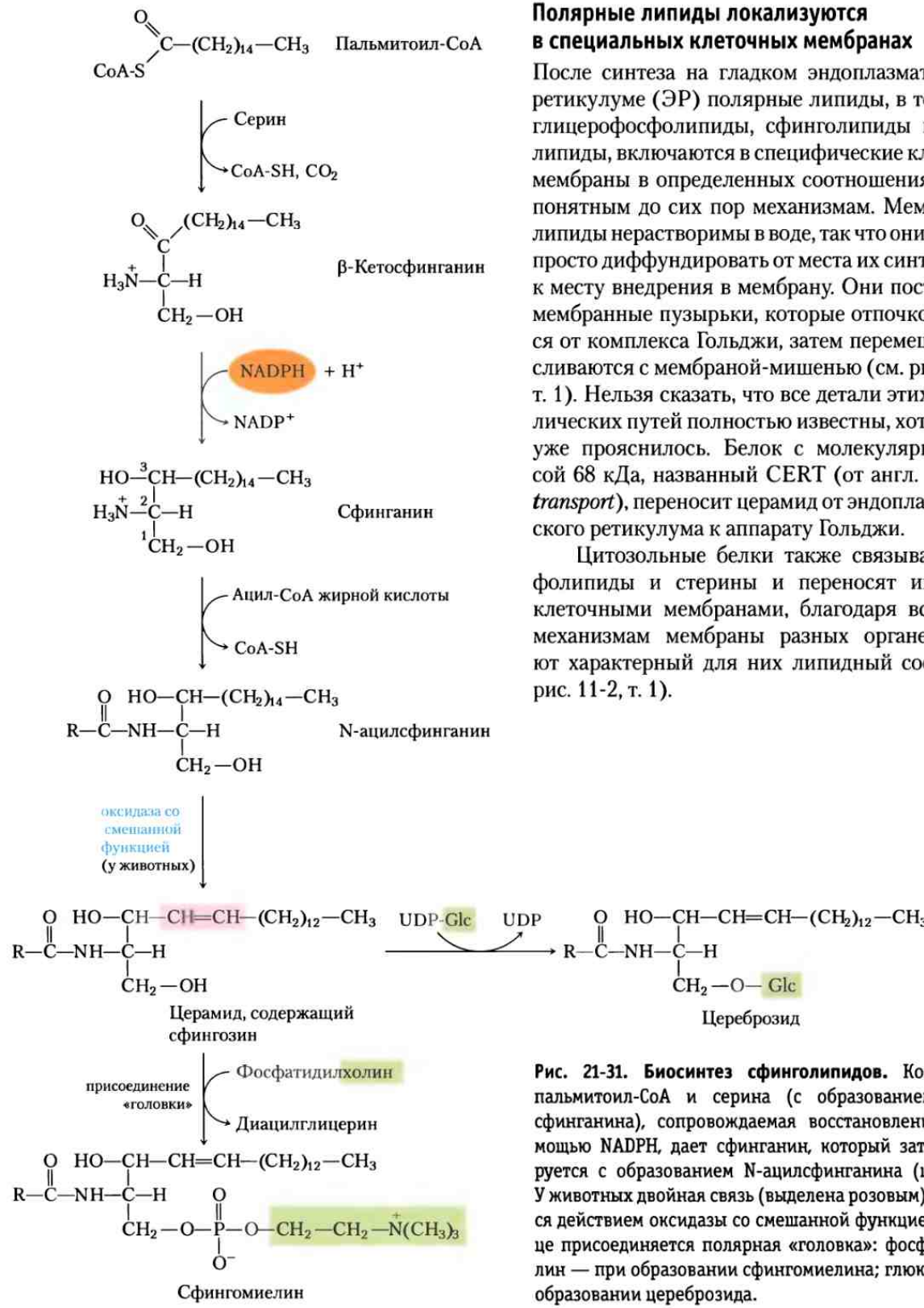


Рис. 21-30. Синтез эфирных липидов и плазмалогенов. Вновь образуемая простая эфирная связь выделена розовым цветом. Интермедиат 1-алкил-2-ацилглицерин-3-фосфат — простой эфир фосфатидной кислоты. Механизмы присоединения полярных «головок» к эфирным липидам в целом те же, что и для их аналогов со сложноэфирной связью. Характерная двойная связь в плазмалогенах (выделена голубым) вводится на конечной стадии с помощью системы оксидазы со смешанной функцией, сходной с показанной на рис. 21-13.

В гликолипидах, цереброзидах и **ганглиозидах** (см. рис. 10-12, т. 1) сахар «головки» связывается непосредственно с гидроксилом при С-1 сфингозина, причем более вероятно, что образуется гликозидная связь, чем фосфодиэфирная. Донором сахара выступает UDP-сахар (UDP-глюкоза или UDP-галактоза).



Полярные липиды локализуются в специальных клеточных мембранах

После синтеза на гладком эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) полярные липиды, в том числе глицерофосфолипиды, сфинголипиды и гликолипиды, включаются в специфические клеточные мембраны в определенных соотношениях по непонятным до сих пор механизмам. Мембранные липиды нерастворимы в воде, так что они не могут просто диффундировать от места их синтеза (ЭР) к месту внедрения в мембрану. Они поступают в мембранные пузырьки, которые отпочковываются от комплекса Гольджи, затем перемещаются и сливаются с мембраной-мишенью (см. рис. 11-22, т. 1). Нельзя сказать, что все детали этих метаболических путей полностью известны, хотя многое уже прояснилось. Белок с молекулярной массой 68 кДа, названный CERT (от англ. ***ceramide transport***), переносит церамид от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи.

Цитозольные белки также связывают фосфолипиды и стерины и переносят их между клеточными мембранами, благодаря всем этим механизмам мембраны разных органелл имеют характерный для них липидный состав (см. рис. 11-2, т. 1).

Рис. 21-31. Биосинтез сфинголипидов. Конденсация пальмитоил-CoA и серина (с образованием β-кетосфинганина), сопровождаемая восстановлением с помощью NADPH, дает сфинганин, который затем ацилируется с образованием N-ацилсфинганина (церамида). У животных двойная связь (выделена розовым) образуется действием оксидазы со смешанной функцией, а в конце присоединяется полярная «головка»: фосфатидилхолин — при образовании сфингомиелина; глюкоза — при образовании цереброзида.

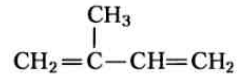
Краткое содержание раздела 21.3 БИОСИНТЕЗ МЕМБРАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ

- Диацилглицерины — главные предшественники глицерофосфолипидов.
- У бактерий фосфатидилсерин образуется путем конденсации серина с CDP-диацилглицерином; при декарбоксилировании фосфатидилсерина получается фосфатидилэтаноламин. Фосфатидилглицерин образуется при конденсации CDP-диацилглицерина с глицерин-3-фосфатом, после чего следует отщепление фосфата от сложноэфирной связи.
- У дрожжей пути синтеза фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилглицерина похожи на пути у бактерий; фосфатидилхолин образуется путем метилирования фосфатидилэтаноламина.
- В клетках млекопитающих существуют некоторые пути, сходные с бактериальными, но пути синтеза фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина до некоторой степени отличаются. Спирт головной группы (холин или этаноламин) активируется в виде CDP-производного, затем конденсируется с диацилглицерином. Фосфатидилсерин получается только из фосфатидилэтаноламина.
- Синтез плазмалогенов включает образование характерной для них двойной связи с помощью оксидазы со смешанной функцией. Головные группы сфинголипидов присоединяются посредством специфических механизмов.
- Фосфолипиды перемещаются к местам их назначения внутри клетки в виде транспортных везикул или с помощью специфических белков.

21.4. Биосинтез холестерина, стероидов и изопреноидов

Без сомнения, холестерин — наиболее известный широкой публике липид; он пользуется дурной славой из-за высокой корреляции между повышенным уровнем холестерина в крови и частотой сердечно-сосудистых заболеваний человека. Меньшее внимание привлечено к решающей роли холестерина как компонента клеточных мембран и как предшественника стероидных гормонов и желчных кислот. Холестерин необходим многим животным, в том числе человеку, но его наличие в пище млекопитающих необязательно — клетки организма сами могут синтезировать его из простых предшественников.

Структура этого 27-углеродного соединения дает основание предположить сложный путь его биосинтеза, однако все его углеродные атомы предоставлены единственным предшественником — ацетатом. **Изопреновые** блоки — самые главные интермедиаты на пути от ацетата до холестерина, они являются предшественниками многих природных липидов, и механизмы, по которым полимеризуются изопреновые блоки, похожи во всех метаболических путях.



Изопрен

Начнем с рассмотрения главных стадий на пути биосинтеза холестерина из ацетата, затем обсудим транспорт холестерина по кровотоку, поглощение его клетками, нормальную регуляцию синтеза холестерина и регуляцию при нарушениях его захвата или транспорта. Затем мы рассмотрим другие вещества, которые происходят от холестерина, такие как желчные кислоты и стероидные гормоны. Наконец, описание биосинтетических путей образования многих соединений — производных изопреновых блоков, в которых есть общие ранние стадии с синтезом холестерина, проиллюстрирует необычайную универсальность изопреноидной конденсации в биосинтезе.

Холестерин производится из ацетил-CoA в четыре стадии

Холестерин, подобно длинноцепочечным жирным кислотам, производится из ацетил-CoA, но схема сборки совершенно иная. В первых опытах в корм животных добавляли ацетат, меченный ^{14}C либо по метильному, либо по карбоксильному атому углерода. На основе распределения метки в холестерине, выделенном из двух групп животных (**рис. 21-32**), были описаны ферментативные стадии биосинтеза холестерина.

Синтез происходит в четыре стадии, как показано на **рис. 21-33**: ① конденсация трех ацетатных остатков с образованием шестиуглеродного интермедиата мевалоната; ② превращение мевалоната в активированные изопреновые блоки; ③ полимеризация шести пятиуглеродных изопреновых единиц с образованием 30-углеродного линейного сквалена; ④ циклизация сквалена с образованием четырех колец стероидного ядра, после чего следует серия изменений (окисление, удаление или миграция метильных групп) с образованием холестерина.

Стадия ①. Синтез мевалоната из ацетата. Первая стадия биосинтеза холестерина приводит к образованию промежуточного продукта **мевалоната (рис. 21-34)**. Две молекулы ацетил-CoA конденсируются, давая ацетоацетил-CoA, который конденсируется с третьей молекулой ацетил-CoA с образованием шестиуглеродного соединения **β-гидрокси-β-метилглутарил-CoA (HMG-CoA)**.

Рис. 21-32. Источник углеродных атомов холестерина. Выявлено в ходе экспериментов с использованием радиоактивного ацетата с меткой по метильному углероду (черный цвет) или углероду карбоксила (красный). В конденсированной структуре кольца обозначены буквами от A до D.

Рис. 21-33. Обобщенная картина биосинтеза холестерина. Четыре стадии синтеза обсуждаются в тексте. Изопреновые блоки в сквалене отмечены красными штриховыми линиями.

Эти две первые реакции катализируются **тиолазой** и HMG-CoA-синтазой соответственно. Цитозольная **HMG-CoA-синтаза** этого метаболического пути отличается от митохондриального изофермента, который катализирует синтез HMG-CoA при образовании кетоновых тел (см. рис. 17-18).

Третья реакция лимитирует скорость всего процесса. В ней происходит восстановление HMG-CoA до мевалоната, для которого каждая из двух молекул NADPH предоставляет два электрона. **HMG-CoA-редуктаза** — интегральный

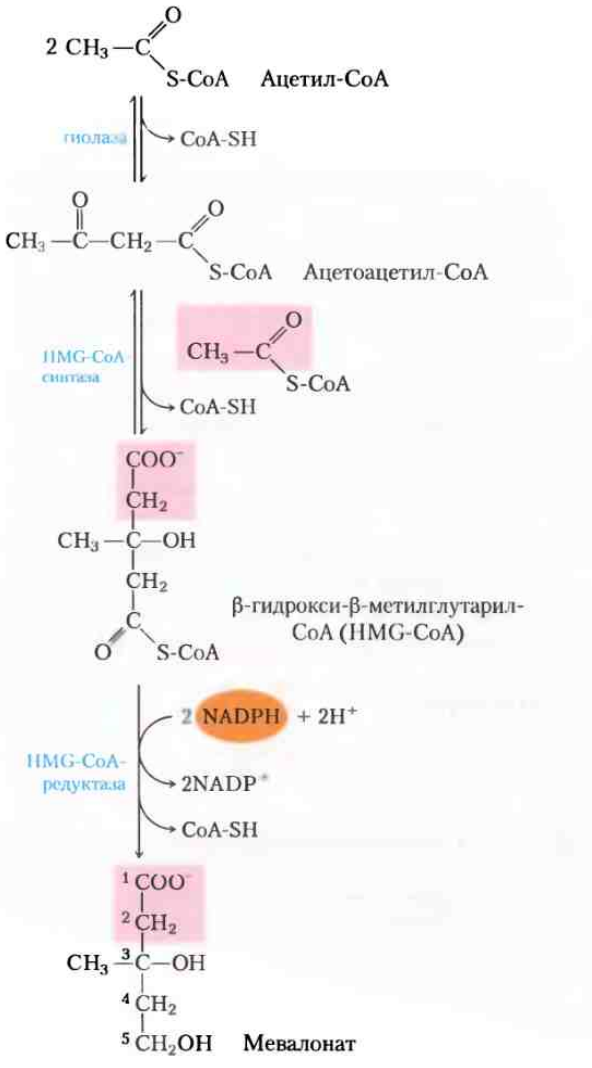


Рис. 21-34. Образование мевалоната из ацетил-CoA. Источник C-1 и C-2 мевалоната из ацетил-CoA выделен розовым цветом.

мембранный белок гладкого ЭР; он служит, как мы увидим далее, главным пунктом регуляции метаболического пути образования холестерина.

Стадия ②. Превращение мевалоната в два активированных изопрена. На следующей стадии синтеза холестерина с молекул ATP на мевалонат переносятся три фосфатные группы (**рис. 21-35**). Фосфат, связанный с гидроксильной группой при C-3 мевалоната в интермедиате 3-фосфо-5-пирофосфомевалонате, является хорошей уходящей группой; на следующей стадии уходят оба

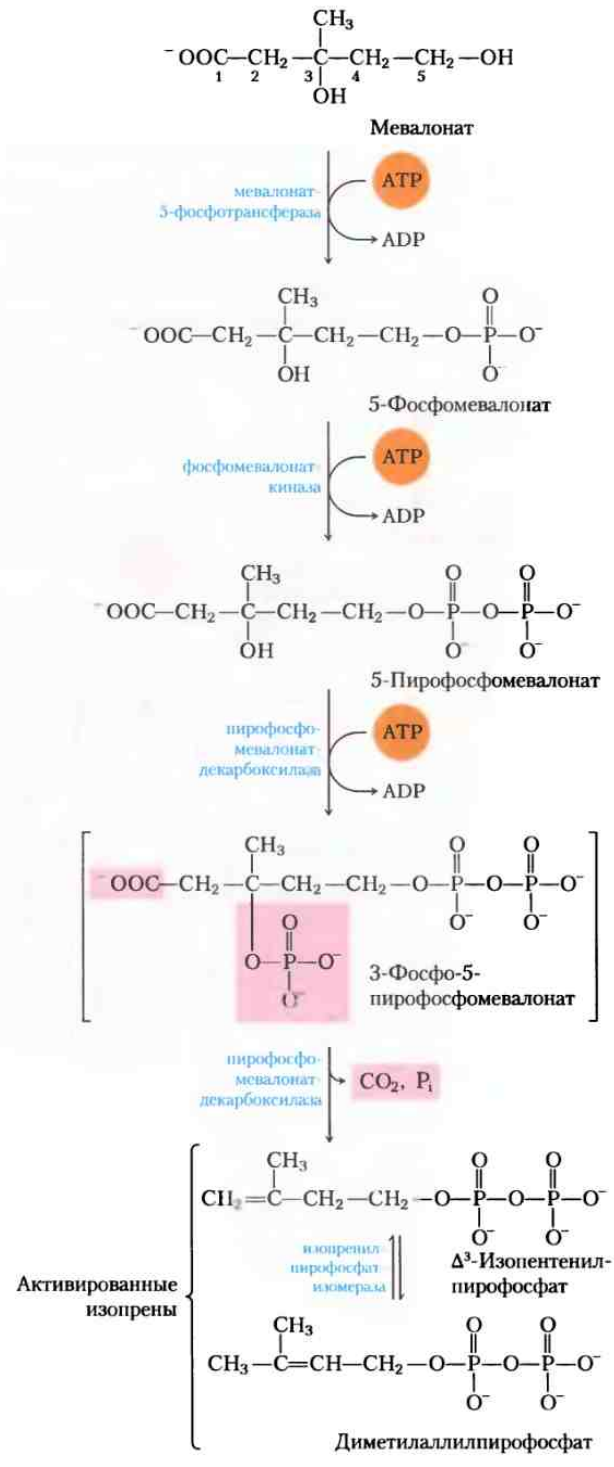


Рис. 21-35. Превращение мевалоната в активированные изопреновые блоки. Шесть активированных единиц объединяются, образуя сквален (см. рис. 21-36). Уходящие группы 3-фосфо-5-пирофосфомевалоната выделены розовым. В квадратных скобках — гипотетический интермедиат.

этих фосфата и прилежащая карбоксильная группа, образуя двойную связь в пятиуглеродном продукте **Δ^3-изопентенилпирофосфате**. Это первый из двух активированных изопренов — главных участников синтеза холестерина. Изомеризация Δ^3-изопентенилпирофосфата дает второй активированный изопрен **диметилаллилпирофосфат**. Синтез изопентенилпирофосфата в цитоплазме растительных клеток происходит по описанному здесь пути. Однако хлоропласты растений и многие бактерии используют независимый от мевалоната путь. Этот альтернативный путь не встречается у животных, поэтому он привлекателен при создании новых антибиотиков.

Стадия ③. Конденсация шести активированных изопреновых единиц с образованием сквалена. Изопентенилпирофосфат и диметилаллилпирофосфат претерпевают теперь конденсацию «голова к хвосту», при которой одна пирофосфатная

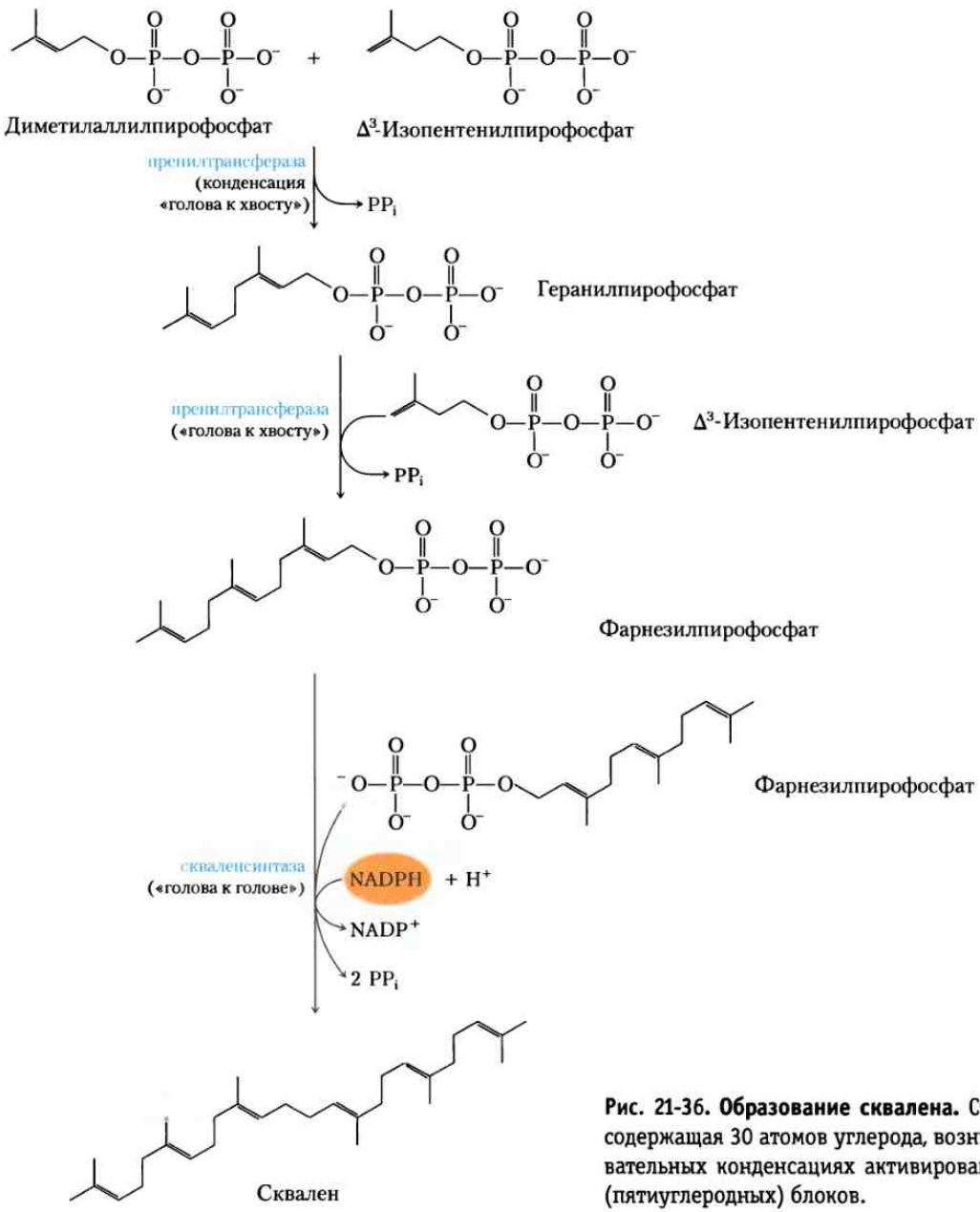


Рис. 21-36. Образование сквалена. Структура сквалена, содержащая 30 атомов углерода, возникает при последовательных конденсациях активированных изопреновых (пятиуглеродных) блоков.

группа перемещается и образуется 10-углеродная цепь — **геранилпирофосфат (рис. 21-36)**. (Пирофосфат присоединяется к «голове».) Геранилпирофосфат подвергается следующей конденсации «голова к хвосту» с изопентенилпирофосфатом, при этом образуется 15-углеродный интермедиат **фарнезилпирофосфат**. Наконец, две молекулы фарнезилпирофосфата соединяются «голова к голове», обе фосфатные группы удаляются — образуется **сквален**.

Общепринятые названия этих промежуточных продуктов происходят от названий тех источников, откуда они были впервые выделены. Гераниол, компонент розового масла, имеет аромат герани, а фарнезол, найденный в цветах акации Фарнеза, — аромат ландыша. Многие природные запахи растительного происхождения принадлежат соединениям, построенным из изопреновых блоков. Сквален, впервые выделенный из печени акулы (вида *Squalus*), состоит

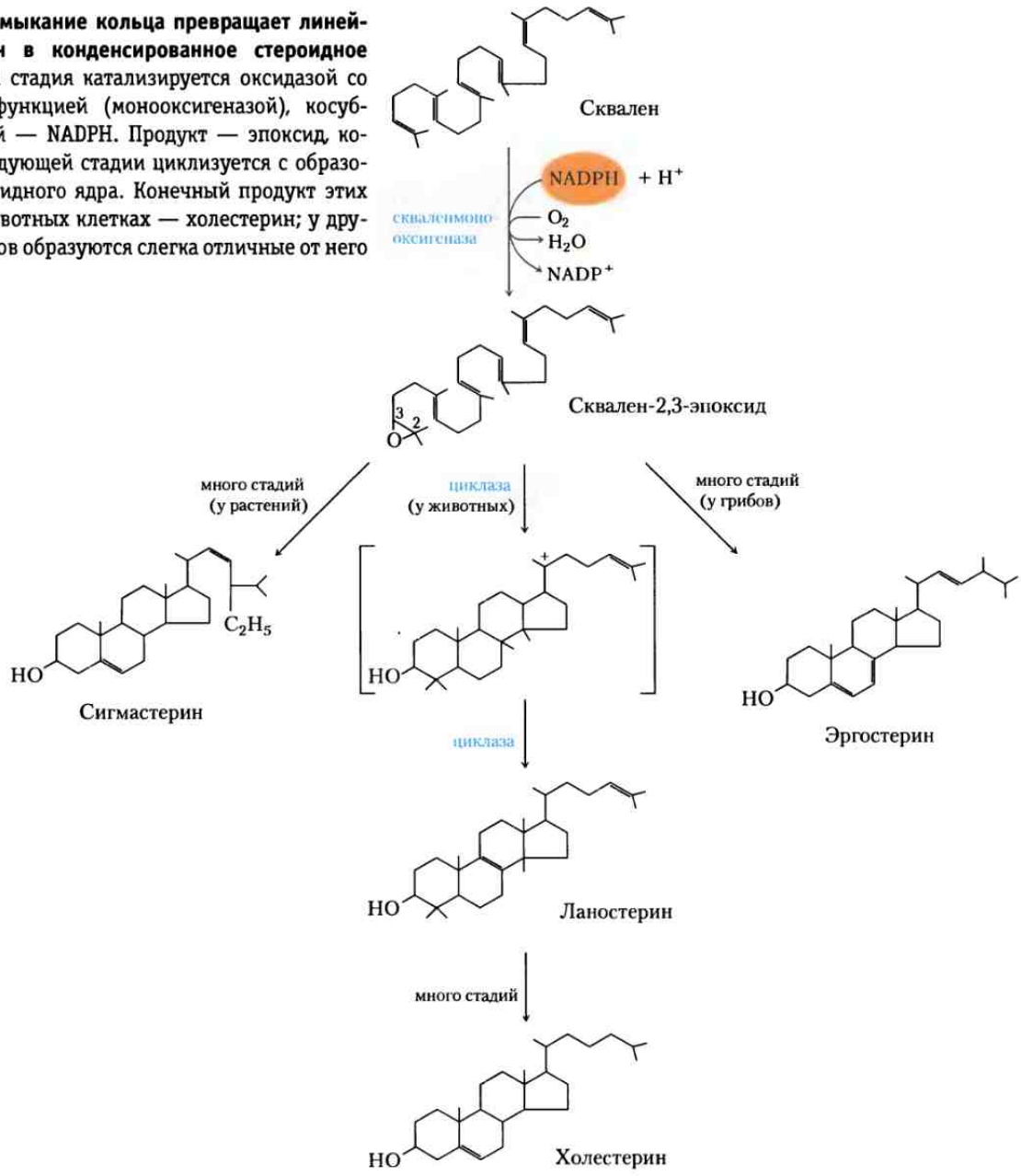


Рис. 21-37. Замыкание кольца превращает линейный сквален в конденсированное стероидное ядро. Первая стадия катализируется оксидазой со смешанной функцией (монооксигеназой), косубстрат которой — NADPH. Продукт — эпоксид, который на следующей стадии циклизуется с образованием стероидного ядра. Конечный продукт этих реакций в животных клетках — холестерин; у других организмов образуются слегка отличные от него стерины.

из 30 атомов углерода: 24 атома в главной цепи и шесть атомов в метильных заместителях.

Стадия ④. Превращение сквалена в четыре кольца стероидного ядра. На **рис. 21-37** ясно видно, что у сквалена цепочечная структура, а у стеринов — циклическая. Все стерины имеют четыре конденсированных кольца, которые образуют стероидное ядро, и все они — спирты с гидроксильной группой при атоме С-3; отсюда английское название *sterol*. При действии **скваленмонооксигеназы** к концу цепи сквалена добавляется один атом кислорода из O_2 и образуется эпоксид. Этот фермент представляет собой еще одну оксидазу со смешанной функцией (доп. 21-1); NADPH восстанавливает другой кислородный атом из O_2 до H_2O. Двойные связи продукта **сквален-2,3-эпоксида** расположены таким образом, что замечательно согласованная реакция может превратить цепочечный сквален-эпоксид в циклическую структуру. В животных клетках эта циклизация приводит к образованию **ланостерина**, который содержит четыре кольца, характерные для стероидного ядра. В итоге ланостерин превращается в холестерин посредством серии примерно из 20 реакций, которая включает миграцию одних метильных групп и удаление других. Описание этого удивительного пути биосинтеза, одного из самых сложных среди известных, было сделано Конрадом Блохом, Феодором Линеном, Джоном Корнфортом и Джорджем Попьяком в конце 1950-х гг.

Холестерин — стерин, характерный для животных клеток; растения, грибы и протисты производят другие очень похожие стерины. Они используют тот же самый путь синтеза до сквален-2,3-эпоксида, но затем пути слегка расходятся, при этом образуются другие стерины, такие как сигмастерин у многих растений и эргостерин у грибов (рис. 21-37).

Пример 21-1 ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЗАТРАТЫ ПРИ СИНТЕЗЕ СКВАЛЕНА

Каковы энергетические затраты (выраженные в числе молекул ATP) на синтез одной молекулы сквалена?

Решение. При синтезе сквалена из ацетил-CoA ATP затрачивается лишь на той стадии, когда мевалонат превращается в активированный изопреновый предшественник сквалена. Для построения молекулы сквалена нужно шесть активированных молекул изопрена, а для получения каждой активированной молекулы требуется три молекулы ATP. Итого, на синтез одной молекулы сквалена затрачивается 18 молекул ATP.

Соединения холестерина в организме

У позвоночных большие количества холестерина синтезируются в печени. Некоторая часть синтезированного там холестерина включается в мембраны гепатоцитов, но в основном он экспортируется в виде одной из трех своих форм: билиарного (желчного) холестерина, желчных кислот или эфиров холестерина. **Желчные кислоты** и их соли — гидрофильные производные холестерина, которые синтезируются в печени и способствуют перевариванию липидов (см. рис. 17-1). **Эфиры холестерина** образуются

Конрад Блох, 1912–2000

Феодор Линен, 1911–1979

Джон Корнфорт

Джордж Попьяк, 1914–1998

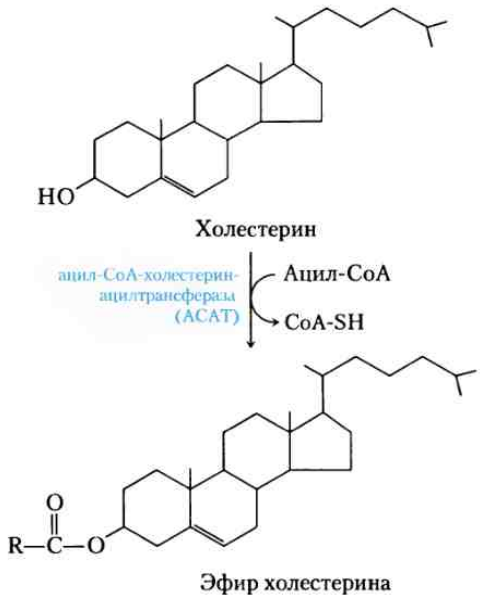


Рис. 21-38. Синтез эфиров холестерина. Этерификация превращает холестерин в еще более гидрофобную форму для хранения и транспорта.

в печени при действии **ацил-CoA-холестерин-ацилтрансферазы (ACAT)**. Этот фермент катализирует перенос остатка жирной кислоты от кофермента А к гидроксильной группе холестерина (**рис. 21-38**), превращая холестерин в более гидрофобную форму. Эфиры холестерина в секретируемых липопротеиновых частицах транспортируются в другие ткани, использующие холестерин, или хранятся в печени.

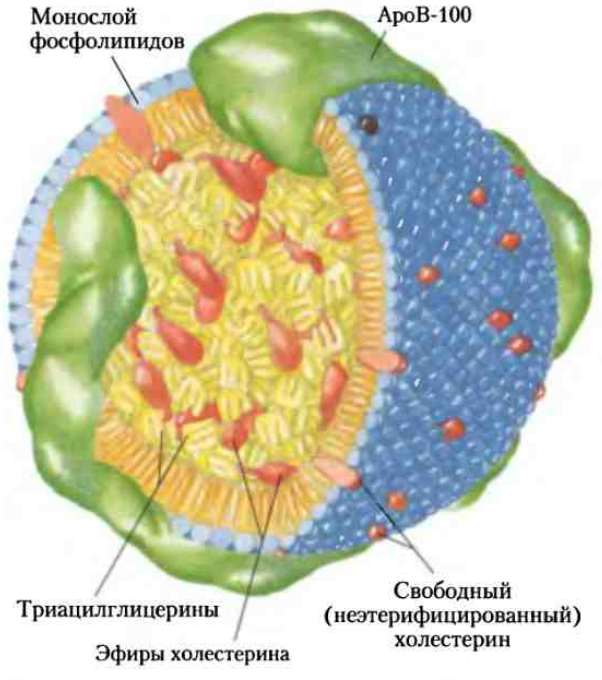
Холестерин необходим всем тканям растущего организма животных для синтеза мембран, а некоторые органы (например, надпочечники и половые железы) используют холестерин в качестве предшественника стероидных гормонов (об этом речь пойдет ниже). Холестерин также является предшественником витамина D (см. рис. 10-20, т. 1).

Холестерин и другие липиды переносят липопротеины плазмы крови

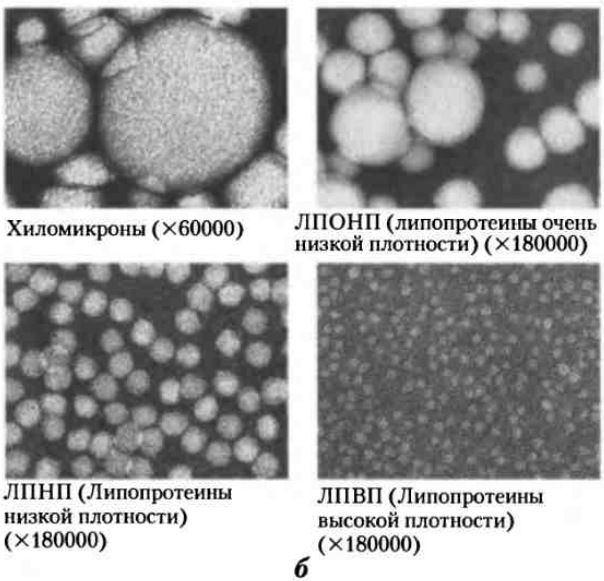
Холестерин и эфиры холестерина, подобно триацилглицеринам и фосфолипидам, практически нерастворимы в воде, тем не менее они должны перемещаться от ткани, в которой были синтезированы, к тканям, где они будут сохраняться или потребляться. Они переносятся кровотоком в виде **липопротеинов плазмы крови** — макромолекулярных комплексов специфических белков-переносчиков (**аполипопротеинов**) с фосфолипидами, холестерином, эфирами холестерина и триацилглицеринами, присутствующими в этих комплексах в различной комбинации.

Аполипопротеины («апо» обозначает сам белок без липида) соединяются с липидами, образуя несколько фракций липопротеиновых частиц — сферических комплексов с гидрофобными липидами в центре и гидрофильными аминокислотными цепями на поверхности (рис. 21-39, *а*). При различных комбинациях липидов и белков образуются частицы разной плотности — от хиломикронов до липопротеинов высокой плотности. Эти частицы можно разделить ультрацентрифугированием (табл. 21-1) и визуально наблюдать с помощью электронной микроскопии (рис. 21-39, *б*). Каждая фракция липопротеинов выполняет специфическую функцию, которая определяется местом синтеза, составом липидов и содержанием аполипопротеина. В плазме крови человека обнаружены по крайней мере 10 различных аполипопротеинов (табл. 21-2), различающихся по размеру, реакциям со специфическими антителами и характерному распределению в липопротеинах разных классов. Эти белковые компоненты работают как сигнальные вещества, направляющие липопротеины к специфическим тканям или активирующие ферменты, которые действуют на липопротеины.

Хиломикроны, о которых шла речь в гл. 17, перемещают триацилглицерины пищи из кишечника в другие ткани. Это самые крупные липопротеины, они имеют наименьшую плотность и высокое относительное содержание триацилглицеринов (см. рис. 17-2). Хиломикроны синтезируются в ЭР эпителиальных клеток, выстилающих тонкий кишечник, затем перемещаются по лимфатической системе и попадают в кровяное русло через левую подключичную вену. Аполипопротеины хиломикронов содержат apoB-48 (уникальный для этого класса липопротеинов), apoE и apoC-II (табл. 21-2). ApoC-II активирует липопротеинлипазу в капиллярах жировой ткани, сердца, скелетных мышц и лактирующей молочной железы, обеспечивая поступление свободных жирных кислот в эти ткани. Таким образом, хиломикроны переносят жирные кислоты пищи к тканям, где они будут потреблять-



а



б

Рис. 21-39. Липопротеины. *а* — структура липопротеина низкой плотности (ЛПНП). Аполипопротеин B-100 (апоВ-100) — это одна из самых длинных известных молекул, в которой 4636 аминокислотных остатков образуют одну полипептидную цепь (M_r = 513 000). В частице ЛПНП имеется ядро приблизительно из 1500 молекул эфиров холестерина, вокруг ядра — оболочка из 500 молекул холестерина, 800 молекул фосфолипидов и одной молекулы апоВ-100. *б* — четыре класса липопротеинов, видимые с помощью электронного микроскопа (после проявления негатива). По часовой стрелке, начиная с верхнего левого рисунка: хиломикроны — диаметром от 50 до 200 нм; ЛПОНП — от 28 до 70 нм; ЛПВП — от 8 до 11 нм; и ЛПНП — от 20 до 55 нм. Свойства липопротеинов даны в табл. 21-2.

ся или храниться как топливо (**рис. 21-40**). Остатки хиломикронов (в основном освобожденные от триацилглицеринов, но еще содержащие холестерин, апоЕ и апоВ-48) транспортируются кровотоком к печени. В печени рецепторы связываются с апоЕ, содержащимся в остатках хиломикронов, и опосредуют их поглощение путем эндоцитоза. В гепатоцитах эти остатки высвобождают содержащийся в них холестерин и в лизосомах разрушаются.

Когда пища содержит больше жирных кислот, чем может в данный момент использоваться в качестве топлива, они превращаются в печени в триацилглицерины, которые со специфическими аполипопротеинами образуют фракцию **липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП)**. Избыточные углеводы в печени также могут превращаться в триацилглицерины и экспортироваться как ЛПОНП (рис. 21-40, *а*). Помимо триацилглицеринов, фракция ЛПОНП содержит некоторое количество холестерина и эфиров холестерина, а также апоВ-100, апоС-I, апоС-II, апоС III и апоЕ (табл. 21-2). Эти липопротеины тоже переносятся кровью от пе-

Таблица 21-1 Липопротеины плазмы крови человека

Липопротеины	Плотность (г/мл)	Состав (массовая доля, %)				
		Белок	Фосфолипиды	Свободный холестерин	Эфиры холестерина	Триацилглицерины
Хиломикроны	<1,006	2	9	1	3	85
ЛПОНП	0,95–1,006	10	18	7	12	50
ЛПНП	1,006–1,063	23	20	8	37	10
ЛПВП	1,063–1,210	55	24	2	15	4

Источник. По Kritchevsky, D. (1986) Atherosclerosis and nutrition. *Nutr. Int.* 2, 290–297; с изм.

Таблица 21-2 Аполипопротеины липопротеинов плазмы крови человека

Аполипопротеин	Молекулярная масса	Липопротеиновый комплекс	Функция (если известна)
ApoA-I	28 331	ЛПВП	Активирует LCAT; взаимодействует с ABC-транспортером
ApoA-II	17 380	ЛПВП	Ингибирует LCAT
ApoA-IV	44 000	Хиломикроны, ЛПВП	Активирует LCAT; транспорт холестерина/клиренс
ApoB-48	240 000	Хиломикроны	Транспорт холестерина/клиренс
ApoB-100	513 000	ЛПОНП, ЛПНП	Связывается с рецептором ЛПНП
ApoC-I	7 000	ЛПОНП, ЛПВП	
ApoC-II	8 837	Хиломикроны, ЛПОНП, ЛПВП	Активирует липопротеинлипазу
ApoC-III	8 751	Хиломикроны, ЛПОНП, ЛПВП	Ингибирует липопротеинлипазу
ApoD	32 500	ЛПВП	
ApoE	34 145	Хиломикроны, ЛПОНП, ЛПВП	Запускает клиренс ЛПОНП и остатков хиломикронов

Источник. По Vance, D. E. & Vance, J. E. (eds) (1985) *Biochemistry of Lipids and Membranes.* The Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA; с изм.

чени в мышечную и жировую ткани, где после активация липопротеинлипазы под действием аро-CII происходит высвобождение свободных жирных кислот из триацилглицеринов фракции ЛПОНП. Адипоциты захватывают свободные жирные кислоты, снова превращают их в триацилглицерины, которые хранятся в этих клетках в виде липидных вкраплений (капель); миоциты, напротив, сразу же окисляют жирные кислоты с целью получения энергии. Большинство остатков ЛПОНП выводится из циркуляции гепатоцитами. Их поглощение, подобно поглощению хиломикронов, опосредовано рецепторами и зависит от присутствия апоЕ в остатках ЛПОНП (в доп. 21-2 описана связь между апоЕ и болезнью Альцгеймера).

При потере триацилглицеринов часть ЛПОНП превращается в остатки ЛПОНП, называемые также липопротеинами промежуточной плотности (ЛППП); дальнейшее уда-

Дополнение 21-2 МЕДИЦИНА **Аллели апоЕ определяют частоту возникновения болезни Альцгеймера**

В человеческой популяции существуют три известных варианта (три аллеля) гена, кодирующего аполипопротеин Е. Из аллелей апоЕ у человека наиболее распространен аллель *APOE3* (около 78%); аллели *APOE4* и *APOE2* составляют 15 и 7% соответственно. Аллель *APOE4* особенно характерен для людей, страдающих болезнью Альцгеймера, и эта связь позволяет прогнозировать возникновение болезни с высокой вероятностью. У людей, унаследовавших *APOE4*, высокий риск заболеть поздней болезнью Альцгеймера. Люди, гомозиготные по *APOE4*, имеют в 16 раз большую вероятность развития болезни; средний возраст тех, кто заболевает, около 70 лет. Для людей, которые наследуют две копии *APOE3*, напротив, средний возраст возникновения болезни Альцгеймера превышает 90 лет.

Молекулярная основа связи между апоЕ4 и болезнью Альцгеймера пока неизвестна. Кроме того, до сих пор непонятно, как апоЕ4 может влиять на рост амилоидных тяжей, которые являются, по-видимому, первопричиной болезни Альцгеймера (см. рис. 4-31, т. 1). Предположения фокусируются на возможной роли апоЕ в стабилизации структуры цитоскелета нейронов. Белки апоЕ2 и апоЕ3 связываются с рядом белков, ассоциированных с микротрубочками нейронов, в то время как апоЕ4 не связывается. Это может ускорять гибель нейронов. Каким бы этот механизм ни оказался, данные наблюдения дают надежду на расширение нашего понимания биологических функций аполипопротеинов.

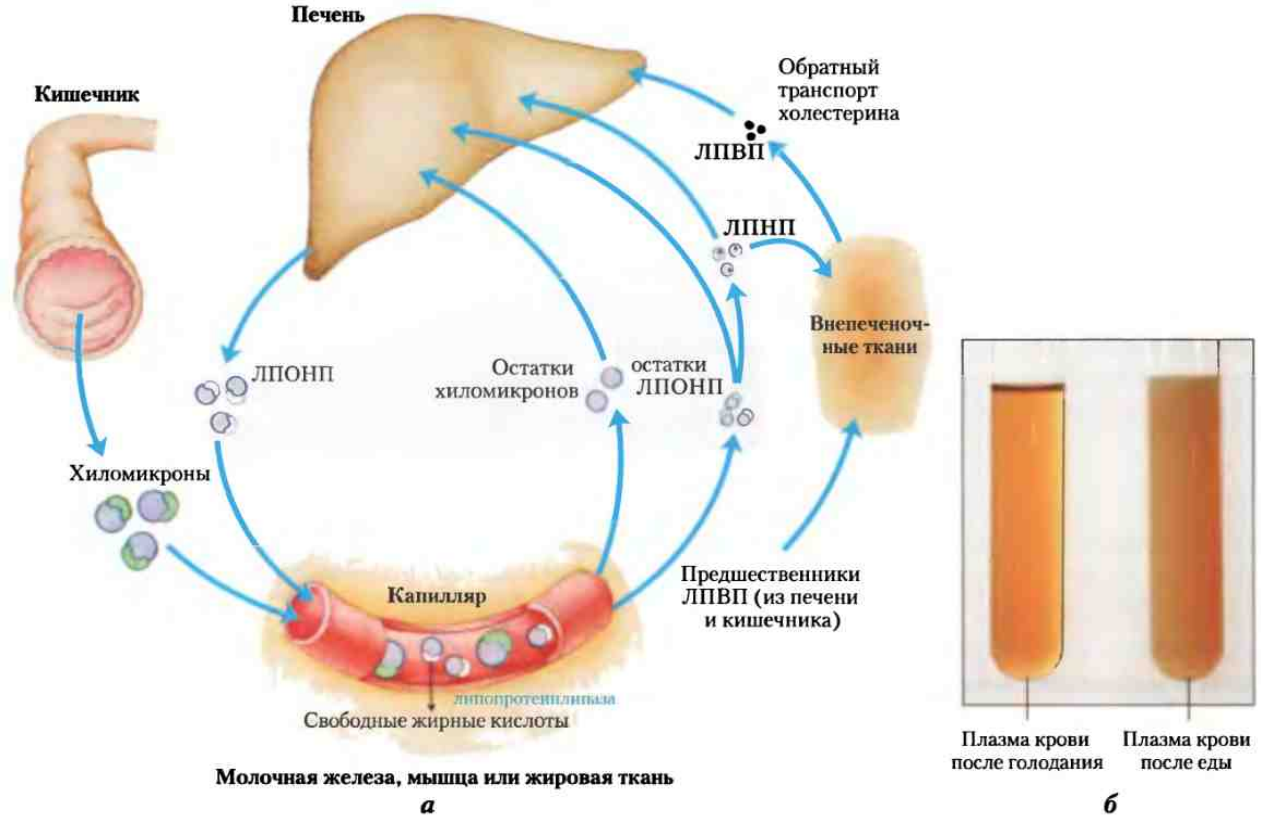


Рис. 21-40. Липопротеины и липидный транспорт. *а* — липиды переносятся кровотоком в виде липопротеинов, которые объединены в несколько фракций с разными функциями и различным составом белков и липидов (табл. 21-1, 21-2) и соответствует плотности этих фракций. Липиды пищи агрегируются в хиломикроны; большая часть содержащихся в них триацилглицеринов высвобождается липопротеинлипазой в жировую и мышечную ткани в капиллярах. Остатки хиломикронов (содержащие главным образом белок и холестерин) захватываются гепатоцитами. Эндогенные липиды и холестерин из печени доставляются в жировую и мышечную ткани в виде ЛПОНП. Выход липидов из ЛПОНП (наряду с потерей некоторых аполипопротеинов) постепенно превращает ЛПОНП в ЛПНП, которые доставляют холестерин во внепеченочные ткани или возвращают его в печень. Печень захватывает остатки ЛПОНП, ЛПНП и остатки хиломикронов путем опосредованного рецепторами эндоцитоза. Избыточный во внепеченочных тканях холестерин транспортируется обратно в печень в виде ЛПНП. В печени часть холестерина превращается в желчные соли. *б* — образцы плазмы крови, отобранные после голодания (*слева*) и после потребления пищи с высоким содержанием жира (*справа*). Хиломикроны, образовавшиеся при употреблении жирной пищи, придают плазме внешнее сходство с молоком.

ление триацилглицеринов из ЛПОНП дает **липопротеины низкой плотности (ЛПНП)** (табл. 21-1). Фракция ЛПНП, очень богатая холестерином и эфирами холестерина, а также содержащая apoB-100, переносит холестерин во внепеченочные ткани, которые несут на своих плазматических мембранах специфические рецепторы, узнающие apoB-100. Эти рецепторы опосредуют поглощение холестерина и эфиров холестерина (как описано ниже).

Четвертый тип липопротеинов — **липопротеины высокой плотности (ЛПВП)**; эта фракция образуется в печени и тонком кишечнике в виде маленьких богатых белком частиц, содержащих относительно мало холестерина и совсем не содержащих эфиров холестерина (рис. 21-40). В состав

фракции ЛПВП входят апоА-I, апоС-I, апоС-II и другие аполипопротеины (табл. 21-2), а также **лецитин-холестерин-ацилтрансфераза (LCAT)**, которая катализирует образование эфиров холестерина из лецитина (фосфатидилхолина) и холестерина (**рис. 21-41**). LCAT на поверхности вновь образующихся частиц ЛПВП превращает холестерин и фосфатидилхолин хиломикрона и остатков ЛПОНП в эфиры холестерина, которые начинают формировать ядро, трансформируя вновь образующиеся дисковидные частицы ЛПВП в зрелые сферические частицы ЛПВП. Этот богатый холестерином липопротеин затем возвращается в печень, где холестерин «выгружается»; некоторая часть этого холестерина превращается в желчные соли.

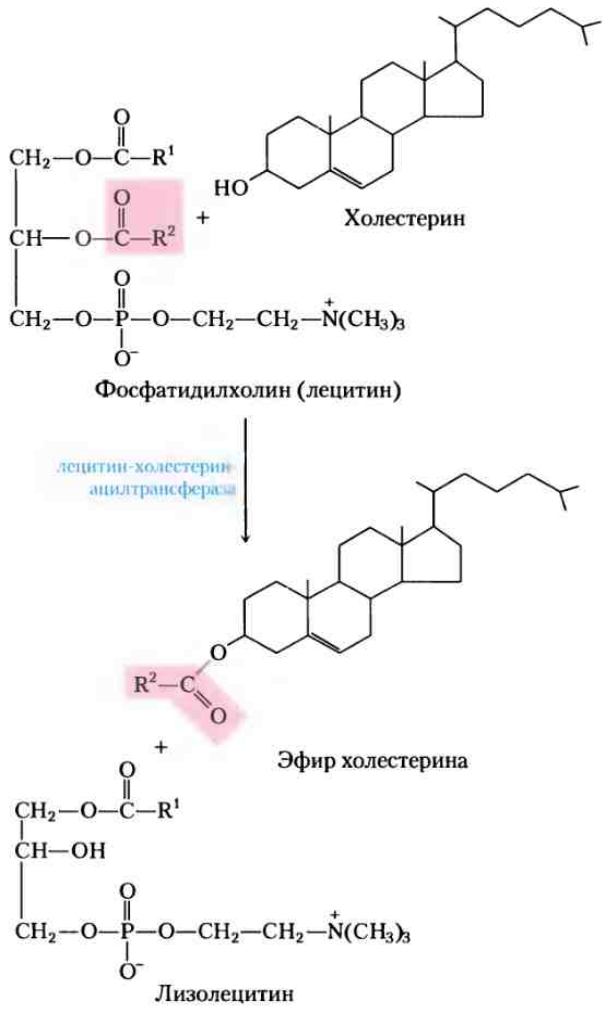


Рис. 21-41. Реакция, катализируемая лецитин-холестерин-ацилтрансферазой (LCAT). Этот фермент присутствует на поверхности частиц ЛПВП и активируется апоА-I (компонентом фракции ЛПВП). Эфиры холестерина накапливаются внутри вновь образующихся частиц ЛПВП, превращая их в зрелый ЛПВП.

ЛПВП могут поглощаться в печени путем опосредованного рецепторами эндоцитоза, но по крайней мере некоторая часть холестерина из ЛПВП доставляется в другие ткани по другим механизмам. Частицы ЛПВП могут связываться с рецепторными белками SR-BI на плазматической мембране клеток печени и в стероидогенной ткани, такой как надпочечники. Эти рецепторы опосредуют не эндоцитоз, а частичный и избирательный перенос холестерина и других липидов фракции ЛПВП внутрь клетки. «Обедненная» фракция ЛПВП затем вновь попадает в кровяное русло, там она включает в себя новые порции липидов из хиломикронов и остатков ЛПОНП. Этот же ЛПВП также может захватывать холестерин, хранящийся во внепеченочных тканях, и переносить его в печень, осуществляя **обратный транспорт холестерина** (рис. 21-40). В одном из вариантов обратного транспорта взаимодействие образующегося ЛПВП с рецепторами SR-BI в богатых холестерином клетках инициирует пассивную диффузию холестерина от клеточной поверхности внутрь частиц ЛПВП, которые затем переносят холестерин обратно в печень. В другом варианте обратного транспорта в богатой холестерином клетке после расщепления ЛПВП апоА-I взаимодействует с активным транспортером — белком ABC. АроА-I (и предположительно ЛПВП) поглощается путем эндоцитоза, затем вновь секретируется, нагруженный холестерином, который переносится к печени.

Белок ABC1 входит в большое семейство переносчиков многих лекарств; эти переносчики иногда называются ABC-транспортерами, так как все они содержат АТР-связывающие кластеры (англ. ***ATP-binding cassettes***); они имеют также два трансмембранных домена с шестью трансмембранными спиралями (см. гл. 11, т. 1). Эти белки активно переносят многие ионы, аминокислоты, витамины, стероидные гормоны и желчные соли через плазматические мембраны. Другой представитель этого семейства переносчиков — белок CFTR, который при кистозном фиброзе оказывается поврежденным (см. доп. 11-3, т. 1).

Эфиры холестерина попадают в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза

Каждая частица ЛПНП в кровяном русле содержит апоВ-100, который распознается специфическими поверхностными рецепторными белками-**ЛПНП-рецепторами** на мембране клеток, которым нужно захватить холестерин. Связывание ЛПНП с рецептором ЛПНП инициирует эндоцитоз, благодаря чему ЛПНП и его рецептор перемещаются в клетку внутри эндосомы (**рис. 21-42**). Эндосома в конце концов сливается с лизосомой, которая содержит ферменты, гидролизующие эфиры холестерина, высвобождая холестерин и жирные кислоты в цитозоль. АроВ-100 из ЛПНП также распадается с образованием аминокислот, которые выделяются в цитозоль, но рецептор ЛПНП избегает деградации и возвращается на клеточную поверхность, чтобы снова участвовать в поглощении ЛПНП. АроВ-100 присутствует и в ЛПОНП, но его рецептор-связывающий домен не способен связываться с рецептором ЛПНП; превращение ЛПОНП в ЛПНП делает доступным рецептор-связывающий домен в апоВ-100. Этот путь транспорта холестерина в крови и его опосредованный рецептором эндоцитоз в тканях-мишенях был изучен Майклом Брауном и Джозефом Голдштейном.

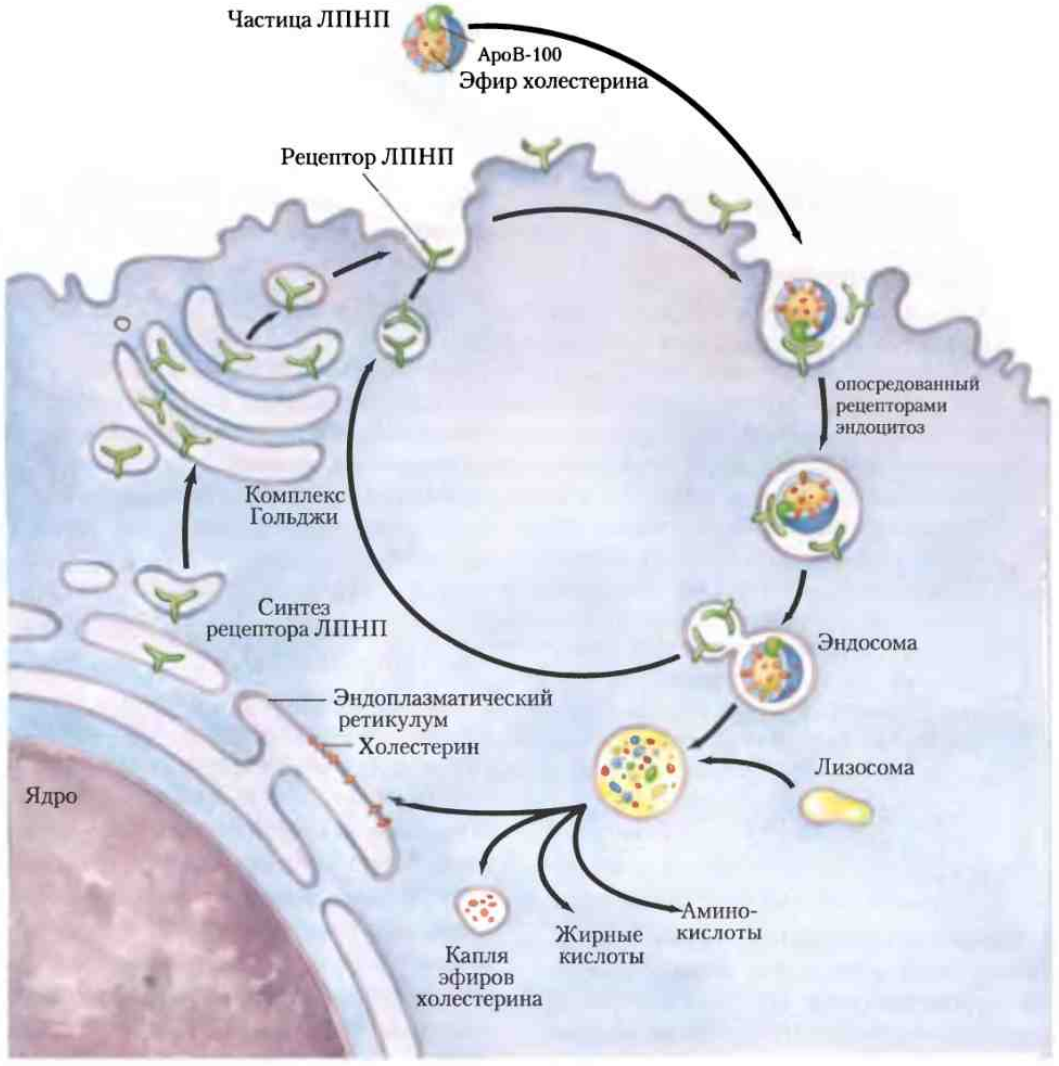


Рис. 21-42. Захват холестерина путем опосредованного рецепторами эндоцитоза.

Майкл Браун и Джозеф Голдштейн

Холестерин, который попадает в клетки этим путем, может включаться в мембраны или повторно этерифицироваться под действием АСАТ (рис. 21-38) для хранения в цитозоле внутри липидных капель. Когда во фракции ЛПНП крови достаточно доступного холестерина, накопление избыточного внутриклеточного холестерина предотвращается путем уменьшения скорости его синтеза.

Рецептор ЛПНП связывается также с апоЕ и играет существенную роль в захвате печенью хиломикронов и остатков ЛПОНП. Однако, если рецепторы ЛПНП не доступны (как, например, у штамма мышей с отсутствующим геном рецептора ЛПНП), остатки ЛПОНП и хиломикроны все же поглощаются печенью, хотя ЛПНП не поглощается. Это указывает на наличие вспомогательной запасной системы для опосредованного рецепторами эндоцитоза остатков ЛПОНП и хиломикронов. Один из запасных рецепторов — это родственный рецепторам липопротеинов белок LRP (***l**ipoprotein **r**eceptor-related **p**rotein*), который связывается с апоЕ и с рядом других лигандов.

Несколько уровней регуляции биосинтеза холестерина

Синтез холестерина — сложный и энергетически дорогостоящий процесс, поэтому ясно, что организму выгодно иметь механизм регуляции биосинтеза холестерина, который пополняет его количество в дополнение к тому, что поступает с пищей. У млекопитающих производство холестерина регулируется внутриклеточной концентрацией холестерина и гормонами глюкагоном и инсулином. Лимитирует скорость в метаболическом пути образования холестерина (главная точка регуляции) стадия превращения HMG-CoA в мевалонат (рис. 21-34). Эту реакцию катализирует HMG-CoA-редуктаза. Регуляция в ответ на изменение уровня холестерина опосредуется с помощью изящной системы регуляции транскрипции гена, кодирующего HMG-CoA-редуктазу. Этот ген вместе с более чем 20 другими генами, кодирующими ферменты, которые участвуют в поглощении и синтезе холестерина и ненасыщенных жирных кислот, контролируется небольшим семейством белков, называемых белками, взаимодействующими со стерол-регулируемым элементом образования белков (SREBP, ***s**terol **r**egulatory **e**lement **b**inding **p**roteins*). После синтеза эти белки внедряются в эндоплазматический ретикулум. Единственный растворимый домен SREBP с концевой аминогруппой функционирует как активатор транскрипции с помощью механизмов, описанных в гл. 28 (т. 3). Однако этот домен не имеет доступа к ядру и не может принимать участие в активации гена, пока он остается в составе молекулы SREBP. Для того чтобы активировать транскрипцию гена HMG-CoA-редуктазы и других генов, транскрипционно активный домен отделяется от остальной части SREBP путем протеолитического расщепления. Когда уровень холестерина высокий, белки SREBP неактивны, закреплены на ЭР в комплексе с другим белком, называемым SCAP (***SREBP** – **c**leavage **a**ctivating **p**rotein*) **(рис. 21-43)**. Именно SCAP связывает холестерин и ряд других стеринов, действуя как стериновый сенсор. Когда уровень стерина высокий, комплекс SCAP–SREBP, вероятно, взаимодействует с другим белком, что удерживает весь комплекс в ЭР. Когда уровень стеринов в клетке падает, конформационное изменение в SCAP приводит к утрате удерживающей активности, и комплекс SCAP–SREBP мигрирует внутри везикул в комплекс Гольджи. В комплексе Гольджи белки SREBP дважды расщепляются двумя разными протеазами, причем второе расщепление высвобождает в цитозоль аминоконцевой домен. Этот домен передвигается к ядру и активирует транскрипцию генов-мишеней. Домен белка SREBP с концевой аминогруппой имеет короткий период полужизни и быстро разлагается протеасомами (см. рис. 27-48, т. 3). Когда уровень стерина повышается в достаточной степени, протеолитическое высвобождение

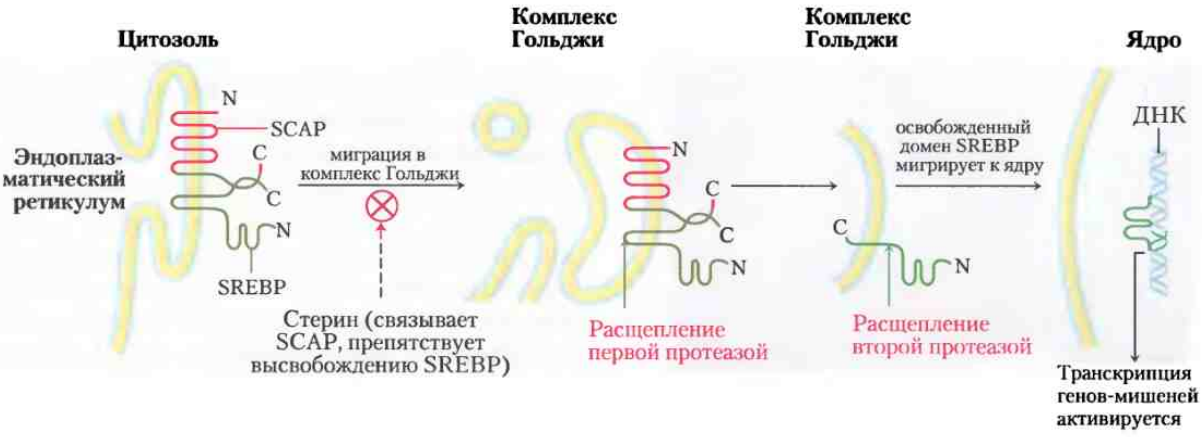


Рис. 21-43. Активация SREBP. Белки SREBP, взаимодействующие со стерол-регулируемым элементом (зеленый цвет), сразу после синтеза внедряются в ЭР, образуя комплекс со SCAP (красный цвет). (N и C обозначают аминный и карбоксильный концы белков.) В связанном с SCAP состоянии белки SREBP неактивны. Когда уровень стерина уменьшается, комплекс SREBP– SCAP мигрирует к комплексу Гольджи, а белки SREBP последовательно отщепляются двумя разными протеазами. Освобожденный домен белка SREBP с концевой аминогруппой мигрирует к ядру, где он активирует транскрипцию стерол-регулируемых генов.

доменов белков SREBP с концевой аминогруппой снова блокируется, а протеасомная деградация существующих активных доменов приводит к быстрому отключению генов-мишеней.

Синтез холестерина также регулируют несколько других механизмов (**рис. 21-44**). Гормональный контроль опосредуется ковалентной модификацией HMG-CoA-редуктазы. Этот фермент существует в фосфорилированной (неактивной) и дефосфорилированной (активной) формах. Глюкагон стимулирует фосфорилирование (инактивацию) фермента, а инсулин способствует дефосфорилированию, активируя фермент и благоприятствуя синтезу холестерина. Высокие внутриклеточные концентрации холестерина активируют ACAT, что увеличивает этерификацию холестерина для депонирования. Наконец, высокий уровень клеточного холестерина подавляет транскрипцию гена, который кодирует рецептор ЛПНП, снижая продукцию этого рецептора и, следовательно, захват холестерина из крови.

Нерегулируемое выделение холестерина может приводить к серьезным болезням у человека. Когда в сумме количество синтезированного холестерина и холестерина, полученного с

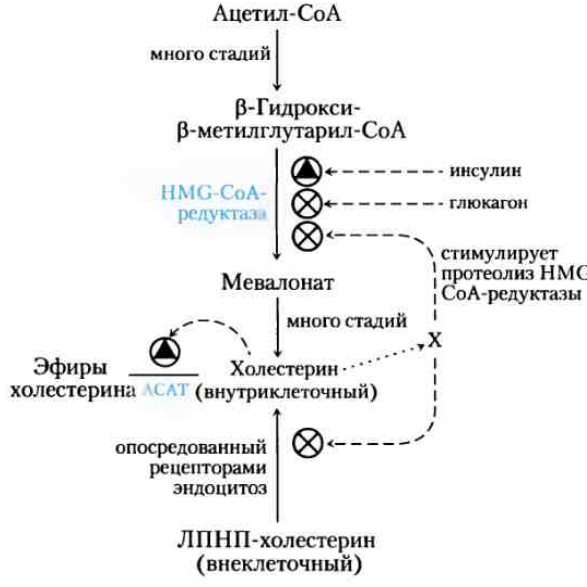


Рис. 21-44. Регуляция уровня холестерина обеспечивает баланс между синтезом и поглощением холестерина из пищи. Глюкагон облегчает фосфорилирование (инактивацию) HMG-CoA-редуктазы; инсулин способствует дефосфорилированию (активации). X — неидентифицированные метаболиты холестерина, которые стимулируют протеолиз HMG-CoA-редуктазы.

пищей, превышает количество, необходимое для сборки мембран, синтеза желчных солей и стероидов, могут появиться патологические скопления холестерина в кровеносных сосудах (атеросклеротические бляшки), приводящие к их закупорке (**атеросклерозу**). В промышленно развитых странах именно сердечная недостаточность, обусловленная закупоркой коронарных артерий, является главной причиной смертности населения. Развитие атеросклероза связывают с высоким уровнем холестерина крови и особенно с высоким уровнем холестерина, переносимого с фракцией ЛПНП; высокий уровень ЛПВП крови, наоборот, благоприятно сказывается на состоянии сосудов.

При наследственной гиперхолестеринемии (генетический дефект) уровень холестерина крови очень высокий — тяжелый атеросклероз развивается у этих людей уже в детстве. Из-за дефект-

Дополнение 21-3 МЕДИЦИНА Липидная гипотеза и создание статинов

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) — основная причина смертности людей в развитых странах. Сужение коронарных артерий, несущих кровь к сердцу, происходит в результате образования жировых отложений, называемых атеросклеротическими бляшками; эти бляшки содержат холестерин, фибриллярные белки, кальций, сгустки тромбоцитов и фрагменты клеток. В XX в. велись активные дебаты по поводу связи между закупоркой артерий (атеросклерозом) и уровнем холестерина в крови. Эти дискуссии и активные исследования в этом направлении привели к созданию эффективных лекарственных препаратов, снижающих уровень холестерина.

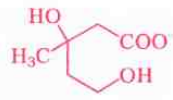
В 1913 г. известный русский ученый, специалист в области экспериментальной патологии Н. Н. Аничков опубликовал работу, в которой продемонстрировал, что у кроликов, получавших богатую холестерином пищу, развиваются повреждения кровеносных сосудов, которые напоминают атеросклеротические бляшки в сосудах пожилых людей. Аничков проводил свои исследования на протяжении нескольких десятков лет и публиковал результаты в известных западных журналах. К сожалению, его данные не стали основой для модели развития атеросклероза у человека, поскольку в то время превалировала гипотеза, что данное заболевание является естественным результатом старения организма и его нельзя предотвратить. Однако постепенно накапливались доказательства связи между уровнем холестерина в сыворотке крови и развитием атеросклероза (липидная гипотеза), а в 1960-х гг. некоторые исследователи прямо заявили, что эту болезнь можно лечить с помощью лекарственных препаратов. Тем не менее противоположная точка зрения существовала вплоть до обнародования в 1984 г. результатов широкого исследования роли холестерина, проведенного Национальным институтом здоровья США (Coronary Primary Prevention Trial). Было продемонстрировано статистически достоверное снижение частоты инфарктов миокарда и инсультов при уменьшении уровня холестерина крови. В этом исследовании для снижения уровня холестерина использовали холестирамин — анионообменную смолу, связывающую желчные кислоты. Полученные результаты стимулировали поиск новых, более мощных терапевтических препаратов. Нужно сказать, что в научном мире сомнения в справедливости липидной гипотезы полностью исчезли только с появлением статинов в конце 1980-х — начале 1990-х гг.

Первый статин открыл Акира Эндо в компании Sankyo в Токио. Свою работу Эндо опубликовал в 1976 г., хотя проблемой метаболизма холестерина он занимался несколько лет. В 1971 г. он высказал предположение, что в изучавшихся в то время грибных продуцентах антибиотиков также могут содержаться ингибиторы синтеза холестерина. За несколько лет интенсивной работы он проанализировал более 6000 культур различных грибов, пока не пришел к положительному результату. Полученное соединение было названо компактином (рис. 1). Это вещество действительно снижало уровень холестерина в организме собак и обезьян. Данные исследования привлекли внимание Майкла Брауна и Джозефа Голдштейна из Юго-Западной медицинской школы Техасского университета. Браун и Голдштейн вместе с Эндо начали совместные исследования и подтвердили его данные. Серьезные успехи первых клинических испытаний привлекли фармацевтические компании к разработке этих новых лекарственных препаратов. В компании Merck группа под руководством Альфреда Альбертса

Продолжение на следующей странице

Дополнение 21-2 МЕДИЦИНА Липидная гипотеза и создание статинов (*продолжение*)

и Роя Вагелоса предприняла новый скрининг культур грибов и в результате анализа всего 18 культур обнаружила еще один активный препарат. Новое вещество получило название ловастатина (рис. 1). Однако в это же время получило распространение мнение о том, что введение собакам высоких доз компактина приводит к развитию рака и поиск новых статинов в 1980-х гг. был приостановлен. Однако к тому моменту уже стали очевидны преимущества применения статинов для лечения пациентов с семейной гиперхолестеринемией. После многочисленных консультаций с мировыми экспертами и с Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA, США) компания Merck приступила к разработке ловастатина. Широкие исследования, проводившиеся на протяжении двух последующих десятилетий, не выявили канцерогенного действия ловастатина и появившихся после него препаратов нового поколения.



Мевалонат

$R_1 = H$ $R_2 = H$ Компактин
$R_1 = CH_3$ $R_2 = CH_3$ Симвастатин (Зокор)
$R_1 = H$ $R_2 = OH$ Правастатин (Правахол)
$R_1 = H$ $R_2 = CH_3$ Ловастатин (Мевакор)

Рис. 1. Статины — ингибиторы HMG-CoA-редуктазы. Сравнение структуры мевалоната и четырех фармацевтических продуктов (статинов), ингибирующих действие HMG-CoA-редуктазы.

Статины ингибируют действие HMG-CoA-редуктазы, имитируя структуру мевалоната (рис. 1), и тем самым блокируют синтез холестерина. У пациентов с гиперхолестеринемией, вызванной дефектом одной копии гена рецептора ЛПНП, при приеме ловастатина уровень холестерина снижается на 30%. Препарат оказывается еще более эффективным в сочетании со специальными смолами, связывающими желчные кислоты и предотвращающими их обратное всасывание из кишечника.

В настоящее время для снижения уровня холестерина плазмы крови чаще всего используют именно статины. При приеме любых лекарств возникает вопрос об их нежелательном побочном действии. Однако в случае статинов многие побочные действия, напротив, являются позитивными. Эти препараты могут стимулировать кровоток, закрепить уже существующие атеросклеротические бляшки (так что они не отрываются от стенок сосудов и не мешают кровотоку), препятствовать агрегации тромбоцитов, а также ослабить воспалительные процессы в стенках сосудов. У пациентов, принимающих статины впервые, эти эффекты проявляются даже до того, как начнет снижаться уровень холестерина, и, возможно, связаны с ингибированием синтеза изопреноидов. Конечно, не всякое побочное действие статинов благотворно. У некоторых пациентов (обычно среди тех, которые принимают статины в сочетании с другими препаратами, снижающими уровень холестерина) могут возникать боли в мышцах и мышечная слабость, причем, иногда в довольно сильной форме. Зарегистрированы и другие, довольно многочисленные побочные проявления действия статинов, которые, к счастью, возникают достаточно редко. У подавляющего большинства пациентов прием статинов позволяет затормозить развитие сердечно-сосудистых заболеваний. Как и любые другие лекарственные препараты, статины следует применять только в соответствии с рекомендациями врача.

Акиро Эндо

Альфред Альбертс

Рой Вагелос

ного рецептора ЛПНП происходит недостаточное рецептор-опосредованное поглощение холестерина фракции ЛПНП. Как следствие, холестерин не удаляется из кровотока; он накапливается и вносит свой вклад в образование атеросклеротических бляшек. Синтез эндогенного холестерина продолжается, несмотря на избыточное содержание холестерина в крови, поскольку внеклеточный холестерин не может попасть в клетку, чтобы отрегулировать внутриклеточный синтез (рис. 21-44). Для лечения больных наследственной гиперхолестеринемией и при других заболеваниях, связанных с повышенным уровнем сывороточного холестерина, используются препараты классов статинов. Некоторые из них получены из природных источников, а другие синтезированы фармацевтической промышленностью. Статины сходны с мевалонатом (доп. 21-3) и являются конкурентными ингибиторами HMG-CoA-редуктазы.

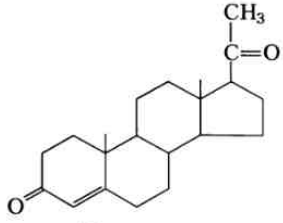
При наследственном отсутствии ЛПВП уровень холестерина очень низкий; при болезни Танжера холестерин практически не определяется. Оба генетических нарушения возникают в результате мутаций в белке ABC1. Лишенная холестерина фракция ЛПВП не может захватывать холестерин из клеток с недостатком белка ABC1, и обедненные холестерином клетки быстро удаляются из крови и разрушаются. И наследственное отсутствие ЛПВП, и болезнь Танжера встречаются очень редко (во всем мире известно менее 100 семей с болезнью Танжера), но эти болезни демонстрируют роль белка ABC1 в регуляции уровня ЛПВП плазмы крови. Поскольку низкий уровень ЛПВП плазмы коррелирует с высокой частотой поражения коронарных артерий, белок ABC1 может оказаться полезной мишенью для действия лекарств, предназначенных регулировать уровень ЛПВП. ■

Стероидные гормоны образуются путем расщепления боковой цепи холестерина и его окисления

Человек получает все свои стероидные гормоны из холестерина (**рис. 21-45**). Два класса стероидных гормонов синтезируются в коре надпочечников: **минералкортикоиды**, которые регулируют всасывание неорганических ионов (Na^+, Cl^- и HCO_3^-) в почках, и **глюкокортикоиды**, которые помогают регулировать глюконеогенез и умень-

Рис. 21-45. Некоторые стероидные гормоны образуются из холестерина. Структуры некоторых из этих соединений представлены на рис. 10-19, т. 1.

шают воспалительную реакцию. Половые гормоны производятся в половых клетках мужчин и женщин и в плаценте. Среди них **прогестерон**, который регулирует женский репродуктивный цикл, **андрогены** (например, тестостерон) и **эстрогены** (эстрадиол), которые влияют на развитие вторичных половых признаков у мужчин и женщин соответственно. Стероидные гормоны оказывают эффект при очень низких концентрациях и поэтому синтезируются в относительно малых количествах. По сравнению с желчными солями для продукции стероидных гормонов потребляется относительно мало холестерина.



Прогестерон

Синтез стероидных гормонов требует удаления нескольких или всех углеродных атомов, на-

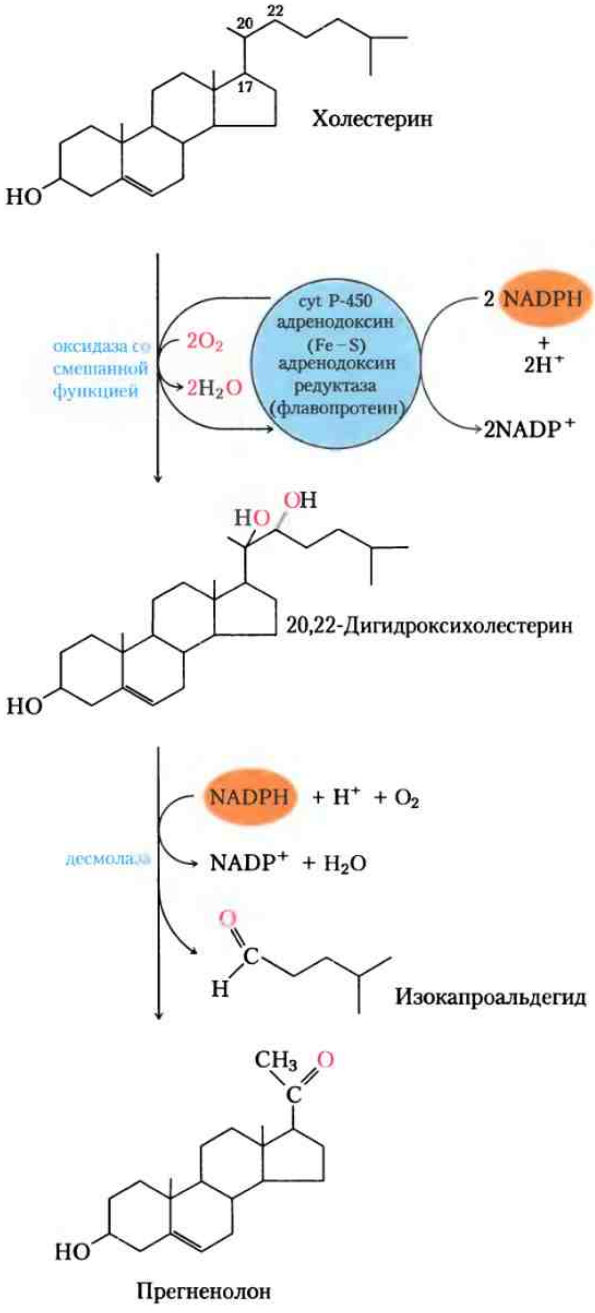


Рис. 21-46. Расщепление боковой цепи при синтезе стероидных гормонов. В данной системе оксидаз со смешанной функцией, которая окисляет прилегающие атомы углерода, цитохром P-450 работает как переносчик электронов. В процессе участвуют также электрон-переносящие белки адренодоксин и адренодоксин-редуктаза. Эта система расщепления боковых цепей обнаружена в митохондриях коры надпочечников, где происходит активное производство стероидов. Прегненолон является предшественником всех других стероидных гормонов (рис. 21-45).

ходящихся в «боковой цепи» при C-17 D-кольца холестерина. Удаление боковой цепи происходит в митохондриях стероидогенных тканей. Процесс удаления состоит из гидроксилирования двух прилежащих атомов углерода боковой цепи (C-20 и C-22), затем — расщепление связи между ними (**рис. 21-46**). Образование разных гормонов включает также введение атомов кислорода. Все реакции гидроксилирования и окисления при биосинтезе стероидов катализируются оксидазами со смешанной функцией (доп. 21-1), которые используют NADPH, O_2 и митохондриальный цитохром P-450.

Промежуточные продукты биосинтеза холестерина участвуют во многих других метаболических путях

Дополнительно к своей роли в качестве интермедиата биосинтеза холестерина изопентенилпирофосфат служит активированным предшественником в синтезе огромного множества биомолекул, выполняющих разнообразные биологические функции (**рис. 21-47**). Сюда относятся витамины A, E и K; растительные пигменты, такие как каротин и фитольная цепь хлорофилла; природный каучук; многие эфирные масла (например, душистая основа лимонного масла, эвкалипта, мускуса); ювенильный гормон насекомых, который регулирует метаморфоз; долихолы, которые служат липидорастворимыми переносчиками в сложном синтезе полисахаридов; убихинон и пластохинон — переносчики электронов в митохондриях и хлоропластах. Все эти молекулы по строению изопреноиды. В природе было найдено более 20 000 различных изопреноидов, и об открытии сотен новых сообщается каждый год.

Пренилирование (ковалентное присоединение изопреноида; см. рис. 27-35) — общий механизм, посредством которого белки заякориваются на внутренней поверхности клеточных мембран млекопитающих (см. рис. 11-14). В некоторых белках связанный липид представлен 15-углеродной фарнезильной группой; в других — это 20-углеродная геранилгеранильная группа. Эти два типа липидов присоединяют разные ферменты. Возможно, что реакции пренилирования направляют белки к различным мембранам в зависимости от того, какой липид присоединяется. Пренилирование белка — это еще одна важная роль производных изопрена — участников холестеринового метаболического пути.

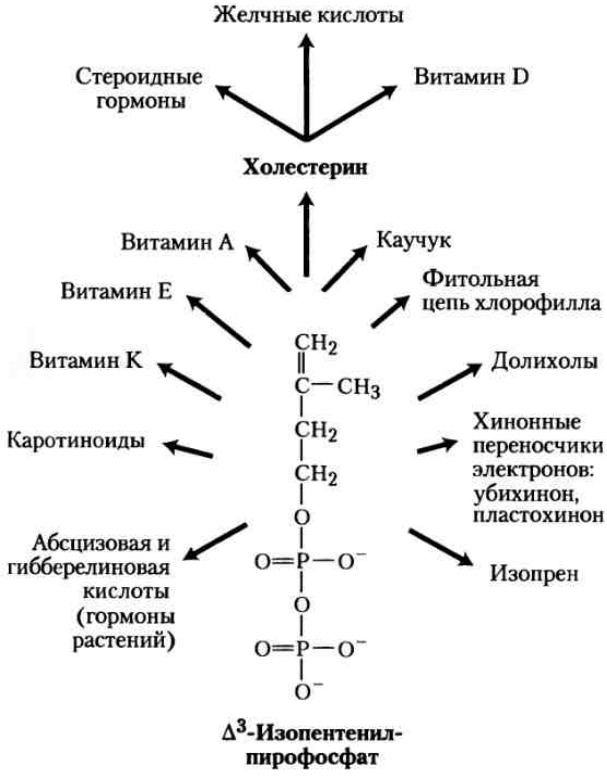


Рис. 21-47. Общая картина биосинтеза изопреноидов. Структуры большинства представленных здесь конечных продуктов приведены в гл. 10 (т. 1).

Краткое содержание раздела 21.4 БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА, СТЕРОИДОВ И ИЗОПРЕНОИДОВ

- Холестерин образуется из ацетил-CoA в сложной последовательности реакций через такие интермедиаты как β-гидрокси-β-метилглутарил-CoA, мевалонат, два активированных изопрена диметилаллилпирофосфат и изопентенилпирофосфат. Конденсация изопреновых единиц дает нециклический сквален, который циклизуется с образованием конденсированной системы колец и боковой цепи стероида.

- Синтез холестерина находится под гормональным контролем и, кроме того, ингибируется нарастающими концентрациями внутриклеточного холестерина, что происходит посредством ковалентной модификации и регуляции транскрипции.

- Холестерин и эфиры холестерина переносятся кровью в виде липопротеинов плазмы. Фракция ЛПОНП переносит холестерин, эфиры холестерина и триацилглицерины от печени к другим тканям, где триацилглицерины расщепляются липопротеинлипазой и ЛПОНП превращается в ЛПНП. Обогащенная холестерином и эфирами холестерина фракция ЛПНП опосредованно захватывается рецепторами путем эндоцитоза, при этом аполипопротеин B-100 в ЛПНП распознается рецепторами плазматической мембраны. ЛПВП удаляют холестерин из крови, перенося его в печень. Условия питания или генетические дефекты метаболизма холестерина могут приводить к атеросклерозу и инфаркту миокарда.

- Стероидные гормоны (глюкокортикоиды, минералокортикоиды и половые гормоны) образуются из холестерина путем изменения в боковой цепи и введения кислородных атомов в стероидную систему колец. Из мевалоната путем конденсации изопентенилпирофосфата и диметилаллилпирофосфата производится наряду с холестерином много других изопреноидных соединений.

- Пренилирование некоторых белков направляет их в места связывания с клеточными мембранами и имеет важное значение для их биологической активности.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

HMD-CoA-редуктаза 480
HMD-CoA-синтаза 480
андрогены 495
аполипопротеины 485
атеросклероз 493
ацетил-CoA-карбоксилаза 446
ацилпереносящий белок (ACP) 449
ганглиозиды 477
β-гидрокси-β-метил-глутарил-CoA (HMD-CoA) 480
глицерин-3-фосфат-дегидрогеназа 465
глицеронеогенез 468
глюкокортикоиды 495
желчные кислоты 484
жирноацил-CoA-десатураза 458
изопрен 479
кардиолипин 472
лейкотриены 463
липопротеины низкой плотности (ЛПНП) 487

липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) 486
малонил-CoA 446
мевалонат 480
минералокортикоиды 495
незаменимые жирные кислоты 459
обратный транспорт холестерина 489
оксидазы со смешанной функцией 458
опосредованный рецепторами эндоцитоз 490
плазмалоген 476
прогестерон 495
простагландины 461
рецепторы ЛПНП 490
синтаза жирных кислот 447
синтаза простагландина H_2 461
сквален 482
статины 494
сфингомиелин 476
тиазолидиндионы 469
тиолаза 480
триацилглицериновый цикл 467
тромбоксансинтаза 463
тромбоксаны 463
фактор активации тромбоцитов 476
фосфатидилглицерин 472
фосфатидилсерин 472
фосфатидилхолин 472
фосфатидилэтаноламин 472
хиломикрон 485
цереброзид 476
циклооксигеназа (COX) 461
цитохром P-450 460
эстрогены 495
эфиры холестерина 484

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Полезны также ссылки на общую литературу в гл. 10 (т. 1) и 17.

Общая литература

Bell, S. J., Bradley, D., Forse, R. A., & Bistrian, B. R. (1997) The new dietary fats in health and disease. *J. Am. Dietetic Assoc.* **97**, 280–286.

Hajjar, D. P. & Nicholson, A. C. (1995) Atherosclerosis. *Am. Sci.* **83**, 460–467.

Хорошее изложение молекулярных основ этой болезни и перспектив лечения.

Ohlrogge, J. & Browse, J. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957–970.

Хороший краткий обзор путей биосинтеза липидов у растений.

Vance, D. E. & Vance, J. E. (eds) (1996) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, New Comprehensive Biochemistry, Vol. **31**, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Прекрасные обзоры, посвященные структуре липидов, их биосинтезу и функции.

Биосинтез жирных кислот и эйкозаноидов

Capdevila, J. H., Falck, J. R., & Estabrook, R. W. (1992) Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB J.* **6**, 731–736.

Двадцать статей по структуре и функции разных цитохромов P-450.

Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 355–381.

Drazen, J. M., Israel, E., & O'Byrne, P. M. (1999) Drug therapy: treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *New Engl. J. Med.* **340**, 197–206.

Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T., & Ban, N. (2006) Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. *Science* **311**, 1263–1267.

Lands, W. E. M. (1991) Biosynthesis of prostaglandins. *Annu.Rev. Xutr.* **11**, 41–60.

Обсуждение необходимости потребления ненасыщенных жирных кислот с пищей и биохимической работы, посвященной метаболическим путям от арахидоната до простагландинов.

Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006) Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* **311**, 1258–1262.

У больших мультибелковых комплексов, которые синтезируют жирные кислоты у грибов, очень интересное и разное строение по сравнению с таковыми у млекопитающих.

Munday, M. R. (2002) Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Travs.* **30**, 1059–1064.

Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., & Hanson, R. M. (2003) Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* **278**, 30 413–30 416.

Warner, T. D. & Mitchell, J. A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **18**, 790–804.

White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M., & Rock, C. O. (2005) The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 791–831.

Биосинтез мембранных фосфолипидов

Bishop, W. R. & Bell, R. M. (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 579–610.

Углубленный обзор высокого уровня сложности по энзимологии и позиционированию фосфолипидов.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Hanada, K. (2006) Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking. *Mol. Cell. Biochem.* **286**, 23–31.

Kennedy, E. P. (1962) The metabolism and function of complex lipids. *Harvey Led* **57**, 143–171.

Классическое описание роли цитидиннуклеотидов в синтезе фосфолипидов.

Pavlidis, P., Ramaswami, M., & Tanouye, M. A. (1994) The *Drosophila easily shocked* gene: a mutation in a phospholipid synthetic pathway causes seizure, neuronal failure, and paralysis. *Cell* **79**, 23–33.

Описание интригующих эффектов на плодовую мушку изменений в мембранных липидах.

Raetz, C. R. H. & Dowhan, W. (1990) Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1235–1238.

Краткий обзор биосинтеза фосфолипидов и липосахаридов у бактерий.

Биосинтез холестерина, стероидов и изопреноидов

Bittman, R. (ed.) (1997) *Subcellular Biochemistry*, Vol. 28: *Cholesterol: Its Functions and Metabolism in Biology and Medicine*, Plenum Press, New York.

Bloch, K. (1965) The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**, 19–28.

Нобелевская лекция автора; классическое описание синтеза холестерина у животных.

Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11 041–11 048.

Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., & Cheng, D. (1997) Acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 613–638.

Edwards, P. A. & Ericsson, J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 157–185.

Gimpl, G., Burger, K., & Fahrenholz, F. (2002) A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 596–599.

Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430.

Описание аллостерической и ковалентной регуляции ферментов мевалонатного пути; содержится краткое обсуждение пренилирования Ras и других белков.

Knopp, R. H. (1999) Drug therapy: drug treatment of lipid disorders. *New Engl. J. Med.* **341**, 498-511.

Обзор по использованию ингибиторов HMG-CoA и связывающих желчные кислоты полимеров для уменьшения сывороточного холестерина.

Krieger, M. (1999) Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 523–558.

McGarvey, D. J. & Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1015–1026.

Описание поразительного разнообразия изопреноидов у растений.

Olson, R. E. (1998) Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* **128** (2 Suppl.), 439S–443S.

Краткое, четкое, историческое введение в исследования функции липопротеинов.

Russell, D. W. (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 137–174.

Steinberg, D. (2006) An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy. *J. Lipid Res.* **47**, 1339–1351.

Последняя из историй в пяти частях, детально описывающих посвященный липидам спор, приведший к разработке статинов.

Young, S. G. & Fielding, C. J. (1999) The ABCs of cholesterol efflux. *Nat. Genet*, 22, 316–318.

Краткий обзор трех статей в этом выпуске журнала, где описаны мутации в ABC1 как причина болезни Танжера и семейной недостаточности ЛПВП.

Вопросы и задачи

1. Путь углерода при синтезе жирных кислот. Используя знания в области биосинтеза жирных кислот, дайте объяснения двум экспериментальным фактам.

а) Добавление равномерно меченного [^{14}C]-ацетил-CoA к растворимой фракции печени дает в результате пальмитат, равномерно меченный ^{14}C.

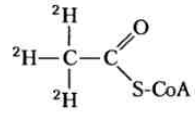
б) Однако добавление *следов* равномерно меченного [^{14}C]ацетил-CoA в присутствии избытка немеченного малонил-CoA к растворимой фракции печени дает пальмитат, меченный ^{14}C только по C-15 и C-16.

2. Синтез жирных кислот из глюкозы. После того как у человека завершится переваривание большого количества сахарозы, глюкоза и фруктоза, количества которых превышают энергетические потребности организма, превращаются в жирные кислоты для синтеза триацилглицеринов. При синтезе жирных кислот потребляются ацетил-CoA, ATP и NADPH. Как эти вещества получаются из глюкозы?

3. Общее уравнение синтеза жирных кислот. Напишите итоговое уравнение биосинтеза пальмитата в печени крысы, начав с митохондриального ацетил-CoA и цитозольных NADPH, ATP и CO_2.

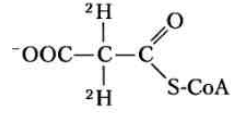
4. Путь водорода в синтезе жирных кислот. Представьте себе препарат, который содержит все ферменты и кофакторы, необходимые для биосинтеза жирной кислоты из добавленных ацетил-CoA и малонил-CoA.

а) Если [2-^{2}H]ацетил-CoA (меченный дейтерием ^{2}H, тяжелым изотопом водорода)



и избыток немеченого малонил-CoA добавляются в качестве субстратов, сколько атомов дейтерия включается в каждую молекулу пальмитата? Где они локализованы? Поясните.

б) Если немеченый ацетил-CoA и [2-^{2}H]-малонил-CoA



добавляются в качестве субстратов, сколько атомов дейтерия включается в каждую молекулу пальмитата? Где они локализованы? Поясните.

5. Энергетика β-кетоацил-ACP-синтазы. В реакции конденсации, катализируемой β-кетоацил-ACP-синтазой (см. рис. 21-6), синтезируется четырехуглеродный модуль путем комбинации двухуглеродного и трехуглеродного модулей с высвобождением CO_2. В чем состоит термодинамическое преимущество этого процесса перед простой комбинацией двухуглеродных модулей?

6. Модуляция ацетил-CoA-карбоксилазы. Ацетил-CoA-карбоксилаза — главный пункт регуляции в биосинтезе жирных кислот. Некоторые из свойств этого фермента приводятся ниже.

а) Добавление цитрата или изоцитрата повышает V_{max} фермента в 10 раз.

б) Фермент существует в двух взаимопревращаемых формах, которые существенно различаются по активностям:

Протомер (неактивный) ⇌
⇌ филаментный полимер (активный)

Цитрат и изоцитрат связываются преимущественно с протомером.

Объясните, как эти свойства согласуются с регуляторной ролью ацетил-CoA-карбоксилазы в биосинтезе жирных кислот.

7. Челночное перемещение ацетильных групп через внутреннюю митохондриальную мембрану. Ацетильная группа ацетил-CoA, образующегося при окислительном декарбоксилировании пирувата в митохондрии, переносится в цитозоль «челноком» ацетильной группы, схематически представленном на рис. 21-10.

а) Напишите полное уравнение для переноса одной ацетильной группы из митохондрии в цитозоль.

б) Какова «цена» этого процесса в эквивалентах ATP на ацетильную группу?

в) В гл. 17 мы сталкивались с ацильным челноком в транспорте жирноацил-CoA из цитозоля в митохондрии при подготовке к β-окислению (см. рис. 17-6). Одним из результатов этого челночного переноса было разделение митохондриального и цитозольного пулов CoA. Выполняет ли и это ацетильный челнок? Поясните.

8. Необходимость кислорода для десатураз. Биосинтез пальмитоолеата (см. рис. 21-12) — широко распространенной ненасыщенной жирной кислоты с *цис*-двойной связью в положении Δ^9 — использует в качестве предшественника пальмитат. Может ли этот процесс осуществляться в строго анаэробных условиях? Объясните.

9. Энергетическая «цена» синтеза триацилглицеринов. Используйте итоговое уравнение биосинтеза трипальмитоилглицерина (трипальмитина) из глицерина и пальмитата для того, чтобы продемонстрировать, сколько молекул ATP требуется на молекулу образующегося трипальмитата.

10. Кругооборот триацилглицеринов в жировой ткани. Когда [^{14}C]глюкозу добавляют в сбалансированное питание взрослых крыс, не наблюдается никакого увеличения общего количества запасаемых триацилглицеринов, но триацилглицерины содержат метку ^{14}C. Объясните.

11. Энергетическая «цена» синтеза фосфатидилхолина. Напишите последовательность стадий и итоговую реакцию биосинтеза фосфа-

тидилхолина из олеата, пальмитата, дигидроксиацетонфосфата и холина путем утилизации отходов метаболизма. Исходя из предшествующих данных рассчитайте, какова «цена» (в молекулах ATP) синтеза фосфатидилхолина этим путем.

12. Синтез фосфатидилхолина путем утилизации отходов метаболизма. Молодые крысы, которые получали пищу без метионина, не могли нормально развиваться, если в их пищевой рацион не был включен холин. Объясните.

13. Синтез изопентенилпирофосфата. Если [^{14}C]ацетил-CoA добавлять в гомогенат печени крыс, синтезирующий холестерин, где в Δ^3-изопентилпирофосфате (активированной форме изопреновой единицы) появится метка ^{14}C?

14. Активированные доноры в синтезе липидов. При биосинтезе сложных липидов сборка компонентов сопровождается переносом нужной группы из активированного донора. Например, активированным донором ацетильных групп является ацетил-CoA. Для каждой из ниже перечисленных групп назовите форму активированного донора: (а) фосфат; (б) D-глюкозил; (в) фосфоэтаноламин; (г) D-галактозил; (д) жирный ацил; (е) метил; (ж) двухуглеродная группа при биосинтезе жирной кислоты; (з) Δ^3-изопентил.

15. Важное значение жиров пищи. При содержании молодых крыс на диете, полностью лишенной жиров, они плохо растут, у них развивается чешуйчатый дерматит, они теряют волосы и скоро умирают. Эти симптомы можно предотвратить, если в диету включать линолеат или растительные продукты. Что делает линолеат незаменимой жирной кислотой? Почему растительный материал может быть заменой?

16. Регуляция биосинтеза холестерина. Человек может получать холестерин из пищи или синтезировать *de novo*. Взрослый человек, потребляющий пищу с низким содержанием холестерина, обычно синтезирует в печени 600 мг холестерина в сутки. Если количество холестерина в диете велико, синтез холестерина *de novo* резко уменьшается. Как осуществляется такая регуляция?

17. Снижение уровня сывороточного холестерина при приеме статинов. У пациентов, принимающих статины, обычно происходит резкое снижение уровня холестерина в сыворотке крови. Однако при этом может заметно вырасти количество HMG-CoA-редуктазы в клетках. Объясните это наблюдение.

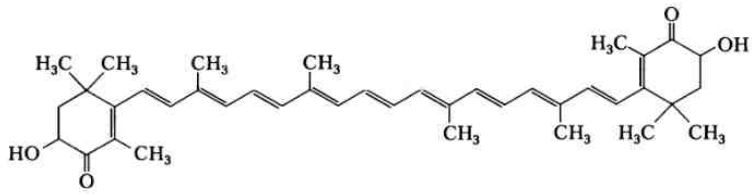
18. Роль тиоэфиров в биосинтезе холестерина. Предложите механизм для каждой из трех реакций, представленных на рис. 21-34, с указанием пути образования мевалоната из ацетил-CoA.

19. Возможное побочное действие от приема статинов. Некоторые врачи считают, что пациентам, принимающим статины, следует одновременно назначать прием кофермента Q (хотя клинические испытания, подтверждающие пользу или нежелательное побочное действие такого лечения, еще не были проведены). Объясните смысл подобной рекомендации.

Анализ экспериментальных данных

20. Создание клеток *E. coli*, производящих большое количество изопреноидов. В природе существует большое разнообразие изопреноидов, некоторые из них имеют важное медицинское или коммерческое значение и производятся в промышленном масштабе. Один из способов получения изопреноидов — ферментативный синтез *in vitro*; однако этот метод дорог и отличается низкой производительностью. В 1999 г. Ванг, Ох и Лиао сообщили о создании штамма бактерии *E. coli*, способного производить большие количества астаксантина — изопреноида, активно используемого в коммерческих целях.

Астаксантин — это красно-оранжевый пигмент (антиоксидант), продуцируемый морскими водорослями. Некоторые морские животные (креветки, лобстеры и некоторые виды рыб), использующие в пищу водоросли, приобретают оранжевую окраску в результате накопления в их организме астаксантина. Это соединение с общей формулой $C_{40}H_{52}O_4$ построено из восьми изопреновых единиц:



Астаксантин

а) Изобразите восемь изопреновых единиц в молекуле астаксантина. *Подсказка.* Используйте выступающие метильные группы.

Путь синтеза астаксантина изображен на следующей странице; он начинается с Δ^3-изопренилпирофосфата (IPP). Стадии ① и ② изображены на рис. 21-36, а реакция, катализируемая IPP-изомеразой, представлена на рис. 21-35.

б) На стадии ④ две молекулы геранилгеранилпирофосфата соединяются, образуя фитоен. Происходит ли это присоединение по механизму «голова к голове» или «голова к хвосту»? (Подробности см. на рис. 21-36.)

в) Объясните суть химического превращения, происходящего на стадии ⑤.

г) Синтез холестерина (рис. 21-37) включает стадию циклизации (замыкания кольца), происходящую при окислении под действием O_2. Происходит ли окисление субстрата (ликопина) при циклизации на стадии ⑥ в ходе синтеза астаксантина? Поясните свой ответ.

E. coli не производит изопреноиды в большом количестве и не синтезирует астаксантина. Известно, что эта бактерия синтезирует некоторое количество изопренилфосфата, диметилаллилпирофосфата, геранилпирофосфата, фарнезилпирофосфата и геранилгеранилпирофосфата. Ванг и сотр. клонировали некоторые гены *E. coli*, кодирующие ферменты, необходимые для синтеза астаксантина, в плазмидах, позволяющих получить высокий уровень экспрессии этих генов. В частности, были клонированы гены *idi* (ген IPP-изомеразы) и *ispA* (ген пренилтрансферазы, катализирующей стадии ① и ②).

Для создания клеток *E. coli*, способных осуществлять полный биосинтез астаксантина, Ванг и сотр. клонировали некоторые гены из других бактерий в плазмиды, позволяющие получать высокий уровень экспрессии в *E. coli*. Это был ген *crtE* из *Erwinia uredovora*, кодирующий фермент, ответственный за проведение стадии ③, а также гены *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* и *crtW* из *Agrobacterium aurantiacum*, кодирующие ферменты для стадий ④, ⑤, ⑥, ⑦ и ⑧ соответственно.

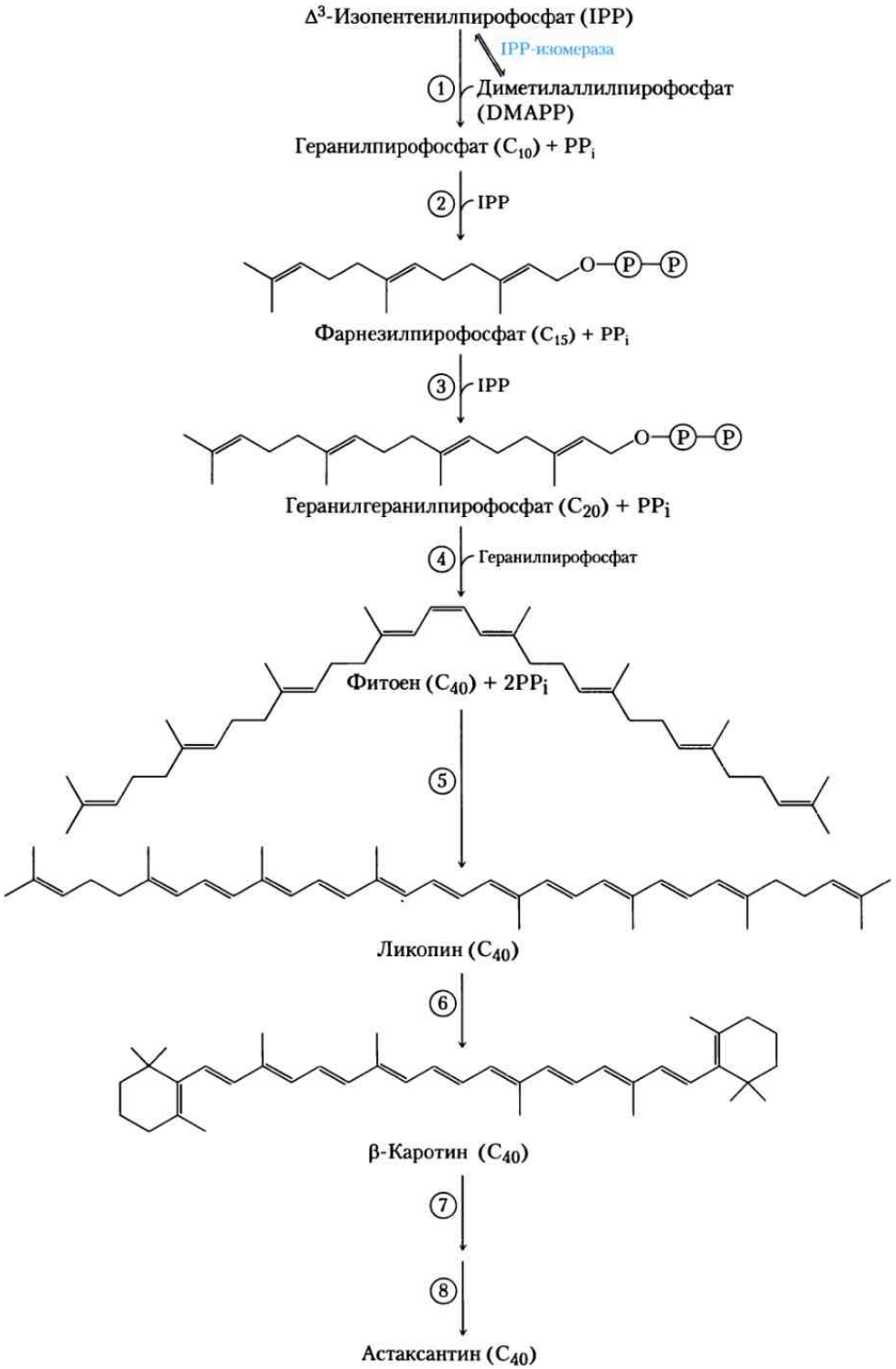
Был также клонирован ген *gps* из *Archaeoglobus fulgidus*, добились высокого уровня экспрессии этого гена в *E. coli* и выделили продукт. При взаимодействии этого экстракта с [^{14}C]изопренилфосфатом, [^{14}C]диметилаллилпирофосфатом, [^{14}C]геранилпирофосфатом или фарнезилпирофосфатом всегда образовывался только [^{14}C]геранилгеранилпирофосфат.

д) На основании этих данных определите, какую стадию (стадии) метаболического пути катализировал фермент, закодированный геном *gps*? Поясните свой ответ.

Далее Ванг и сотр. сконструировали несколько вариантов *E. coli* с повышенной экспрессией различных генов и определяли интенсивность оранжевого окрашивания колоний (колонии клеток *E. coli* дикого типа не имеют оранжевой окраски) и количество образовавшегося астаксантина. Эти результаты представлены ниже.

Штамм	Ген(ы) с повышенной экспрессией	Оранжевая окраска	Выход астаксантина, мкг/г сухого веса
1	*crtBIZYW*	–	НО
2	*crtBIZYW, ispA*	–	НО
3	*crtBIZYW, idi*	–	НО
4	*crtBIZYW, idi, ispA*	–	НО
5	*crtBIZYW, crtE*	+	32,8
6	*crtBIZYW, crtE, ispA*	+	35,3
7	*crtBIZYW, crtE, idi*	++	234,1
8	*crtBIZYW, crtE, idi, ispA*	+++	390,3
9	*crtBIZYW, gps*	+	35,6
10	*crtBIZYW, gps, idi*	+++	1418,8

НО – не обнаружен.


Δ3-Изопентенилпирофосфат (IPP)
IPP-изомераза
1
Диметилаллилпирофосфат (DMAPP)
Геранилпирофосфат (C10) + PPi
2
IPP
O—P—P
Фарнезилпирофосфат (C15) + PPi
3
IPP
O—P—P
Геранилгеранилпирофосфат (C20) + PPi
4
Геранилпирофосфат
Фитоен (C40) + 2PPi
5
Ликопин (C40)
6
β-Каротин (C40)
7
8
Астаксантин (C40)

е) Сравните результаты для штаммов 1–4 с результатами для штаммов 5–8 и сделайте заключение об уровне экспрессии фермента, катализирующего стадию ③ в синтезе астаксантина в штамме *E. coli* дикого типа. Объясните свой ответ.

ж) На основании представленных данных сделайте вывод о том, какой из ферментов лимитирует скорость этого метаболического пути — IPP-изомераза или фермент, закодированный геном *idi*? Объясните свой ответ.

з) Каким был бы уровень экспрессии астаксантина в штамме с повышенным уровнем экспрессии *crtBIZYW*, *gps* и *crtE* (низким (+), средним (++) или высоким (+++), если оценивать по интенсивности оранжевой окраски)? Поясните свой ответ.

Литература

Wang, C.-W., Oh, M.-K., & Liao, J. C. (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 235–241.

Время проходит быстро, когда нет причин для грусти. Увидев, что человек, который чуть не умер от болезни, при изменившихся обстоятельствах идет на поправку и явно хорошо себя чувствует, испытываешь радостный подъем настроения... и это состояние нельзя выразить словами. А Нобелевская премия – это только глазурь на торте.

Гертруда Элайон, Science, *2002*

22

Биосинтез аминокислот, нуклеотидов и родственных соединений

22.1. Общий обзор метаболизма азота 506

22.2. Биосинтез аминокислот 518

22.3. Производные аминокислот 532

22.4. Биосинтез и деградация нуклеотидов 543

В живой природе азот занимает четвертое место по массе после углерода, водорода и кислорода. Основные количества азота находятся в связанном виде и входят в состав аминокислот и нуклеотидов. В этой главе рассматриваются все аспекты метаболизма азотсодержащих соединений, кроме катаболизма аминокислот, которому посвящена гл. 18.

Пути биосинтеза аминокислот и нуклеотидов рассматривают, как правило, вместе, не только потому, что оба класса соединений содержат азот (поступающий из одного и того же биологического источника), но и потому, что два этих пути имеют много точек пересечения, включая несколько общих ключевых промежуточных стадий. Некоторые аминокислоты или части их молекул входят в состав пуринов и пиримидинов, а в одной аминокислоте — гистидине — имеется пуриновое кольцо. У этих двух синтетических путей много общего и с чисто химической точки зрения, в частности там преобладают реакции, включающие перенос азота и одноуглеродных групп.

Студенту, только приступающему к изучению биохимии, описываемые в этой главе пути могут показаться сложными. Однако сложность обусловлена не столько химией как таковой — химизм реакций, как правило, понятен, удручающее действует большое число стадий и разнообразие интермедиатов. Изучать эти метаболические пути лучше всего с учетом уже рассмотренных нами ранее принципов метаболизма, ключевых интермедиатов и предшественников, общих типов реакций. Стоит бросить хотя бы беглый взгляд на эти пути и станет ясно, что именно в биологических системах происходят самые необычные химические превращения, например редкие для живых существ реакции с участием металлов молибдена, селена и ванадия. Ваши усилия окупятся, в особенности если вы студент-медик или ветеринар, ведь многие наследственные болезни человека и животных обусловлены отсутствием одного или нескольких ферментов метаболизма аминокислот и/или нуклеотидов, а многие лекарства, применяемые в борьбе с инфекциями, являются ингибиторами ферментов этих путей, как и целый ряд противоопухолевых химиотерапевтических препаратов.

Регуляция биосинтеза азотсодержащих соединений жизненно важна. Но так как нуклео-

тиды и аминокислоты требуются в относительно небольших количествах, производительность большинства этих реакций далеко не так высока, как реакций синтеза жиров и углеводов в тканях животныхВ то же время для синтеза белков и нуклеиновых кислот разные аминокислоты и нуклеотиды необходимы в правильном соотношении и в определенный момент, поэтому точная и координированная регуляция всех процессов их биосинтеза имеет важное значение. А так как и белки, и аминокислоты обычно ионизованы, т. е. могут нести заряд, при регуляции их уровня (содержания) в клетке должен поддерживаться также электрохимический баланс. Как обсуждалось в предыдущих главах, контроль метаболических путей может осуществляться либо через изменение ферментативной активности, либо через количества специфических ферментов. Метаболические пути, обсуждаемые в этой главе, предоставляют нам самые нетрудные для понимания примеры регуляции ферментативной активности. *Количественный* контроль разных ферментов в клетке (т. е. соотношения между продуктивностью реакций синтеза и распада) описан в гл. 28 (т. 3).

22.1. Общий обзор метаболизма азота

Азот необходим для синтеза и аминокислот, и нуклеотидов. В окружающей среде растворимые соединения, содержащие азот в биологически доступной форме, присутствуют в очень ограниченном количестве, поэтому большинство организмов существуют в режиме строгой экономии аммиака, аминокислот и нуклеотидов. Действительно, как мы увидим далее, свободные аминокислоты, пурины и пиримидины, образующиеся в результате химических превращений белков и нуклеиновых кислот, часто используются вновь и вновь, т. е. клетки функционируют, усваивая и высвобождая необходимые им вещества циклически. Сначала мы рассмотрим пути, по которым азот из окружающей среды включается в биологические системы.

В круговороте азота поддерживается пул биологически доступного азота

Воздух, наиболее важный источник азота, на 4/5 состоит из молекулярного азота (N_2). Тем не менее число биологических видов, способных превращать атмосферный азот в соединения, доступные для живых организмов, крайне мало. В биосфере метаболические процессы разных видов взаимосвязаны, что позволяет получать и повторно использовать азот в природном **цикле (круговороте) азота (рис. 22-1)**. Первый стадия этого цикла — **фиксация** (восстановление) атмосферного азота азотфиксирующими бактериями с образованием аммиака или ионов аммония (NH_3 или NH_4^+). Аммиак может использоваться многими живыми организмами, однако установлено, что почвенные бактерии, получающие энер-

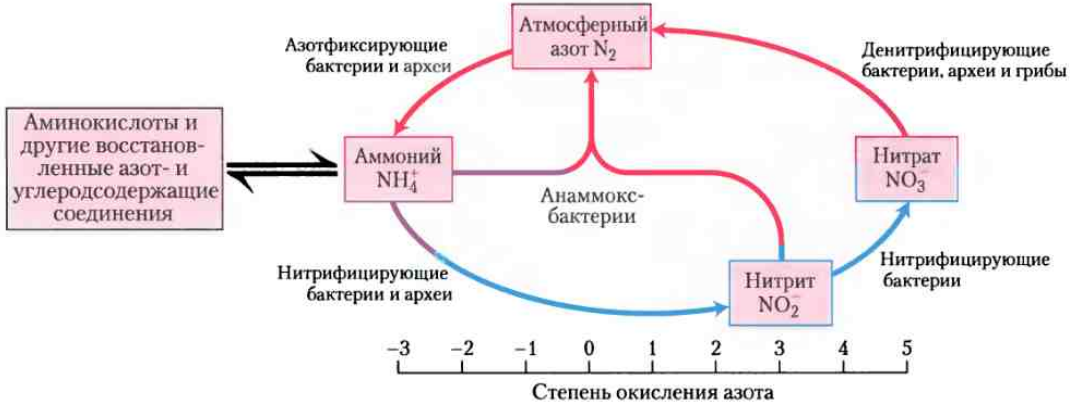


Рис 22-1. Цикл азота. Общее количество азота, ежегодно фиксируемое в биосфере, превышает 10^{11} кг. Реакции, выделенные красными стрелками, происходят почти исключительно в анаэробных условиях. Степень окисления соединений азота показана на шкале в нижней части рисунка.

гию при окислении аммиака до нитритов (NO_2^-) и далее до нитратов (NO_3^-), так широко распространены и так активны, что почти весь попадающий в почву аммиак окисляется до нитратов. Этот процесс называется **нитрификацией**. Растения и многие бактерии могут захватывать и быстро восстанавливать нитриты и нитраты под действием нитрит- и нитратредуктаз. Полученный таким образом аммиак включается в состав аминокислот в растениях. Затем животные используют растения в пищу как источник аминокислот, заменимых и незаменимых, для синтеза собственных белков. Когда организм погибает, белки разрушаются до аммиака под действием микроорганизмов почвы, где нитрифицирующие бактерии снова превращают его в нитриты и нитраты. Баланс между фиксированным и атмосферным азотом поддерживается бактериями, которые в анаэробных условиях превращают нитрат в N_2; этот процесс называется **денитрификацией** (рис. 22-1). Почвенные бактерии используют в качестве конечного акцептора электронов NO_3^- вместо O_2 в целом ряде реакций (таких как окислительное фосфорилирование), создающих трансмембранный градиент протонов, который используется для синтеза ATP.

Недавно были открыты бактерии, способные осуществлять окисление аммиака в анаэробных условиях (рис. 22-1); этот процесс получил название **анаммокс** (англ. *anammox*, ***an**aerobic **amm**onia **ox**idation*) — происходит превращение аммиака и нитрита в N_2. В биосфере превращение NH_3 в N_2 на 50–70% происходит именно по этому метаболическому пути, открытому лишь в 1980-х гг. Облигатные анаэробы, осуществляющие анаммокс, интересны сами по себе и, кроме того, позволяют решить некоторые проблемы, связанные с очисткой сточных вод (доп. 22-1).

А теперь давайте рассмотрим первую стадию в цикле азота — фиксацию атмосферного азота.

Дополнение 22-1 Необычный стиль жизни многочисленных, но загадочных существ

Мы дышим воздухом и легко можем не заметить бактерий и архей в анаэробных средах обитания. В учебниках биохимии, излагающих начальный курс (введение), эти организмы обсуждаются редко, однако они составляют значительную долю биомассы нашей планеты и вносят существенный вклад в баланс углерода и азота в биосфере, важный для всех других живых форм.

Как подробно обсуждалось в предыдущих главах, энергия, необходимая для существования живых организмов, связана с созданием градиента ионов водорода на мембранах. Электроны от восстановленного субстрата доставляются к переносчикам электронов в мембранах и после серии переходов попадают к конечному акцептору электронов. В результате этого на одной стороне мембраны накапливаются протоны — возникает протонный градиент. Этот градиент используется для синтеза ATP или для осуществления других энергозатратных процессов в клетке. У всех эукариот восстановленным субстратом обычно являются углеводы (глюкоза или пируват), а в роли акцептора электронов выступает кислород.

Метаболизм бактерий и архей гораздо более гибкий. В анаэробных условиях, например в донных отложениях морей и пресноводных водоемов, разнообразие жизненных стратегий весьма велико. Практически любая окислительно-восстановительная пара может служить источником энергии для специализированного организма или группы организмов. У многих литотрофных бактерий (у хемотрофов, использующих в качестве источника энергии неорганические вещества; см. рис. 1-5, т. 1) имеется фермент гидрогеназа, который использует молекулярный водород для восстановления NAD:

$$H_2 + NAD^+ \xrightarrow{\text{гидрогеназа}} NADH + H^+$$

NADH служит источником электронов для многих связанных с мембраной акцепторов электронов; при переносе электронов создается градиент протонов, необходимый для синтеза ATP. Другие литотрофы способны окислять соединения серы (H_2S, элементную серу или тиосульфаты) или соединения двухвалентного железа. В широко распространенную группу архей, называемых метаногенами, входят строгие анаэробы, способные получать энергию в результате восстановления CO_2 до метана. И это лишь некоторые примеры того, как анаэробные организмы умеют приспосабливаться к условиям окружающей среды. Их метаболические

Продолжение на следующей странице

Дополнение 22-1 Необычный стиль жизни многочисленных, но загадочных существ (*продолжение*)

процессы включают множество интереснейших реакций и протекают с участием специализированных кофакторов, не встречающихся в мире облигатных аэробных организмов. Использование некоторых анаэробных бактерий может принести ощутимую практическую пользу. Кроме того, изучение таких организмов помогает отыскать ответы на вопросы о происхождении жизни на Земле в тех условиях, когда молекулярного кислорода еще не было.

Цикл азота связан с деятельностью целого ряда специализированных бактерий. Выделяют две группы нитрифицирующих бактерий: бактерии, которые окисляют аммиак до нитритов, и бактерии, которые окисляют образующиеся нитриты до нитратов (рис. 22-1). Нитрат — второй после кислорода биологический акцептор электронов; многие бактерии и археи могут катализировать денитрификацию нитратов до азота, который азотфиксирующие бактерии затем вновь превращают в аммиак. Аммиак — главное загрязняющее вещество в составе сточных вод и отходов животноводческих ферм; он также является побочным продуктом при производстве удобрений и при переработке нефти. На водоочистных предприятиях для превращения аммиака сточных вод в атмосферный азот «работают» сообщества нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий. В этом процессе расходуются кислород и органические соединения.

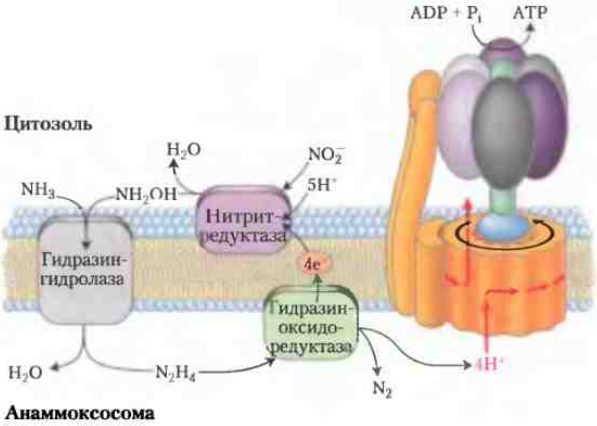


Рис. 1. Реакции процесса анаммокс. Аммиак и гидроксид аммония превращаются в гидразин и H_2O под действием гидразингидролазы, а затем гидразин окисляется гидразиноксидоредуктазой с образованием N_2 и протонов. Возникает градиент протонов для синтеза АТР. На внешней стороне анаммоксосомы протоны используются нитритредуктазой, образующей оксид азота и завершающей весь цикл. Все участвующие в этом процессе ферменты окружены мембраной анаммоксосомы.

В 1960–1970-х гг. в научных журналах появилось несколько публикаций, где выдвигалась версия, что аммоний может окисляться до азота в анаэробных условиях при использовании нитрита в качестве акцептора электронов; этот процесс получил название **анаммокс**. Данные сообщения не привлекали внимания до тех пор, пока в середине 1980-х гг. на водоочистном сооружении в Делфте (Нидерланды) не были обнаружены бактерии, осуществляющие этот процесс. Группа голландских микробиологов под руководством Гижса Куенена и Майка Жеттена взялась исследовать эти бактерии. Вскоре оказалось, что это редкий тип бактерий планктомицетов. Далее ученых ждало еще несколько сюрпризов.

Постепенно прояснялись биохимические механизмы, лежащие в основе процесса анаммокс (рис. 1). Неожиданно выяснилось, что промежуточным продуктом реакций является гидразин (N_2H_4) — активное химическое соединение, которое используют даже в составе ракетного топлива. Молекулы этого вещества, имеющие небольшой размер, очень токсичны и легко проникают через фосфолипидные мембраны. Бактерии, осуществляющие анаммокс, решают эту проблему, заключая гидразин в специализированные органеллы **анаммоксосомы**. Мембраны этих органелл образованы особыми липидами **ладдеранами** (рис. 2), которые ранее не были обнаружены в биологических системах. Соединенные между собой циклобутановые кольца, формирующие структуру ладдеранов, прижаты друг к другу, образуя очень плотный барьер, значительно замедляющий диффузию гидразина. Кольца циклобутана имеют напряженную структуру, и их достаточно сложно синтезировать. До сих пор механизмы синтеза этих липидов в бактериях остаются загадкой.

Открытие анаммоксосом было неожиданным. Обычно в бактериальных клетках нет особых отделов, а наличие заключенного в оболочку ядра часто называют первым отличием эукариот от бактерий. Уже само открытие таких органелл представляло большой научный интерес, однако планктомицеты,

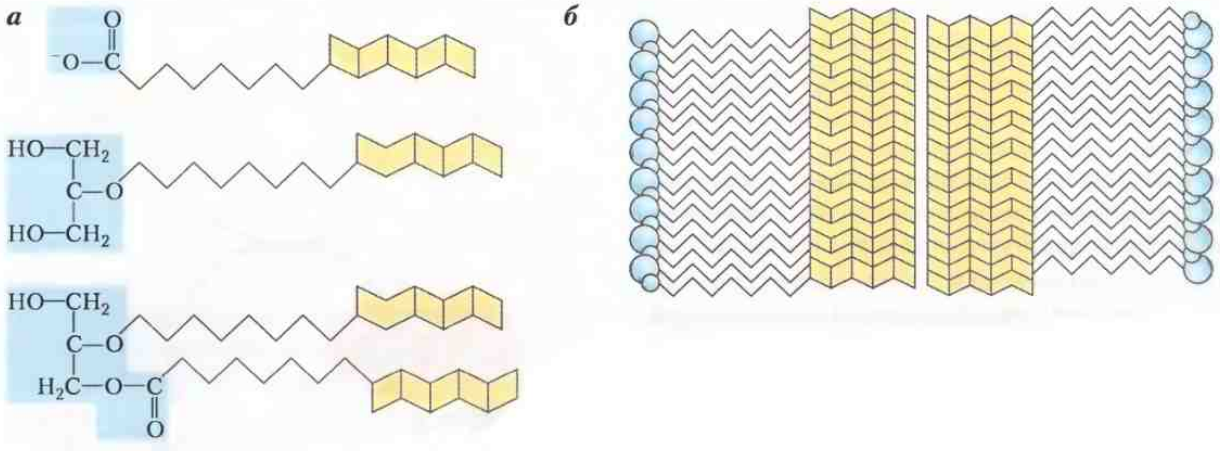


Рис. 2. *а* — ладдераны в мембране анаммоксосомы. Механизм синтеза нестабильной структуры, состоящей из конденсированных колец циклобутана, пока остается неизвестным. *б* — ладдераны укладываются в очень плотную, непроницаемую гидрофобную мембранную структуру, что позволяет ограничивать диффузию гидразина, образующегося в процессе анаммокса.

кроме того, имеют и ядро: их хромосомная ДНК заключена в оболочку (рис. 3). Обнаружение подобной субклеточной организации стимулировало дальнейшие исследования с целью выяснения происхождения планктомицетов и эволюции эукариотического ядра. Планктомицеты — древняя бактериальная ветвь, содержащая множество родов; известно, что бактерии трех родов планктомицетов осуществляют анаммокс. Более детальное изучение этих бактерий, возможно, позволит нам ближе подойти к разгадке основного вопроса эволюционной биологии, а именно, к обнаружению организма, последнего универсального предшественника всех живых организмов на нашей планете (его сокращенно называют LUCA — *last universal common ancestor*).

В настоящий момент бактерии, осуществляющие анаммокс, активно применяются при очистке сточных вод. Это позволяет на 90% снизить расходы на удаление аммиака (обычная стадия денитрификации полностью исключается, а расходы на аэрацию и нитрификацию снижаются) и уменьшить выход побочных продуктов. Понятно, что подробно узнать о населяющих биосферу бактериях очень полезно человеку XXI в.

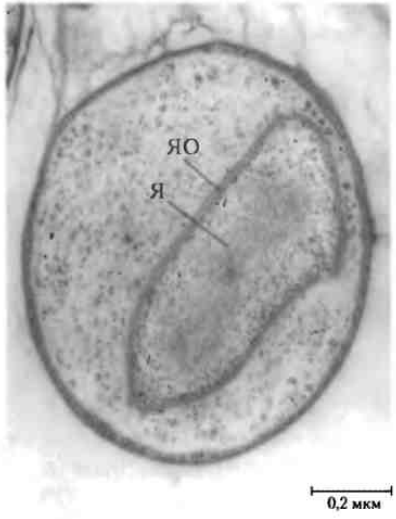


Рис. 3. Изображение поперечного среза клеток *Gemmata obscuriglobus*, полученное с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ), позволяет увидеть ДНК в ядре (Я), заключенном в ядерную оболочку (ЯО). Бактерии рода *Gemmata* (планктомицеты) не способны осуществлять анаммокс.

Азот фиксируется ферментным комплексом нитрогеназой

Только некоторые бактерии и археи могут фиксировать атмосферный азот. К ним относятся почвенные, пресноводные и морские цианобактерии и другие виды свободноживущих почвенных бактерий, такие как р. Azotobacter, и азотофиксирующие бактерии-**симбионты** бобовых растений, которые обитают в клубеньках на их корнях. Первый важный продукт в цепи фиксации азота — аммиак, который может быть использован всеми организмами либо непосредственно, либо после его превращения в другие растворимые соединения, такие как нитриты, нитраты или аминокислоты. Восстановление азота до аммиака сопровождается выделением энергии:

$$N_2 + 3\,H_2 \rightarrow 2\,NH_3 \quad \Delta G'^{\circ} = -33{,}5 \text{ кДж/моль}$$

Но тройная связь N≡N очень прочная, энергия этой связи 930 кДж/моль. Таким образом, фиксация азота — процесс, требующий очень высокой энергии активации, и в обычных условиях атмосферный азот — инертное вещество. В промышленности аммиак получают по методу Габера (названного в честь его изобретателя Фрица Габера) из смеси азота и водорода при нагревании до 400–500 °C и высоком давлении до десятков тысяч килопаскалей (нескольких сот атмосфер), чтобы обеспечить необходимую энергию активации. Биологическая фиксация азота, однако, должна протекать при биологических температурах и 0,8 атм азота. Здесь высокий барьер активации преодолевается другими способами. Это достигается, по крайней мере частично, путем связывания и гидролиза ATP. В общем виде реакция может быть записана так:

$$N_2 + 10\,H^+ + 8\,e^- + 16\,ATP \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\,NH_4 + 16\,ADP + 16\,P_i + H_2$$

Биологическая фиксация азота обеспечивается высококонсервативным комплексом белков, называемым **нитрогеназным комплексом** (или просто **нитрогеназой**) **(рис. 22-2)**, наиболее важные компоненты которого — **редуктаза динитрогеназы** и **динитрогеназа (рис. 22-3)**. Редуктаза динитрогеназы (M_r = 60 000) представляет собой димер из двух одинаковых субъединиц. В нем один находящийся между субъединицами активный окислительно-восстановительный центр 4Fe-4S (см. рис. 19-5), который может быть

Рис. 22-2. Фиксация азота нитрогеназным комплексом. Электроны с пирувата переносятся на динитрогеназу через ферредоксин (или флаводоксин) и редуктазу динитрогеназы. Редуктаза динитрогеназы восстанавливает динитрогеназу путем переноса одного электрона за один реакционный акт, в то время как для фиксации одной молекулы N_2 требуются по крайней мере шесть электронов. Кроме того, два электрона необходимы для восстановления двух протонов H^+ до H_2 в процессе, который обязательно сопровождает фиксацию азота анаэробами. Таким образом, на фиксацию одной молекулы N_2 тратится восемь электронов. Строение субъединиц и металлсодержащих кофакторов редуктазы динитрогеназы и белков динитрогеназы описаны в тексте и на рис. 22-3.

окислен или восстановлен одним электроном. Комплекс также имеет два центра связывания (один в каждой субъединице) ATP/ADP. Динитрогеназа (M_r = 240 000) — тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов, по две субъединице каждого типа, и содержащий железо и молибден.

Активный центр тетрамера в сумме несет два атома Mo, 32 атома Fe и 30 атомов S. Около половины атомов железа и серы находятся в составе P-кластеров, в каждом из которых два близкорасположенных 4Fe-4S-центра; оставшиеся атомы Mo, Fe и S входят в состав не совсем обычного железо-молибденового кофактора. Была открыта форма нитрогеназы, содержащая вместо молибдена ванадий, а некоторые виды бактерий могут использовать оба типа нитрогеназ. При определенных условиях ванадийсодержащие формы могут выступать главными первичными азотфиксирующими системами, но они еще не так хорошо изучены, как молибденсодержащие.

Фиксация азота производится полностью восстановленной формой динитрогеназы и требует восемь электронов: шесть на восстановление N_2, два на получение одной молекулы H_2 — обязательного компонента в механизме этой реакции. Восстановление динитрогеназы происходит путем переноса электронов с редуктазы динитрогеназы (рис. 22-2). В тетрамере динитрогеназы имеются два центра связывания редуктазы. Необходимые для реакции электроны переносятся с редуктазы на динитрогеназу по одному: восстановленная молекула редуктазы связывается с динитрогеназой и переносит один электрон, затем окисленная редуктаза диссоциирует с молекулы динитрогеназы и цикл повторяется. Прохождение каждого цикла требует гидролиза двух молекул ATP на димер редуктазы. Источник электронов для восстановления редуктазы ди-

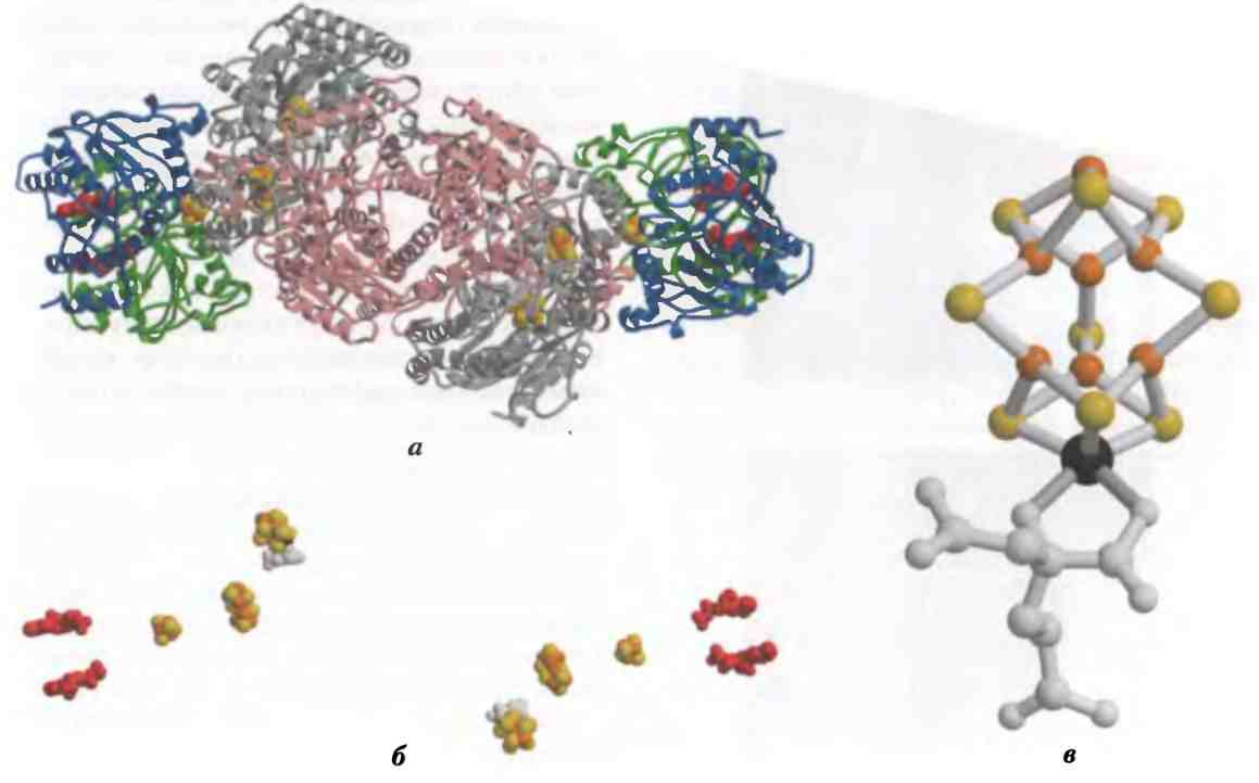


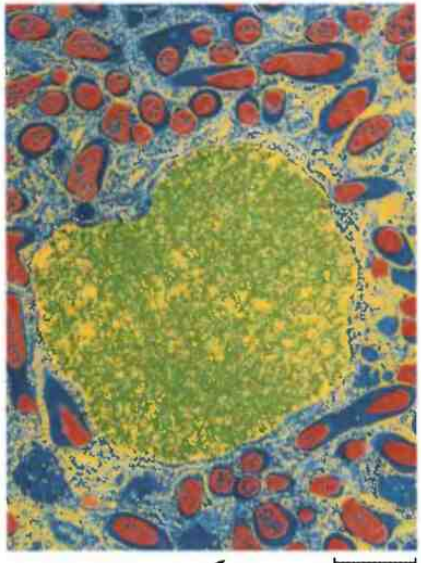
Рис. 22-3. Ферменты и кофакторы нитрогеназного комплекса (PDB 1D 1N2C). *а* — субъединицы динитрогеназы показаны серым и розовым, а редуктазы динитрогеназы — синим и зеленым. Связанная молекула ADP окрашена красным. Обратите внимание на комплекс 4Fe-4S (атомы Fe выделены оранжевым цветом, S — желтым) и железо-молибденовый кофактор (Mo — черный, гомоцитрат — светло-серый). Показаны также P-кластеры (близкорасположенные пары комплексов 4Fe-4S). *б* — кофакторы комплекса динитрогеназы без белка (цвета такие же, как в *а*). *в* — железо-молибденовый кофактор содержит один атом Mo (черный), семь атомов Fe (оранжевые), девять атомов S (желтые) и молекулу гомоцитрата (серая).

нитрогеназы может варьировать и представлять собой восстановленный **ферредоксин** (с. 371, см. также рис. 19-5), восстановленный флаводоксин и, возможно, другие источники. По крайней мере у одного вида конечным источником электронов для восстановления ферредоксина служит пируват (рис. 22-2).

Роль АТР в этом процессе несколько необычна. Как будет видно далее, АТР может быть источником химической энергии не только за счет гидролиза одной или более фосфодиэфирных связей, но и за счет энергии связи (с. 227, 425, т. 1) при нековалентных взаимодействиях, которые понижают энергию активации. В реакции, протекающей под действием редуктазы динитрогеназы, и связывание, и гидролиз АТР вызывают конформационные изменения, помогающие преодолеть высокую энергию активации реакции фиксации азота. Связывание двух молекул АТР редуктазой изменяет восстановительной потенциал (E'°) этого белка с –300 до –420 мВ, что вызывает повышение восстановительной способности, достаточное для переноса электронов на динитрогеназу. Затем непосредственно перед переносом одного электрона на динитрогеназу происходит гидролиз молекул АТР.

Другим важным свойством нитрогеназного комплекса является его исключительная неустойчивость в присутствии кислорода. Редуктаза инактивируется на воздухе, ее время полужизни 30 с, время полужизни динитрогеназы на воздухе 10 мин. Свободноживущие бактерии, фиксирующие азот, справляются с этой проблемой разными способами. Одни живут только в анаэробных условиях или выключают синтез нитрогеназы в присутствии кислорода. Некоторые аэробы, такие как *Azotobacter vinelandii*, частично разобщают транспорт электронов и синтез АТР, так что кислород «сжигается» сразу же, как поступает в клетку (см. доп. 19-1). Чтобы защитить себя от кислорода, в культурах таких бактерий во время фиксации азота температура действительно повышается.

а



б

Рис. 22-4. Азотфиксирующие клубеньки. *а* — корневые клубеньки лядвенца рогатого, семейство бобовые. Цветки этого растения показаны на врезке. *б* — проявленная (раскрашенная) электронная микрофотография тонкого среза клубенька гороха. Симбиотические азотфиксирующие бактерии, или бактероиды (показаны красным), живут внутри клеток клубенька, окруженные перибактероидной мембраной (синий цвет). Бактероиды синтезируют нитрогеназный комплекс, который превращает атмосферный азот (N_2) в аммоний (NH_4^+); без бактероидов растения не способны фиксировать N_2. Клетки корня, содержащие бактерии, обладают некоторыми важными свойствами, необходимыми для фиксации азота, в частности они образуют леггемоглобин; этот гемсодержащий белок обладает высоким сродством к кислороду, который ингибирует нитрогеназу. (Ядра клеток показаны желтым/зеленым. Другие органеллы клеток корня, обычно присутствующие в клетках растений, не видны.)

Симбиоз между бобовыми растениями и клубеньковыми азотфиксирующими бактериями (**рис. 22-4**) учитывает и потребность в энергии, и кислородную уязвимость нитрогеназного комплекса. Затраты энергии на фиксацию азота, возможно, были движущей силой в эволюции этой связи бактерий с растением. Живущие в корневых клубеньках бактерии получили доступ к обширному резервуару энергии в виде изобилия углеводов и промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты, производимых растением. Это позволяет бактериям фиксировать в сотни раз больше азота, чем их свободноживущие сородичи могут позволить себе в условиях жизни в почве. Чтобы решить проблему токсичности кислорода, клубеньковые бактерии «купаются» в растворе связывающего кислород гемсодержащего белка **леггемоглобина**, производимого растением (хотя в ряде случаев гем могут синтезировать бактерии). Леггемоглобин связывает весь кислород, поэтому он не может повлиять на фиксацию азота, и эффективно доставляет кислород к бактериальной системе переноса электронов. Выгода для растения — обеспечение его восстановленным легкоусвояемым азотом. Полезный результат симбиоза между растениями и бактериями, очевидно, состоит в обогащении почвы азотом, которое осуществляют бобовые растения. Это и положено в основу методов севооборота, когда после небобовых культур (например, кукурузы), которые забирают восстановленный азот из почвы, через несколько лет поля засевают бобовыми — люцерной, горохом или клевером.

Из-за огромного практического значения фиксация азота интенсивно изучается. Промышленное производство аммиака (аммония) с целью использования его в качестве удобрения — очень энергозатратный процесс, а поэтому дорогой. В настоящее время очень много усилий направлено на создание рекомбинантных или трансгенных организмов, способных фиксировать азот. Технологии рекомбинантных ДНК (см. гл. 9, т. 1) используются для переноса генов, которые кодируют ферменты, обеспечивающие фиксацию азота, в неазотфиксирующие бактерии и растения. Успех в этом направлении зависит от решения проблемы токсичности кислорода для любой клетки, производящей нитрогеназу.

Аммоний включается в биомолекулы через глутаминовую кислоту (глутамат) и глутамин

Восстановленный азот в виде NH_4^+ включается в аминокислоты, а затем в другие азотсодержащие биомолекулы. Эту ключевую точку фиксации азота обеспечивают две аминокислоты — **глутаминовая кислота** и **глутамин**. Вспомним, что эти две аминокислоты играют центральную роль в катаболизме аммиака и аминогрупп при окислении аминокислот (см. гл. 18). Глутаминовая кислота служит донором аминогруппы для большинства других аминокислот посредством реакций трансаминирования (обратную реакцию см. на рис. 18-4). Азот амидной группы в составе молекулы глутаминовой кислоты служит источником аминогруппы в целом ряде процессов биосинтеза. У высших организмов во многих клетках и во внеклеточной жидкости одна–две эти аминокислоты присутствуют в большей концентрации, чем остальные аминокислоты, иногда на порядок и более. Клеткам *Escherichia coli* требуется так много глутаминовой кислоты, что она является одним из основных веществ, растворенных в цитозоле. Ее концентрация регулируется не только в соответствии с потребностью клетки в азоте, но и для поддержания осмотического равновесия между цитозолем и окружающей средой.

Пути биосинтеза глутаминовой кислоты и глутамина простые, все или хотя бы некоторые их стадии обнаружены у всех организмов. Наиболее важный путь включения аммиака в глутаминовую кислоту требует протекания двух реакций. Во-первых, **глутаминсинтетаза** катализирует реакцию между глутаматом и NH_4^+ с образованием глутамина. Эта реакция протекает в две стадии с образованием промежуточной связанной с ферментом формы γ-глутамилфосфата (см. рис. 18-8):

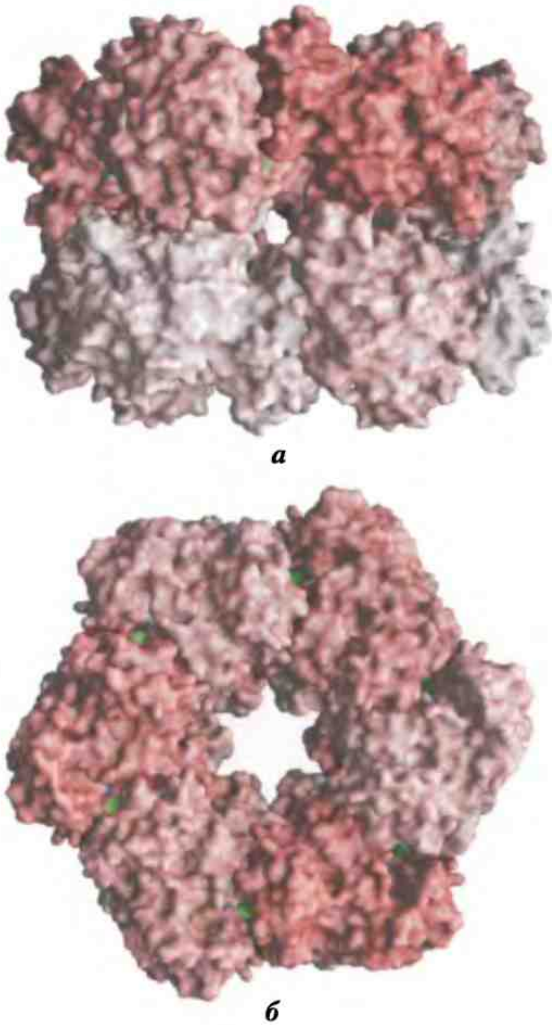
(1) Глутамат + ATP → γ-глутамилфосфат + ADP

(2) γ-Глутамилфосфат + NH_4^+ → глутамин + P_i + H^+

Суммарное уравнение:

$$\text{глутамат} + NH_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{глутамин} + P_i + H^+ \quad (22\text{-}1)$$

Глутаминсинтетаза обнаружена у всех организмов. Помимо важной роли для ассимиляции NH_4^+ у бактерий, этот фермент играет центральную роль в метаболизме аминокислот у млекопитающих, превращая токсичный аммиак в глутамин, который поступает в кровоток (гл. 18).



а

б

Рис. 22-5. Структура субъединиц глутаминсинтетазы по данным рентгеноструктурного анализа (PDB 1D 2 GLS). *а — вид сбоку*; все 12 субъединиц идентичны; они окрашены в разные цвета для того, чтобы продемонстрировать упаковку и расположение. *б — вид сверху*; активные центры показаны зеленым.

У бактерий и растений глутамат получается из глутамина в реакции, катализируемой **глутаматсинтазой**. α-Кетоглутарат, промежуточный продукт цикла лимонной кислоты, подвергается восстановительному аминированию с глутамином в качестве донора азота:

α-Кетоглутарат + глутамин + NADPH + H^+ →
→ 2 глутамат + $NADP^+$ (22-2)

Суммарная реакция, осуществляемая глутаминсинтетазой и глутаматсинтазой (уравнения 22-1 и 22-2):

α-Кетоглутарат + NH_4^+ NADPH + ATP →
→ L-глутамат + $NADP^+$ + ADP + P_i

Глутаматсинтаза отсутствует у животных, которые поддерживают высокий уровень глутамата за счет таких процессов, как трансаминирование α-кетоглутарата при катаболизме аминокислот.

Глутамат может быть получен и в результате другого, не так часто используемого пути: по реакции между α-кетоглутаратом и NH_4^+, протекающей в одну стадию. Она катализируется L-глутаматдегидрогеназой — ферментом, который есть у всех организмов. Восстановительный потенциал обеспечивает NADPH:

α-Кетоглутарат + NH_4^+ + NADPH →
→ L-глутамат + $NADP^+$ + H_2O

Мы рассматривали эту реакцию в разделе, посвященном катаболизму аминокислот (см. рис. 18-7). В эукариотических клетках L-глутаматдегидро-

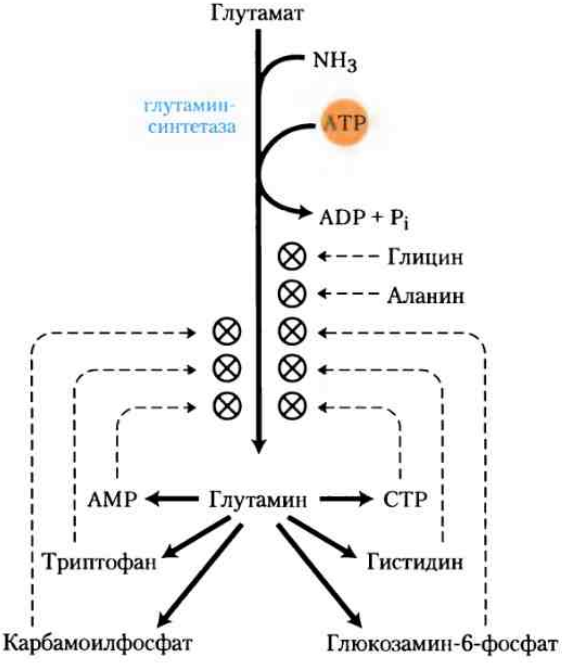


Рис. 22-6. Аллостерическая регуляция глутаминсинтетазы. Фермент кумулятивно регулируется шестью конечными продуктами метаболизма глутамина. Аланин и глицин, возможно, служат индикаторами общего статуса метаболизма аминокислот в клетке.

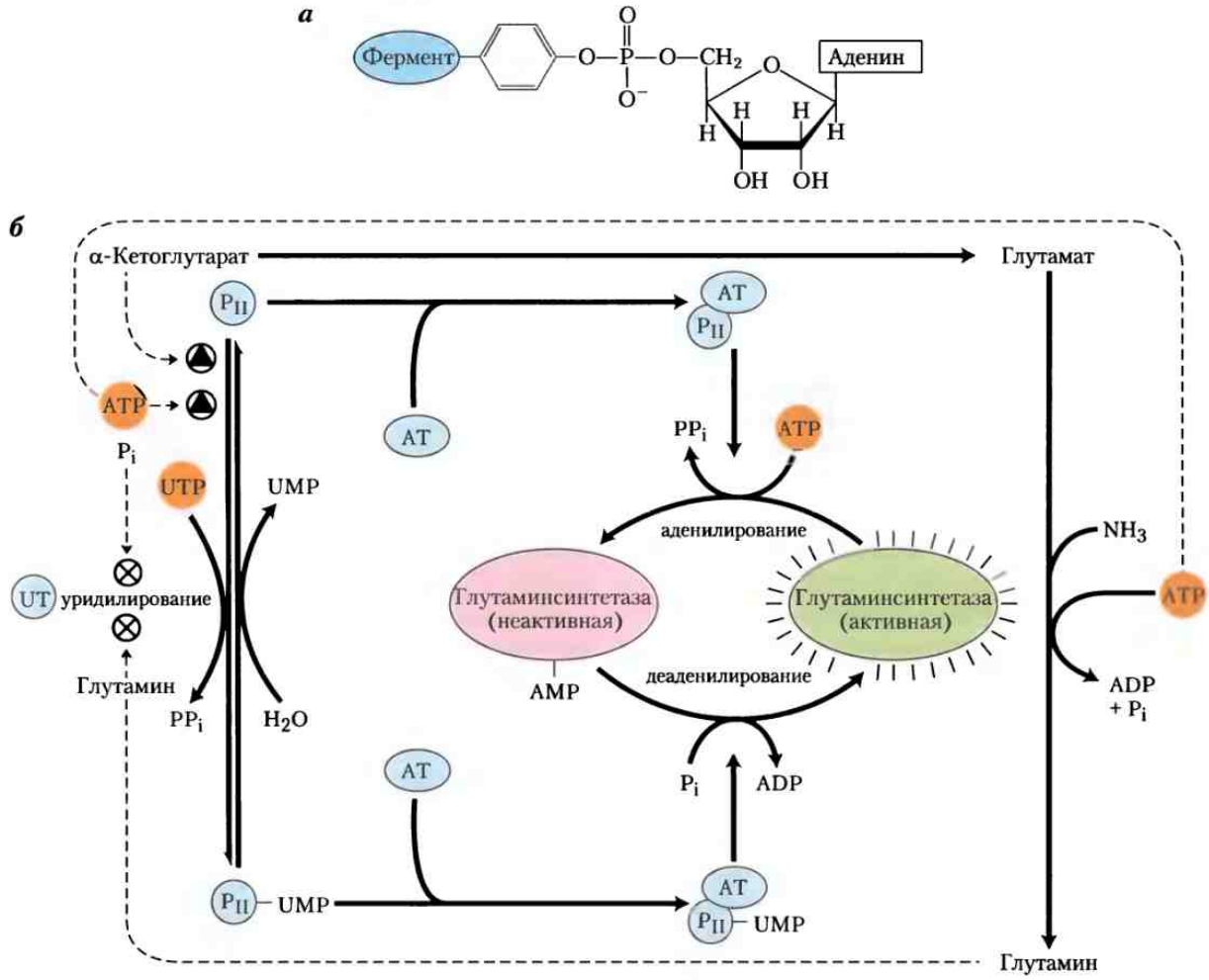


Рис. 22-7. Второй уровень регуляции глутаминсинтетазы: ковалентные модификации. *а* — аденилированный остаток тирозина. *б* — каскад, ведущий к аденилированию (инактивации) глутаминсинтетазы. AT — аденилилтрансфераза; UT — уридилилтрансфераза. Детали каскада описаны в тексте.

геназа локализована в митохондриальном матриксе. Равновесие реакции сдвинуто в сторону реагентов, а для NH_4^+ константа Михаэлиса $K_м$ такая высокая (~1 мМ), что, вероятно, эта реакция вносит очень скромный вклад во включение NH_4^+ в аминокислоты и другие метаболиты. (Вспомним (см. рис. 18-10), что реакция, протекающая под действием глутаматдегидрогеназы, напротив, обеспечивает аммонием цикл мочевины.) Достаточно высокие концентрации NH_4^+ с тем, чтобы реакция глутаматдегидрогеназы вносила существенный вклад в уровень глутамата, обычно наблюдаются, когда в почву добавлен NH_3 или организмы растут в лаборатории в присутствии высоких концентраций аммиака. В общем, у почвенных бактерий и растений преобладает двухферментный путь, рассмотренный выше (уравнения 22-1, 22-2).

Глутаминсинтетаза — основной регуляторный пункт в метаболизме азота

Активность глутаминсинтетазы регулируется практически у всех организмов, что неудивительно, учитывая ключевую метаболическую роль катализа первой реакции в пути включения азота в биологические соединения. У кишечных бактерий, таких как *E. coli*, регуляция необычайно сложная. Фермент состоит из 12 одинаковых

субъединиц с M_r = 50 000 (**рис. 22-5**) и регулируется как аллостерически, так и путем ковалентных модификаций. Аланин, глицин и, по крайней мере, еще шесть конечных продуктов метаболизма глутамина являются аллостерическими ингибиторами этого фермента (**рис. 22-6**). Каждый ингибитор в отдельности способен только к частичному ингибированию, зато несколько ингибиторов оказывают на активность фермента больше, чем просто суммарный эффект, а все восемь вместе они практически полностью выключают синтетазу. Этот контрольный механизм обеспечивает постоянную регулировку уровня глутамина для того, чтобы он соответствовал актуальным требованиям метаболизма.

На аллостерическую регуляцию накладывается ингибирование аденилированием (присоединением AMP) по Tyr[397], расположенному рядом с активным центром фермента (**рис. 22-7**). Эта ковалентная модификация повышает чувствительность к аллостерическим ингибиторам, и ферментативная активность снижается пропорционально количеству аденилированных субъединиц. И аденилирование, и деаденилирование осуществляются **аденилилтрансферазой** (AT на рис. 22-7), которая является частью сложного ферментного каскада, ответственного за уровень глутамина, α-кетоглутарата, ATP и P_i. Активность аденилилтрансферазы модулируется связыванием регуляторного белка P_{II}, а его активность в свою очередь регулируется путем ковалентной модификации (уридилирования) тоже по тирозиновому остатку. Комплекс аденилилтрансферазы с уридинилированным P_{II} (P_{II}-UMP) стимулирует деаденилирование, тогда как тот же комплекс с деуридинилированным P_{II} стимулирует аденилирование глутаминсинтетазы. И уридилирование, и деуридилирование P_{II} осуществляется одним ферментом — **уридилилтрансферазой**. Уридилирование ингибируется связыванием глутамина и P_i с уридилилтрансферазой, а стимулируется присоединением α-кетоглутарата и ATP к P_{II}.

Но регуляция этим не ограничивается. Уридилированный P_{II} также опосредует активацию транскрипции гена глутаминсинтетазы, увеличивая таким образом концентрацию фермента. Деуридилированный P_{II} вызывает снижение транскрипции того же гена. Этот механизм включает взаимодействие P_{II} с дополнительными белками, вовлеченными в регуляцию транскрипции; они

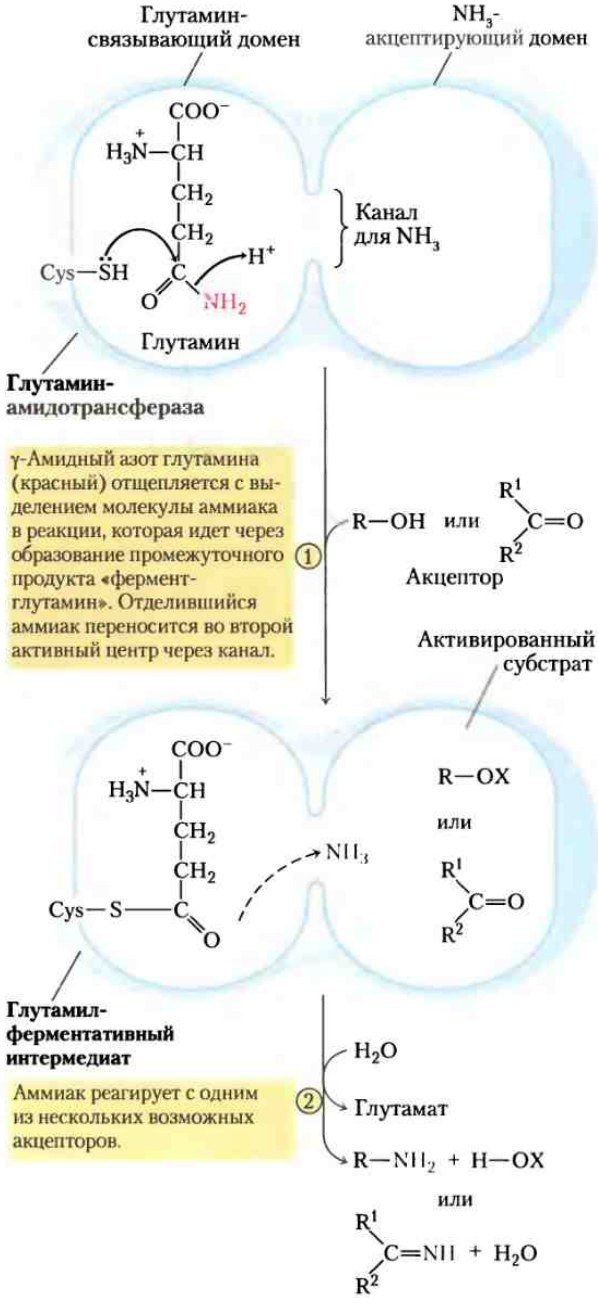


Рис. 22-8. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Предполагаемый механизм реакции, осуществляемой глутаминамидотрансферазами. Каждый фермент имеет два домена. Глутамин-связывающий домен содержит структурные элементы, которые консервативны у всех этих ферментов, включая остаток цистеина, необходимый для их активности. Домены, акцептирующие NH_3 (второй субстрат реакции), различаются. Показаны два типа акцепторов аминов. X — активированная группа, обычно фосфорил, полученный от ATP, что облегчает замещение гидроксильной группы в R–OH на NH_3.

описаны в гл. 28. Суммарный результат действия этой сложной системы контроля — снижение активности глутаминсинтетазы при высоком уровне глутамина и повышение ее активности, когда доступны α-кетоглутарат и ATP (субстраты фермента). Многоступенчатая регуляция обеспечивает чувствительность ответа, приспосабливая синтез глутамина к нуждам клетки.

Несколько типов реакций, играющих особую роль в биосинтезе аминокислот и нуклеотидов

Пути, описанные в этой главе, включают ряд интересных химических реакций с переносом функциональных групп. Некоторые из этих реакций неоднократно повторяются и поэтому заслуживают специального рассмотрения до того, как мы перейдем к самим путям. Вот эти реакции: (1) трансаминирование и другие «перестройки», осуществляемые ферментами, содержащими пиридоксальфосфат, (2) перенос одноуглеродных групп кофакторами: тетрагидрофолатом (обычно переносит группы, имеющие степень окисления углерода, как в $-CHO$ и $-CH_2OH$) либо S-аденозилметионином ($-CH_3$ — наиболее восстановленное состояние) и (3) перенос аминогрупп, образованных из амидного азота глутамина. Пиридоксальфосфат (PLP), тетрагидрофолат (H_4-фолат) и S-аденозилметионин (adoMet) детально описаны в гл. 18 (см. рис. 18-6, 18-17 и 18-18). А здесь мы сфокусируем внимание на переносе аминогрупп, в котором участвует амидный азот глутамина.

В более чем 10 известных реакциях биосинтеза глутамин выступает в качестве основного физиологического источника аминогрупп, большинство этих реакций происходит в путях, описанных в этой главе. Ферменты, катализирующие эти реакции, называются **глутаминамидотрансферазами**. Все они содержат два домена в своей структуре: один связывает глутамин, а другой — второй субстрат, который служит акцептором аминогрупп (**рис. 22-8**). Полагают, что консервативный остаток цистеина в глутаминсвязывающем домене действует как нуклеофил, разрывая амидную связь глутамина и формируя ковалентную связь интермедиата глутамил–фермента. Получающийся в этой реакции NH_3 не высвобождается, а переносится по «аммонийному каналу» на второй активный центр, где реагирует со вторым субстратом с образованием аминированного продукта.

Краткое содержание раздела 22.1 ОБЩИЙ ОБЗОР МЕТАБОЛИЗМА АЗОТА

- Молекулярный азот, составляющий более 80% земной атмосферы, до тех пор, пока он не восстановлен, не доступен большинству живых организмов. Фиксацию атмосферного азота осуществляют некоторые виды свободноживущих почвенных бактерий и симбиотических клубеньковых бактерий бобовых растений.
- Круговорот азота обеспечивают: синтез аммиака путем фиксации азота бактериями, нитрификация аммония до нитратов почвенными организмами, превращение нитратов снова в аммиак высшими растениями, синтез аминокислот из аммония всеми организмами и превращение нитратов обратно в N_2 денитрифицирующими почвенными бактериями. Бактериальный анаммокс анаэробно окисляет аммоний до молекулярного азота, используя нитрит в качестве акцептора электронов.
- Фиксация азота в виде NH_3 осуществляется нитрогеназой в реакции, требующей ATP. Комплекс нитрогеназы очень неустойчив в присутствии O_2.
- В живых системах восстановленный азот включается сначала в аминокислоты, а затем в целый ряд других биомолекул, в том числе нуклеотиды. Ключевым веществом в этой цепи является глутаминовая кислота. Глутаминовая кислота и глутамин служат донорами азота в широком спектре реакций биосинтеза. Глутаминсинтетаза, катализирующая синтез глутамина из глутаминовой кислоты, — главный регуляторный фермент метаболизма азота.
- В путях биосинтеза аминокислот и нуклеотидов неоднократно используются биологические кофакторы: пиридоксальфосфат, тетрагидрофолат и S-аденозилметионин. Пиридоксальфосфат требуется для реакций трансаминирования с участием глутамата и для других превращений аминокислот. Тетрагидрофолат и S-аденозилметионин необходимы для переноса одноуглеродных фрагментов. Глутаминамидотрансферазы катализируют реакции включения в молекулу атома азота из амидной группы глутамина.

22.2. Биосинтез аминокислот

Все аминокислоты образуются из интермедиатов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот или пентозофосфатного пути **(рис. 22-9)**. Атомы азота попадают в эти пути через глутамат или глутамин. Некоторые из этих путей довольно простые, а некоторые нет. Десять аминокислот образуются всего за одну или несколько стадий из общих метаболитов-предшественников. Биосинтез других аминокислот, например ароматических, более сложный.

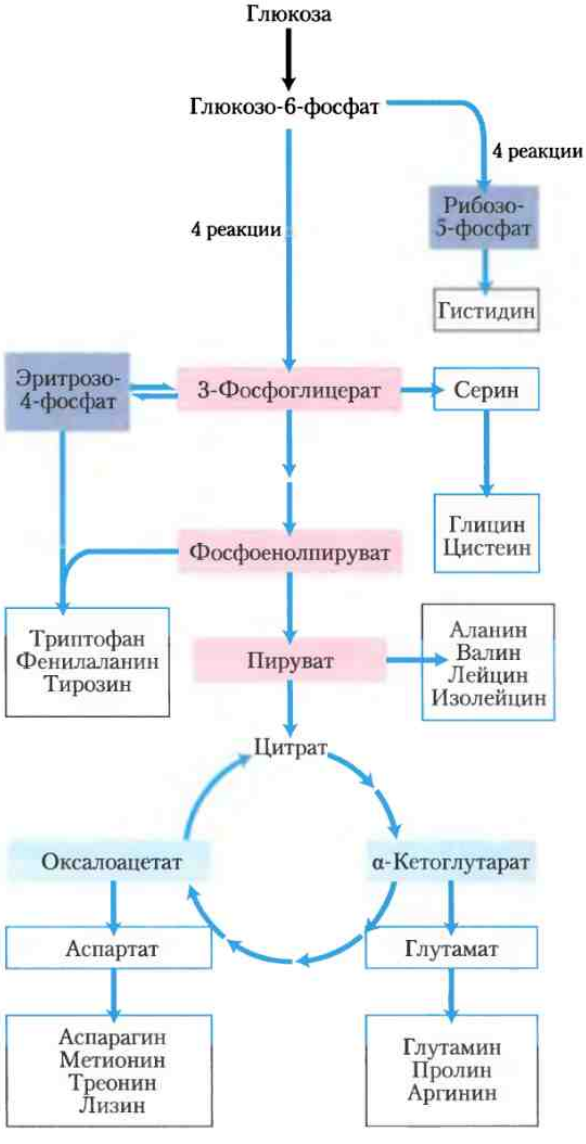


Рис. 22-9. Обзор биосинтеза аминокислот. Предшественники углеродных скелетов молекул поступают из трех источников: гликолиз (показано розовым цветом), цикл трикарбоновых кислот (голубой) и пентозофосфатный путь (синий).

Организмы сильно различаются по способности синтезировать 20 аминокислот, входящих в состав белков. Большинство бактерий и растений умеют синтезировать их все, а млекопитающие могут синтезировать только около половины из 20 аминокислот — главным образом те аминокислоты, которые образуются простыми способами. Это так называемые **заменимые аминокислоты** — они необязательно должны присутствовать в пищевом рационе (см. табл. 18-1). **Незаменимые аминокислоты** непременно должны поступать вместе с пищей. Ниже представлены пути синтеза 20 аминокислот, которые осуществляют бактерии, если не оговорено другое.

При классификации этих биосинтетических путей полезно выделить шесть семейств аминокислот по их общим предшественникам (табл. 22-1). Вдобавок к шести предшественникам, существует примечательный интермедиат нескольких путей синтеза аминокислот и нуклеотидов — **5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP):**

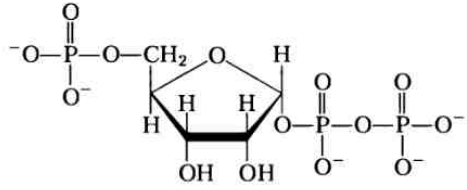


Таблица 22-1 Классификация аминокислот на основе их предшественников в метаболизме

α-Кетоглутарат	**Пируват**
Глутаминовая кислота	Аланин
Глутамин	Валин*
Пролин	Лейцин*
Аргинин	Изолейцин*
3-Фосфоглицерат	**Фосфоенолпируват и эритрозо-4-фосфат**
Серин	Триптофан*
Глицин	Фенилаланин*
Цистеин	Тирозин**
Оксалоацетат	
Аспарагиновая кислота	**Рибозо-5-фосфат**
Аспарагин	Гистидин*
Метионин*	
Треонин*	
Лизин*	

*Незаменимые аминокислоты.

**У млекопитающих синтезируется из фенилаланина.

Интермедиат PRPP образуется из рибозо-5-фосфата, который синтезируется в пентозофосфатном цикле (см. рис. 14-21) в реакции, катализируемой **рибозофосфат-пирофосфокиназой**:

Рибоза-5-фосфат + ATP →

→ 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + AMP

Этот фермент аллостерически регулируется многими молекулами, для которых PRPP является предшественником.

α-Кетоглутарат — предшественник глутаминовой кислоты, глутамина, пролина и аргинина

Мы уже описывали биосинтез **глутаминовой кислоты** (глутамата) и **глутамина**. **Пролин** — циклическое производное глутаминовой кислоты (**рис. 22-10**). На первой стадии синтеза пролина ATP реагирует с γ-карбоксильной группой глутамата, образуется ацилфосфат, который восстанавливается NADPH или NADH до γ-полуальдегида глутамата. Этот промежуточный продукт претерпевает быструю спонтанную циклизацию и последующее восстановление — образуется пролин.

Аргинин у животных синтезируется из глутамата через орнитин в цикле мочевины (гл. 18). Орнитин также может быть синтезирован через трансаминирование γ-полуальдегида глутамата, но из-за спонтанной циклизации последнего, которая приводит к пролину, такая реакция не вносит заметного вклада в синтез орнитина. У бактерий есть путь синтеза орнитина (и аргинина) *de novo*, некоторые стадии которого совпадают с реакциями, приводящими к пролину, благодаря двум дополнительным стадиям; проблему спонтанной циклизации γ-полуальдегида глутамата здесь удается решить (рис. 22-10). На первой стадии α-аминогруппа глутамата защищается ацетилированием при участии ацетил-CoA. После стадии трансаминирования ацетильная группа удаляется с образованием орнитина.

Пути синтеза пролина и аргинина у млекопитающих имеют некоторые отличия. Пролин может синтезироваться в пути, показанном на рис. 22-10, но также он может образоваться из аргинина, входящего в состав белков пищи, или белков собственных тканей. Аргиназа, фермент цикла мочевины, превращает аргинин в орнитин и мочевину (см. рис. 18-10, 18-26). Орнитин превращается в глутамат-γ-полуальдегид ферментом **орнитин-δ-аминотрансферазой** (**рис. 22-11**). Полуальдегид циклизуется в Δ^1-пирролин-5-карбоксилат, который затем превращается в пролин (рис. 22-10). Путь синтеза аргинина, показанный на рис. 22-10, у млекопитающих отсутствует. Когда аргинина, поступающего с пищей или при превращениях собственных белков, недостаточно, осуществляемая орнитин-δ-аминотрансферазой реакция протекает в направлении образования орнитина. Затем орнитин превращается в цитруллин и аргинин в цикле мочевины.

Серин, глицин и цистеин — производные 3-фосфоглицерата

У всех организмов одинаковый основной путь биосинтеза **серина** (**рис. 22-12**). На первой стадии гидроксильная группа 3-фосфоглицерата окисляется дегидрогеназой (использующей NAD^+) с образованием 3-фосфогидроксипирувата. Путем трансаминирования (перенос аминогруппы с глутамата) образуется 3-фосфосерин, который гидролизуется до свободного серина фосфосеринфосфатазой.

Серин (три атома углерода) служит предшественником **глицина** (два атома углерода) — образуется после удаления одного атома углерода **серин-гидроксиметилтрансферазой** (рис. 22-12).

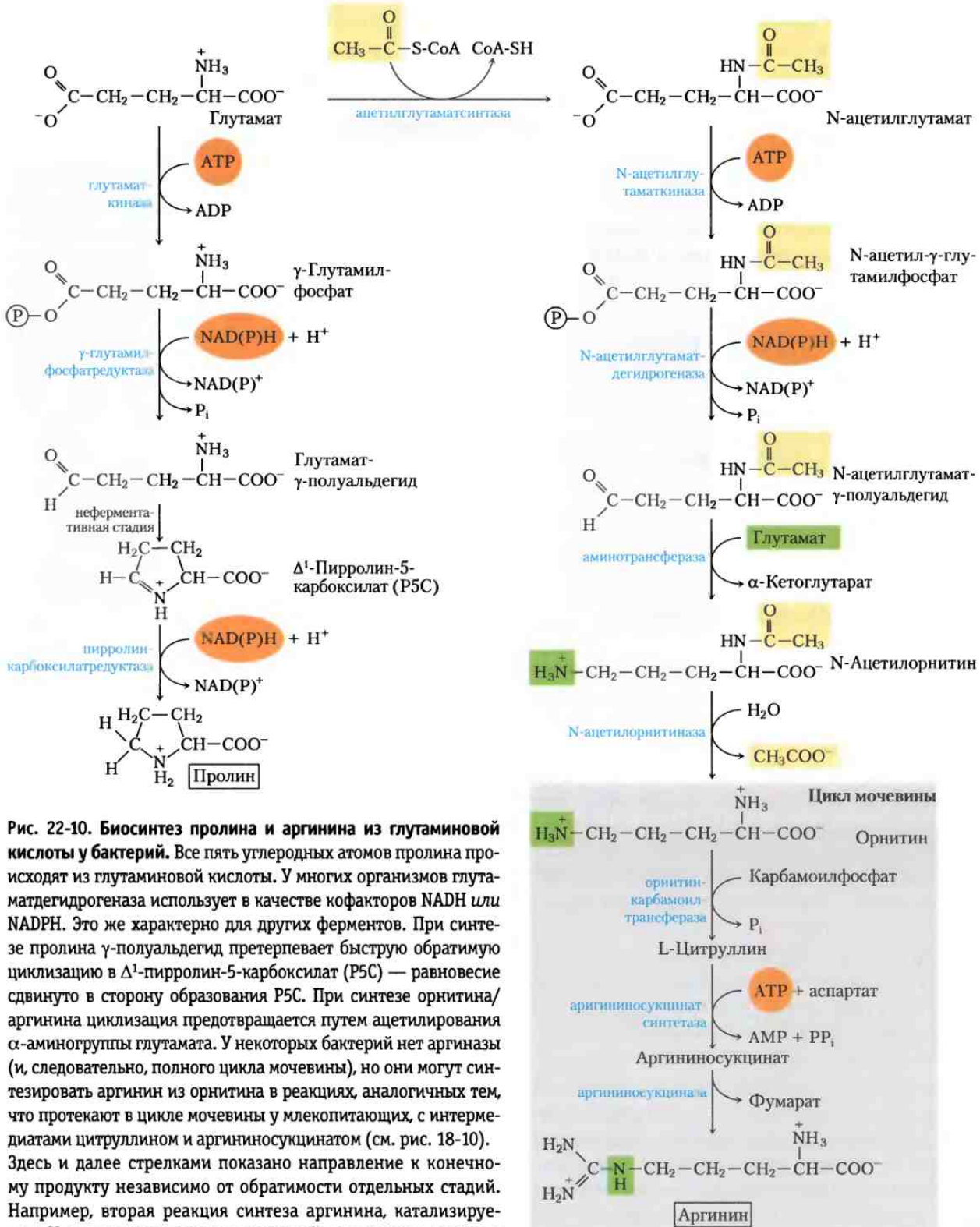


Рис. 22-10. Биосинтез пролина и аргинина из глутаминовой кислоты у бактерий. Все пять углеродных атомов пролина происходят из глутаминовой кислоты. У многих организмов глутаматдегидрогеназа использует в качестве кофакторов NADH *или* NADPH. Это же характерно для других ферментов. При синтезе пролина γ-полуальдегид претерпевает быструю обратимую циклизацию в Δ^1-пирролин-5-карбоксилат (P5C) — равновесие сдвинуто в сторону образования P5C. При синтезе орнитина/аргинина циклизация предотвращается путем ацетилирования α-аминогруппы глутамата. У некоторых бактерий нет аргиназы (и, следовательно, полного цикла мочевины), но они могут синтезировать аргинин из орнитина в реакциях, аналогичных тем, что протекают в цикле мочевины у млекопитающих, с интермедиатами цитруллином и аргининосукцинатом (см. рис. 18-10). Здесь и далее стрелками показано направление к конечному продукту независимо от обратимости отдельных стадий. Например, вторая реакция синтеза аргинина, катализируемая N-ацетилглутаматдегидрогеназой, химически схожа с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакцией при гликолизе (см. рис. 14-7) и легко обратима.

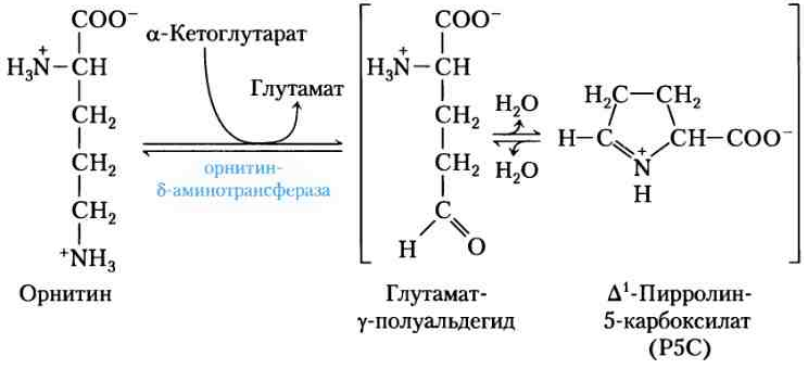
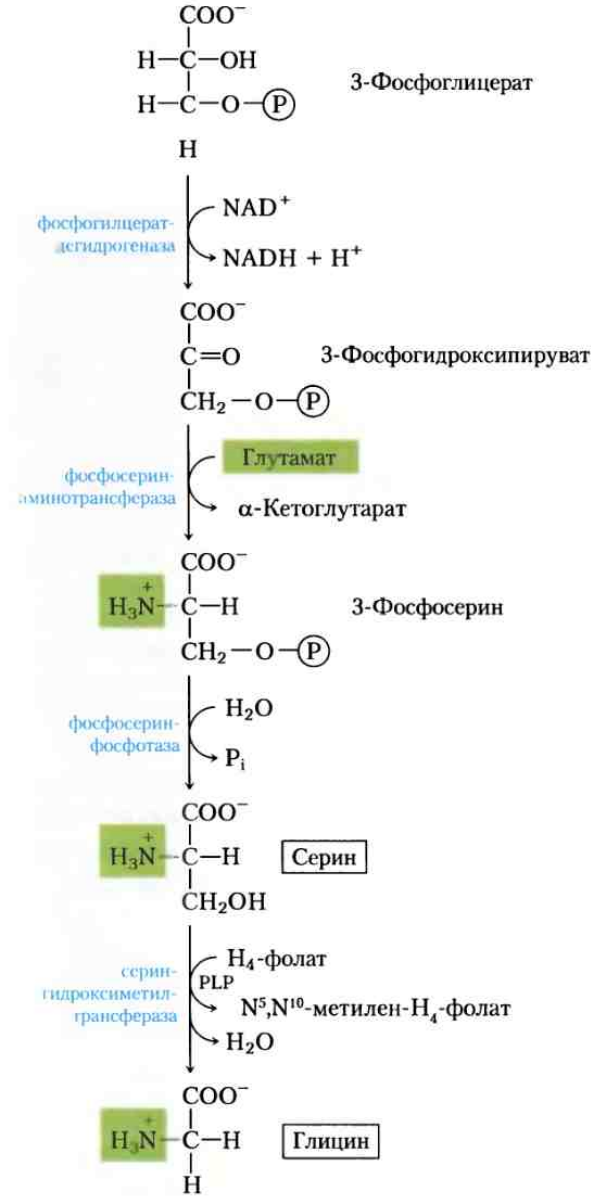


Рис. 22-11. Реакция, осуществляемая орнитин-δ-аминотрансферазой, — одна из стадий в синтезе пролина у млекопитающих. Этот фермент находится в матриксе митохондрий большинства тканей. Хотя равновесие смещено в сторону образования P5C, обратная реакция используется млекопитающими как единственный путь синтеза орнитина (и аргинина), когда аргинина недостаточно для синтеза белка.



Тетрагидрофолат принимает β-углерод (C-3), который «строит» метиленовый мостик между N-5 и N-10 — в результате получается N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат (см. рис. 18-17). Суммарная реакция обратима и для нее требуется пиридоксальфосфат. В печени позвоночных глицин может образовываться по другой реакции, обратной той, что показана на рис. 18-20, *в*. Катализатором выступает глицинрасщепляющий фермент **глицинсинтаза**:

$$CO_2 + NH_4^+ + N^5,N^{10}\text{-метилентетрагидрофолат} + \\ + NADH + H^+ \rightarrow \\ \rightarrow \text{глицин} + \text{тетрагидрофолат} + NAD^+$$

Растения и бактерии способны получать из сульфатов окружающей среды восстановленную серу, необходимую для синтеза **цистеина** (и метионина, синтез которого мы рассмотрим ниже); этот путь показан на **рис. 22-13**. Сульфат активируется в две стадии с образованием 3-фосфоаденозин-5′-фосфосульфата (PAPS), который, принимая восемь электронов, восстанавливается до сульфида. Сульфид затем используется для образования цистеина из серина — этот путь состоит из двух реакций. Млекопитающие синтезируют цистеин из двух аминокислот: метионин предоставляет атом серы, а серин — углеродный скелет. Метионин сначала превращается в S-аденозилметионин (см. рис. 18-18), который может отдать свою ме-

Рис. 22-12. Биосинтез серина из 3-фосфоглицерата и глицина из серина у всех организмов. Глицин получается также из CO_2 и NH_4^+ под действием глицинсинтазы с N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолатом в качестве донора метильной группы (см. текст).

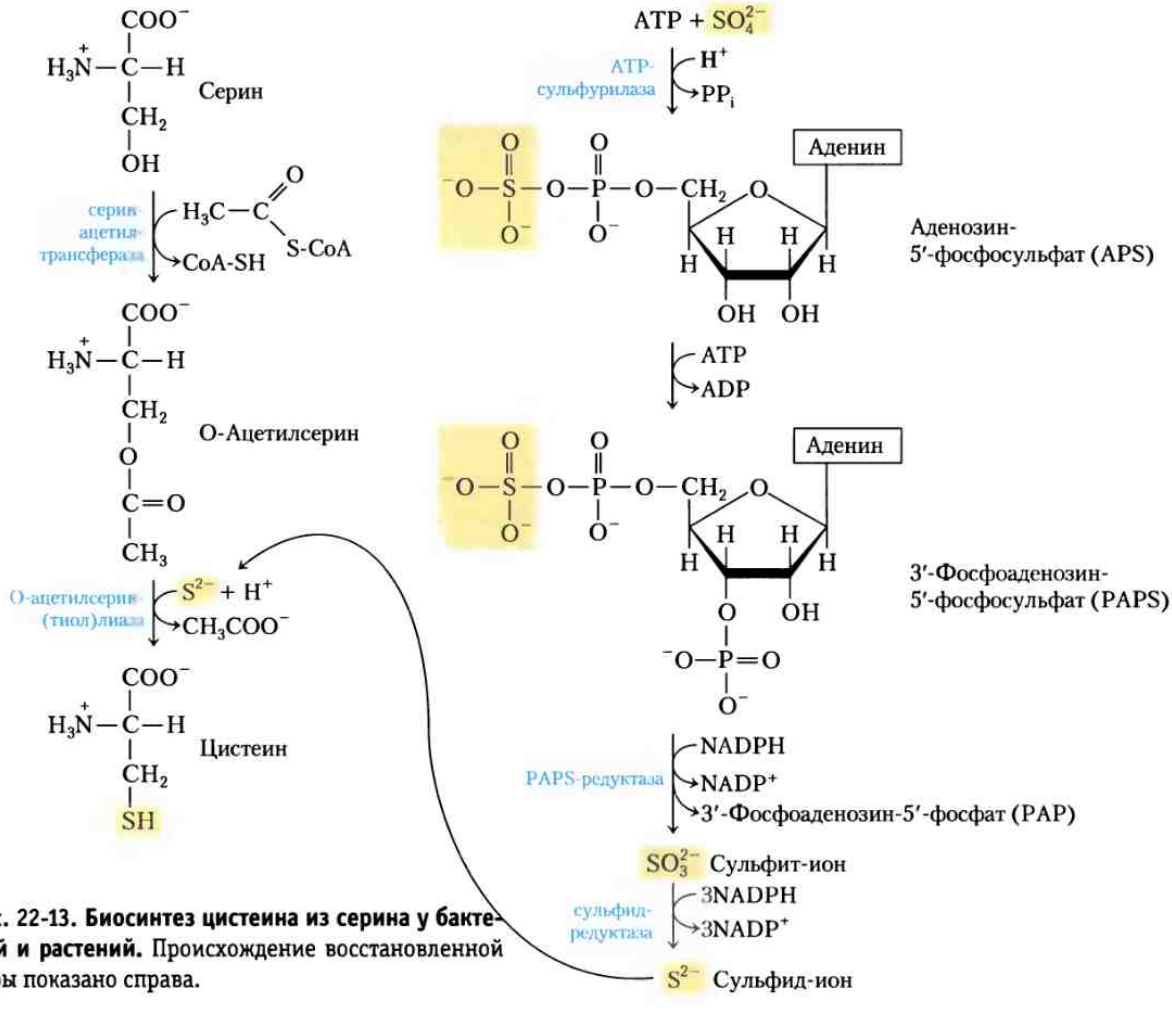
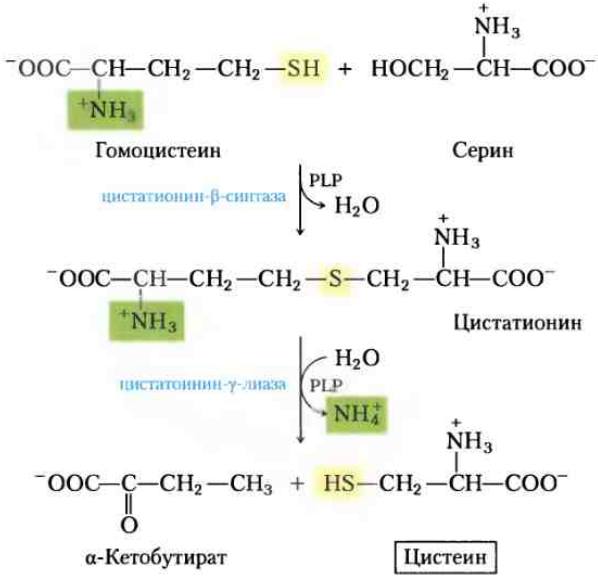


Рис. 22-13. Биосинтез цистеина из серина у бактерий и растений. Происхождение восстановленной серы показано справа.



тильную группу любому из акцепторов и превратиться в S-аденозилгомоцистеин (adoHcy). Этот деметилированный продукт гидролизуется до свободного гомоцистеина, который вступает в реакцию с серином, катализируемую **цистатионин-β-синтазой**, образуя цистатионин (**рис. 22-14**). И, наконец, **цистатионин-γ-лиаза**, фермент, использующий PLP, катализирует удаление аммония и расщепление цистатионина с образованием цистеина.

Рис. 22-14. Биосинтез цистеина из гомоцистеина и серина у млекопитающих. Гомоцистеин образуется из метионина, как описано в тексте.

На основе оксалоацетата и пирувата синтезируются три заменимые и шесть незаменимых аминокислот

Аланин и **аспарагиновая кислота** синтезируются из пирувата и оксалоацетата (соответственно) путем трансаминирования (аминогруппа переносится с глутамата). **Аспарагин** возникает путем амидирования аспартата — группу NH_4^+ предоставляет глутамин. Все это заменимые аминокислоты, их биосинтез происходит простыми путями и встречается у всех организмов.

По непонятным пока причинам опухолевые лимфоциты, обнаруживаемые при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ) у детей, при росте опухоли расходуют аспарагин. При проведении химиотерапии больным с ОЛЛ дополнительно вводят бактериальную L-аспарагиназу, снижающую уровень аспарагина в плазме крови пациентов. При таком комбинированном лечении частота ремиссий у детей достигает 95% (применение одной только L-аспарагиназы позволяет достичь ремиссии в 40–60% случаев). Однако использование аспарагиназы сопряжено с некоторыми нежелательными побочными эффектами, и приблизительно у 10% пациентов после ремиссии вновь начинает развиваться заболевание, причем возникает опухоль, устойчивая к действию лекарственных препаратов. В настоящее время для лечения детей с ОЛЛ разрабатываются ингибиторы человеческой аспарагинсинтетазы. ■

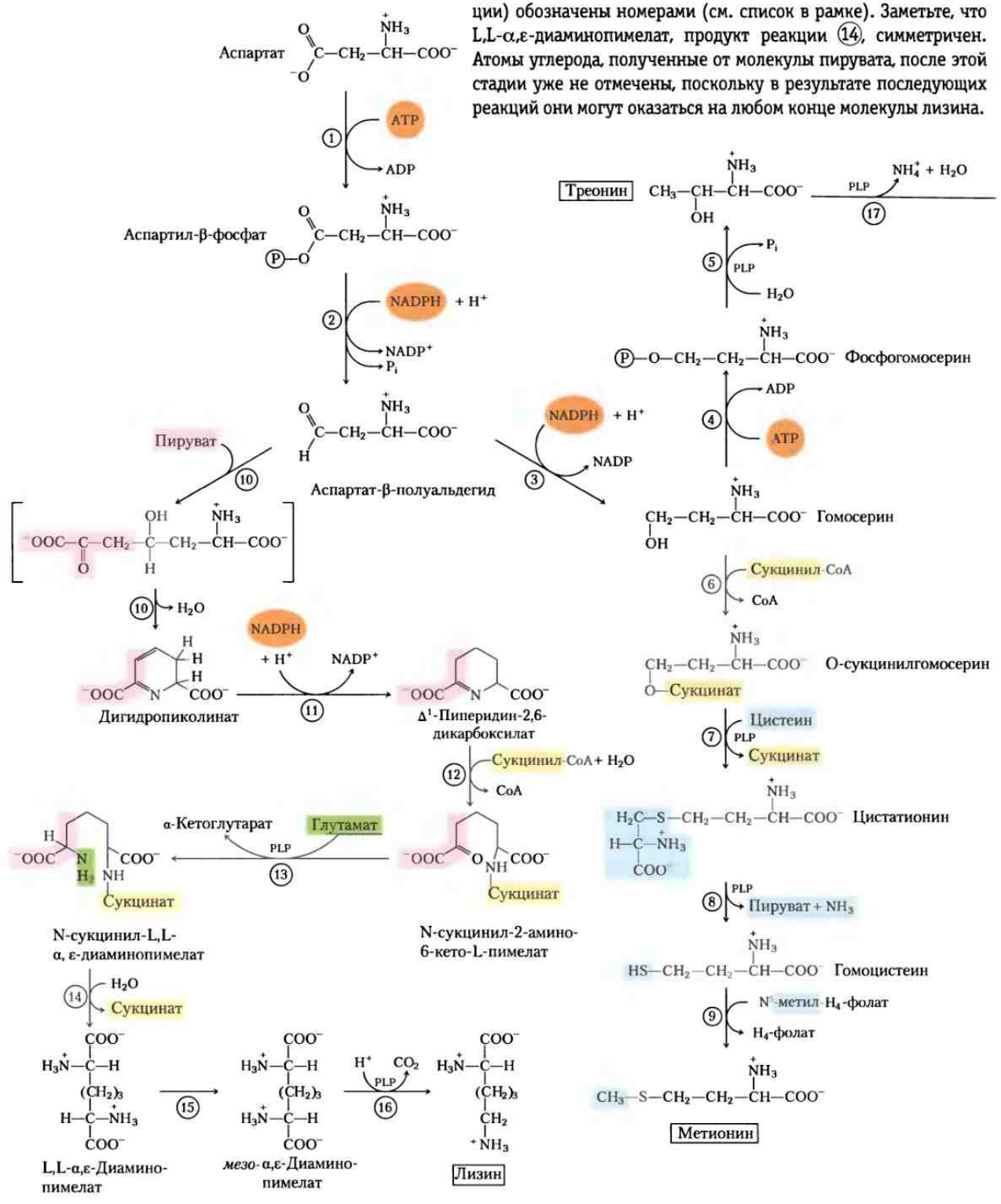
Метионин, треонин, лизин, изолейцин, валин и лейцин — незаменимые аминокислоты. Пути их биосинтеза сложные и взаимосвязанные (**рис. 22-15**). У бактерий, грибов и растений пути биосинтеза могут существенно отличаться; для бактерий они представлены на рис. 22-15.

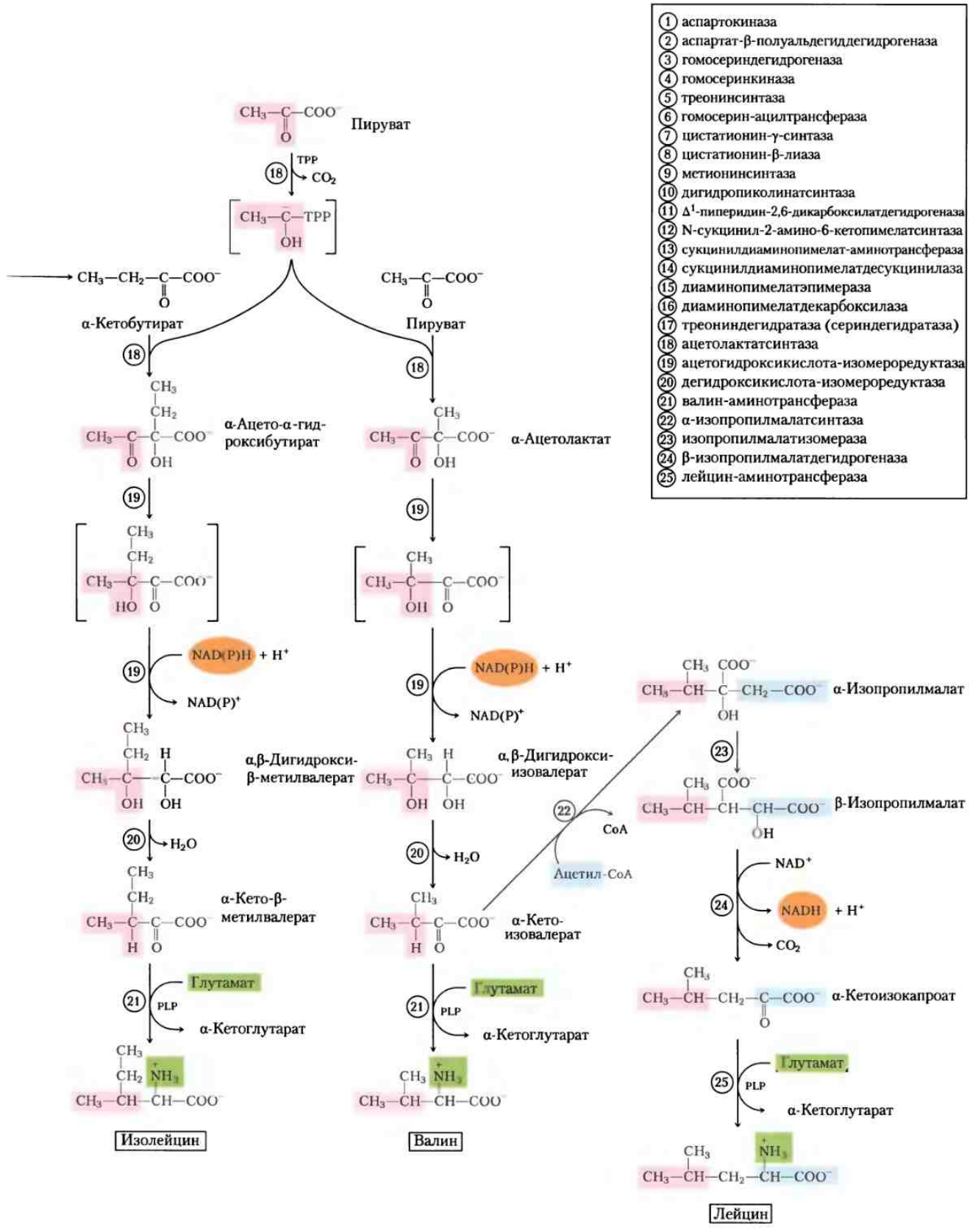
Аспарагиновая кислота служит предшественником **метионина**, **треонина** и **лизина**. Точками разветвления путей оказываются аспартат-β-полуальдегид, промежуточный продукт всех трех путей, и гомосерин, предшественник треонина и метионина. Треонин в свою очередь служит одним из предшественников изолейцина. Пути биосинтеза **валина** и **изолейцина** включают три общих фермента (рис. 22-15, реакции с ⑱ по ㉑). Предшественник валина и изолейцина — пируват; этот путь начинается реакцией между молекулой пирувата (в форме гидроксиэтилтиаминпирофосфата, см. рис. 14-14) с другой молекулой пирувата (синтез валина) или молекулой α-кетобутирата (синтез изолейцина). α-Кетобутират образуется из треонина в реакции, требующей присутствия пиридоксальфосфата (рис. 22-15, реакция ⑰). Четырехстадийный путь синтеза **лейцина** (реакции ㉒–㉕) начинается с α-кетоизовалерата, промежуточного продукта при синтезе валина.

Хоризмат — ключевое соединение в синтезе триптофана, фенилаланина и тирозина

Ароматические кольца нелегко получить из окружающей среды, даже несмотря на то что бензольное кольцо очень устойчиво. Основной путь образования ароматических колец у бактерий, грибов и растений — это биосинтез триптофана, фенилаланина и тирозина. Все начинается с замыкания в кольцо алифатического предшественника, затем следует постадийное добавление двойных связей. В ходе первых четырех реакций образуется шикимат — молекула, содержащая семь атомов углерода, полученных от молекул эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата (**рис. 22-16**). Шикимат превращается в хоризмат в ходе трех реакций, где происходит добавление еще трех атомов углерода от новой молекулы фосфоенолпирувата.

Рис. 22-15. Бактериальный синтез из оксалоацетата и пирувата шести незаменимых аминокислот: метионина, треонина, лизина, изолейцина, валина и лейцина. Здесь, как и в других многостадийных путях биосинтеза, ферменты (и реакции) обозначены номерами (см. список в рамке). Заметьте, что L,L-α,ε-диаминопимелат, продукт реакции (14), симметричен. Атомы углерода, полученные от молекулы пирувата, после этой стадии уже не отмечены, поскольку в результате последующих реакций они могут оказаться на любом конце молекулы лизина.




1 аспартокиназа
2 аспартат-β-полуальдегиддегидрогеназа
3 гомосериндегидрогеназа
4 гомосеринкиназа
5 треонинсинтаза
6 гомосерин-ацилтрансфераза
7 цистатионин-γ-синтаза
8 цистатионин-β-лиаза
9 метионинсинтаза
10 дигидропиколинатсинтаза
11 Δ¹-пиперидин-2,6-дикарбоксилатдегидрогеназа
12 N-сукцинил-2-амино-6-кетопимелатсинтаза
13 сукцинилдиаминопимелат-аминотрансфераза
14 сукцинилдиаминопимелатдесукцинилаза
15 диаминопимелатэпимераза
16 диаминопимелатдекарбоксилаза
17 треониндегидратаза (сериндегидратаза)
18 ацетолактатсинтаза
19 ацетогидроксикислота-изомероредуктаза
20 дегидроксикислота-изомероредуктаза
21 валин-аминотрансфераза
22 α-изопропилмалатсинтаза
23 изопропилмалатизомераза
24 β-изопропилмалатдегидрогеназа
25 лейцин-аминотрансфераза
Пируват
TPP
CO2
α-Кетобутират
Пируват
α-Ацето-α-гидроксибутират
α-Ацетолактат
NAD(P)H + H+
NAD(P)+
α,β-Дигидрокси-β-метилвалерат
α,β-Дигидроксиизовалерат
H2O
α-Кето-β-метилвалерат
α-Кетоизовалерат
CoA
Ацетил-CoA
α-Изопропилмалат
β-Изопропилмалат
NAD+
NADH + H+
CO2
α-Кетоизокапроат
Глутамат
PLP
α-Кетоглутарат
Изолейцин
Валин
Лейцин

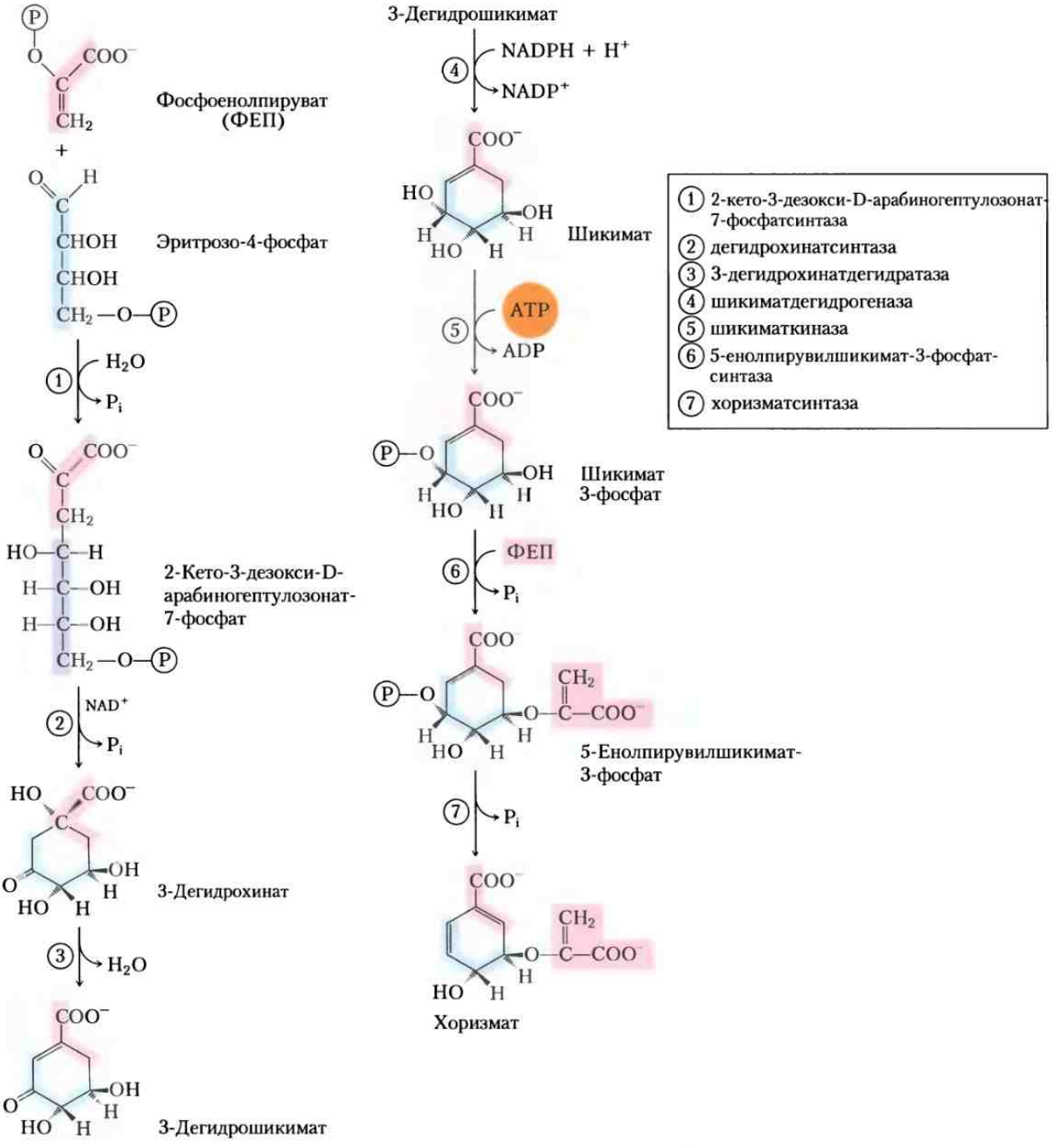
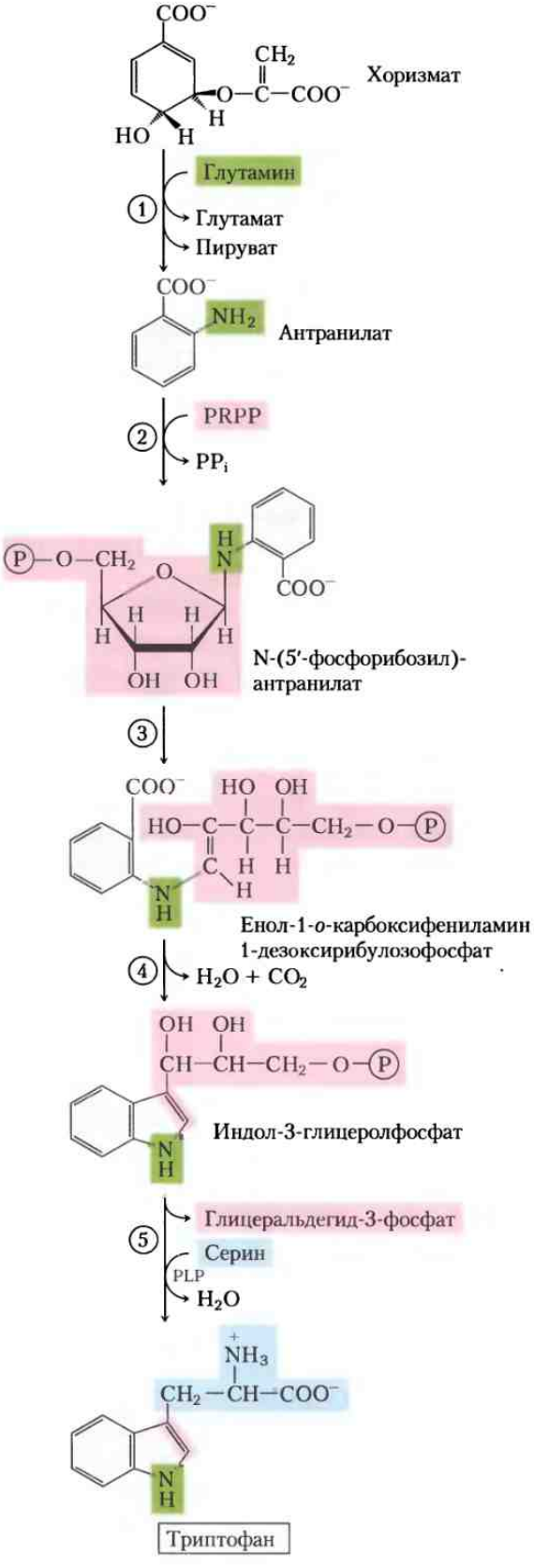


Рис. 22-16. Биосинтез хоризмата, промежуточного продукта биосинтеза ароматических аминокислот у бактерий и растений. Все атомы углерода происходят из молекул эритрозо-4-фосфата (светло-сиреневый цвет) или фосфоенолпирувата (розовый цвет). Заметьте, что NAD+, необходимый в качестве кофактора реакции ②, остается неизменным, он может быть временно восстановлен до NADH в ходе реакции с образованием окисленного промежуточного продукта. Реакция ⑥ конкурентно ингибируется глифосатом ($^-OOC-CH_2-NH-CH_2-PO_3^{2-}$), активным компонентом широко используемого гербицида раундапа. Этот гербицид относительно безопасен для млекопитающих, у которых нет подобного биосинтетического пути. Названия соединений хинат и шикимат даны по именам растений (хинное дерево и анисовый бадьян (шикими)), в которых было обнаружено накопление этих веществ.



1. антранилатсинтаза
2. антранилат-фосфорибозилтрансфераза
3. N-(5′-фосфорибозил)антранилатизомераза
4. индол-3-глицеролфосфатсинтаза
5. триптофансинтаза

Рис. 22-17. Биосинтез триптофана из хоризмата у бактерий и растений. У *E. coli* ферменты, катализирующие реакции ① и ②, — субъединицы одного комплекса.

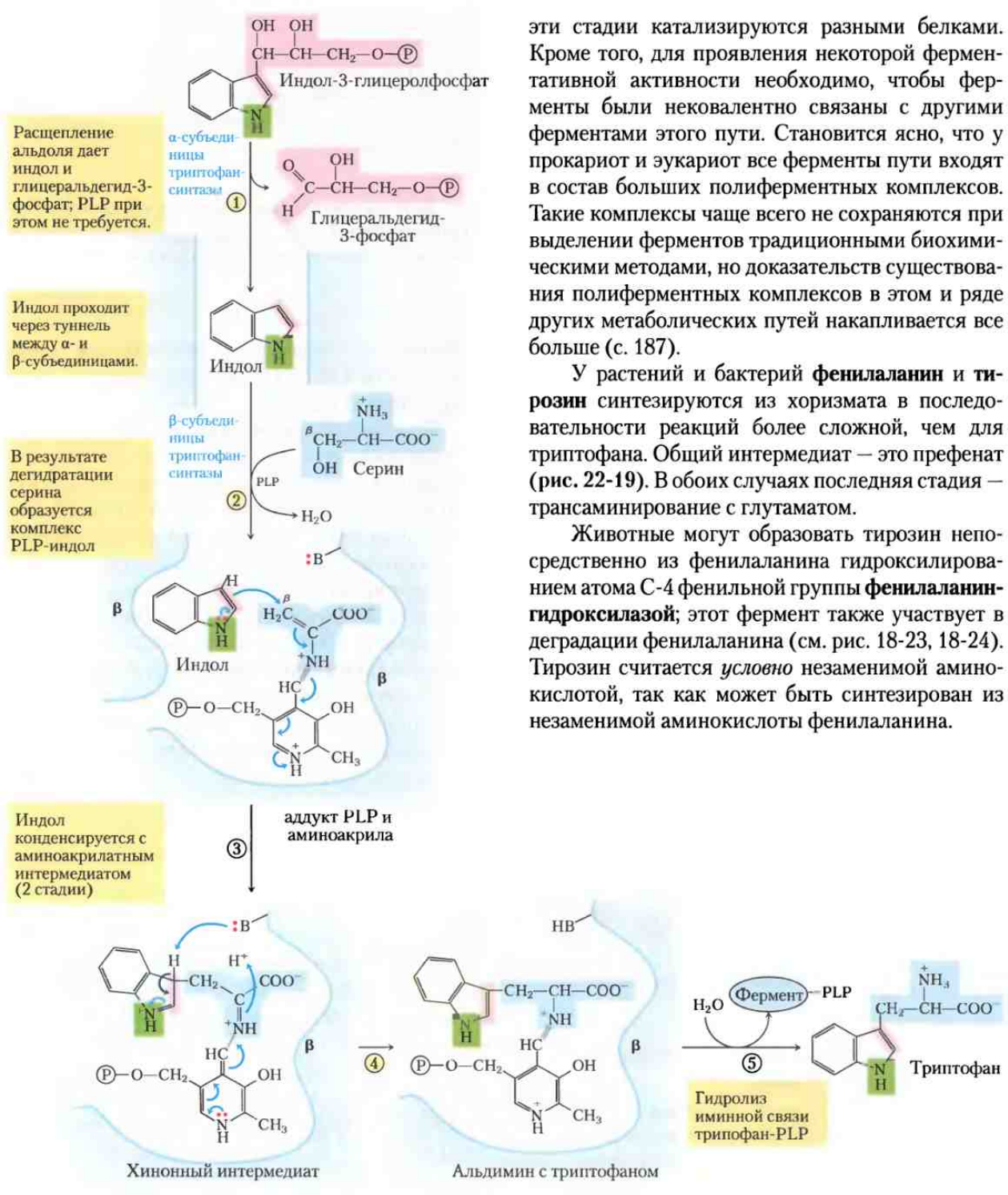
Хоризмат — первая точка разветвления путей, одна из ветвей ведет к триптофану, другая — к фенилаланину и тирозину.

При синтезе **триптофана (рис. 22-17)** хоризмат превращается в антранилат в реакции, где глутамин выступает донором атома азота, который далее включается в индольное кольцо. Затем антранилат конденсируется с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом (PRPP). Индольное кольцо триптофана образуется из атомов углерода кольца и аминогруппы антранилата, а также углеродов из PRPP. Последнюю реакцию катализирует **триптофансинтаза**. Этот фермент имеет субъединичную структуру типа $\alpha_2\beta_2$ и может диссоциировать на две α-субъединицы и одну β_2-субъединицу, которые катализируют разные стадии суммарной реакции:

$$\text{Индол-3-глицеринфосфат} \xrightarrow[\alpha\text{-субъединица}]{} \text{индол} + \text{глицеральдегид-3-фосфат}$$

$$\text{Индол} + \text{серин} \xrightarrow[\beta_2\text{-субъединица}]{} \text{триптофан} + H_2O$$

Во второй стадии используется пиридоксальфосфат (PLP) **(рис. 22-18)**. Индол, образованный в первой стадии, не отщепляется ферментом, но вместо этого движется по каналу из активного центра α-субъединицы в активный центр β-субъединицы, где он конденсируется с интермедиатом — шиффовым основанием, образованным серином с PLP. Туннелирование интермедиата таким способом можно назвать особенностью всего пути от хоризмата до триптофана. Активные центры фермента, катализирующие разные стадии (иногда даже непоследовательные) пути образования триптофана, у некоторых видов грибов и бактерий расположены на отдельных полипептидах, но у других видов этих организмов



эти стадии катализируются разными белками. Кроме того, для проявления некоторой ферментативной активности необходимо, чтобы ферменты были нековалентно связаны с другими ферментами этого пути. Становится ясно, что у прокариот и эукариот все ферменты пути входят в состав больших полиферментных комплексов. Такие комплексы чаще всего не сохраняются при выделении ферментов традиционными биохимическими методами, но доказательств существования полиферментных комплексов в этом и ряде других метаболических путей накапливается все больше (с. 187).

У растений и бактерий **фенилаланин** и **тирозин** синтезируются из хоризмата в последовательности реакций более сложной, чем для триптофана. Общий интермедиат – это префенат **(рис. 22-19)**. В обоих случаях последняя стадия – трансаминирование с глутаматом.

Животные могут образовать тирозин непосредственно из фенилаланина гидроксилированием атома С-4 фенильной группы **фенилаланин-гидроксилазой**; этот фермент также участвует в деградации фенилаланина (см. рис. 18-23, 18-24). Тирозин считается *условно* незаменимой аминокислотой, так как может быть синтезирован из незаменимой аминокислоты фенилаланина.

Рис. 22-18. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Реакция, катализируемая триптофансинтазой. Эта ферментативная реакция включает несколько стадий с различными химическими перегруппировками. Эти облегченные благодаря участию PLP превращения происходят со стороны β-углерода (С-3) аминокислоты, что отличается от реакций, затрагивающих α-углерод (рассмотрены на рис. 18-6). β-Углерод серина соединяется с индольным циклом. ● **Механизм триптофансинтазы**

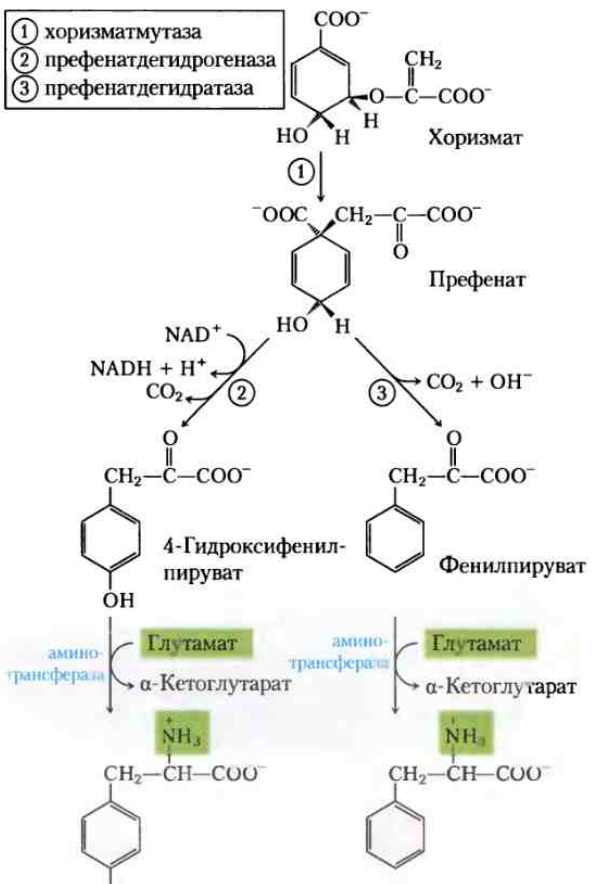
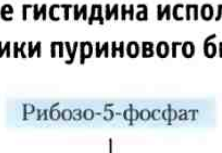


Рис. 22-19. Биосинтез фенилаланина и тирозина из хоризмата в бактериях и растениях. Превращение хоризмата в префенат служит редким биологическим примером перегруппировки Кляйзена.

При биосинтезе гистидина используются предшественники пуринового биосинтеза



У всех растений и бактерий путь синтеза **гистидина** несколько отличается от биосинтетических путей других аминокислот. Гистидин образуется из трех предшественников (**рис. 22-20**): из PRPP берется пять атомов углерода, из пуринового кольца ATP — атомы азота и углерода и из глутамина — второй атом азота кольца. *Ключевые стадии:* конденсация ATP и PRPP, в которой N-1 пуринового кольца связывается с активированным углеродом C-1 рибозы в PRPP (стадия ① на рис. 22-20); размыкание пуринового кольца, что обеспечивает образование связи между N-1 аденина и C-2 рибозы (стадия ③); образование имидазольного кольца в реакции, для которой поступление азота обеспечивает глутамин (стадия ⑤). Использование ATP в качестве метаболита, а не в качестве высокоэнергетического кофактора довольно необычно, но нерасточительно, потому что координируется биосинтезом пуринов. Остаток молекулы ATP после преобразований при атомах N-1 и C-2 называется 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотидом (AICAR от англ. *5-**a**mino**i**midazole-4-**c**arbox**a**mide **r**ibonucleotide*), он служит интермедиатом в биосинтезе пуринов (см. рис. 22-33) и быстро регенерирует ATP.

Биосинтез аминокислот регулируется аллостерически

Как подробно обсуждалось в гл. 15, метаболический поток часто связан с активностью многих ферментов, действующих на данном метаболическом пути. В случае синтеза аминокислот регуляция метаболизма частично достигается путем ингибирования первой стадии конечным продуктом всего метаболического пути. Первая стадия обычно необратима и катализируется аллостерическим ферментом, который играет важную роль в регуляции общей скорости этого метаболического пути. Например на **рис. 22-21** показана аллостерическая регуляция синтеза изолейцина из треонина (см. рис. 22-15). Конечный продукт изолейцин — аллостерический ингибитор первой стадии этой цепи реакций. У бактерий такая аллостерическая модуляция аминокислотного синтеза обеспечивает мгновенную адаптацию к потребностям клетки.

Аллостерическая регуляция может быть значительно более сложной. В качестве примера рассмотрим удивительный набор аллостерических регуляторов глутаминсинтетазы *E. coli* (рис. 22-6). Шесть продуктов, образованных из глутамина, обеспечивают отрицательную обратную связь, ингибируя этот фермент, и суммарный эффект этих и других модуляторов не просто аддитивный. Такая регуляция называется **кооперативным ингибированием**.

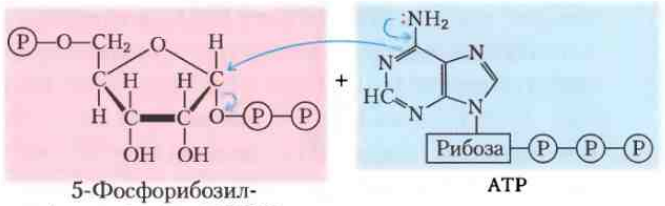
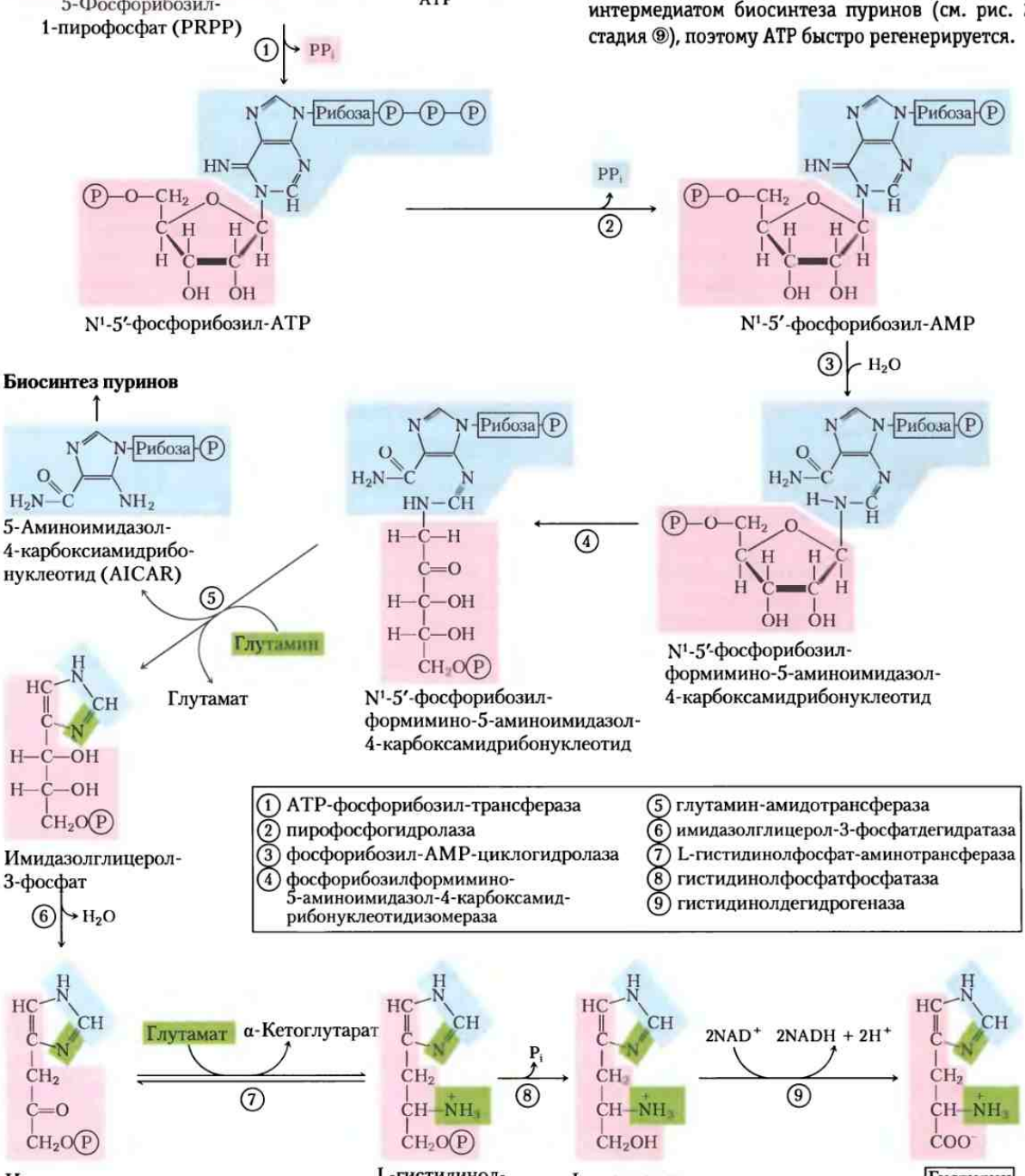


Рис. 22-20. Биосинтез гистидина у бактерий и растений. Атомы, поступившие от PRPP и ATP, выделены красным и голубым полем соответственно. Два атома азота гистамина происходят из глутамина и глутамата (зеленое). Обратите внимание, что после стадии ⑤ остается производное ATP (AICAR), которое служит интермедиатом биосинтеза пуринов (см. рис. 22-33, стадия ⑨), поэтому ATP быстро регенерируется.



① АТР-фосфорибозил-трансфераза
② пирофосфогидролаза
③ фосфорибозил-АМР-циклогидролаза
④ фосфорибозилформимино-5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотидизомераза
⑤ глутамин-амидотрансфераза
⑥ имидазолглицерол-3-фосфатдегидратаза
⑦ L-гистидинолфосфат-аминотрансфераза
⑧ гистидинолфосфатфосфатаза
⑨ гистидинолдегидрогеназа

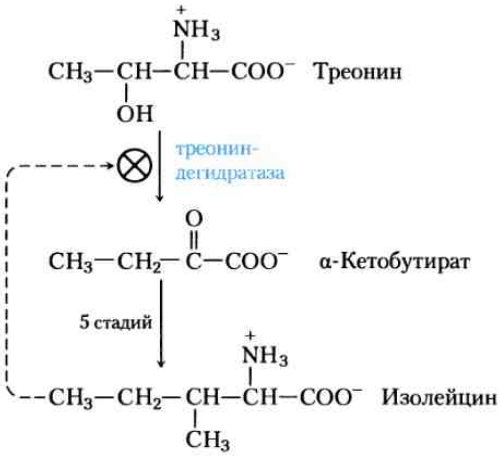


Рис. 22-21. Аллостерическая регуляция биосинтеза изолейцина. Первая реакция в цепочке от треонина до изолейцина ингибируется конечным продуктом пути, изолейцином. Этот пример аллостерического ингибирования по принципу отрицательной обратной связи был открыт одним из первых. Стадии от α-кетобутирата до изолейцина соответствуют реакциям от (18) до (21) на рис. 22-15 (пять стадий, так как реакция (19) идет в две стадии).

Другие механизмы также вносят свой вклад в регуляцию биосинтеза аминокислот. Для синтеза белков 20 аминокислот должны образовываться в организме в нужном соотношении, поэтому в клетках существуют способы контроля не только скорости синтеза каждой аминокислоты, но также согласованности их накопления. Согласованность относительных количеств особенно хорошо можно наблюдать в быстро растущих бактериальных клетках. На **рис. 22-22** показано, как клетки *E. coli* контролируют синтез лизина, метионина, треонина и изолейцина — аминокислот, образованных из аспартата. Очевидны некоторые важные ингибирующие связи. Стадия образования аспартил-β-фосфата из аспартата катализируется тремя изозимами, каждый из них независимо контролируется различными модуляторами. **Многообразие ферментов** предотвращает выключение ключевых стадий единственным конечным продуктом биосинтеза, ведь могут потребоваться другие продукты этого пути. В цепочках реакций от аспартат-β-полуальдегида до гомосерина и от треонина до α-кетобутирата (подробно на рис. 22-15) стадии катализируются двумя независимо контролируемыми изозимами. Один изозим, обеспечивающий превращение аспартата в аспартил-β-фосфат, аллостерически ингибируется двумя различными модуляторами, лизином и изолейцином, чье действие сильнее, чем просто аддитивно — еще один пример кооперативного ингибирования. Цепочка реакций от аспартата до изолейцина подвергается множественной перекрестной регуляции по механизму отрицательной обратной связи; например,

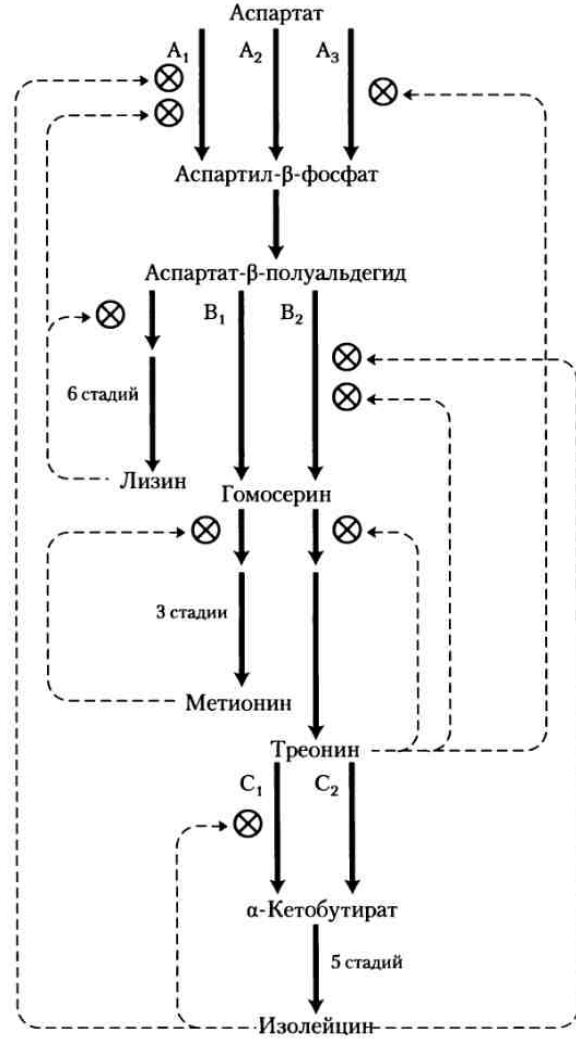


Рис. 22-22. Взаимные ингибирующие регуляторные механизмы биосинтеза некоторых аминокислот, образующихся из аспартата, в метаболизме *E. coli*. Три фермента (A, B, C) имеют по два или по три изозима, показанные с помощью нижних индексов. В каждом случае один изозим (A_2, B_1 или C_2) не имеет аллостерической регуляции; эти изозимы регулируются уровнем своего синтеза (гл. 28, т. 3). Синтез изозимов A_2 и B_1 подавляется при высоком уровне метионина, а синтез изозима C_2 подавляется при высоком уровне C_2. Ферменты: A — аспартокиназа; B — гомосериндегидрогеназа; C — треониндегидратаза.

изолейцин ингибирует превращение треонина в α-кетобутират (как описано выше), а треонин ингибирует свое собственное образование в трех местах: из гомосерина, из аспартат-β-полуальдегида и из аспартата (стадии ④, ③ и ① на рис. 22-15). Такой всеобъемлющий регуляторный механизм называется **последовательным ингибированием с отрицательной обратной связью**.

Похожие фрагменты встречаются в путях, ведущих к образованию ароматических аминокислот. В начале пути к общему интермедиату хоризмату первая стадия катализируется ферментом 2-кето-3-деокси-D-арабиногептулозонат-7-фосфатсинтазой (DAHP от англ. *2-keto-3-deoxy-**D**-**a**rabino**h**eptulosonate 7-**p**hosphate*) (стадия ① на рис. 22-16). У большинства микроорганизмов и растений есть три изозима DAHP-синтазы. Один из этих изозимов аллостерически ингибируется (по механизму отрицательной обратной связи) фенилаланином, другой — тирозином, а третий — триптофаном. Такая работа помогает всему пути отвечать на потребности клетки в одной или более ароматических аминокислот. После разветвления путей от хоризмата существует и дополнительная регуляция. Например, ферменты, катализирующие первые две стадии в синтезе триптофана, аллостерически ингибируются триптофаном.

Краткое содержание раздела 22.2 БИОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ

- Растения и бактерии синтезируют все 20 протеиногенных аминокислот. Млекопитающие могут синтезировать только около половины этих аминокислот; остальные же аминокислоты должны поступать вместе с пищей (незаменимые аминокислоты).

- Из заменимых аминокислот глутамат получается восстановительным аминированием α-кетоглутарата и служит в качестве предшественника глутамина, пролина и аргинина. Аланин и аспартат (и аспарагин) образуются в реакции трансаминирования из пирувата и оксалоацетата соответственно. Углеродный скелет серина происходит из 3-фосфоглицерата. Серин является предшественником глицина; β-углеродный атом серина переносится на тетрагидрофолат. У микроорганизмов цистеин образуется из серина и сульфида, полученного восстановлением природного сульфата. Млекопитающие синтезируют цистеин из метионина и серина в последовательности реакций, требующих участия S-аденозилметионина и цистатионина.

- Из незаменимых аминокислот ароматические аминокислоты (фенилаланин, тирозин и триптофан) образуются через пути, в которых хоризмат — ключевая точка ветвления. Предшественником триптофана и гистидина служит фосфорибозилпирофосфат. Путь синтеза гистидина пересекается с синтезом пуринов. Тирозин также может быть получен гидроксилированием фенилаланина (поэтому это условно незаменимая аминокислота). Пути синтеза других незаменимых аминокислот более сложные.

- Пути биосинтеза аминокислот аллостерически регулируются конечными продуктами; регуляторный фермент часто находится в начале пути. Регуляция различных синтетических путей происходит координировано.

22.3. Производные аминокислот

Помимо того, что из аминокислот построены белки, они служат предшественниками многих специализированных биомолекул, включая гормоны, коферменты, нуклеотиды, алкалоиды, полимеры клеточной стенки, порфирины, антибиотики, пигменты и нейромедиаторы. В этом разделе описаны пути, ведущие к некоторым из этих производных аминокислот.

Глицин — предшественник порфиринов

Биосинтез **порфиринов**, для которых главным предшественником служит глицин, будет нашим первым примером, так как порфириновое ядро играет ключевую роль при построении гема таких важных белков, как гемоглобин и цитохромы. Порфирины образуются из четырех молекул монопиррольного производного **порфобилиногена**, который образуется из двух молекул δ-аминолевулината. Существуют два пути, ведущие к δ-аминолевулинату. У высших эукариот (**рис. 22-23, *а***) глицин взаимодействует на первой стадии с сукцинил-CoA с образованием

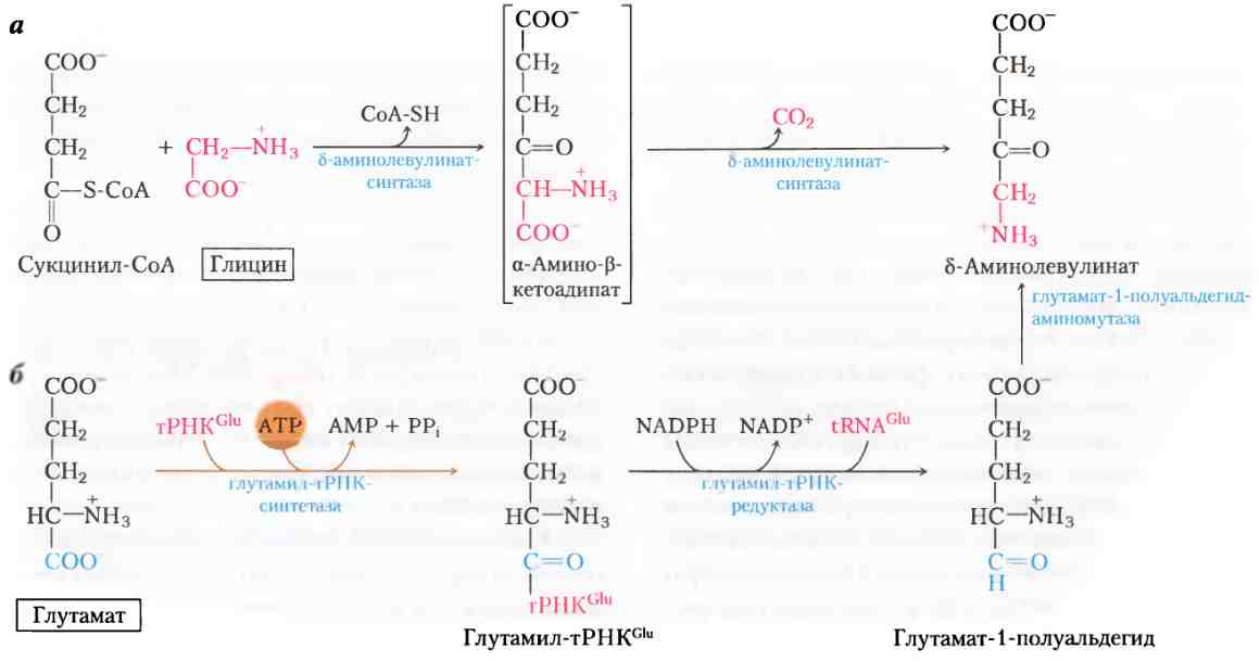
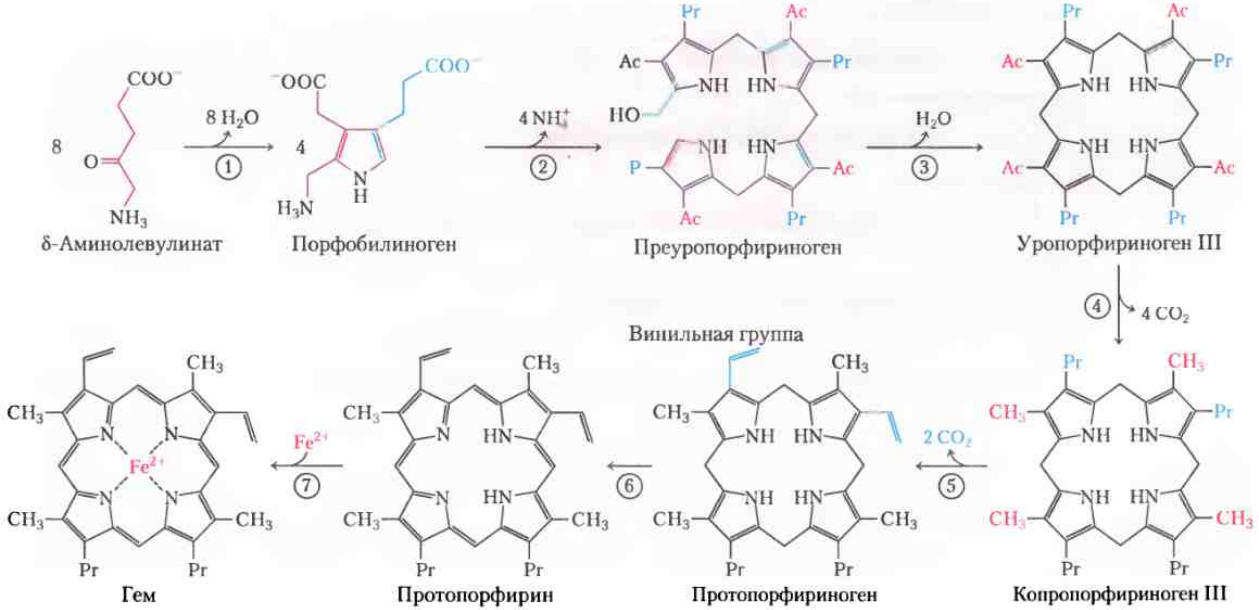


Рис. 22-23. Биосинтез δ-аминолевулината. *а* — у большинства животных, включая млекопитающих, δ-аминолевулинат синтезируется из глицина и сукцинил-CoA. Атомы, полученные от глицина, показаны красным. *б* — у бактерий и растений предшественником δ-аминолевулината служит глутамат.



1. порфобилиногенсинтаза
2. уропорфириногенсинтаза
3. уропорфириноген-III-косинтаза
4. уропорфириногендекарбоксилаза
5. копропорфириноген-оксидаза
6. протопорфириноген-оксидаза
7. феррохелатаза

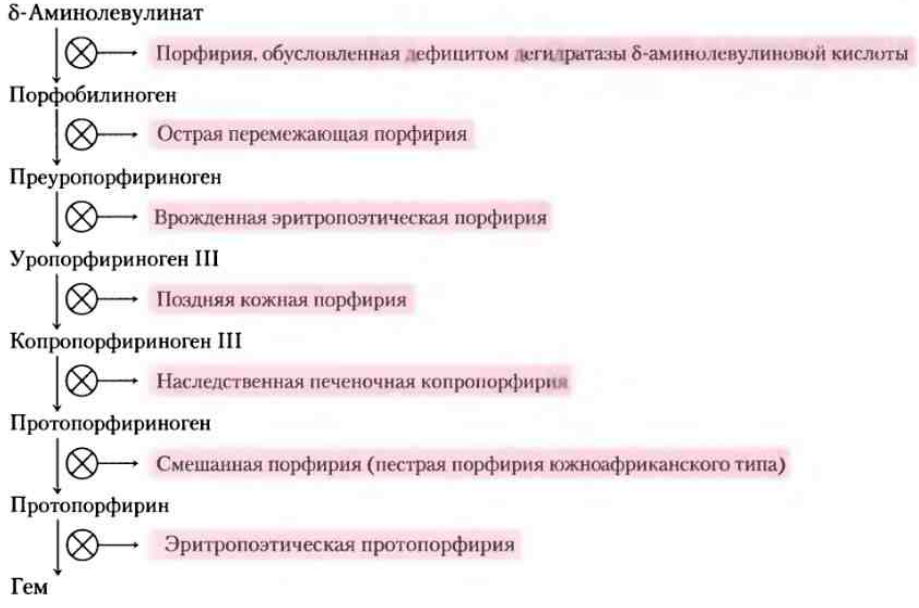
Рис. 22-24. Биосинтез гема из δ-аминолевулината. Ac — ацетил ($-CH_2COO^-$); Pr — пропионил ($-CH_2CH_2COO^-$).

Дополнение 22-2 МЕДИЦИНА Биохимия у королей и вампиров

Порфирии — группа генетических болезней, при которых из-за дефектов ферментов биосинтетического пути от глицина до порфиринов в эритроцитах, жидкостях организма и печени накапливаются специфические предшественники порфирина. Наиболее частая форма этой болезни — острая перемежающая порфирия. Большинство людей с этой болезнью гетерозиготные, и обычно у них нет никаких симптомов, потому что одна копия нормального гена обеспечивает необходимый уровень ферментативной активности. Однако определенный режим питания или условия окружающей среды (что еще плохо изучено) могут вызывать накопление δ-аминолевулината и порфобилиногена, что ведет к приступам острой боли в животе и нарушениям функций нервной системы. У короля Великобритании Георга III во время американской революции было несколько приступов очевидного сумасшествия, хотя во всех своих поступках он был вполне нормальным человеком. Симптомы болезни наводят на мысль, что Георг III страдал от острой перемежающей порфирии.

Одна из редких форм порфирии приводит к накоплению уропорфириногена I, предшественника протопорфирина. Это вещество окрашивает мочу в красный цвет, вызывает сильную флуоресценцию зубов в ультрафиолетовом свете и делает кожу болезненно чувствительной к солнечному свету. Многие из таких больных также страдают анемией, потому что у них синтезируется недостаточно гема. Это генетическое расстройство легло в основу мифов о вампирах в народных легендах.

Симптомы многих форм порфирий сейчас успешно контролируются изменением питания или добавлением в пищу гема или производных гема.



α-амино-β-кетоадипата, который затем декарбоксилируется до δ-аминолевулината. У растений, водорослей и большинства бактерий δ-аминолевулинат образуется из глутамата (рис. 22-23, *б*). Глутамат сначала превращается в глутамил-тРНК^{Glu} (см. гл. 27, т. 3, о транспортных РНК), который восстанавливается под действием NADPH до глутамат-1-полуальдегида и полуальдегид отщепляется от тРНК. Превращение глутамат-1-полуальдегида в δ-аминолевулинат осуществляет аминотрансфераза.

У всех организмов две молекулы δ-аминолевулината конденсируются с образованием порфобилиногена, и через ряд сложных ферментативных реакций четыре молекулы порфобилиногена соединяются вместе с образованием **протопорфирина (рис. 22-24)**. После того как собран протопорфирин, в него включается атом железа

в реакции, катализируемой феррохелатазой. У высших эукариот биосинтез порфирина регулируется концентрацией гема, который служит ингибитором первых стадий синтетического пути по принципу отрицательной обратной связи. Генетические дефекты биосинтеза порфиринов могут вести к накоплению интермедиатов пути, что вызывает различные болезни человека, известные под общим названием **порфирии** (доп. 22-2).

Гем — источник желчных пигментов

Гем (порфириновая группа гемоглобина, содержащая железо), высвобождающийся при гибели эритроцитов в селезенке, распадается с образованием свободного Fe^{3+} и в итоге **билирубина**. Внимание к этому пути обусловлено окраской билирубина.

Первая реакция этого двухстадийного пути катализируется гем-оксигеназой (НО — от англ. ***heme oxygenase***), превращающей гем в биливердин, молекула которого содержит четыре пиррольных цикла, соединенных в линейную цепочку (**рис. 22-25**). Другие продукты этой реакции — свободный ион железа Fe^{3+} и CO. Железо Fe^{3+} быстро связывается с ферритином. Монооксид углерода опасен для здоровья, поскольку связывается с гемоглобином (см. доп. 5-1, т. 1); из-за гем-оксигеназной активности, приводящей к образованию CO, около 1% гема организма связано с CO даже в отсутствие вредных условий в окружающей среде.

Биливердин превращается в билирубин на второй стадии, катализируемой биливердинредуктазой. Эта реакция всем хорошо знакома: при сильном ушибе синяк имеет черный и/или пур-

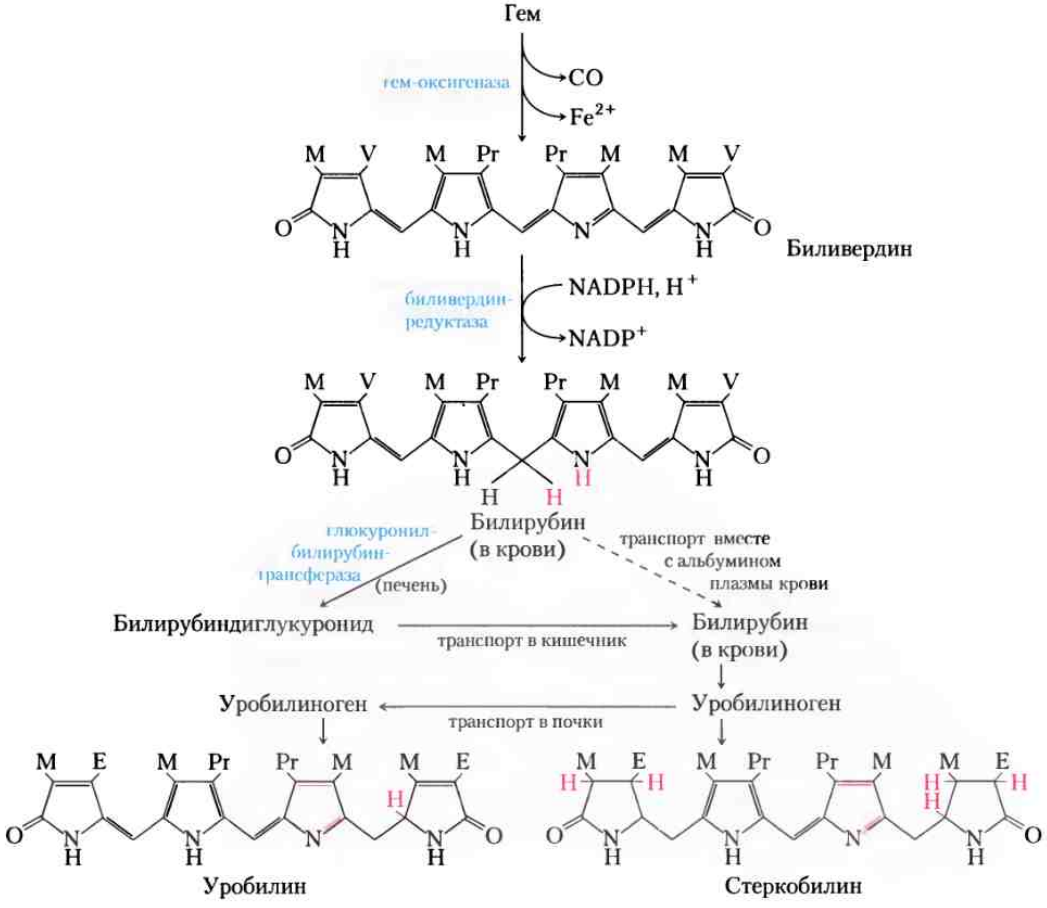


Рис. 22-25. Билирубин и продукты его распада. M — метил; V — винил; Pr — пропионил; E — этил. Для простоты сравнения все структуры приведены в виде линейных цепочек из пиррольных колец, а не в реальной стереохимической конформации.

пурный цвет из-за гемоглобина, высвободившегося из поврежденных эритроцитов; со временем цвет становится зеленым из-за биливердина, а потом желтым из-за билирубина. Билирубин очень плохо растворим, поэтому он транспортируется кровотоком как комплекс с белком плазмы крови альбумином. В печени билирубин превращается в желчный пигмент билирубин-диглюкуронид. Это вещество достаточно растворимо в воде, чтобы секретироваться вместе с остальными компонентами желчи в тонкий кишечник, где бактериальные ферменты катализируют его превращение в другие продукты, главным образом в уробилиноген. Некоторые количества уробилиногена снова всасываются в кровь и транспортируются к почкам, где происходит превращение в уробилин — вещество, которое обеспечивает моче желтый цвет (рис. 22-25, *левая ветвь*). Уробилиноген, оставшийся в кишечнике, превращается (в другой реакции, осуществляемой микробами) в стеркобилин (рис. 22-25, *правая ветвь пути*), который придает коричневый цвет фекалиям.

Ухудшение работы печени или блокировка выделения желчи вызывает «утечку» билирубина из печени в кровь, что проявляется в пожелтении кожи и глазных яблок — желтуха. Анализ крови на билирубин делают при диагностике заболеваний печени. У новорожденных желтуха развивается потому, что у них еще не хватает глюкоронилбилирубинтрансферазы. Обычно с целью удаления избыточного билирубина младенцам назначают освещение флуоресцентной лампой, при этом происходят фотохимические реакции и билирубин превращается в более растворимые соединения, которые легче выводятся из организма.

Эти пути распада гема играют важную роль при защите клеток от окислительного повреждения, а также при регулировании определенных клеточных функций. Монооксид углерода CO, образованный в гем-оксигеназной реакции, токсичен при высоких концентрациях, но при очень низких концентрациях, достигаемых при деградации гема, он выполняет некоторые регуляторные и/или сигнальные функции. Он оказывает сосудорасширяющий эффект (но не такой мощный, как монооксид азота); об этом речь пойдет ниже. В небольших количествах CO также действует как регулятор при передаче нервных импульсов. Билирубин — часто встречающийся антиоксидант в тканях млекопитающих, именно он в основном определяет антиоксидантную активность плазмы. Эта защитная функция имеет особое значение в период развития мозга у новорожденных. Токсичность билирубина, проявляющаяся при желтухе, может быть вызвана его избытком по сравнению с альбумином плазмы, который связывает его.

Учитывая эти весьма различающиеся роли продуктов распада гема, путь его деградации жестко регулируется, главным образом на первой стадии. У человека обнаружены по крайней мере три формы изозима гем-оксигеназы (HO). HO-1 регулируется в высокой степени: экспрессия этого гена индуцируется в широком диапазоне различных стрессовых ситуаций (механическое воздействие, ангиогенез — неконтролируемое развитие кровеносных сосудов, гипоксия, гипероксия, тепловой шок, действие ультрафиолетового излучения, действие пероксида водорода и множество других метаболических повреждений). HO-2 найдена главным образом в мозге и яичках, где она экспрессируется непрерывно. Третий изозим, HO-3, недостаточно охарактеризован. ■

Аминокислоты — предшественники креатина и глутатиона

Фосфокреатин, образующийся из **креатина**, действует как важный энергетический буфер в скелетных мышцах (см. рис. 13-15). Креатин синтезируется из глицина и аргинина (**рис. 22-26**); метионин в виде S-аденозилметионина служит донором метильной группы.

Глутатион (GSH) присутствует в растениях, животных и некоторых бактериях, часто в высоких концентрациях, и считается окислительно-восстановительным буфером. Он синтезируется из глицина, глутамата и цистеина (**рис. 22-27**). γ-Карбоксильная группа глутамата активируется ATP с образованием ацилфосфатного интермедиата, который затем атакуется α-аминогруппой цистеина. После этого следует вторая реакция конденсации, в которой α-карбоксильная группа цистеина активируется ацилфосфатом, что позволяет ей взаимодействовать с глицином. Окисленная форма глутатиона (GSSG), продуцируемая в

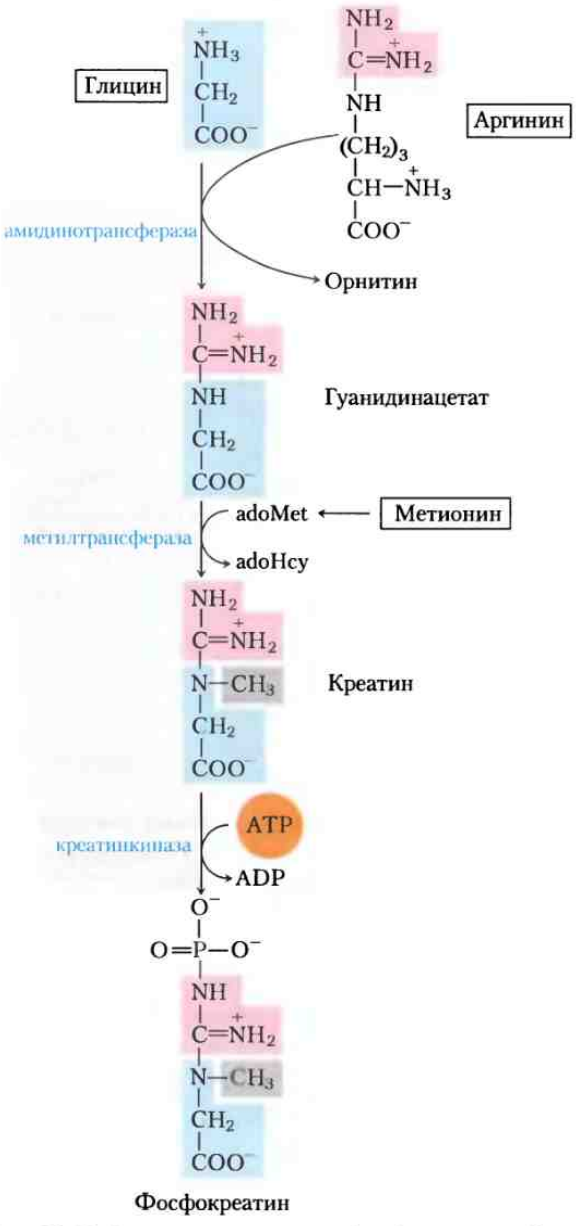


Рис. 22-26. Биосинтез креатина и фосфокреатина. Креатин синтезируется из трех аминокислот: глицина, аргинина и метионина. Этот путь показывает, что аминокислоты могут быть предшественниками в биосинтезе и других азотсодержащих биомолекул.

случае его окислительно-восстановительной активности, содержит две молекулы глутатиона, соединенные дисульфидным мостиком.

Возможно, глутатион позволяет поддерживать сульфгидрильные группы белков в восстановленном состоянии, а железо гема в двухвалентном состоянии (Fe^{2+}) и служит восстанавливающим агентом для глутаредоксина при синтезе дезоксирибонуклеотидов (см. рис. 22-39). Его окислительно-восстановительные свойства также используются для удаления токсичных пероксидов, образованных при нормальном развитии при аэробных условиях:

$$2\,GSH + R{-}O{-}O{-}H \rightarrow GSSG + H_2O + R{-}OH$$

Эта реакция катализируется **глутатионпероксидазой**, ферментом, который примечателен тем, что содержит атом селена (Se), включенный в селеноцистеин (см. рис. 3-8, *а*) и необходимый для его активности.

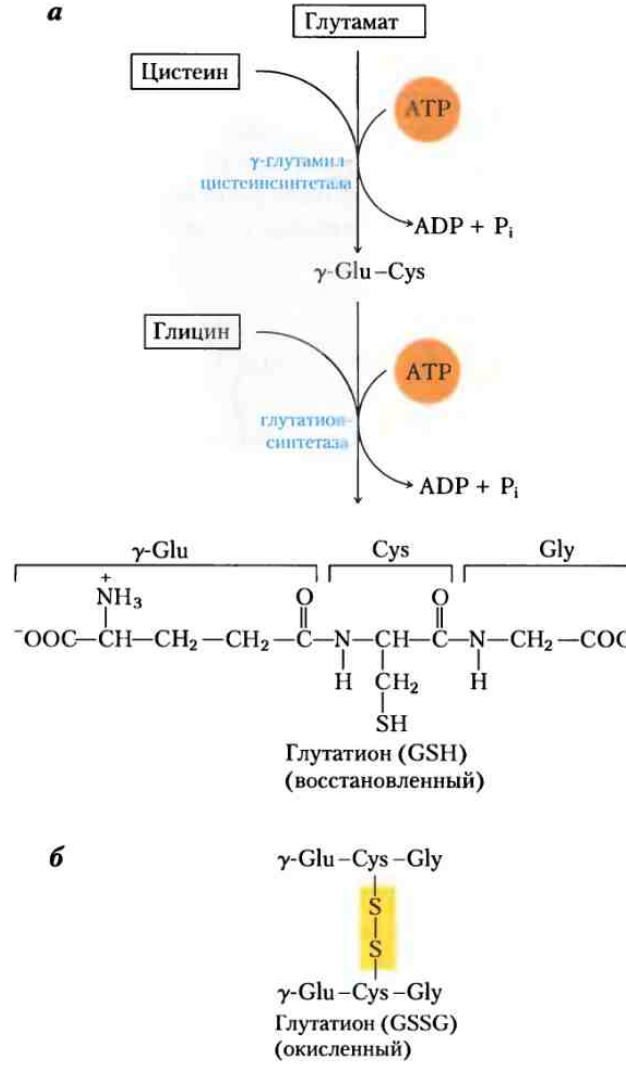
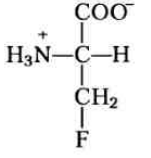


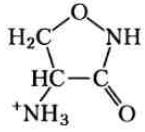
Рис. 22-27. Метаболизм глутатиона. *а* — биосинтез глутатиона. *б* — восстановленная форма глутатиона.

D-Аминокислоты найдены главным образом у бактерий

В белках D-аминокислоты обычно не встречаются, однако они выполняют некоторые специальные функции в структуре бактериальной клеточной стенки и входят в состав пептидных антибиотиков. Бактериальный пептидогликан (см. рис. 20-31) содержит D-аланин и D-глутамат. D-Аминокислоты образуются из L-изомеров под действием рацемаз аминокислот, которые в качестве кофактора используют пиридоксальфосфат (см. рис. 18-6). Не вызывает сомнений, что в настоящее время рацемизация аминокислот имеет большое значение для метаболизма бактерий, поэтому ферменты, такие как аланинрацемаза, выступают первичными целями для действия фармацевтических агентов. Один из таких агентов, **L-фтораланин**, был проверен в качестве антибактериального лекарства. Другой, **циклосерин**, используется при лечении туберкулеза. К сожалению, эти ингибиторы также воздействуют на некоторые PLP-зависимые ферменты человека, поэтому они могут вызывать нежелательные побочные эффекты. ■



L-Фтораланин



Циклосерин

Ароматические аминокислоты — предшественники многих растительных веществ

У растений фенилаланин, тирозин и триптофан превращаются в ряд важных соединений. **Лигнин** — твердое высокомолекулярное соединение, он образуется из фенилаланина и тирозина, по распространенности в растительных тканях уступает только целлюлозе. Полимерная структура лигнина пока недостаточно изучена. Триптофан служит предшественником гормона роста растений индол-3-ацетата, или **ауксина (рис. 22-28, *а*)**, который участвует в регуляции очень многих биологических процессов в растениях.

Из фенилаланина и тирозина также образуются много коммерчески значимых натуральных продуктов (природных соединений), включая танины, которые тормозят процессы окисления

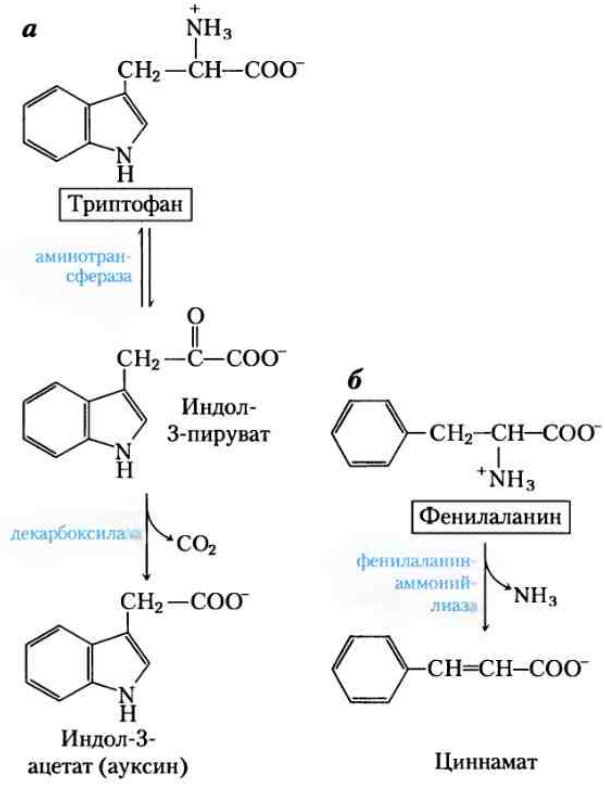


Рис. 22-28. Биосинтез двух характерных для растений веществ из аминокислот. *а* — индол-3-ацетат (ауксин) и *б* — циннамат (вещество, придающее вкус корице).

в винах; алкалоиды, такие как морфин, который оказывает мощное физиологическое действие на организм человека; алкалоиды содержатся также в приправах (корице, мускатном орехе, гвоздике, ванили, красном перце и других).

Биологические амины — продукты декарбоксилирования аминокислот

Многие важные нейромедиаторы представляют собой первичные или вторичные амины, получающиеся из аминокислот по довольно простому пути. Вдобавок некоторые полиамины, которые образуют комплексы с ДНК, синтезируются из аминокислоты орнитина, участника цикла мочевины. Реакция декарбоксилирования, общая для нескольких путей метаболизма, — это другой PLP-зависимый процесс (см. рис. 18-6).

Синтез некоторых нейромедиаторов показан на **рис. 22-29**. Из тирозина образуются вещества семейства катехоламинов: **дофамин**, **норадрена-**

лин и **адреналин**. Помимо всего прочего, уровень катехоламинов коррелирует с изменением кровяного давления. Нервное расстройство болезнь Паркинсона вызывается уменьшенным производством дофамина, и обычно эту болезнь лечат, назначая L-дофа. Усиленное выделение дофамина в мозге может быть связано с такими физиологическими расстройствами, как шизофрения.

При декарбоксилировании глутамата образуется **γ-аминомаслянная кислота (ГАМК)**, тормозной медиатор. Недостаток этого вещества вызывает приступы эпилепсии. При лечении эпилепсии и гипертензии используются аналоги ГАМК. Уровень ГАМК может быть также повышен при употреблении ингибиторов фермента, ответственного за деградацию ГАМК — ГАМК-аминотрансферазы. Другой важный нейромедиатор **серотонин** синтезируется в две стадии из триптофана.

Из гистидина при декарбоксилировании образуется **гистамин**, который оказывает мощное

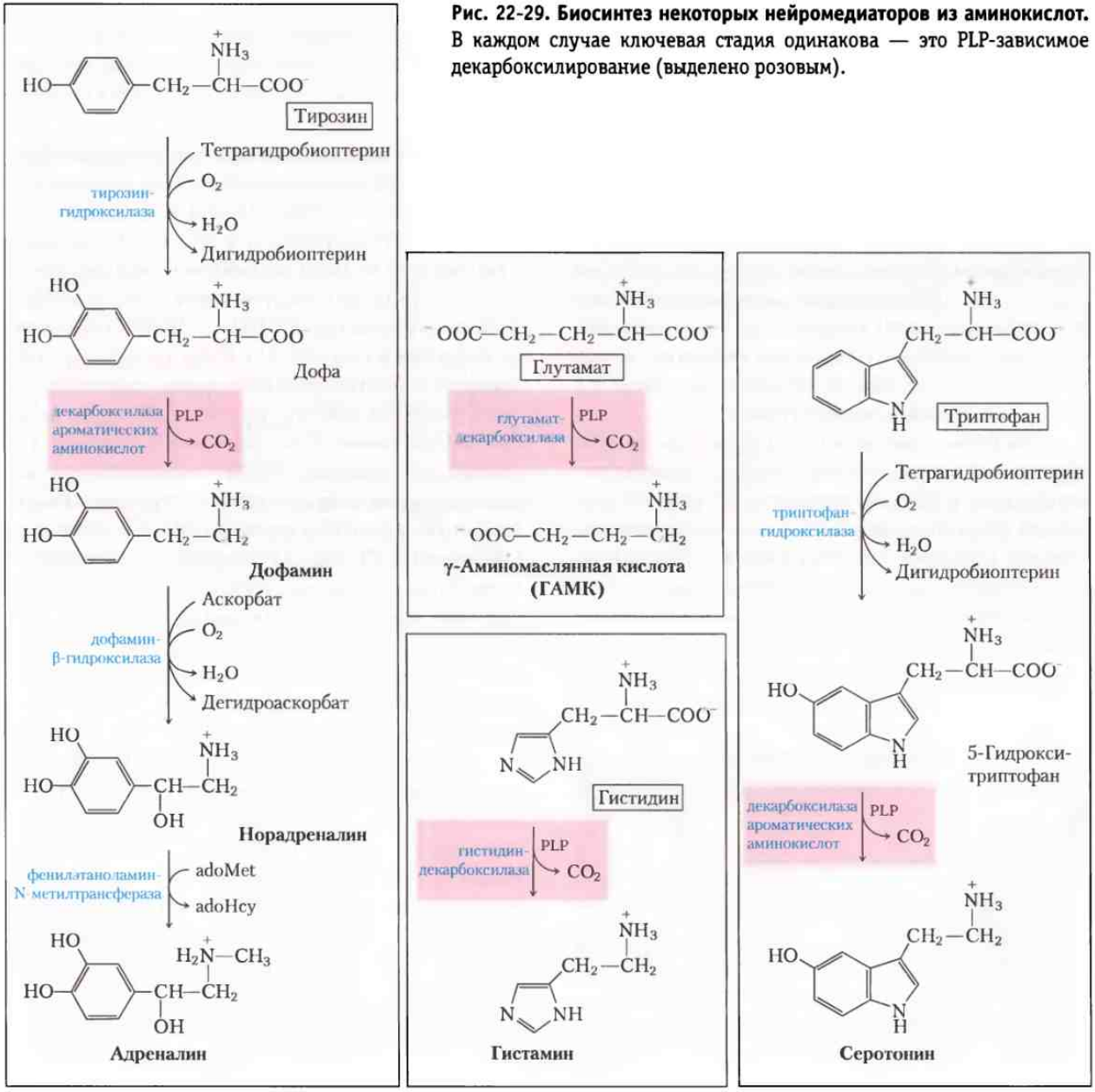


Рис. 22-29. Биосинтез некоторых нейромедиаторов из аминокислот. В каждом случае ключевая стадия одинакова — это PLP-зависимое декарбоксилирование (выделено розовым).

Дополнение 22-3 МЕДИЦИНА Лечение африканской сонной болезни биохимическим «троянским конем»

Африканская сонная болезнь, или африканский трипаносомоз, вызывается простейшими (одноклеточными эукариотами) трипаносомами (рис. 1). Эта болезнь (и родственные болезни, вызываемые трипаносомами) имеет медицинское и экономическое значение во многих развивающихся странах. Совсем недавно это заболевание было практически неизлечимо. Вакцины неэффективны, потому что у этого паразита есть необычный механизм ускользания от иммунной системы хозяина.

Клеточная стенка трипаносом покрыта единственным белком — антигеном, на который отвечает иммунная система. Но время от времени в процессе генетической рекомбинации (см. табл. 28-1, т. 3) некоторые клетки в популяции инфицирующей трипаносомы переключаются на синтез нового белка оболочки и уже не распознаются иммунной системой. Процесс «смены оболочки» может происходить сотни раз. В результате развивается хроническая циклическая инфекция: у зараженного человека наблюдается жар, который затихает, как только иммунная система отбивает первую инфекцию, затем трипаносомы с изменившейся оболочкой вызывают следующую инфекцию, и жар возвращается. Этот цикл может длиться неделями, и в итоге ослабленный больной погибает.

Некоторые современные подходы при лечении африканской сонной болезни основаны на понимании метаболизма и действия ферментов. По крайней мере в одном из способов лечения используются фармацевтические препараты, разработанные как инактиваторы, основанные на механизме работы фермента (суицидные инактиваторы, или необратимые ингибиторы; с. 298, т. 1). Уязвимой точкой метаболизма трипаносом является путь биосинтеза полиаминов. Быстроделящимся клеткам требуются в больших количествах полиамины спермин и спермидин, используемые при упаковке ДНК. Первая стадия их синтеза катализируется PLP-зависимым ферментом орнитинкарбоксилазой (см. рис. 22-30). В клетках млекопитающих орнитиндекарбоксилаза находится в постоянном обороте, т. е. фермент постоянно синтезируется и разрушается. Однако у некоторых трипаносом по не вполне понятным причинам фермент довольно стабилен и заменяется заново синтезированным довольно медленно. Ингибитор орнитиндекарбоксилазы, который надолго связывается с ферментом, слабо влияет на клетки человека, где инактивированный фермент быстро заместится новой молекулой, но сильно навредит клеткам паразита.

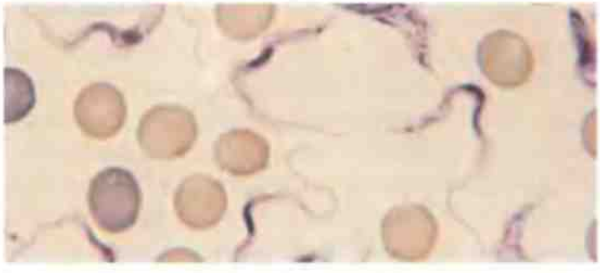


Рис. 1. *Trypanosoma brucei rhodesiense*, одна из нескольких известных трипаносом, который вызывают африканскую сонную болезнь.

Первые несколько стадий орнитиндекарбоксилазной реакции показаны на рис. 2. При удалении CO_2 поток электронов разворачивается в обратную сторону и образуется путресцин (см. рис. 22-30). На основе этого механизма было разработано несколько необратимых суицидных инактиваторов, один из которых дифторметилорнитин (ДФМО). ДФМО относительно инертный в растворе. Но, когда это вещество связывается с орнитиндекарбоксилазой, фермент быстро инактивируется (рис. 3). Ингибитор действует, вызывая альтернативный сток электронов в виде двух подходяще расположенных атомов фтора, которые служат великолепными «проводящими» группами. Вместо того, чтобы электронам перемещаться на циклическую структуру (PLP), реакция заканчивается замещением атома фтора. Атом серы остатка Cys в активном центре фермента затем образует ковалентный комплекс с высокореакционноспособным аддуктом PLP и ингибитора — абсолютно необратимая реакция. Таким образом, ингибитор использует собственный механизм ферментативной реакции для того, чтобы остановить процесс.

В клинических испытаниях ДФМО показал высокую эффективность против африканской сонной болезни и сейчас используется при лечении африканской сонной болезни, вызванной *T. brucei gambiense*. Подходы к терапии инфекций, подобные показанному здесь, обещают большие успехи в лечении широкого ряда заболеваний. Разработка препаратов, основанная на механизме ферментативной реакции и на строении ферментативного комплекса может дополнить традиционные методы проб и ошибок в развивающейся фармацевтике.

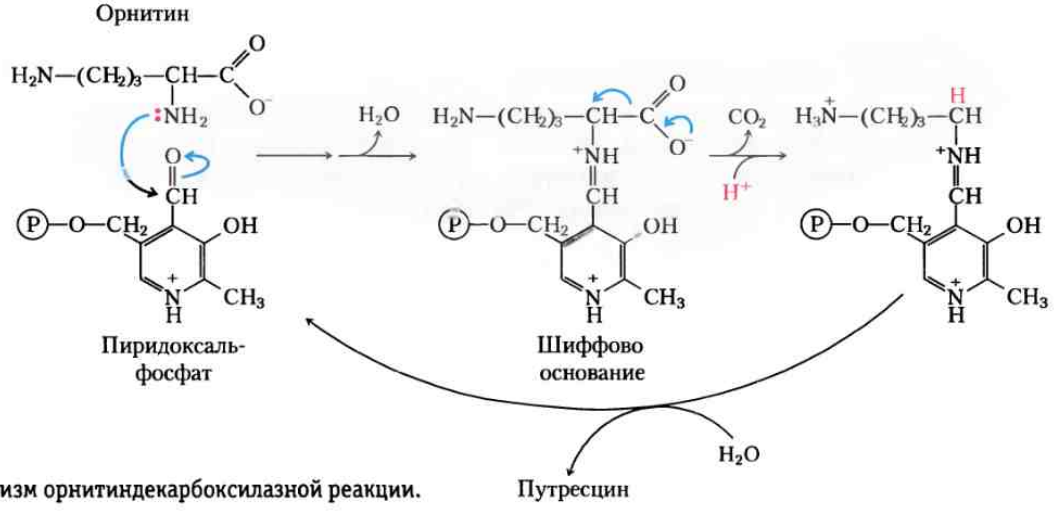


Рис. 2. Механизм орнитиндекарбоксилазной реакции.

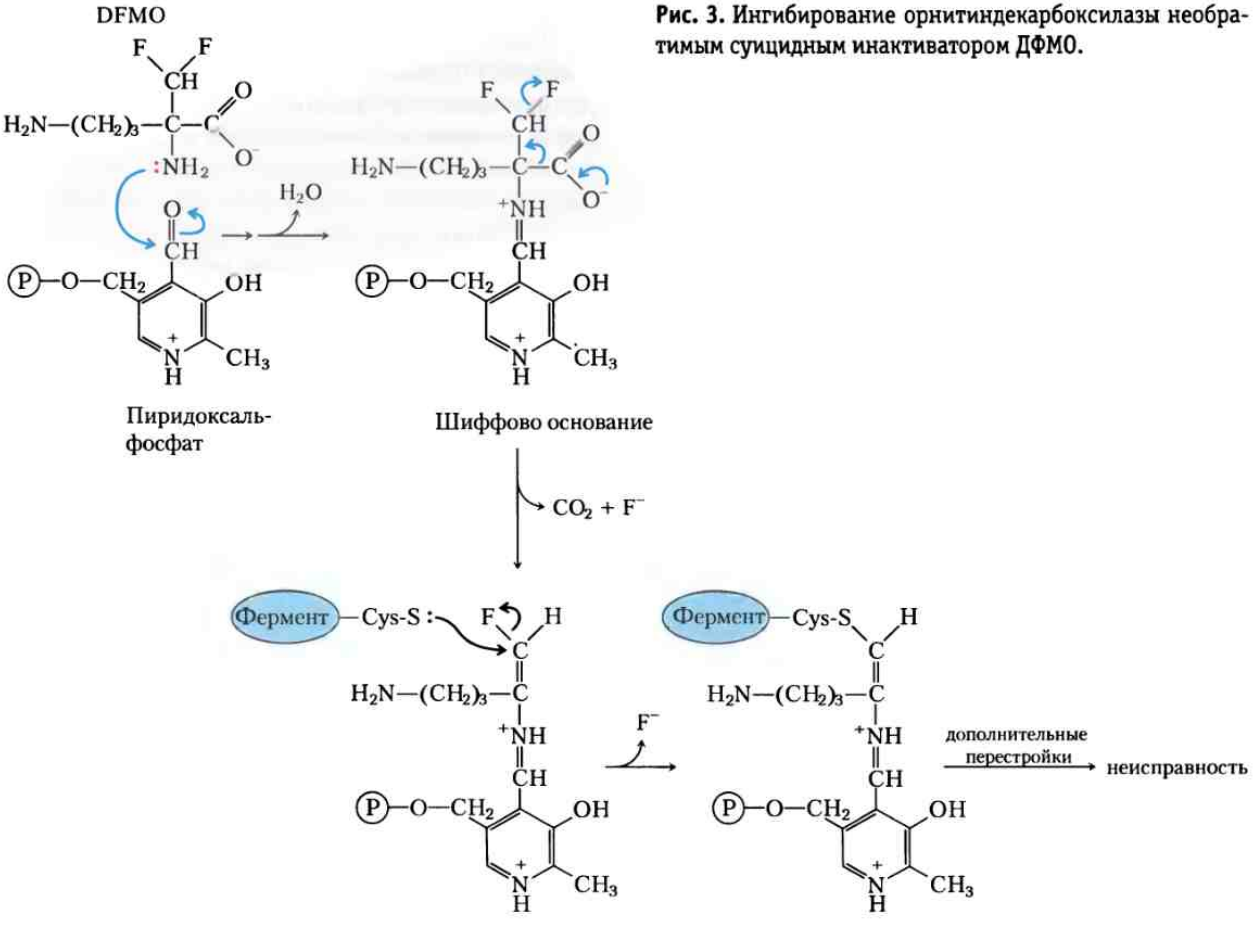
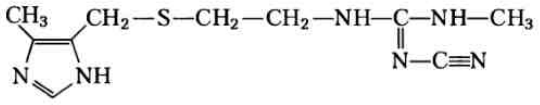


Рис. 3. Ингибирование орнитиндекарбоксилазы необратимым суицидным инактиватором ДФМО.

сосудорасширяющее действие в тканях животных. Гистамин высвобождается в больших количествах при аллергических реакциях, он также стимулирует секрецию кислоты в желудке. Ведется активная разработка антигистаминных препаратов широкого спектра действия, тем не менее все они так или иначе влияют на синтез или накопление гистамина. Известный пример антагониста гистаминового рецептора — **циметидин** (Тагамет), структурный аналог гистамина:



Его назначают при язве двенадцатиперстной кишки, чтобы ингибировать секрецию кислоты в желудке.

Полиамины, такие как **спермин** и **спермидин**, участвуют в упаковке ДНК. Они образуются из метионина и орнитина в пути, показанном на **рис. 22-30**. Первая стадия — декарбоксилирование орнитина, предшественника аргинина (рис. 22-10). **Орнитиндекарбоксилаза**, PLP-зависимый фермент, ингибируется некоторыми мощными лекарственными препаратами (доп. 22-3). ■

Аргинин — предшественник оксида азота в биологическом синтезе

Удивительным открытием в середине 1980-х гг. было выяснение роли в живых организмах монооксида азота NO, ранее известного главным образом как компонент смога. Это газообразное вещество выполняет функцию важного биологического мессенджера. Монооксид азота легко диффундирует через мембраны, хотя из-за своей высокой реакционной способности расстояние, на которое NO может диффундировать, составляет всего ~1 мм от места его синтеза. У человека NO играет важную роль в ряде физиологических процессов, включая передачу нервного импульса, свертывание крови и контроль кровяного давления. Способ действия NO описан в гл. 12 (с. 628, т. 1).

Монооксид азота синтезируется из аргинина в NADPH-зависимой реакции, катализируемой синтазой оксида азота (**рис. 22-31**), димерная молекула которой структурно схожа с цитохром-P-450-редуктазой (см. доп. 21-1). Реакция представляет собой окисление с участием пяти электронов. Каждая субъединица фермента связывает по одной молекуле каждого из четырех разных кофакторов: FMN, FAD, тетрагидроптерин и гемовое железо Fe^{3+}. NO — нестабильная

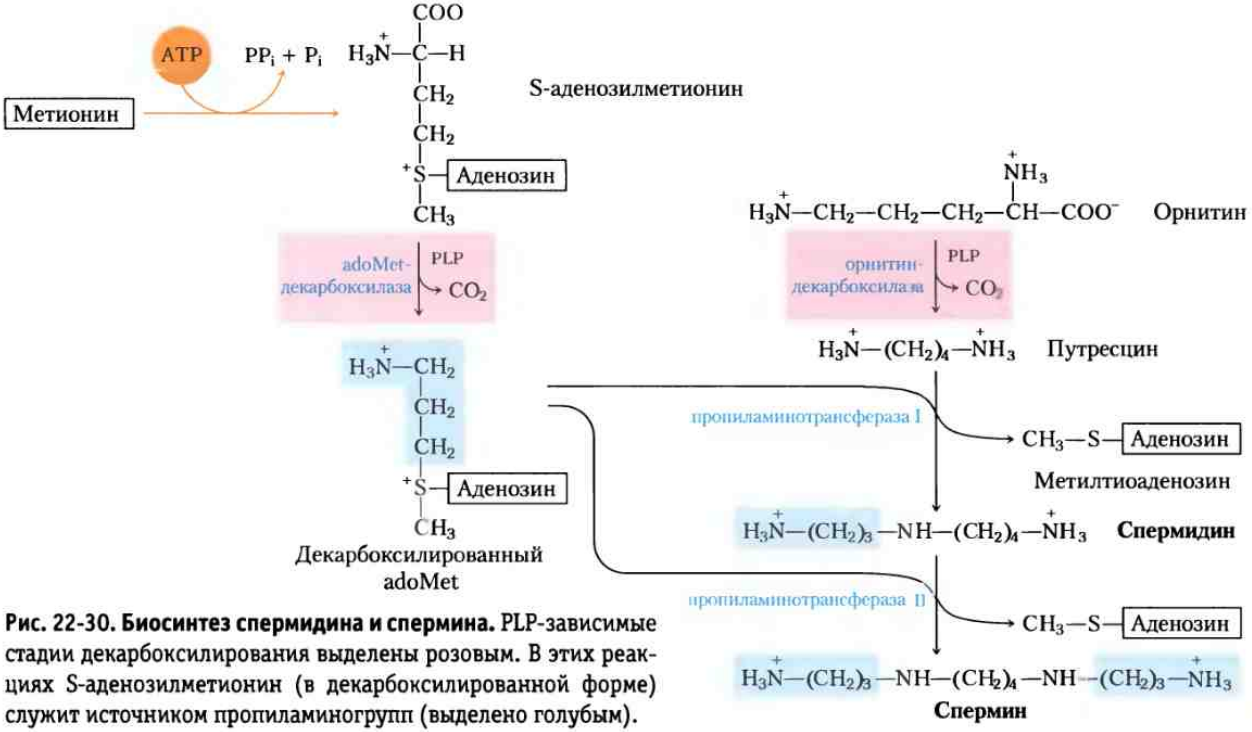


Рис. 22-30. Биосинтез спермидина и спермина. PLP-зависимые стадии декарбоксилирования выделены розовым. В этих реакциях S-аденозилметионин (в декарбоксилированной форме) служит источником пропиламиногрупп (выделено голубым).

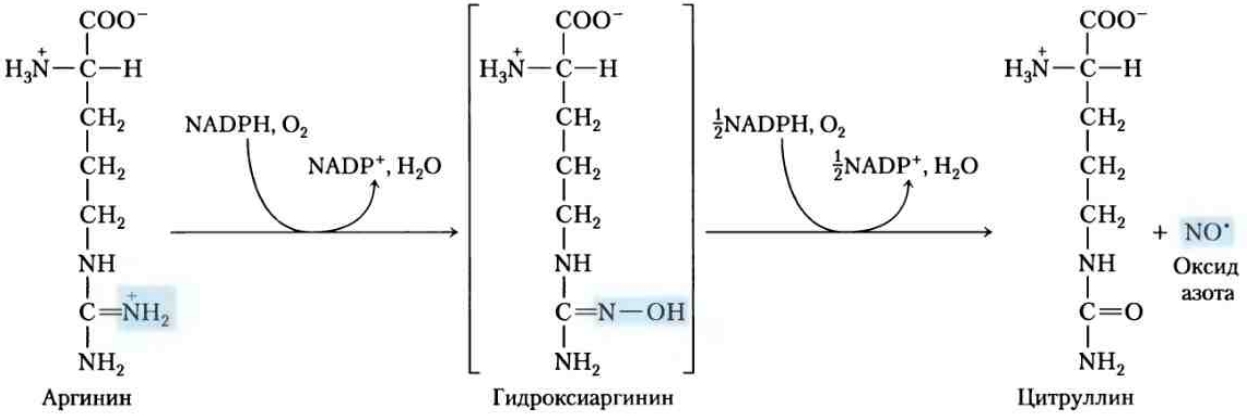


Рис. 22-31. Биосинтез монооксида азота. Обе стадии катализируются синтазой оксида азота. Атом азота в молекуле NO поступает от гуанидиновой группы аргинина.

молекула и не может запасаться. Ее синтез стимулируется взаимодействием синтазы NO с Ca^{2+}-кальмодулином (см. рис. 12-21, т. 1).

Краткое содержание раздела 22.3 ПРОИЗВОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТ

- Большинство важных биомолекул образуется из аминокислот. Глицин является предшественником порфиринов. Деградация железосодержащего порфирина (гема) вызывает образование билирубина, который превращается в желчные пигменты, выполняющие ряд физиологических функций.
- Энергетические буферы креатин и фосфокреатин синтезируются из глицина и аргинина. Глутатион, образующийся из трех разных аминокислот, служит важным восстанавливающим агентом в клетке.
- Бактерии синтезируют D-аминокислоты из L-аминокислот в реакции рацемизации, осуществляющейся с использованием пиридоксальфосфата (PLP).
- Ароматические аминокислоты служат источником многих специфических для растений веществ. При PLP-зависимом декарбоксилировании некоторых аминокислот образуются важные биологические амины, включая нейромедиаторы.
- Аргинин играет роль предшественника оксида азота, биологического мессенджера.

22.4. Биосинтез и деградация нуклеотидов

Как было описано в гл. 8 (т. 1), нуклеотиды играют ряд важных ролей в клетке. Они служат предшественниками ДНК и РНК. Они необходимы при переносе энергии — в первую очередь ATP, а также в некоторой степени GTP. Они входят в состав кофакторов NAD, FAD, S-аденозилметионина и кофермента A и в активированные интермедиаты биосинтеза, такие как UDP-глюкоза и CDP-диацилглицерин. Некоторые нуклеотиды, например cAMP и cGMP, представляют собой вторичные мессенджеры.

Получение нуклеотидов может идти двумя путями: **синтез *de novo*** и **путь реутилизации**. Синтез нуклеотидов *de novo* начинается с их метаболических предшественников: аминокислот, рибозо-5-фосфата, CO_2 и NH_3. При реутилизации повторно используются свободные основания и нуклеотиды, образованные при распаде нуклеиновых кислот. Оба пути биосинтеза важны для клеточного метаболизма и рассмотрены далее в этой главе.

Вероятно, синтез пуринов и пиримидинов *de novo* практически одинаков у всех живых организмов. Примечательно, что гуанин, аденин, тимин, цитидин и урацил *не* интермедиаты этого пути, т. е. не происходит синтез, а затем присоединение оснований к рибозе, как это можно было бы ожидать. Пуриновое кольцо «строится» непосредственно присоединением к рибозе одного или нескольких атомов один раз за весь цикл биосинтеза. Пиримидиновое кольцо синтезируется в виде **оротата**, который присоединяется к рибозофосфату,

а затем превращается в общие пиримидиновые нуклеотиды, нужные для синтеза нуклеиновых аминокислот. Свободные основания не участвуют в синтезе *de novo*, они появляются как интермедиаты в некоторых путях реутилизации.

Некоторые важные предшественники участвуют в синтезе *de novo* и пуринов, и пиримидинов. Фосфорибозилпирофосфат (PRPP) **важную роль** в синтезе и тех и других, и в отличие от биосинтеза триптофана и гистидина в нуклеотиде в итоге остается молекула рибозы, как было показано ранее. При синтезе нуклеотидов главное — это аминокислота — глицин для пуринов, аспартат для пиримидинов.Глутамин опять служит самым важным источником аминогрупп — на пяти различных стадиях путей *de novo*. Аспартат также используется в качестве донора аминогруппы в двух реакциях при синтезе пуринов.

Две особенности синтеза нуклеотидов заслуживают внимания. Во-первых, ферменты в клетках представлены большими полиферментными комплексами, особенно те, которые участвуют в синтезе пуринов *de novo*, и об этом мы будем часто говорить при обсуждении метаболизма. Во-вторых, клеточный пул нуклеотидов (всех, кроме АТР) довольно невелик и составляет, вероятно, ~1% или менее нужного количества для синтеза клеточной ДНК. Поэтому клетки должны продолжать синтезировать нуклеотиды и во время образования нуклеиновых кислот, а в некоторых случаях синтез нуклеотидов может лимитировать скорость репликации ДНК и транскрипции. Из-за важности этих биологических процессов для делящейся клетки препараты, ингибирующие синтез нуклеотидов, получили заслуженное признание в современной медицине.

Мы рассмотрим здесь биосинтетические пути пуринов и пиримидинов и их регуляцию, образование дезоксинуклеотидов и распад пуринов и пиримидинов до мочевой кислоты и мочевины. Закончим наше обсуждение изучением химиотерапевтических агентов, которые влияют на синтез нуклеотидов.

Синтез нуклеотидов *de novo* начинается с PRPP

Два основных пуриновых нуклеотида, входящих в состав нуклеиновых кислот, аденозин-5′-монофосфат (AMP; аденилат) и гуанозин-5′-монофосфат (GMP; гуанилат) содержат пуриновые основания аденин и гуанин. На **рис. 22-32** показано происхождение атомов углерода и азота в пуриновом кольце — установлено Джоном Бьюкененом на птицах в экспериментах с использованием изотопных меток. Детализированный путь биосинтеза пуринов был выявлен главным образом Бьюкененом и Дж. Робертом Гринбергом в 1950-х гг.

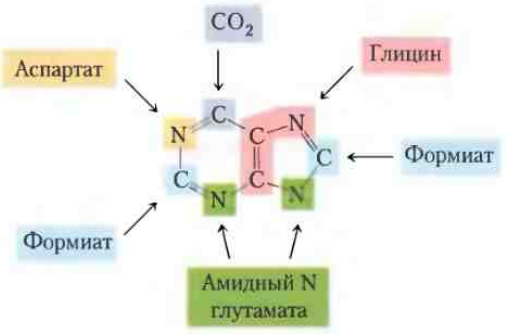


Рис. 22-32. Происхождение атомов пуринового кольца. Данные были получены из экспериментов с предшественниками, содержащими радиоактивную метку ^{14}C или ^{15}N. Формиат — в виде N^{10}-формилтетрагидрофолата.

На первой стадии этого пути аминогруппа от глутамата присоединяется к С-1 атому PRPP (**рис. 22-33**). Образованный **5-фосфорибозиламин** очень неустойчив, при pH 7,5 время полураспада 30 с. Затем на этой структуре достраивается пуриновое кольцо. Описанный здесь путь у всех организмов одинаков, кроме одной стадии, которая отличается у высших эукариот, как будет показано ниже.

Вторая стадия — это присоединение трех атомов глицина (рис. 22-33, стадия ②). В этой реакции конденсации на активацию карбоксильной

Джон Бьюкенен

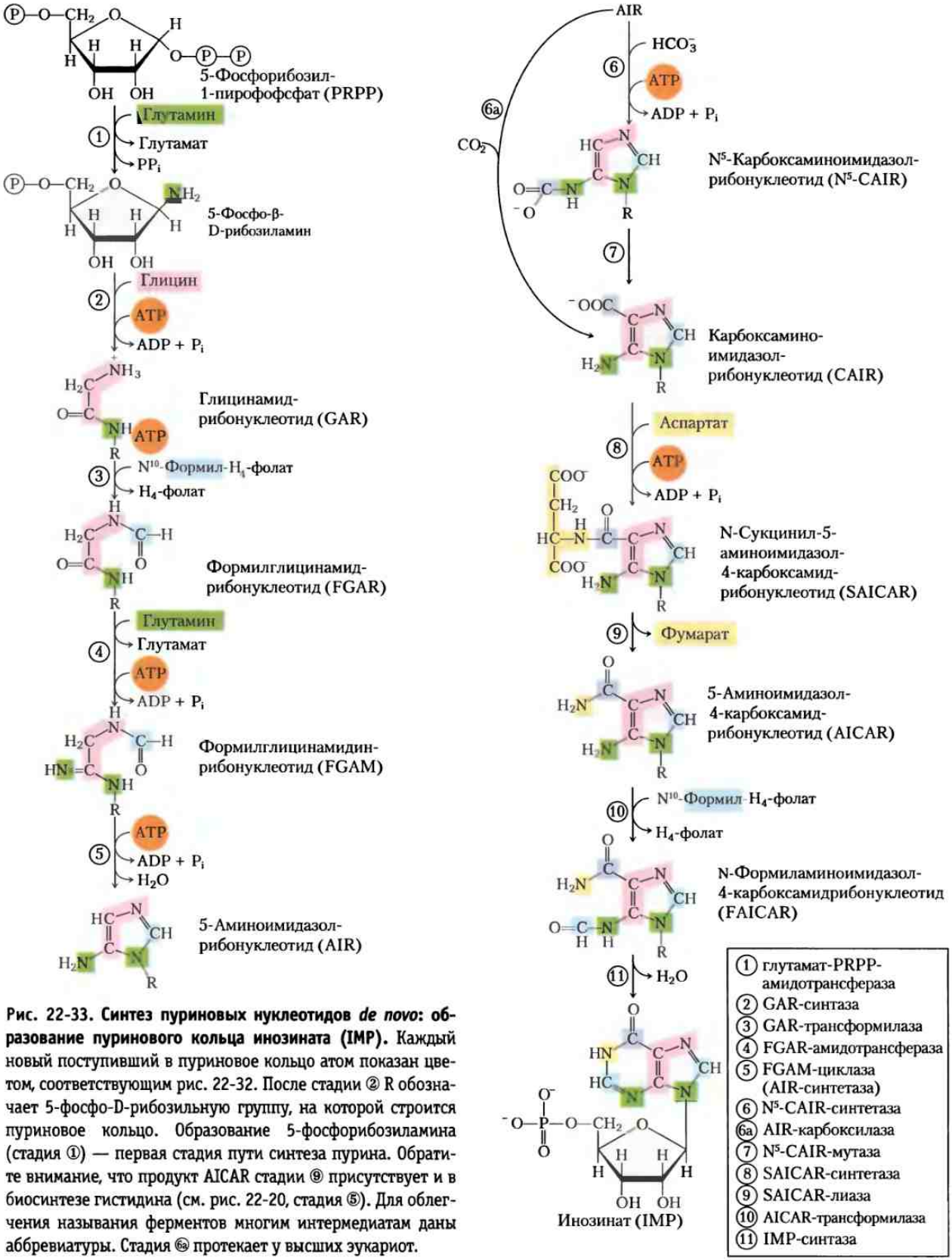


Рис. 22-33. Синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*: образование пуринового кольца инозината (IMP). Каждый новый поступивший в пуриновое кольцо атом показан цветом, соответствующим рис. 22-32. После стадии ② R обозначает 5-фосфо-D-рибозильную группу, на которой строится пуриновое кольцо. Образование 5-фосфорибозиламина (стадия ①) — первая стадия пути синтеза пурина. Обратите внимание, что продукт AICAR стадии ⑨ присутствует и в биосинтезе гистидина (см. рис. 22-20, стадия ⑤). Для облегчения называния ферментов многим интермедиатам даны аббревиатуры. Стадия ⑥a протекает у высших эукариот.

группы глицина (в виде ацилфосфата) тратится ATP. Затем к аминогруппе глицина добавляется формил от N^{10}-формилтетрагидрофолата (стадия ③), а от глутамина — атом азота (стадия ④), после чего следует реакция дегидратации и замыкание цикла, ведущее к образованию пятичленного имидазольного кольца пуринового ядра, — и получается 5-аминоимидазолрибонуклеотид (AIR; стадия ⑤).

На этой стадии три из шести атомов, необходимых для построения второго кольца в пуриновой структуре, уже на своем месте. Для того чтобы закончить этот процесс, сначала присоединяется карбоксильная группа (стадия ⑥). Это карбоксилирование несколько необычно, так как в реакции используется не биотин, а гидрокарбонат, присутствующий в водном окружении в достаточном количестве. При перегруппировке карбоксилат с внециклической аминогруппы переносится на четвертый атом имидазольного кольца (стадия ⑦). Стадии ⑥ и ⑦ есть у бактерий и грибов. У высших эукариот, и у человека в том числе, 5-аминоимидазолнуклеотид, образованный на стадии ⑤, карбоксилируется непосредственно с образованием карбоксиаминоимидазолрибонуклеотида в одну, а не в две стадии (стадия ⑥а). Фермент, катализирующий эту реакцию, называется карбоксилазой аминоимидазолрибонуклеотида (AIR-карбоксилаза).

В двух последующих стадиях (⑧ и ⑨) аспартат служит донором аминогрупп: происходит образование амидной связи, которое сопровождается удалением углеродного скелета аспартата (в виде фумарата). Вспомните, что аспартат играет аналогичную роль на двух стадиях цикла мочевины (см. рис. 18-10). Последний атом углерода поступает от N^{10}-формилтетрагидрофолата (стадия ⑩), и замыкание второго цикла приводит к образованию второго смежного кольца пуринового ядра (стадия ⑪). Так образуется первый интермедиат **инозинат (IMP)** с полностью готовым пуриновым кольцом.

Как в триптофановом и гистидиновом биосинтетических путях, ферменты, участвующие в синтезе IMP, в клетке организованы в огромный мультиферментный комплекс. Это снова подтверждается существованием отдельных полипептидов с несколькими функциями, в том числе они катализируют непоследовательные стадии данного пути. В эукариотических клетках, от дрожжей до плодовых мушек и кур, стадии ①, ③ и ⑤ (рис. 22-33) катализируются многофункциональным белком. Вдобавок многофункциональный белок катализирует стадии ⑩ и ⑪. У человека многофункциональный фермент совмещает активности AIR-синтазы и SAICAR-синтетазы (стадии ⑥а и ⑧). У бактерий эти активности представлены разными белками, но в их клетках может существовать огромный не-

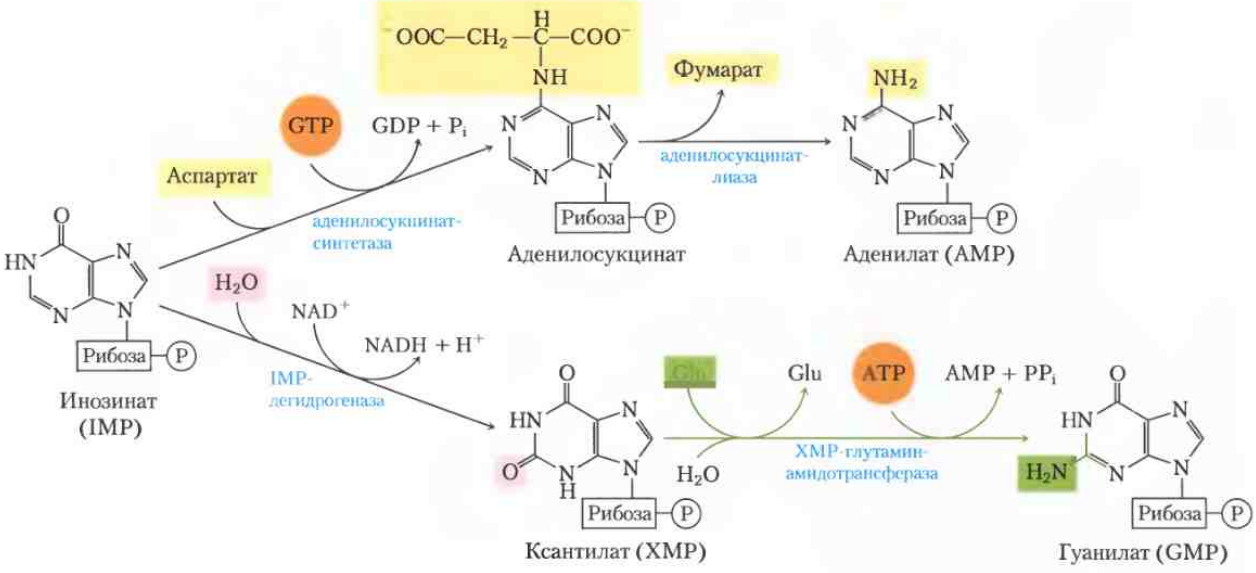


Рис. 22-34. Биосинтез AMP и GMP из IMP.

ковалентно связанный комплекс. Туннелирование интермедиатов реакций от одного фермента к другому, которое возможно благодаря существованию такого комплекса, вероятно, имеет особенно важное значение для неустойчивых интермедиатов, например для 5-фосфорибозиламина.

Для превращения инозината в аденилат необходимо внедрение аминогруппы, полученной от аспартата (**рис. 22-34**); это осуществляется в две стадии, похожие на те, что происходят при включении атома N-1 в пуриновое кольцо (рис. 22-33, стадии ⑧ и ⑨). Главное отличие в том, что для синтеза аденозилсукцината как источник высокоэнергетического фосфата используется GTP, а не ATP. Гуанилат образуется при NAD^+-зависимом окислении инозината, сопровождающимся добавлением аминогруппы, взятой с глутамина. На финальной стадии ATP расщепляется на AMP и PP_i (рис. 22-34).

Биосинтез нуклеотидов регулируется по механизму отрицательной обратной связи

При регуляции общей скорости синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* и отношения скоростей образования двух конечных продуктов аденилата и гуанилата совместно действуют три главных управляющих механизма (**рис. 22-35**). Первый механизм регулирует первую реакцию, которая уникальна для синтеза пуринов, — перенос аминогруппы на PRPP с образованием 5-фосфорибозиламина. Эта реакция катализируется аллостерическим ферментом глутамин-PRPP-амидотрансферазой, которая ингибируется конечными продуктами IMP, AMP и GMP. В этом согласованном ингибировании AMP и GMP действуют совместно, усиливая эффект друг друга. Таким образом, какой бы продукт ни накапливался в избытке, AMP или GMP, первая стадия биосинтеза из PRPP всегда будет частично ингибироваться.

Второй контролирующий механизм, приводимый в действие на более поздней стадии, основан на том, что избыток GMP в клетке ингибирует образование ксантилата из инозината под действием IMP-дегидрогеназы без влияния на образование AMP (рис. 22-35). И наоборот, накопление аденилата ингибирует синтез аденозилсукцината аденозилсукцинатсинтетазой без воздействия на образование GMP. Работу третьего механизма обеспечивает то, что при превращении IMP в AMP необходим GTP (рис. 22-34), в то время как при превращении IMP в GMP требуется ATP — взаиморегуляция, которая поддерживает баланс при синтезе двух рибонуклеотидов.

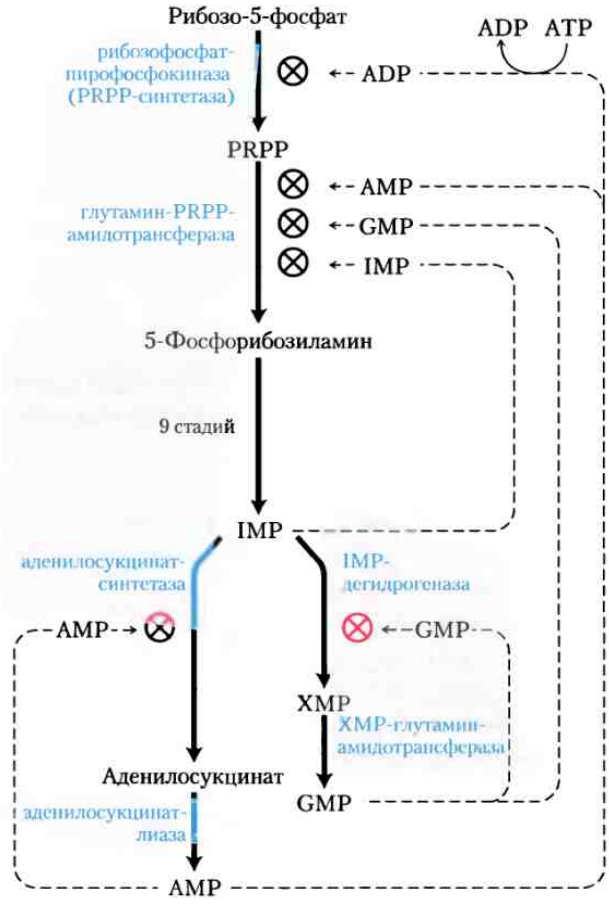
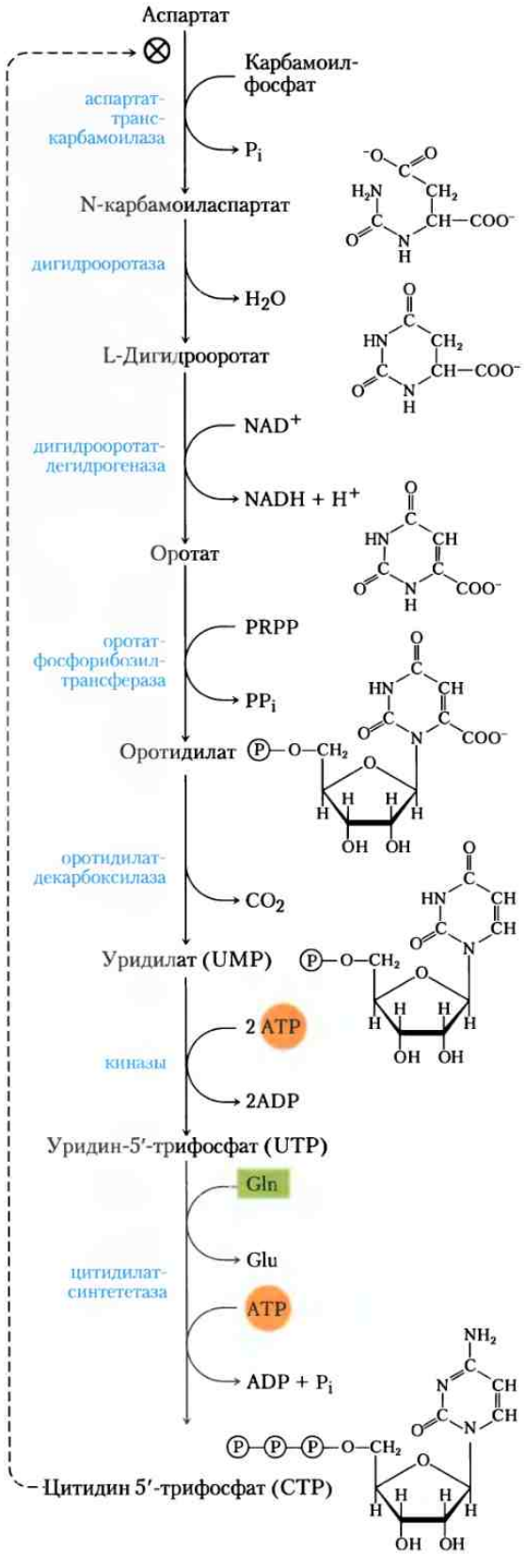


Рис. 22-35. Регуляция биосинтеза адениновых и гуаниновых нуклеотидов у *E. coli*. Регуляция этих путей у других организмов отличается.

Последний механизм контроля — это ингибирование синтеза PRPP аллостерической регуляцией рибозофосфатпирофосфокиназы. Этот фермент, помимо метаболитов других путей, которые начинаются с PRPP, ингибируется еще ADP и GDP.

Пиримидиновые нуклеотиды образуются из аспартата, PRPP и карбамоилфосфата

К обычным пиримидиновым нуклеотидам относятся цитидин-5′-монофосфат (CMP; цитидилат) и уридин-5′-монофосфат (UMP; уридилат), которые содержат пиримидины цитозин и урацил. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов



de novo (**рис. 22-36**) несколько отличается от синтеза пуриновых нуклеотидов; шестичленное пиримидиновое кольцо сначала присоединяется к рибозо-5-фосфату. Для этой реакции необходим карбамоилфосфат, еще один интермедиат цикла мочевины (см. рис. 18-10). Однако, как мы отмечали в гл. 18, нужный для цикла мочевины карбамоилфосфат у животных синтезируется карбамоилфосфатсинтетазой I в митохондриях, в то время как карбамоилфосфат, участвующий в биосинтезе пиримидинов, образуется в цитозоле другой формой фермента, **карбамоилфосфатсинтетазой II**. У бактерий поток карбамоилфосфата и для синтеза аргинина, и для синтеза пиримидина обеспечивает один-единственный фермент. Бактериальный фермент имеет три различных активных центра, разделенные каналом длиной около 100 Å (**рис. 22-37**). Бактериальная карбамоилфосфатсинтетаза дает яркий пример туннелирования нестабильных интермедиатов реакции между активными центрами.

В первой реакции, принадлежащей пути биосинтеза пиримидинов, карбамоилфосфат взаимодействует с аспартатом с образованием N-карбамоиласпартата (рис. 22-36). Эта реакция катализируется **аспартаттранскарбамоилазой**. У бактерий эта стадия жестко регулируется, а бактериальная аспартаттранскарбамоилаза — один из наиболее тщательно изученных аллостерических ферментов (см. ниже). При удалении воды с N-карбамоиласпартата, которое катализирует **дигидрооротаза**, пиримидиновое кольцо замыкается с образованием L-дигидрооротата. Это соединение окисляется до пиримидинового производного оротата в реакции, где NAD^+ служит конечным акцептором электронов. У эукариот первые три фермента этого пути карбамоилфосфатсинтаза II, аспартаттранскарбамоилаза и дигидрооротаза являются частью одного трехфункционального белка CAD. Это белок содержит

Рис. 22-36. Синтез пиримидиновых нуклеотидов *de novo*: биосинтез UTP и CTP через оротидилат. Пиримидин образуется из карбамоилфосфата и аспартата. Затем оротатфосфорилтрансфераза добавляет рибозо-5-фосфат к завершенному пиримидиновому кольцу. Первая стадия этого пути (здесь не показана; см. рис. 18-11, *а*) — синтез карбамоилфосфата из CO_2 и NH_4^+, катализируемый у эукариот карбамоилфосфатсинтетазой II.

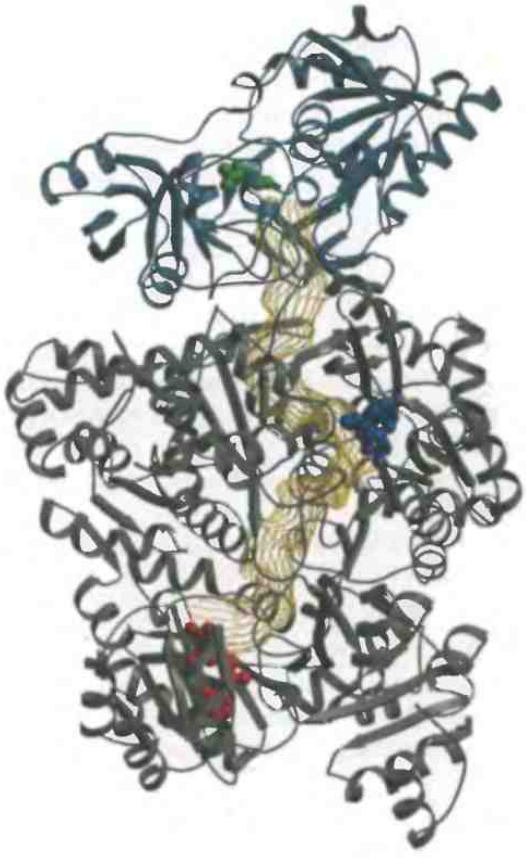


Рис. 22-37. Туннелирование интермедиатов в бактериальной карбамоилфосфатсинтетазе (по PDB 1D 1 M6V). Реакция, катализируемая этим ферментом, показана на рис. 18-11, *а*. Большая и малая субъединицы окрашены серым и голубым соответственно; канал между активными центрами (длиной почти 100 Å) изображен в виде желтой сети. Молекула глутамина (зеленая) связывается с малой субъединицей, в глутамин-амидотрансферазной реакции от нее отщепляется амидный азот в виде NH_4^+. NH_4^+ входит в канал, который ведет ко второму активному центру, где NH_4^+ соединяется с гидрокарбонатом в ATP-зависимой реакции (связанный ADP показан синим). Затем карбамат опять попадает в канал, чтобы достигнуть третьего активного центра, где он фосфорилируется с образованием карбамоилфосфата (связанный ADP показан красным).

три идентичные полипептидные цепи (M_r каждого полипептида 230 000), каждая цепь несет активные центры для всех трех реакций. Отсюда следует, что для этого пути могут быть довольно обычны большие мультиферментные комплексы.

После образования оротата к нему присоединяется боковая цепь рибозо-5-фосфата, которую опять предоставляет PRPP (рис. 22-36). Получаемый при этом оротидилат затем декарбоксилируется до уридилата, который фосфорилируется до UTP. CTP образуется из UTP под действием **цитидилатсинтетазы** через ацилфосфатный интермедиат (с потреблением одной молекулы ATP). Донором азота обычно служит глутамин, хотя во многих случаях цитидилатсинтетазы могут использовать непосредственно NH_4^+.

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов регулируется по механизму отрицательной обратной связи

Регуляция скорости синтеза пиримидиновых нуклеотидов у бактерий происходит главным образом через аспартаттранскарбамоилазу, которая катализирует первую реакцию пути и ингибируется CTP, конечным продуктом этой цепочки реакций (рис. 22-36). Молекула бактериальной аспартаттранскарбамоилазы состоит из шести каталитических субъединиц (см. рис. 6-32, т. 1). Каталитические субъединицы связывают молекулы субстратов, а аллостерические субъединицы связывают аллостерический ингибитор CTP. Молекула аспартаттранскарбамоилазы, как и ее субъединицы, существует в двух различных конформациях — активной и неактивной. Когда CTP не связан с регуляторными субъединицами, фер-

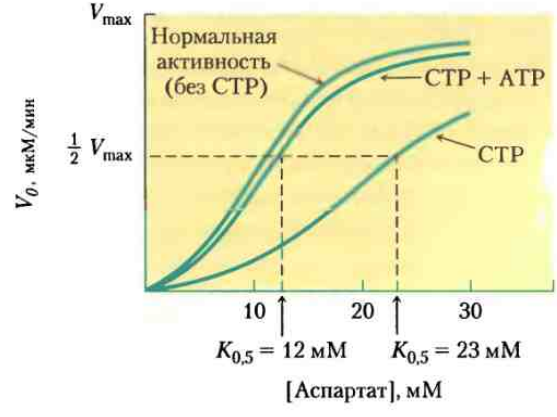


Рис. 22-38. Аллостерическая регуляция аспартаттранскарбамоилазы с помощью CTP и ATP. Добавление 0,8 мМ CTP, аллостерического ингибитора аспартаттранскарбамоилазы, увеличивает $K_{0,5}$ для аспартата (нижняя кривая) и скорость превращения аспартата в N-карбамоиласпартат. Введение 0,6 мМ ATP практически полностью снимает этот эффект (средняя кривая).

мент максимально активен. По мере накопления CTP он связывается с регуляторными субъединицами и меняет их конформацию. Это изменение передается на каталитические субъединицы, которые затем также принимают неактивную конформацию. ATP предотвращает эти изменения, вызванные CTP. На **рис. 22-38** показано влияние аллостерических регуляторов на активность аспартаттранскарбамоилазы.

Нуклеозидмонофосфаты превращаются в нуклеозидтрифосфаты

В биосинтезе нуклеотиды обычно превращаются в нуклеозидтрифосфаты по путям, одинаковым для всех клеток. Фосфорилирование AMP до ADP осуществляется **аденилаткиназой** по реакции

$$ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$$

Образованный ADP фосфорилируется до ATP гликолитическими ферментами в процессе окислительного фосфорилирования.

ATP также участвует в образовании других нуклеозиддифосфатов под действием ферментов **нуклеозидмонофосфаткиназ**. Этот класс ферментов специфичен в основном в отношении конкретного основания, но не специфичен по сахарам (рибоза или дезоксирибоза) и катализируют реакцию:

$$ATP + NMP \rightleftharpoons ADP + NDP$$

Эффективные системы рефосфорилирования ADP до ATP в клетке сдвигают равновесие этой реакции в сторону образования продуктов.

Нуклеозиддифосфаты превращаются в трифосфаты под действием распространенного фермента **нуклеозиддифосфаткиназы**, которая катализирует реакцию

$$NTP_D + NDP_A \rightleftharpoons NDP_D + NTP_A$$

Этот фермент необычен тем, что он неспецифичен ни по основанию (пурин или пиримидин), ни по сахару (рибоза или дезоксирибоза). Такое отсутствие специфичности относится и к акцептору фосфата (A) и к его донору (D), хотя донором (NTP_D) обычно постоянно оказывается ATP, так как в аэробных условиях его в клетке намного больше, чем других нуклеозидтрифосфатов.

Рибонуклеотиды служат предшественниками дезоксирибонуклеотидов

Дезоксирибонуклеотиды, строительные блоки ДНК, образуются из соответствующих рибонуклеотидов непосредственным восстановлением 2′-углеродного атома D-рибозы с образованием 2′-дезоксипроизводного. Например, аденозиндифосфат (ADP) восстанавливается до 2′-дезоксиаденозиндифосфата (dADP), а GDP — до dGDP. Эта реакция в некотором смысле необычна, так как перед восстановлением атом углерода не активируется; другие аналогичные реакции пока неизвестны. Реакция катализируется **рибонуклеотидредуктазой**, наиболее охарактеризованной для *E. coli*, ее субстраты — рибонуклеозиддифосфаты.

Восстановление некоторых остатков D-рибозы в рибонуклеозиддифосфате до 2′-дезокси-D-рибозы происходит с участием двух атомов водорода, которые поставляет NADPH через

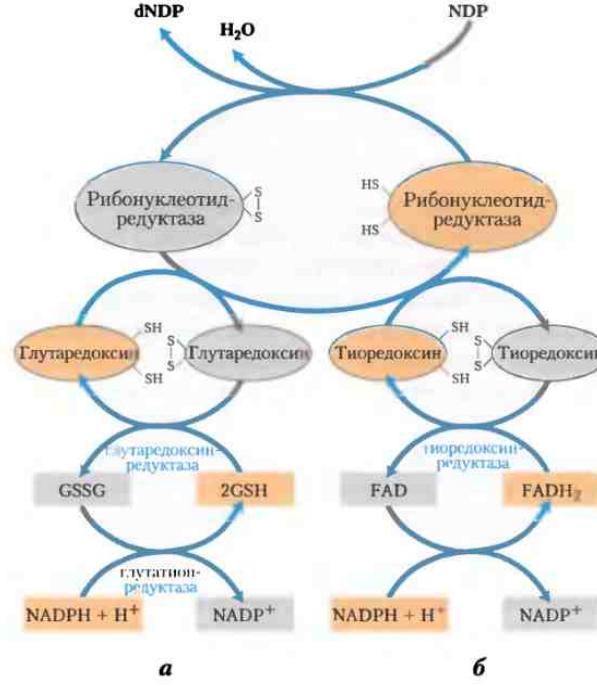


Рис. 22-39. Восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов рибонуклеотидредуктазой. Электроны передаются (синие стрелки) к ферменту от NADPH через (*а*) глутаредоксин или (*б*) тиоредоксин. Сульфидные группы глутаредоксинредуктазы принадлежат связанному глутатиону (GSH; GSSG — окисленный глутатион). Обратите внимание, что тиоредоксинредуктаза — это флавофермент, в котором простетической группой служит FAD.

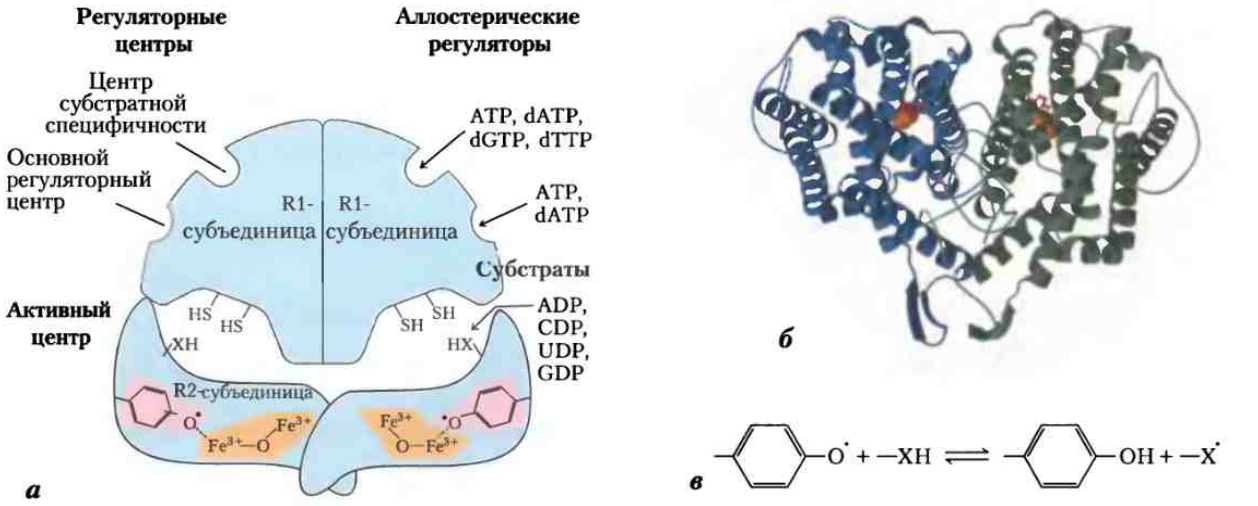


Рис. 22-40. Рибонуклеотидредуктаза. *а* — строение субъединиц. Работа двух регуляторных центров показана на рис. 22-42. Каждый активный центр содержит две тиоловых группы и одну группу –XH, которая может быть преобразована в радикал; это, вероятнее всего, –SH-группа Cys^{439}, который функционирует как тиоловый радикал. *б* — R2-субъединица рибонуклеотидредуктазы *E. coli* (PDB 1D 1 PFR). Остаток тирозина, который работает как тирозиновый радикал, показан красным; двухъядерный железный центр — оранжевым. *в* — функция тирозинового радикала — образовывать в активном центре радикал $-X^{\cdot}$, необходимый в реакции, механизм которой изображен на рис. 22-41.

промежуточный водород-переносящий белок **тиоредоксин**. Этот распространенный белок выполняет похожую функцию в реакциях окисления–восстановления при фотосинтезе (см. рис. 20-19) и других процессах. Тиоредоксин содержит парные группы –SH, которые переносят атомы водорода от NADPH на рибонуклеозиддифосфат. Его окисленная (дисульфидная) форма восстанавливается с помощью NADPH в реакции, катализируемой **тиоредоксинредуктазой (рис. 22-39)**, а затем используется рибонуклеотидредуктазой для восстановления нуклеозиддифосфатов (NDP) до дезоксирибонуклеозиддифосфатов (dNDP). Другой источник восстанавливающих эквивалентов для рибонуклеозидредуктазы — это глутатион (GSH). Глутатион служит восстановителем родственного тиоредоксину белка **глутаредоксина**, который передает восстановительный потенциал далее на рибонуклетидредуктазу (рис. 22-39).

Рибонуклеотидредуктаза примечательна тем, что механизм катализа с ее участием подробно описан как пример свободнорадикальной реакции в биохимических процессах, что когда-то считалось довольно редким событием в живых системах. Этот фермент у *E. coli* и большинства эукариот представляет собой димер, его субъединицы называются R1 и R2 **(рис. 22-40)**. R1-субъединица содержит два типа регуляторных центров, как будет описано ниже. Два активных центра фермента образуются при взаимодействии R1- и R2-субъединиц. В каждом активном центре две сульфгидрильные группы, необходимые для активности фермента, принадлежат R1-субъединице, а стабильный радикал тирозина — R2-субъединице. R2-Субъединица также содержит кофактор с двумя ионами железа Fe^{3+}, которые помогают генерировать и стабилизировать радикалы тирозина (рис. 22-40). Радикал тирозина находится слишком далеко от активного центра, чтобы непосредственно с ним взаимодействовать. Но он вызывает в активном центре образование другого радикала, который и функционирует при катализе. Наиболее вероятный механизм рибонуклеотидредуктазной реакции показан на **рис. 22-41**. У *E. coli* наиболее вероятные источники необходимых восстановительных эквивалентов для этой реакции — это тиоредоксин и глутаредоксин (см. далее).

Обнаружено три класса рибонуклеотидредуктаз. Механизмы реакций (известные) в основном соответствуют схеме, приведенной на рис. 22-41, различия наблюдаются в природе радикала в активном центре и в природе кофактора, необходимого для его образования. Ферменту *E. coli* (класс I) для «восстановления» «погашенного» радикала тирозина необходим кислород, поэтому этот фермент работает только в аэробных условиях. Ферменты

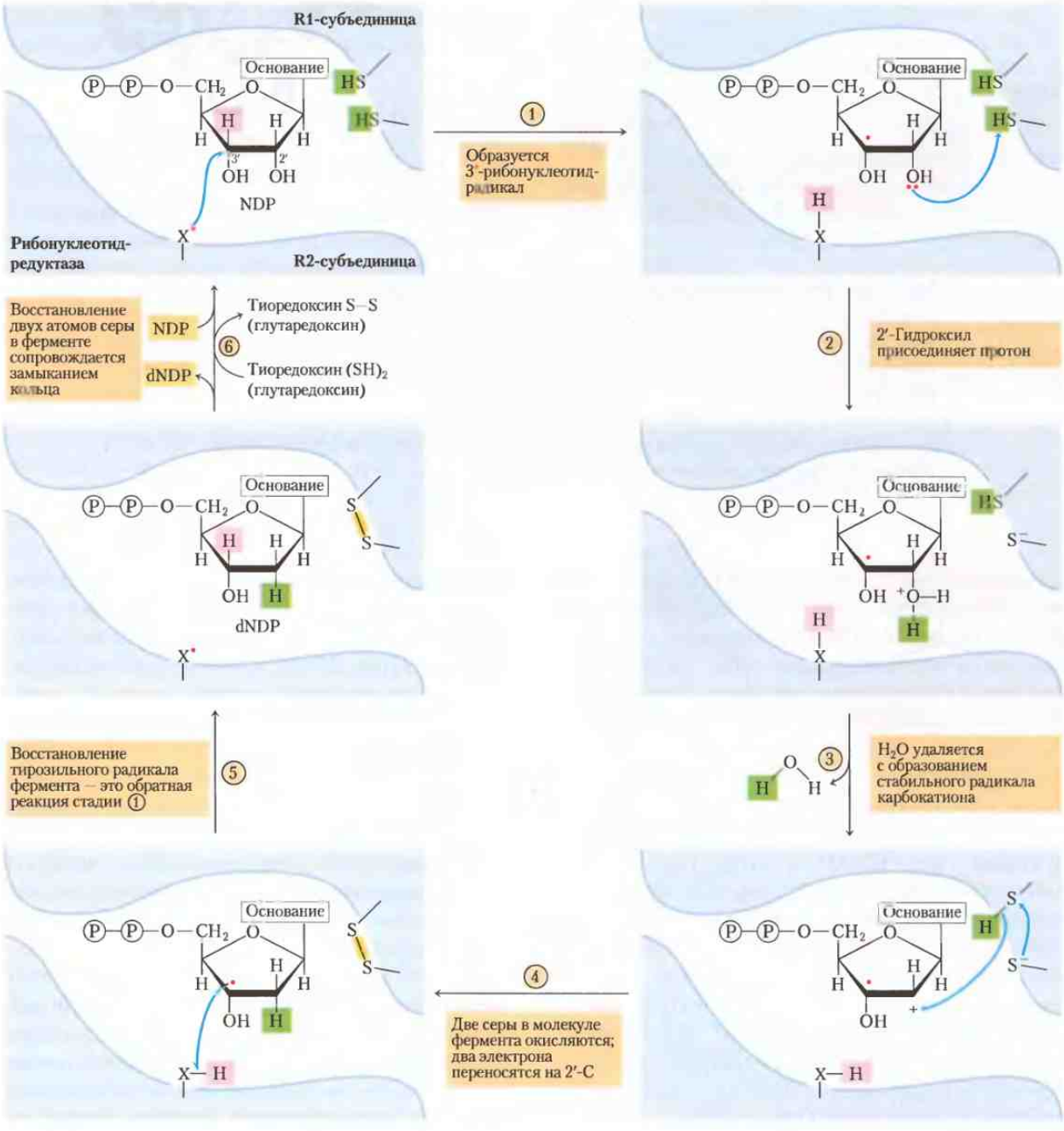


Рис. 22-41. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Предполагаемый механизм катализа рибонуклеотидредуктазой. У *E. coli* и большинства эукариот активные тиоловые группы этого фермента находятся на R1-субъединице, радикал активного центра –X˙ — на R2-субъединице, у *E. coli*, возможно, это сульфгидрильный радикал Cys^{439} (см. рис. 22-40).

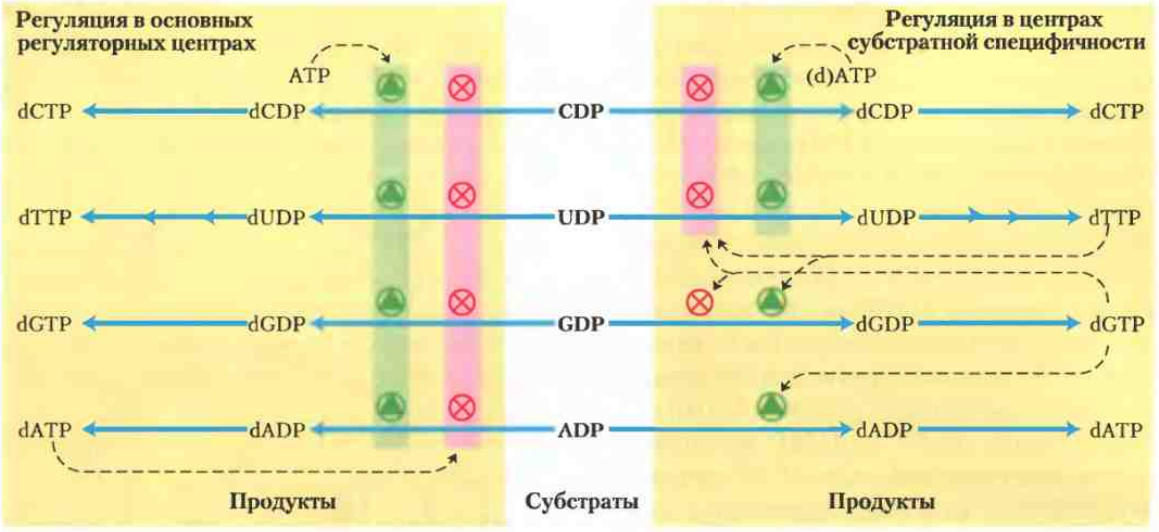


Рис. 22-42. Регуляция рибонуклеотидредуктазы дезоксинуклеозидтрифосфатами. Суммарная ферментативная активность регулируется путем связывания модуляторов с основным регуляторным центром (*слева*). Субстратная специфичность фермента регулируется природой эффекторной молекулы, связанной с регуляторным центром второго типа (*справа*). Показано ингибирование или активирование ферментативной активности четырьмя различными субстратами. Путь от dUDP до dTTP описан позднее (см. рис. 22-43, 22-44).

класса II, найденные у других микроорганизмов, содержат 5′-дезоксиаденозилкобаламин (см. доп. 17-2) вместо двухъядерного железного центра. Ферменты класса III приспособились функционировать в анаэробных условиях. Если *E. coli* растет анаэробно, она содержит независимый фермент класса III; этот фермент несет железо-серный кластер (его структура отличается от двухъядерного железного центра ферментов класса I) и использует в работе NADPH и S-аденозилметионин. В качестве субстрата он предпочитает нуклеозидтрифосфаты, а не нуклеозиддифосфаты. Появление рибонуклеотидредуктаз различных классов, необходимых для образования предшественников ДНК в различных условиях окружающей среды, свидетельствует о важности этой реакции в метаболизме нуклеотидов.

Регуляция рибонуклеотидредуктазы *E. coli* несколько необычна: при связывании эффекторных молекул регулируется не только ее *активность*, но и ее *субстратная специфичность*. Каждая R1-субъединица имеет регуляторные центры двух типов (рис. 22-40). Один центр влияет на активность всего ферментативного комплекса и связывает либо ATP, который активирует фермент, либо dATP, который инактивирует его. Второй центр изменяет субстратную специфичность в ответ на молекулу-модулятор (ATP, dATP, dTTP или dGTP), которая с ним связывается **(рис. 22-42)**. Когда с ним связаны ATP или dATP, более предпочтительно восстановление UDP и CDP. Когда связаны dTTP или dGTP, стимулируется восстановление GDP или ADP. Такая регуляция обеспечивает баланс между пулами предшественников для синтеза ДНК. ATP также выступает главным активатором биосинтеза и восстановления рибонуклеотидов. Присутствие dATP в небольших количествах увеличивает восстановление пиримидиновых нуклеотидов. Избыточное образование пиримидиновых dNTP приводит к высокому уровню dTTP, который изменяет специфичность реакции восстановления по субстрату — более предпочтителен GDP. В свою очередь высокие концентрации dGDP влияют на равновесие реакции, сдвигая его в сторону восстановления ADP, а большие концентрации dATP вообще «выключают» фермент. Считается, что эти эффекторы индуцируют несколько различных конформационных сдвигов, которые и вызывают изменение специфичности.

Тимидилат образуется из dCDP и dUMP

ДНК содержит тимин вместо урацила, и в пути синтеза тимина *de novo* участвуют только дезоксирибонуклеотиды. Непосредственным предшественником тимидилата (dTMP) служит dUMP. У бактерий путь, ведущий к dUMP, начинается с образования dUTP, который получается либо при дезаминировании dCTP, либо при фосфорилировании dUDP (**рис. 22-43**). dUTP превращается в dUMP под действием dUTPазы. Последняя реакция должна быть эффективной, чтобы поддерживать пул dUTP на низком уровне и таким образом предотвращать включение уридилата в ДНК.

Превращение dUMP в dTMP катализируется **тимидилатсинтазой**. От N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата на dUMP переносится углеродая единица со степенью окисления углерода, как в гидроксиметильной группе $-CH_2OH$, (см. рис. 18-17), а затем восстанавливается до метильной группы (**рис. 22-44**). Это восстановление «оплачивается» окислением тетрагидрофолата до дигидрофолата, что довольно необычно для тетрагидрофолат-зависимых реакций. (Механизм этой реакции показан на рис. 22-50.) Дигидрофолат восстанавливается до тетрагидрофолата **дигидрофолатредуктазой** в реакции регенерации, которая почти обязательно присутствует во многих процессах с участием тетрагидрофолата. У растений и по крайней мере у одного простейшего тимидилатсинтаза и дигирофолатредуктаза образуют один бифункциональный белок.

Около 10% всей человеческой популяции (в том числе почти у 50% бедного населения) страдают от недостатка в организме фолиевой кислоты. При значительном дефиците фолиевой кислоты могут возникать сердечно-сосудистые заболевания, злокачественные новообразования, а также те или иные нарушения мозговой деятельности. Ряд этих симптомов связан с ослаблением синтеза тимидилата, в результате чего в ДНК начинает встраиваться урацил. Урацил в ДНК распознается и удаляется системой репарации (см. гл. 25, т. 3). При высоком содержании урацила в ДНК появляются разрывы, что нарушает нормальную работу и регуляцию ядерной ДНК и в итоге приводит к нарушениям в работе сердца и головного мозга, а также способствует возникновению рака. ■

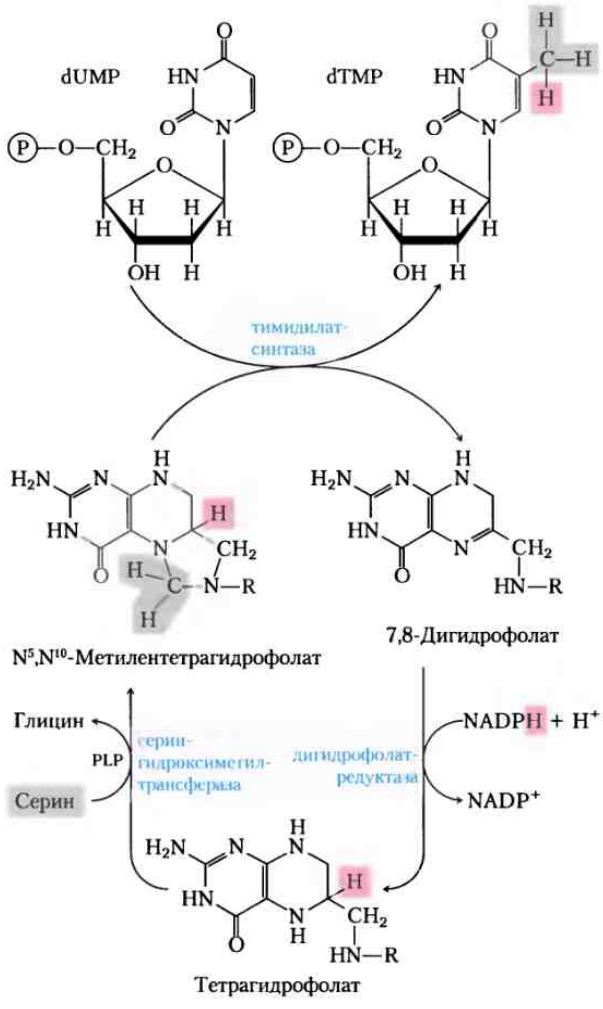


Рис. 22-44. Превращение dUMP в dTMP под действием тимидилатсинтазы и дигидрофолатредуктазы. Для получения метиленовой формы N^5,N^{10}-тетрагидрофолата необходима серингидроксиметилтрансфераза. При синтезе dTMP три атома водорода метильной группы поступают с N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата (розовый и серый).

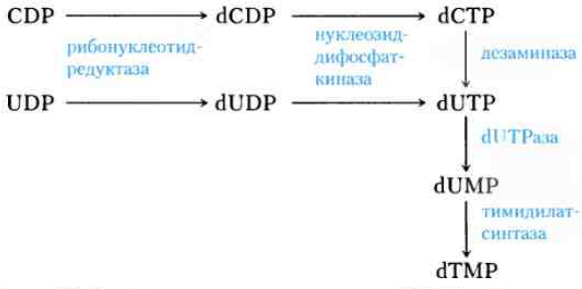


Рис. 22-43. Биосинтез тимидилата (dTMP). Показаны пути, начинающиеся с реакции, катализируемой рибонуклеотидредуктазой. На рис. 22-44 подробно изображена реакция тимидилатсинтазы.

При распаде пуринов и пиримидинов образуются мочевая кислота и мочевина

Пуриновые нуклеотиды разрушаются по пути, в котором они теряют свои фосфаты под действием **5′-нуклеотидазы (рис. 22-45)**. Аденилат превращается в аденозин, который дезаминируется с образованием инозина под действием **аденозиндезаминазы**, а инозин гидролизуется до гипоксантина (своего пуринового основания) и D-рибозы. Гипоксантин последовательно окисляется до ксантина, а затем до мочевой кислоты под действием **ксантиноксидазы**, флавосодержащего фермента с атомом молибдена и четырьмя железо-серными центрами в качестве простетических групп. Акцептором электронов в этой сложной реакции служит молекулярный кислород.

Катаболизм GMP также идти с образованием мочевой кислоты в качестве конечного продукта. GMP сначала гидролизуется до гуанозина, который потом расщепляется с образованием свободного гуанина. От гуанина гидролитически удаляется аминогруппа с образованием ксантина, который затем превращается в мочевую кислоту при действии ксантиноксидазы (рис. 22-45).

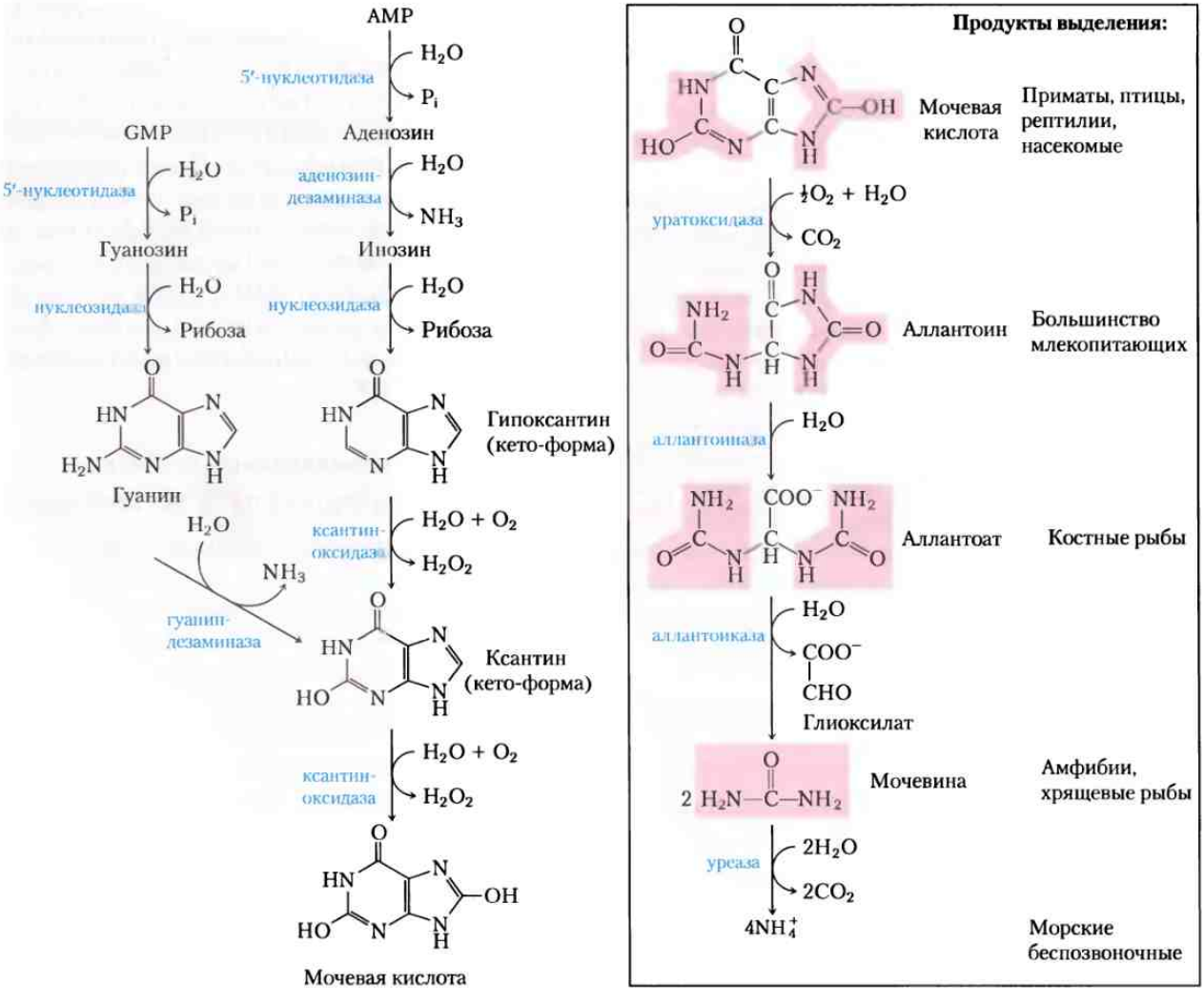


Рис. 22-45. Катаболизм пуриновых нуклеотидов. Обратите внимание на то, что у приматов основное количество азота выводится в цикле мочевины в виде мочевины (гл. 18), а не в виде мочевой кислоты, образующейся при распаде нуклеотидов. У рыб же азот выводится главным образом как NH_4^+, а не как мочевина, образование которой показано здесь.

Мочевая кислота — конечный экскретируемый продукт пуринового катаболизма приматов, птиц и некоторых других животных. У здорового взрослого человека мочевая кислота выделяется со скоростью около 0,6 г/сут; часть выделяемого организмом продукта образуется из всасываемых в желудке пуринов, а часть — из пуриновых оснований нуклеиновых кислот. У большинства млекопитающих и других позвоночных мочевая кислота в дальнейшем разрушается до **аллантоина** под действием **уратоксидазы**. У других организмов этот путь продолжается дальше, как показано на рис. 22-45.

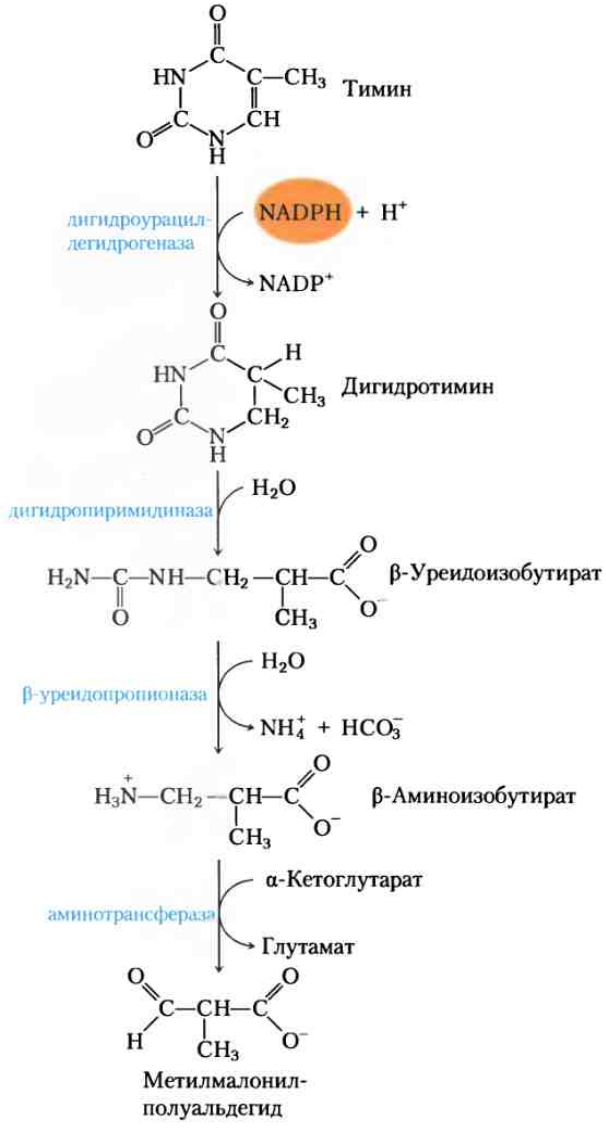


Рис. 22-46. Катаболизм пиримидина. Показаны пути деградации тимина. Метилмалонилполуальдегид затем разрушается до сукцинил-CoA.

Пути распада пиримидинов главным образом ведут к NH_4^+, а значит, к мочевине. Тимин, например, деградирует до метилмалонилполуальдегида (**рис. 22-46**), интермедиата катаболизма валина. Дальше он распадается через пропионил-CoA и метилмалонил-CoA до сукцинил-CoA (см. рис. 18-27).

У человека в метаболизме пуринов были найдены генетические отклонения, некоторые с серьезными последствиями. Например, **дефицит аденозиндезаминазы (ADA)** ведет к серьезной форме иммунодефицита, в которой Т-лимфоциты и В-лимфоциты развиваются не до конца. Отсутствие ADA ведет к увеличению концентрации dATP в 100 раз, что сильно ингибирует рибонуклеотидредуктазу (рис. 22-42). Высокий уровень образования dATP приводит главным образом к недостатку других dNTP в Т-лимфоцитах. Причины поражения В-лимфоцитов менее понятны. При дефиците ADA иммунная система человека неэффективна, и люди способны выжить только в строго стерильных условиях. Дефицит ADA — одна из первых генетических болезней, в отношении которой были проведены испытания генной терапии на человеке (см. доп. 9-2, т. 1). ■

Пуриновые и пиримидиновые основания повторно используются в путях реутилизации

Свободные пуриновые и пиримидиновые основания постоянно высвобождаются в клетке в процессе катаболизма нуклеотидов. Основные количества свободных пуринов остаются и повторно используются для синтеза нуклеотидов в пути, намного более простом, чем ранее описанный синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*. Один из самых простых путей реутилизации нуклеотидов состоит из одной-единственной реакции, катализируемой **аденозинфосфорибозилтрансферазой**, в которой свободный аденин взаимодействует с PRPP с образованием соответствующего аденинового нуклеотида:

$$\text{Аденин} + \text{PRPP} \rightarrow \text{AMP} + PP_i$$

Свободный гуанин и гипоксантин (продукт дезаминирования аденина; рис. 22-45) реутилизируются в похожем пути под действием **гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы**. Аналогичный путь «спасения» существует и для пи-

римидиновых оснований у микроорганизмов, и, возможно, у млекопитающих.

Генетические дефекты в гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе, наблюдаемые практически исключительно у мальчиков, вызывают причудливый набор симптомов, называемых **синдромом Лёша–Нихена**. Дети с этим генетическим расстройством, которое становится очевидным в возрасте двух лет, иногда довольно плохо ориентируются в пространстве и умственно недоразвиты. Вдобавок они чрезвычайно враждебны и показывают маниакальную настроенность на саморазрушение: они калечат себя, откусывая пальцы рук, ног и губы. Попытки лечить этот синдром предпринимались еще на ранних этапах развития генной терапии (см. доп. 9-2). ■

Избыток мочевой кислоты вызывает подагру

Долго бытовало заблуждение, что подагра бывает только у аристократов. Подагра — это болезнь суставов, вызванная повышенным содержанием мочевой кислоты в крови и тканях. При воспалении суставов человек испытывает сильную боль, а из-за отложения кристаллов урата натрия могут проявляться симптомы артрита.

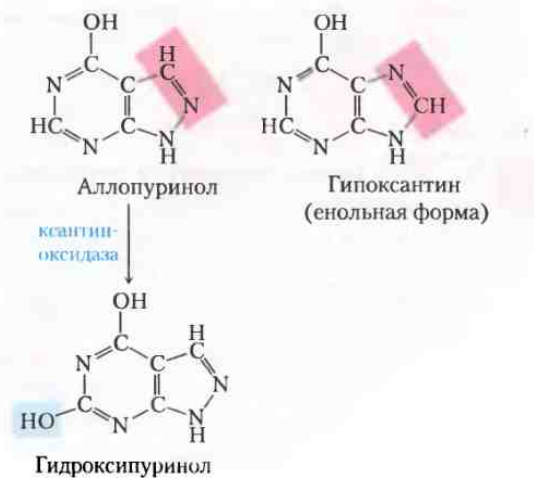


Рис. 22-47. Аллопуринол, ингибитор ксантиноксидазы. Гипоксантин — природный субстрат ксантиноксидазы. Всего лишь небольшие изменения в гипоксантине (выделено розовым) приводят к эффективному ингибитору этого фермента — аллопуринолу. В активном центре ксантиноксидазы аллопуринол превращается в гидроксипуринол, сильный конкурентный ингибитор, который остается прочно связанным с восстановленной формой фермента.

Гертруда Элайон (1918–1999)
и Джордж Хитчингс (1905–1998)

Повреждаются также почки, ведь избыток мочевой кислоты накапливается и в почечных канальцах. Обычно подагра развивается у мужчин. Причины болезни до конца неизвестны, но она часто сопровождается недостаточным выделением уратов. В некоторых случаях причиной может быть также генетическое нарушение в том или ином ферменте пуринового метаболизма.

Для эффективного лечения подагры назначают соблюдение определенной диеты в комбинации с лекарственной терапией. Пища, особенно богатая нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами, такая как печень или железы, должна быть исключена из рациона. Облегчение симптомов достигается при приеме лекарства **аллопуринола (рис. 22-47)**, которое ингибирует ксантиноксидазу — фермент, катализирующий превращение пуринов в мочевую кислоту. Аллопуринол — субстрат ксантиноксидазы, под действием которой он превращается в гидроксипуринол (аллоксантин). Гидроксипуринол инактивирует восстановленную форму фермента, оставаясь прочно связанным с его активным центром. При ингибировании ксантиноксидазы выделяются продукты пуринового метаболизма: ксантин и гипоксантин, которые более растворимы, чем мочевая кислота и менее склонны к образованию кристаллических отложений. Аллопуринол был предложен Гертрудой Элайон и Джорджем Хитчингсом, которые также разработали ацикловир, используемый при лечении людей, больных СПИДом, и другие пуриновые аналоги, применяемые для химиотерапии рака. ■

Большинство ферментов, служащих мишенями химиотерапевтических препаратов, относятся к пути биосинтеза нуклеотидов

Рост раковых клеток контролируется не так, как рост клеток в большинстве нормальных тканей. Раковые клетки нуждаются в больших количествах нуклеотидов как предшественников ДНК и РНК, и поэтому более чувствительны к ингибиторам биосинтеза нуклеотидов, чем нормальные клетки. Список важных химиотерапевтических препаратов, используемых при лечении рака и других болезней, и действующих как ингибиторы одного или более ферментов этих путей все расширяется. Мы опишем здесь несколько хорошо изученных примеров, которые иллюстрируют эффективные подходы при лечении, а также помогают нам понять, как работают эти ферменты.

Первый набор лекарств включает соединения, которые ингибируют глутаминамидотрансферазы. Вспомните, что глутамин служит донором азота по крайней мере в полудюжине разных реакций при биосинтезе нуклеотидов. Связывающий центр глутамина и механизм, по которому выделяется NH_4^+ в таких реакциях, довольно похожи для многих этих ферментов. Большинство ферментов эффективно ингибируется аналогами глутамина, такими как **азасерин** и **ацивин (рис. 22-48)**. Азасерин, охарактеризованный Джоном Бьюкененом в 1950-х гг., был одним из первых примеров инактиваторов ферментов, разработанных на основе механизма реакции

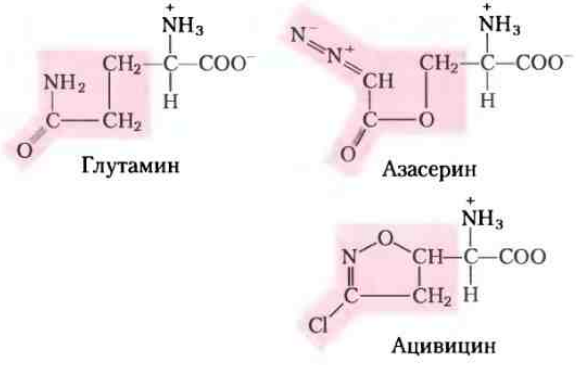
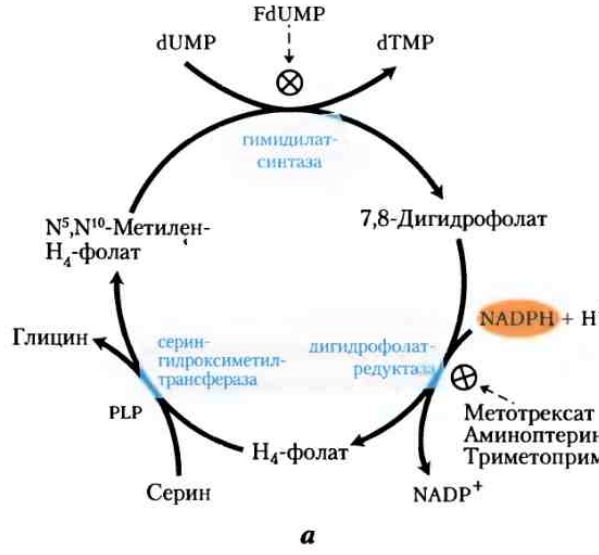
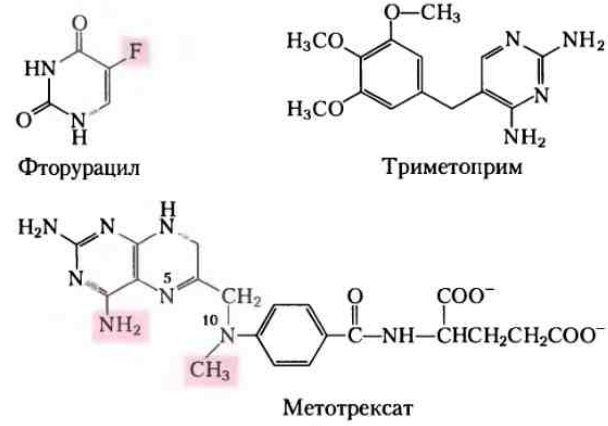


Рис. 22-48. Азасерин и ацивицин — ингибиторы глутаминамидотрансфераз. Эти аналоги глутамина вмешиваются в ряд биосинтетических путей с участием аминокислот и нуклеотидов.



а



б

Рис. 22-49. Синтез тимидилата и метаболизм фолата как мишени химиотерапии. *а* — в процессе синтеза тимидилата N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолат превращается в 7,8-дигидрофолат; затем в две стадии происходит регенерация N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата (см. рис. 22-44). Этот цикл и является главной мишенью некоторых лекарственных препаратов. *б* — фторурацил и метотрексат — это важные химиотерапевтические препараты. В клетках фторурацил (флуороурацил) превращается в FdUMP, который ингибирует тимидилатсинтазу. Метотрексат, структурный аналог тетрагидрофолата, ингибирует дигидрофолатредуктазу; выделенные цветом метильная и аминогруппы замещают в фолате карбонильный кислород и водород соответственно (см. рис. 22-44). Другой важный аналог фолата аминоптерин идентичен метотрексату, только у него отсутствует метильная группа (она выделена). Триметоприм — ингибитор, прочно связывающийся с бактериальной дигидрофолатредуктазой; разрабатывался как антибиотик.

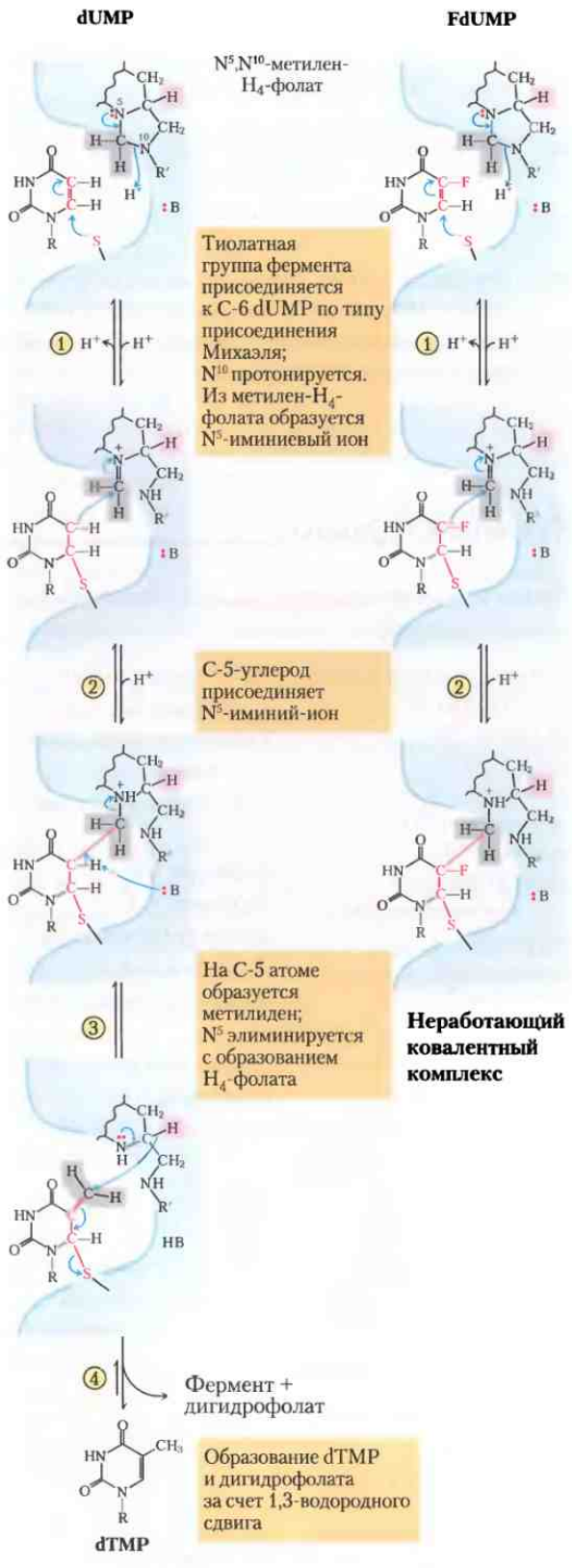


Рис. 22-50. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ. Превращение dUMP в dTMP и его ингибирование FdUMP. *Слева* — обычный механизм реакции тимидилатсинтазы. Нуклеофильная сульфгидрильная группа фермента используется в реакции на стадии ①. Атомы кольца dUMP, принимающие участие в реакции, показаны красным; :B означает боковую группу аминокислоты, которая выступает в качестве основания, необходимого для оттягивания протона на стадии ③. Атомы водорода, взятые с метиленовой группы N^5,N^{10}-метилентетрагидрофолата выделены серым цветом. Необычной особенностью механизма этой реакции является 1,3-водородный сдвиг (стадия ③) — смещение иона водорода (выделен розовым) с C-6 атома H_4-фолата к метильной группе тимидина, в результате чего тетрагидрофолат окисляется до дигидрофолата. Именно этот этап реакции (водородный сдвиг) ингибируется, когда в качестве субстрата используется FdUMP (см. ниже). Стадии ① и ② протекают нормально, но в результате образуется стабильный комплекс, в котором FdUMP ковалентно связан с ферментом и тетрагидрофолатом, что инактивирует фермент. ● **Механизм работы тимидилатсинтазы**

(суицидный ингибитор, с. 298, т. 1 и доп. 22-3). Большие надежды связаны также с ацивином как химиотерапевтическим препаратом.

Другими полезными целями для фармацевтических препаратов могут быть тимидилатсинтаза и дигидрофолатредуктаза — ферменты, которые работают только в клеточном пути синтеза тимина (**рис. 22-49**). Ингибирующий эффект на тимидилатсинтазу оказывает только фторурацил **(флуороурацил)**; это важный химиотерапевтический препарат. Сам по себе фторурацил не ингибирует фермент. На пути реутилизации в клетке он превращается в дезоксинуклеозидмонофосфат FdUMP, который связывается с ферментом и ингибирует его. Ингибирование под действием FdUMP (**рис. 22-50**) — классический пример инактивации фермента, основанной на механизме ферментативной реакции. Другой очень действенный химиотерапевтический агент **метотрексат** ингибирует дигидрофолатредуктазу. Этот аналог фолата активно действует как конкурентный ингибитор; сродство фермента дигидрофолатредуктазы к метотрексату выше, чем к дигидрофолату, примерно в 100 раз. **Аминоптерин** — родственное соединение, которое действует похожим образом.

Значение ингибиторов биосинтеза нуклеотидов в медицине не ограничивается лечением рака. Их потенциальными мишенями являются

все быстрорастущие клетки (включая бактерий и простейших). **Триметоприм**, антибиотик, разработанный Хитчингсом и Элайон, связывается с бактериальной дигидрофолатредуктазой примерно в 100 000 раз лучше, чем с ферментом млекопитающих. Он используется для лечения определенных бактериальных инфекций мочеполовых путей и среднего уха. У паразитических простейших, таких как трипаносомы, которые вызывают африканскую сонную болезнь (африканский трипаносомоз), нет способов биосинтеза нуклеотидов *de novo*, и эти паразиты чрезвычайно чувствительны к агентам, которые препятствуют повторному использованию нуклеотидов из окружающей среды. Аллопуринол (рис. 22-47) и ряд схожих пуриновых аналогов показывают хорошие результаты при лечении африканского трипаносомоза, и это дает возможность еще глубже понять метаболизм и работу ферментов. ■

Краткое содержание раздела 22.4 БИОСИНТЕЗ И ДЕГРАДАЦИЯ НУКЛЕОТИДОВ

- Система пуринового кольца строится постадийно, начиная с 5-фосфорибозиламина. Все атомы азота пуринам поставляют аминокислоты глутамин, глицин и аспартат. Две финальные стадии замыкания цикла приводят к образованию пуринового ядра.

- Пиримидины синтезируются из карбамоилфосфата и аспартата, а затем к ним присоединяется рибозо-5-фосфат с образованием пиримидиновых рибонуклеотидов.

- Нуклеозидмонофосфаты превращаются в соответствующие трифосфаты в реакциях ферментативного фосфорилирования. Из рибонуклеотидов под действием рибонуклеотидредуктазы образуются дезоксирибонуклеотиды; этот фермент проявляет себя очень необычно в катализе и регуляции. Тиминовые нуклеотиды образуются из dCDP и dUMP.

- Конечные продукты распада пуринов и пиримидинов — мочевая кислота и мочевина.

- Свободные пурины могут снова включаться в нуклеотиды. Генетические дефекты определенных ферментов пути утилизации вызывают серьезные болезни, такие как синдром Лёша–Нихена и дефицит ADA.

- Накопление кристаллов мочевой кислоты в суставах, возможно, связанное с другим генетическим дефектом, вызывает подагру.

- Ферменты пути биосинтеза нуклеотидов служат мишенями ряда химиотерапевтических препаратов, используемых при лечении рака и других заболеваний.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

γ-аминомасляная кислота (ГАМК) 539
адреналин 539
азасерин 560
аллопуринол 558
аминоптерин 561
анаммокс 507
аспартаттранскарбамоилаза 550
ауксин 539
ацивицин 560
билирубин 535
гистамин 539
глутаматсинтаза 514
глутаминамидотрансферазы 516
глутаминсинтетаза 513
глутатион (GSH) 538
дефицит аденозиндезаминазы 557
дигидрофолатредуктаза 555
дофамин 539
инозинат (IMP) 548
карбамоилфосфатсинтетаза II 549
креатин 537
леггемоглобин 513
метотрексат 560
нитрогеназный комплекс 510
норадреналин 539
нуклеозиддифосфаткиназа 551
нуклеозидмонофосфаткиназа 551
орнитиндекарбоксилаза 540
порфирин 534
порфирия 534
путь реутилизации 544
путь синтеза *de novo* 544
рибонуклеотидредуктаза 551
серотонин 539
симбионты 510
синдром Лёша–Нихена 558
спермидин 540
спермин 540
тимидилатсинтаза 555
тиоредоксин 551
триптофансинтаза 526
фиксация азота 506
фосфокреатин 537
5-фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP) 519
фторурацил 560
цикл азота 506
циметидин 540

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Фиксация азота

Arp, D. J. & Stein, L. Y. (2003) Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 491–495.

Burris, R. H. (1995) Breaking the N–N bond. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 1–19.

Fuerst, J. A. (2005) Intracellular compartmentation in planctomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 299–328.

Igarishi, R. Y. & Seefeldt, L. C. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 351–384.

Patriarca, E. J., Tate, R., & Iaccarino, M. (2002) Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 203–222.

Хороший обзор ассимиляции аммония в бактериальных системах и его регуляция.

Prell, J. & Poole, P. (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14**, 161–168.

Хорошее описание запутанных симбиотических отношений между ризобиями и их хозяевами.

Sinha, S. C. & Smith, J. L. (2001) The PRT protein family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 733–739.

О семействе белков, в которое входят многие аминотрансферазы, с туннелированием NH_3 при его передаче от одного центра к другому.

Биосинтез аминокислот

Frey, P. A. & Hegeman, A. D. (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Обновленная сводка механизмов реакций, включая метаболизм одноуглеродных соединений и ферменты превращения пиридоксальфосфата.

Neidhardt, F. C. (ed.). (1996) Escherichia coli *and* Salmonella: *Cellular and Molecular Biology*, 2nd edn, ASM Press, Washington, DC.

Первый том этого двухтомника содержит 13 глав, посвященных детальному описанию биосинтеза аминокислот и нуклеотидов у бактерий. Сетевая версия доступна по адресу www.ecosal.org и постоянно обновляется. Очень полезный ресурс.

Pan P., Woehl, E., & Dunn, M. F. (1997) Protein architecture, dynamics and allostery in tryptophan synthase channeling. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 22–27.

Richards, N. G. J. & Kilberg, M. S. (2006) Asparagine synthetase chemotherapy. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 629–654.

Производные аминокислот

Ajioka R. S., Phillips, J. D., & Kushner, J. P. (2006) Biosynthesis of heme in mammals *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1763**, 723–736.

Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 175–195.

Meister, A. & Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–760.

Morse, D. & Choi, A. M. K. (2002) Heme oxygenase-1—the "emerging molecule" has arrived. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **27**, 8–16.

Rondon, M. R., Trzebiatowski, J. R., & Escalante-Semerena, J. C. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cobalamin biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **56**, 347–384.

Stadtman, T. C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 83–100.

Биосинтез нуклеотидов

Carreras, C. W. & Santi, D. V. (1995) The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 721–762.

Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**, 13 963–13 966.

Kappock, T. J., Ealick, S. E., & Stubbe, J. (2000) Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 567–572.

Kornberg, A. & Baker, T. A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Хорошо изложен синтез нуклеотидов.

Licht, S., Gerfen, G. J., & Stubbe, J. (1996) Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**, 477–481.

Nordlund, P. & Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 681–706.

Schachman, H. K. (2000) Still looking for the ivory tower. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1–29.

Описание исследований аспартат-транскарбамоилазы, снабженное интересными обсуждениями на тему науки и политики.

Stubbe, J. & Riggs-Gelasco, P. (1998) Harnessing free radicals: formation and function of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 438–443.

Генетические заболевания

Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D., Sly, W. S., Childs, B., Kinzler, L. W., & Vogelstein, B. (eds). (2001) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn, McGraw-Hill Professional, New York.

В этом четырехтомном издании есть хорошо написанные главы о нарушениях метаболизма аминокислот, порфирина и гема. Кроме того, прочтите главы о врожденных расстройствах метаболизма пуринов и пиримидинов.

Вопросы и задачи

1. Потребление ATP в корневых клубеньках бобовых. Бактерии, находящиеся в корневых клубеньках гороха потребляют более чем 20% ATP, образованного в растении. Объясните, почему бактерии тратят такое большое количество ATP.

2. Глутаматдегидрогеназа и синтез белка. Бактерия *Methylophilus methylotrophus* может синтезировать белок из метанола и аммиака. Количество белка, производимого бактерией, было увеличено благодаря тому, что в геном *M. methylotrophus* методами рекомбинации ДНК был встроен ген глутаматдегидрогеназы из *E. coli*. Объясните, почему эти манипуляции с генами увеличили выход белка.

3. Механизм реакций с участием пиридоксальфосфата. Пиридоксальфосфат (PLP) помогает катализировать химические превращения, сопровождающиеся удалением одного или двух атомов углерода из молекулы аминокислоты. Так, фермент треонинсинтаза (см. рис. 22-15) осуществляет PLP-зависимое превращение фосфогомосерина в треонин. Предложите механизм этой реакции.

4. Образование аспарагина из аспартата. Есть два способа образования аспарагина из аспартата в присутствии ATP. Многие бактерии имеют аспарагинсинтетазу, которая использует ион аммония в качестве донора азота. У млекопитающих аспарагинсинтетаза использует в качестве донора азота глутамин. Учитывая последующие затраты ATP (для синтеза глутамина), почему же млекопитающие используют второй путь?

5. Уравнение синтеза аспартата из глюкозы. Напишите полное уравнение синтеза аспартата (заменимой аминокислоты) из глюкозы, диоксида углерода и аммиака.

6. Лечение лейкоза ингибиторами аспарагинсинтетазы. Аспарагинсинтетаза млекопитающих представляет собой глутаминзависимую амидотрансферазу. Поиски эффективного ингибитора человеческой аспарагинсинтетазы для лечения лейкоза связаны с ингибированием не N-концевого домена с глутаминазной активностью, а C-концевого домена, в котором расположен активный центр синтетазы. Объясните, почему глутаминазный домен не может быть мишенью лекарственного препарата.

7. Дефект фенилаланингидроксилазы и питание. В норме тирозин является заменимой аминокислотой, но организмам с генетическим дефектом в гене фенилаланингидроксилазы для нормального роста требуется поступление тирозина вместе с пищей. Объясните этот факт.

8. Кофакторы для реакций переноса одноуглеродных фрагментов. Большинство переносов одноуглеродных фрагментов осуществляется одним из трех кофакторов: биотином, тетрагидрофолатом или S-аденозилметионином (гл. 18). В качестве донора метильной группы обычно используется S-аденозилметионин; в большинстве реакций биосинтеза недостаточно энергии, выделяемой при переносе метильной группы N^5-метилтетрагидрофолата. Однако существует пример использования N^5-метилтетрагидрофолата в качестве переносчика метильной группы при образовании метионина в реакции метионинсинтазы (стадия ⑨ на рис. 22-15); метионин служит непосредственным предшественником S-аденозилметионина (см. рис. 18-18). Объясните, как метильная группа для S-аденозилметионина может отщепляться от N^5-метилтетрагидрофолата, хотя энергия переноса метильной группы в N^5-метилтетрагидрофолате составляет тысячные доли по сравнению с таким процессом в S-аденозилметионине.

9. Согласованная регуляция биосинтеза аминокислот. Глутаминсинтетаза *E. coli* модулируется независимо различными продуктами метаболизма глутамина (см. рис. 22-6). В этом согласованном ингибировании степень подавления фермента намного больше, чем просто сумма эффектов каждого продукта-ингибитора в отдельности. Каково будет преимущество согласованного ингибирования для роста *E. coli* в среде, богатой гистидином?

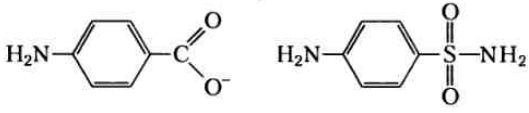
10. Связь между недостатком фолиевой кислоты и анемией. Недостаток фолиевой кислоты считается наиболее распространенной недостаточностью витаминов и вызывает такой тип анемии, при которой снижен синтез гемоглобина и эритроциты созревают не до конца. Какова метаболическая связь между синтезом гемоглобина и недостатком фолиевой кислоты?

11. Биосинтез нуклеотидов у бактерий, ауксотрофных по аминокислоте. Клетки *E. coli* дикого типа способны синтезировать все 20 протеиногенных аминокислот, но некоторые мутанты, называемые ауксотрофами по какой-либо определенной аминокислоте, не способны синтезировать эту аминокислоту, поэтому для нормального роста им необходимо ее присутствие в среде. Помимо участия в синтезе белка некоторые аминокислоты служат

также предшественниками других азотсодержащих продуктов в клетке. Рассмотрите три ауксотрофа, которые не способны синтезировать глицин, глутамин и аспартат. Для каждого мутанта определите, какие азотсодержащие продукты наряду с белками, не смогут синтезировать эти клетки.

12. Ингибирование биосинтеза нуклеотидов. Предположите механизмы ингибирования (а) аланинрацемазы L-фтораланином и (б) глутаминамидотрансферазы азасерином.

13. Способ действия серосодержащих лекарств. Некоторым бактериям для нормального роста необходимо присутствие в среде *пара*-аминобензоата, и их рост сильно ингибируется добавлением сульфаниламида, одного из первых серосодержащих лекарств. Более того, в присутствии этого препарата в среде накапливается 5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид (AICAR; см. рис. 22-33). Эти эффекты снимаются добавлением избытка *пара*-аминобензоата.



n-Аминобензоат и Сульфаниламид

а) Какую функцию выполняет *пара*-аминобензоат в этих бактериях? (*Подсказка.* См. рис. 18-16.)

б) Почему в присутствии сульфаниламида накапливается AICAR?

в) Почему эффекты ингибирования исчезают при добавлении избытка *пара*-аминобензоата?

14. Путь углерода при биосинтезе пиримидина. Предскажите локализацию ^{14}C в оротате, выделенном из клеток, растущих в среде, содержащей небольшое количество полностью меченного [^{14}C]сукцината. Докажите свой прогноз.

15. Нуклеотиды как бедный источник энергии. В условиях голодания организм может использовать белки и аминокислоты в качестве источника энергии. При дезаминировании аминокислот их углеродные скелеты могут расщепляться в гликолизе или цикле трикарбоновых кислот с высвобождением энергии в виде АТР. В то же время нуклеотиды при деградации не образуют соединения, которые могли бы использоваться как биологическое топливо. Какие факты из клеточной физиологии поддерживают такое утверждение? Какие структурные особенности нуклеотидов делают их относительно бедным источником энергии?

16. Лечение подагры. При лечении хронической подагры используется ингибитор ксантиноксидазы аллопуринол (см. рис. 22-47). Объясните биологические основы такого лечения. Иногда у пациентов, принимающих аллопуринол, образуются ксантиновые камни в почках, хотя частота случаев повреждения почек значительно ниже, чем у тех, кто не лечится. Объясните это наблюдение на основе растворимости этих веществ: мочевая кислота 0,15 г/л, ксантин 0,05 г/л и гипоксантин 1,4 г/л.

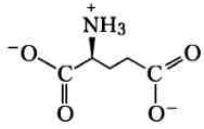
17. Ингибирование синтеза нуклеотидов азасерином. Диазосоединение O-(2-диазоацетил)-L-серин, известный как азасерин (см. рис. 22-48), служит мощным ингибитором глутаминамидотрансфераз. Если в среду с растущими клетками добавить азасерин, какие будут накапливаться интермедиаты нуклеотидного биосинтеза? Объясните свой ответ.

Анализ экспериментальных данных

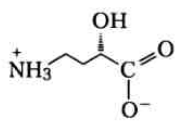
18. Использование современных технологий для определения пути синтеза новой аминокислоты. Большинство путей биосинтеза, описанных в данной главе, были изучены до развития технологии рекомбинантных ДНК и до появления геномики, так что методы анализа того времени сильно отличались от современных методов. Здесь мы рассмотрим пример применения новых молекулярных технологий для изучения пути синтеза новой аминокислоты (2S)-4-амино-2-гидроксибутирата (AHBA). Используемые в данной задаче методы описаны в различных разделах книги, а здесь мы попытаемся показать, каким образом они могут применяться в одном конкретном исследовании.

AHBA — это γ-аминокислота, входящая в состав некоторых аминогликозидных антибиотиков, в частности бутирозина. Антибиотики, модифицированные путем введения остатка AHBA, часто более устойчивы к инактивации под действием бактериальных ферментов. Поэтому понимание путей синтеза AHBA и ее связывания с молекулами антибиотиков необходимо для разработки новых лекарственных препаратов.

В опубликованной в 2005 г. статье Ли с соавторами описали свой метод изучения пути синтеза AHBA из глутамата.



Глутамат



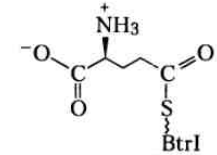
AHBA

а) Перечислите химические превращения, необходимые для образования AHBA из глутамата; можно не стараться указывать реакции *в правильном порядке*.

Ли с соавторами взялись клонировать генный кластер, ответственный за синтез бутирозина в клетках *Bacillus circulans*, где образуется много бутирозина. Они идентифицировали пять генов, необходимых для осуществления этого метаболического пути: *btrI*, *btrJ*, *btrK*, *btrO* и *btrV*. Исследователи встроили эти гены в плазмиду, позволяющую получить высокий выход продукта в клетках *E. coli*; образующиеся белки содержали на N-конце последовательность из нескольких остатков гистидина (см. с. 447, т. 1), что облегчало их выделение и очистку. Предсказанная аминокислотная последовательность белка BtrI имела высокий уровень гомологии с последовательностями известных ацилпереносящих белков (см. рис. 21-5). Методом масс-спектрометрии (см. доп. 3-2, т. 1) Ли с соавторами определили, что молекулярная масса очищенного белка BtrI (вместе с гистидиновой последовательностью) составляет 11 812. После инкубации очищенного белка BtrI с коферментом A и с ферментом, присоединяющим CoA к другим ацилпереносящим белкам, были получены продукты, среди которых значительную часть составлял белок с молекулярной массой M_r = 12 153.

б) Как эти данные подтверждают тот факт, что белок BtrI может выполнять функцию ацилпереносящего белка с CoA в качестве простетической группы?

Согласно стандартной терминологии, Ли с соавторами назвали белок, не связанный с CoA, apo-BtrI, а белок с CoA (см. рис. 21-5) — holo-BtrI. В результате инкубации белка holo-BtrI с глутамином, ATP и очищенным белком BtrJ белок holo-BtrI с M_r = 12 153 превратился в белок с M_r = 12 281, что соответствует тиоэфиру глутамата и holo-BtrI. На основании этих данных авторы предположили, что формула белка с M_r = 12 281 (γ-глутамил-S-BtrI) следующая:



γ-Глутамил-S-BtrI

в) Какие еще структурные формулы могли бы соответствовать представленным выше данным?

г) Ли с соавторами утверждали, что изображенная здесь структура (γ-глутамил-S-BtrI) справедлива, поскольку α-карбоксильная группа должна удаляться в какой-то момент в процессе биосинтеза. Объясните химический смысл этого утверждения. (*Подсказка*. См. рис. 18-6, *в*.)

Белок BtrK имел значительную гомологию с PLP-зависимой декарбоксилазой аминокислот, а выделенный из клеток *E. coli* белок BtrK был прочно связан с PLP. В результате инкубации γ-глутамил-S-BtrI с очищенным белком BtrK было получено вещество с M_r = 12 240.

д) Какова наиболее вероятная структура этого вещества?

е) Интересно, что в результате инкубации глутамата и ATP с очищенными белками BtrI, BtrJ и BtrK получалось вещество с M_r = 12 370. Какова наиболее вероятная структура этого вещества? *Подсказка*. Вспомните, что BtrJ может использовать ATP для взаимодействия с γ-глутамильной нуклеофильной группой.

Ли с соавторами обнаружили, что BtrO является гомологом монооксигеназы (см. доп. 21-1), осуществляющей гидроксилирование алканов, используя в качестве кофактора FMN, а BtrV является гомологом NAD(P)H-оксидоредуктазы. Два других гена в кластере, *btrG* и *btrH*, возможно, кодируют ферменты, удаляющие γ-глутамильную группу и присоединяющие AHBA к молекуле антибиотика-мишени.

ж) На основании этих данных предложите возможный механизм синтеза AHBA и его присоединения к антибиотику-мишени. Укажите ферменты, катализирующие каждую стадию, а также все необходимые субстраты и кофакторы (ATP, NAD и т. д.).

Литература

Li, Y., Llewellyn, N. M., Giri, R., Huang, F., & Spencer, J. B. (2005) Biosynthesis of the unique amino acid side chain of butirosin: possible protective-group chemistry in an acyl carrier protein–mediated pathway. *Chem. Biol.* **12**, 665–675.

Мы считаем, что любая ткань и, что более существенно, любая клетка организма секретирует... в кровь специфические вещества, или ферменты, которые влияют на все другие клетки, объединяя их с помощью иного, чем нервная система, механизма.

Шарль Эдуард Броун-Секар и Ж. д'Арсонваль, статья в Comptes Rendus de la Société de Biologie, 1891

23

Гормональная регуляция и интеграция метаболизма млекопитающих

23.1. Гормоны: различные структуры для различных функций 566

23.2. Тканеспецифичный метаболизм: разделение функций 579

23.3. Гормональная регуляция энергетического метаболизма 593

23.4. Ожирение и регуляция массы тела 604

23.5. Ожирение, метаболический синдром и диабет II типа 615

В главах 13–22 мы обсудили метаболизм на уровне отдельной клетки, причем особое внимание уделялось основным путям, общим почти для всех клеток, как прокариотических, так и для эукариотических. Мы теперь увидели, каким образом метаболические процессы регулируются внутри клетки на уровне отдельных ферментативных реакций путем изменения доступности субстрата, с помощью аллостерических механизмов, а также путем фосфорилирования или других ковалентных модификаций ферментов.

Для полного понимания роли отдельных метаболических путей и способов их регуляции рассмотрим проблему на уровне всего организма. Самыми существенными особенностями многоклеточных организмов являются дифференцировка клеток и разделение функций. Специализация тканей и органов в таком сложном организме, как организм человека, предполагает наличие определенных метаболических путей и особые требования к источникам энергии. Метаболическая активность различных тканей координируется и интегрируется с помощью гормональных сигналов. Они оптимизируют распределение энергетически богатых веществ и предшественников для каждого органа.

В этой главе мы рассмотрим обмен веществ у млекопитающих, обращая особое внимание на специализированный метаболизм нескольких главных органов и тканей, а также на интеграцию каждого специализированного метаболизма в метаболизм всего организма. Начнем с описания широкого круга гормонов и гормональных механизмов, затем обратимся к тканеспецифическим функциям, которые регулируются этими механизмами. Обсудим распределение биологически активных веществ в различных органах, подчеркивая центральную роль печени, и метаболическую кооперацию органов. Для иллюстрации объединяющей роли гормонов опишем взаимодействие инсулина, глюкагона и адреналина при координации энергетического метаболизма в мышцах, печени и жировой ткани. Затем на примере метаболических нарушений при сахарном диабете покажем важность гормональной регуляции метаболизма.

Мы обсудим механизмы гормональной регуляции массы тела и влияние избыточной массы тела на развитие метаболического синдрома и диабета.

23.1. Гормоны: различные структуры для различных функций

В сущности, в сложном организме одним или несколькими гормонами регулируются все процессы: поддержание кровяного давления, изменения объема крови и баланса электролитов, эмбриогенез, половая дифференциация, развитие и репродукция, голод, пищевое поведение, переваривание и распределение энергетически обогащенных веществ и т. д. Рассмотрим методы определения и измерения концентрации гормонов, их взаимодействие с рецепторами и обсудим типы гормонов.

Координация метаболизма у млекопитающих осуществляется с помощью **нейроэндокринной системы**. Отдельные клетки в одной ткани чувствуют изменения условий для всего организма и отвечают на них секрецией химических посредников, которые проходят к другим клеткам в той же или в другой ткани, где они связываются с молекулой рецептора и запускают изменения в этой второй клетке. При передаче нервного импульса (**рис. 23-1, *а***), химический посредник (нейромедиатор, например ацетилхолин) может преодолеть расстояние только порядка микрометра, проходя через синаптическую щель к следующему нейрону. При гормональной сигнализации роль посредников выполняют гормоны, приносимые кровотоком к соседним клеткам или к удаленным органам и тканям. Чтобы достигнуть своей клетки-мишени, гормоны могут перемещаться на расстояние 1 м или более (рис. 23-1, *б*). За исключением этого различия, два химических сигнальных механизма, нейрональный и гормональный, очень похожи. Адреналин и норадреналин, например, играют роль нейромедиаторов в синапсах мозга и в гладкой мускулатуре и роль гормонов, регулирующих энергетический метаболизм в печени и в мышцах. Опираясь на обсуждение энергетического метаболизма в предыдущих главах, опишем клеточную сигнализацию, уделяя особое внимание действию гормонов. Отметим, что большинство рассмотренных фундаментальных сигнальных механизмов характерны и для действия нейромедиаторов.

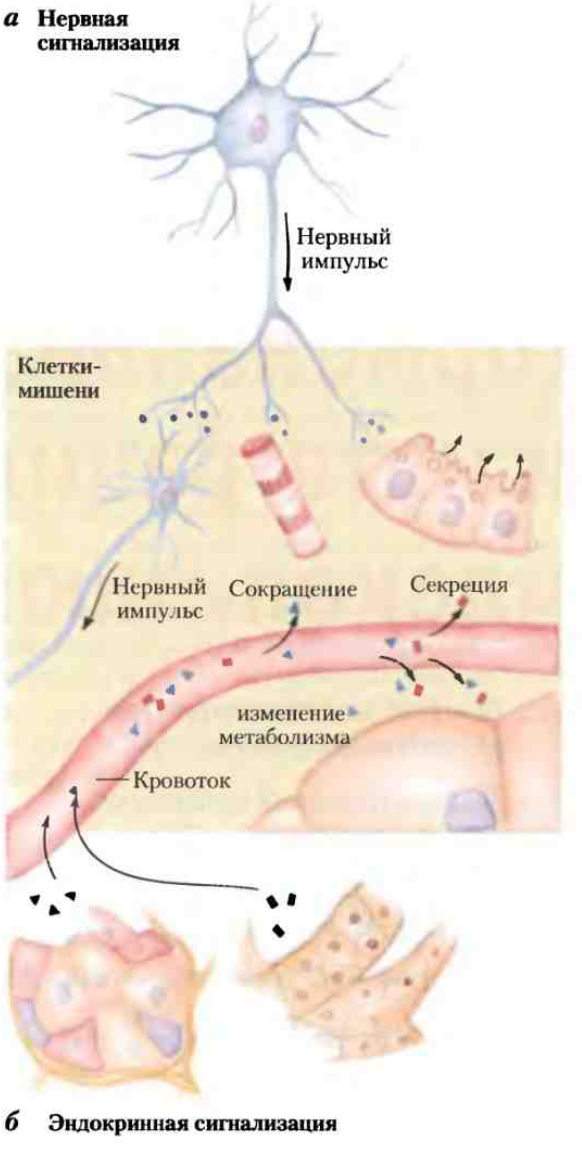


Рис. 23-1. Сигнализация с помощью нейроэндокринной системы. *а* — при передаче нервного импульса в теле нейрона возникают электрические сигналы, которые очень быстро проходят к вершине аксона, где высвобождаются нейромедиаторы, диффундирующие затем к клеткам-мишеням. Такими клетками-мишенями (другой нейрон, миоцит или секреторная клетка) могут быть только те клетки, которые удалены от места высвобождения нейромедиатора на расстояние не более нескольких микрометров. *б* — в эндокринной системе гормоны секретируются в кровоток, который может транспортировать их через все тело к тканям-мишеням, которые могут быть удалены от секретирующей клетки на расстояние метр или более. И нейромедиаторы, и гормоны взаимодействуют со специфическими рецепторами на поверхности или внутри своих клеток-мишеней, вызывая ответ.

Для обнаружения и очистки гормонов необходимы биологические исследования

Как были обнаружены и изолированы гормоны? Во-первых, было установлено, что физиологические процессы в одной ткани зависят от сигналов, которые приходят из другой ткани. Например, поджелудочная железа вырабатывает вещество, которое влияет на объем и состав мочи; это и был первый открытый гормон — инсулин. (см. доп. 23-1). После того как установлено физиологическое действие предполагаемого гормона, производят количественные исследования для установления биологической роли гормона. В случае инсулина исследование состояло в инъекциях экстрактов поджелудочной железы (грубого источника инсулина) экспериментальным животным, испытывающим дефицит инсулина, затем анализировали результирующие изменения концентраций глюкозы в крови и в моче. Чтобы выделить гормон, экстракты, содержащие предполагаемый гормон, фракционируют с помощью тех же биохимических методов, которые используются для выделения других биомолекул (тонкослойная хроматография и другие хроматографические методы, электрофорез), и затем исследуют каждую фракцию на гормональную активность. Как только вещество очищено, могут быть определены его состав и структура.

Такая методика исследования гормона только на первый взгляд кажется простой. Гормоны — чрезвычайно сильнодействующие вещества и поэтому вырабатываются в очень малых дозах. Получение достаточного количества гормона, позволяющего охарактеризовать его химически, часто подразумевает биохимические работы в огромных масштабах. Так, когда Роже Гиймен и Эндрю Шалли независимо друг от друга очистили и охарактеризовали тиреотропин-высвобождающий гормон (TRH) из гипоталамуса, группа Шалли переработала 20 т гипоталамуса примерно из 2 млн овец, а группа Гиймена приготовила экстракты из тканей примерно 1 млн свиней! Оказалось, что TRH представляет собой производное трипептида Glu–His–Pro (**рис. 23-2**). Когда структура гормона была установлена, стало возможным химически синтезировать его в больших количествах для использования в физиологических и биохимических исследованиях.

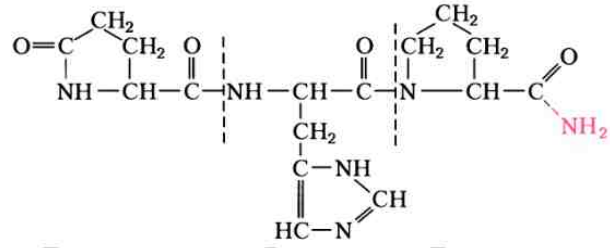


Рис. 23-2. Структура тиреотропин-высвобождающего гормона (ТТГ или *англ.* TRH). Очищенный благодаря героическим усилиям тиреотропин-высвобождающий гормон из экстрактов гипоталамуса, как оказалось, является производным трипептида Glu–His–Pro. Карбоксильная группа боковой цепи N-концевого Glu образуется амид (связь выделена красным) с α-аминогруппой остатка, превращаясь в пироглутамат, а карбоксильная группа C-концевого Pro превращается в амид (красный $-NH_2$). Такие модификации типичны для низкомолекулярных пептидных гормонов. В белке с $M_r \approx 50\,000$ заряды на N- и C-концевых группах вносят относительно малый вклад в общий заряд белковой молекулы, но в трипептиде наличие этих двух заряженных групп определяют свойства пептида. Образование амидных производных нейтрализует эти заряды.

Нобелевская премия по физиологии и медицине в 1977 г. за работу на гормонах гипоталамуса была разделена между Шалли и Гийменом («За открытия, связанные с секрецией пептидных гормонов»), с одной стороны, а с другой — Розалин

Эндрю В. Шалли

Роже Гиймен

Розалин С. Ялоу

Дополнение 23-1 МЕДИЦИНА Как открывали гормоны. Тяжелый путь к чистому инсулину

Миллионы людей с сахарным диабетом I типа (инсулинзависимого) ежедневно делают себе инъекции чистого инсулина, чтобы компенсировать отсутствие выработки этого важнейшего гормона их собственными β-клетками поджелудочной железы. Инъекции инсулина не могут излечить сахарный диабет, но позволяют человеку, который иначе бы умер молодым, провести длинную и продуктивную жизнь. Открытие инсулина, начинавшееся со случайных наблюдений, показывает, как совсем неожиданно научно-техническое достижение было поддержано тщательно спланированным экспериментом. Именно благодаря такому стечению обстоятельств были открыты многие гормоны.

В 1889 г. Оскар Минковски, молодой ассистент Медицинского колледжа, и Йозеф фон Меринг из Института Хоппе-Зейлера в Страсбурге дружески поспорили о том, какую роль в процессе переваривания жира у собак играет поджелудочная железа, содержащая, как им было известно, липазы. Для решения своего спора исследователи начали опыты по изучению переваривания жира в организме. Они хирургически удалили поджелудочную железу у собаки, и Минковски заметил, что собака в этом случае вырабатывает намного больше мочи, чем нормальная (это общий симптом нелеченного диабета). Содержание глюкозы в моче собаки тоже намного превышало норму (это другой симптом диабета). Полученные данные указывали на то, что отсутствие некоторого продукта поджелудочной железы вызывает развитие диабета.

Минковски попытался исправить последствия удаления поджелудочной железы, снизить содержание глюкозы в моче или в крови, приготовив экстракт из поджелудочной железы собаки, но эти попытки были безуспешны... В настоящее время известно, что инсулин — белок и что поджелудочная железа очень богата протеазами (трипсином и химотрипсином), которые в норме высвобождаются в тонкий кишечник для переваривания пищи. Именно эти протеазы и расщепляли инсулин в экстрактах поджелудочной железы в экспериментах Минковски.

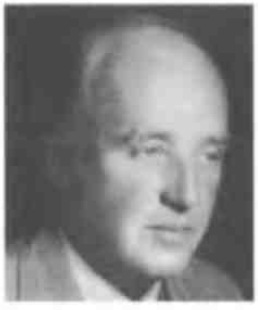
Вопреки значительным усилиям ученых существенного прогресса в выделении и в определении «антидиабетического фактора» не было вплоть до лета 1921 г. В тот год за решение этой задачи взялись Фредерик Г. Бантинг, молодой ученый, работающий в лаборатории Дж. Дж. Р. Маклеода в Торонтском университете, и студент-ассистент Чарлз Бест. Через некоторое время было получено несколько независимых доказательств того, что поставщиком антидиабетического фактора, названного инсулином (от лат. *insula* — остров), служит группа специализированных клеток поджелудочной железы (островки Лангерганса; см. рис. 23-24).

В декабре 1921 г., предприняв все предосторожности для предотвращения протеолиза, Бантинг и Бест (позже к ним присоединился биохимик Дж. Б. Коллип) смогли приготовить очищенный экстракт поджелудочной железы, который снимал симптомы экспериментально вызванного диабета у собак. Уже месяц спустя 25 января 1922 г. их препарат инсулина ввели Леонарду Томсону, 14-летнему мальчику тяжело больному диабетом. Через несколько дней уровень кетоновых тел и глюкозы в моче Томсона значительно снизился; экстракт сохранил ему жизнь. В 1923 г. Бантинг и Маклеод получили Нобелевскую премию за выделение инсулина. Бантинг немедленно объявил, что он должен разделить эту награду с Бестом, Маклеод разделил ее с Коллипом.

К 1923 г. по всему миру фармацевтические компании снабжали уже тысячи пациентов инсулином, экстрагированным из поджелудочных желез свиней.

Фредерик Г. Бантинг, 1891–1941

Дж. Дж. Р. Маклеод, 1876–1935



Чарлз Бест, 1899–1978

Дж. Б. Коллип, 1892–1965

С развитием технологий генной инженерии в 1980-х гг. (гл. 9, т. 1) появилась возможность вырабатывать неограниченные количества человеческого инсулина с помощью микроорганизмов, которых позже стали выращивать в промышленных масштабах. В настоящее время некоторые пациенты с диабетом используют инсулиновые насосы, которые контролируют уровень сахара крови и при необходимости вводят определенные количества инсулина, удовлетворяя изменяющиеся потребности в гормоне во время еды и при нагрузках. В перспективе возможна трансплантация больным диабетом фрагмента панкреатической ткани как источника инсулина, который будет реагировать подобно нормальной поджелудочной железе и высвобождать инсулин в кровоток только при увеличении уровня глюкозы крови.

Ялоу («За развитие радиоиммунологических методов определения пептидных гормонов), которая (вместе с Соломоном А. Берсоном) предложила использовать очень чувствительный метод **радиоиммунного анализа (РИА)** для определения пептидных гормонов и разработала методику изучения действия гормонов. Метод РИА резко изменил весь процесс исследования гормонов, сделав возможным быстрое количественное и специфичное измерение гормонов в ультрамалых дозах.

Ключевое вещество в радиоиммунном анализе — антитела, специфичные к определенному гормону. Очищенный гормон, введенный кролику, вызывает образование антител, связывающихся с этим гормоном с очень высоким сродством и специфичностью. При инкубации одного и того же (постоянного) количества изолированных антител с известным количеством радиоактивно меченного гормона с антителом связываются определенная доля радиоактивного гормона **(рис. 23-3)**. Если помимо радиоактивно меченного гормона инкубируется и немеченый гормон, то

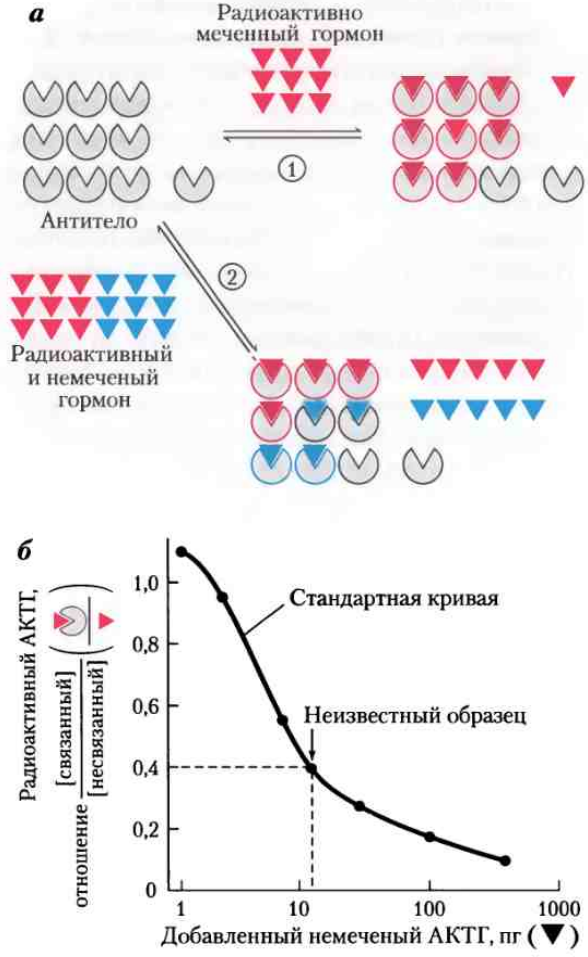


Рис. 23-3. Радиоиммунный анализ (РИА). *а* — низкие концентрации радиоактивно меченного гормона (красный) инкубировали ① с определенным количеством антител, специфичных для этого гормона, или ② с определенным количеством антител и немеченым гормоном в различных концентрациях (голубой). В последнем случае немеченый гормон конкурирует с меченым гормоном за связывание с антителом; количество связанного меченого гормона изменяется обратно пропорционально концентрации немеченого гормона. *б* — радиоиммунный анализ адренокортикотропного гормона (АКТГ, или кортикотропина). Для определения количества (немеченого) АКТГ в неизвестном образце строят стандартную кривую в координатах: отношение концентраций связанного радиоактивно меченного АКТГ и несвязанного против логарифма концентрации добавленного немеченого АКТГ. Если аликвоте с неизвестным количеством немеченого гормона соответствует отношение [связанный АКТГ]/[несвязанный АКТГ] = 0,4 (отмечено стрелкой), то эта аликвота должна содержать около 10 пг гормона.

немеченый гормон конкурентно вытесняет некоторое количество меченого гормона из его центра связывания на антителе. По концентрации, при которой меченый гормон вытесняется с антитела, рассчитывают количество немеченого гормона в образце крови или тканевого экстракта. При использовании очень высокорадиоактивного гормона можно повысить чувствительность метода до пикограммов гормона. Позднее появилась модификация этого метода — иммунофлуоресцентный анализ (ИФА); см. рис. 5-26, *б*, т. 1.

Гормоны действуют через специфические клеточные рецепторы с высоким сродством

Как мы видели в гл. 12 (т. 1), все гормоны действуют через высокоспецифичные рецепторы в чувствительных к гормону клетках-мишенях, связывающих гормоны с высоким сродством (см. рис. 12-2, т. 1). Каждый тип клеток обладает своей собственной комбинацией рецепторов гормонов, которая определяет способность клеток отвечать на гормоны. Более того, клетки двух разных типов с одинаковыми рецепторами могут иметь разные внутриклеточные мишени для действия гормона и по-разному отвечать на один и тот же гормон. Специфичность действия гормонов определяется структурной комплементарностью гормона к рецептору; это взаимодействие очень избирательно, и поэтому похожие по структуре гормоны могут оказывать разное действие. Высокое сродство к определенному гормону позволяет клеткам отвечать на гормон в очень низкой концентрации. При лекарственной терапии гормональными препаратами, чтобы не нарушить тонкое равновесие в организме, необходимо исходя из структуры препарата учитывать соответствие специфичности и сродства у лекарства и природного гормона. Напомним, взаимодействие рецептора с гормоном можно количественно измерить с помощью **анализа Скэтчарда** (см. доп. 12-1, т. 1), который при оптимальных условиях позволяет рассчитать сродство (константу диссоциации комплекса) и число центров связывания гормона в препарате рецептора.

В зависимости от типа гормона взаимодействие гормона с рецептором может происходить на поверхности клетки, в цитозоле или в ядре. Внутриклеточные последствия взаимодействий гормон–рецептор можно разделить по крайней мере на шесть основных типов. (1) Внутри клетки образуется вторичный мессенджер (такой, как cAMP или инозиттрисфосфат), который действует как аллостерический регулятор одного или более ферментов. (2) Рецепторная тирозинкиназа активируется внеклеточным гормоном. (3) Рецепторная гуанилатциклаза активируется и образует вторичный мессенджер cGMP. (4) Из-за открывания или закрывания регулируемых гормоном ионных каналов происходит изменение мембранного потенциала. (5) Рецептор адгезии на клеточной поверхности взаимодействует с молекулами внеклеточного матрикса и сообщает информацию на цитоскелет. (6) Стероид или стероидоподобная молекула вызывает изменение уровня экспрессии (транскрипции ДНК в мРНК) одного или более генов, это происходит при связывании гормона с белком своего ядерного рецептора (см. рис. 12-2, т. 1).

Водорастворимые пептидные гормоны и гормоны-амины (например, инсулин и адреналин) действуют внеклеточно, связываясь на поверхности клетки с рецепторами, пронизывающими плазматическую мембрану (**рис. 23-4**). Когда гормон связывается с внеклеточным доменом рецептора, конформация рецептора меняется так же, как это происходит у аллостерического фермента при связывании молекулы эффектора. Конформационное изменение вызывает последующие эффекты гормона.

Одна молекула гормона, образуя комплекс гормон–рецептор, активирует катализатор, который вызывает продуцирование многих молекул вторичного мессенджера; таким образом, рецептор не только передает сигнал, но и усиливает его. Далее сигнал может быть амплифицирован сигнальным каскадом из последовательных стадий, в которых катализатор активирует катализатор, приводя к очень большому усилению первоначального сигнала. Каскад такого типа происходит при регуляции адреналином синтеза и расщепления гликогена (см. рис. 12-7, т. 1). Адреналин (через свой рецептор) активирует аденилатциклазу, вырабатывающую много молекул cAMP в ответ на каждую молекулу гормона, связанную с рецептором. Циклический AMP в свою очередь активирует cAMP-зависимую протеинкиназу (протеинкиназу A), активирующую фосфорилазу киназы, которая активирует гликогенфосфорилазу. В результате происходит амплификация (усиление) сигнала: одна молекулу адреналина вызывает образование многих тысяч молекул глюкозо-1-фосфата из гликогена.

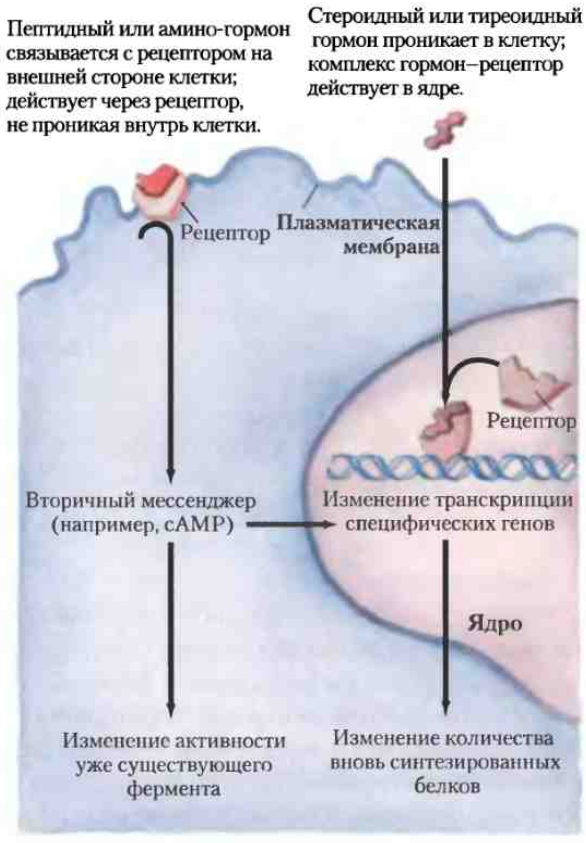


Рис. 23-4. Два основных механизма действия гормона. Пептидные гормоны и гормоны-амины действуют быстрее, чем стероидные и тиреоидные гормоны.

Нерастворимые в воде гормоны (стероиды, ретиноиды и гормоны щитовидной железы) легко проходят через плазматическую мембрану своих клеток-мишеней к рецепторным белкам в ядре (рис. 23-4). Для этого класса гормонов характерно, что комплекс гормон–рецептор сам передает сигнал; он взаимодействует с ДНК, меняя экспрессию специфических генов, при этом изменяется соотношение ферментов в клетке и, таким образом, изменяется и клеточный метаболизм (см. рис. 12-29, т. 1).

Гормоны, которые действуют через рецепторы плазматической мембраны, в основном инициируют очень быстрые физиологические или биохимические ответы. Так, уже через несколько секунд после выделения в кровоток адреналина из мозгового вещества надпочечников в скелетных мышцах происходит ответное ускоренное расщепление гликогена. Напротив, гормоны щитовидной железы и половые (стероидные) гормоны дают максимальные ответы в тканях-мишенях только через часы или даже дни. Эти различия в характерных временах ответа соответствуют различным способам действия. В основном быстро действующие гормоны вызывают изменения активности с помощью аллостерического механизма или ковалентной модификации одного или нескольких из уже существующих в клетке ферментов. Медленно действующие гормоны, как правило, меняют экспрессию генов, приводя к усилению или подавлению синтеза регулируемых ими белков.

Гормоны химически разнообразны

В организме млекопитающих синтезируются гормоны нескольких классов, которые различаются по своей химической структуре и способам действия (табл. 23-1). Снаружи клетки-мишени действуют, связываясь с поверхностными рецепторами, пептидные гормоны, эйкозаноидные гормоны и гормоны-амины. Стероиды, витамин D, ретиноиды и гормоны щитовидной железы проникают внутрь клетки и действуют через ядерные рецепторы. Монооксид азота также проникает в клетку, но активирует цитозольный фермент, гуанилатциклазу (см. рис. 12-10, т. 1).

Классификация гормонов может быть также основана на пути от центра их высвобождения до ткани-мишени. **Эндокринные** (от греч. *endon* — внутри и *krinein* — освобождать) гормоны высвобождаются в кровь и переносятся к клеткам-мишеням через все тело (например, инсулин). **Паракринные** гормоны выделяются в межклеточное пространство и диффундируют к соседним клеткам-мишеням (к такому типу принадлежат эйкозаноидные гормоны). **Аутокринные** гормоны высвобождаются теми клетками, на которые они же и действуют, связываясь с рецепторами на клеточной поверхности.

Млекопитающие обладают необычайной уникальной гормональной сигнальной системой. Но у насекомых и нематод также есть высокоразвитые системы гормональной регуляции, причем механизмы регуляции во многом похожи на механизмы регуляции у млекопитающих. Растения тоже используют гормональные сигналы для координации ферментативной активности в разных тканях (гл. 12). Исследование действия расти-

Таблица 23-1 Классы гормонов

Тип	Пример	Путь синтеза	Способ действия
Пептиды	Инсулин, глюкагон	Протеолитический процессинг прогормона	Рецепторы плазматической мембраны; вторичные мессенджеры
Катехоламины	Адреналин	Из тирозина	
Эйкозаноиды	PGE_1	Из арахидоновой кислоты (жирная кислота 20:4)	
Стероиды	Тестестерон	Из холестерина	Ядерные рецепторы; регуляция транскрипции
Витамин D	1,25-Дигидроксихолекальциферол	Из холестерина	
Ретиноиды	Ретиноевая кислота	Из витамина A	
Тиреоидные гормоны	Трииодтиронин (T_3)	Из Tyr в тиреоглобулине	
Монооксид азота	Монооксид азота	Окисление аргинина кислородом	Цитозольный рецептор (гуанилатциклаза) и вторичный мессенджер (cGMP)

тельных гормонов продвигается не так успешно, как изучение гормонов животных, но уже известно, что некоторые механизмы у них одинаковы. Для иллюстрации структурного разнообразия и механизмов действия гормонов млекопитающих обсудим для каждого класса гормонов (табл. 23-1) наиболее яркие примеры.

Петидные гормоны. Пептидные гормоны могут состоять из 3–200 или более аминокислотных остатков. Это гормоны поджелудочной железы инсулин, глюкагон и соматостатин, гормон паращитовидных желез кальцитонин и все гормоны гипоталамуса и гипофиза (см. ниже). Эти гормоны синтезируются на рибосомах в форме длинных белков-предшественников (прогормонов), затем упаковываются в секреторные везикулы и протеолитически расщепляется до образования активных пептидов. **Инсулин** — это небольшой белок (M_r 5800) с двумя полипептидными цепями A и B, соединенными двумя дисульфидными связями. В поджелудочной железе синтезируется неактивный одноцепочечный предшественник препроинсулин (**рис. 23-5**) с сигнальной

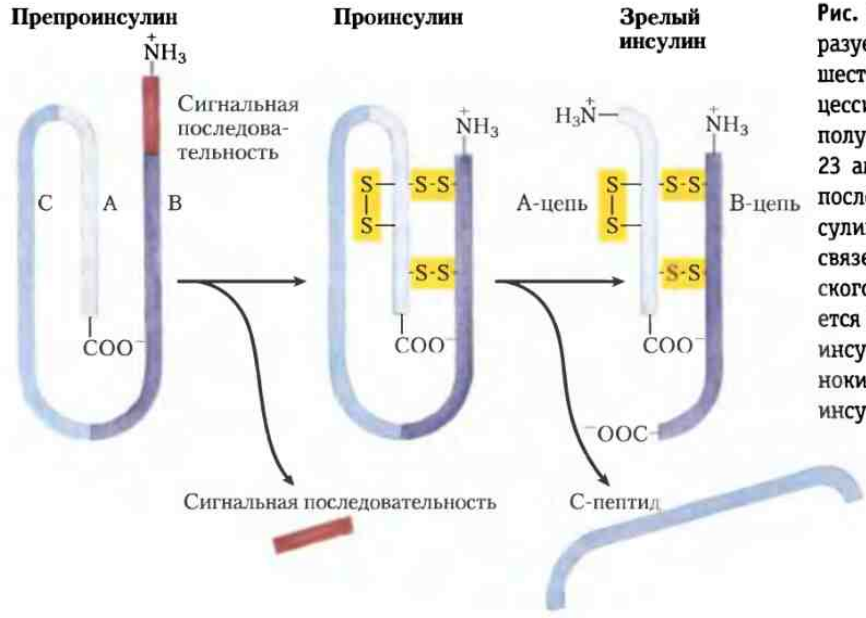


Рис. 23-5. Инсулин. Зрелый инсулин образуется из макромолекулы своего предшественника препроинсулина при процессинге путем протеолиза. Проинсулин получается при удалении сегмента из 23 аминокислотных остатков (сигнальная последовательность) с N-конца препроинсулина и образовании трех дисульфидных связей. В ходе дальнейшего протеолитического расщепления с проинсулина удаляется C-пептид, при этом получается зрелый инсулин, состоящий из A- и B-цепей. Аминокислотная последовательность бычьего инсулина представлена на рис. 3-24 в т. 1.

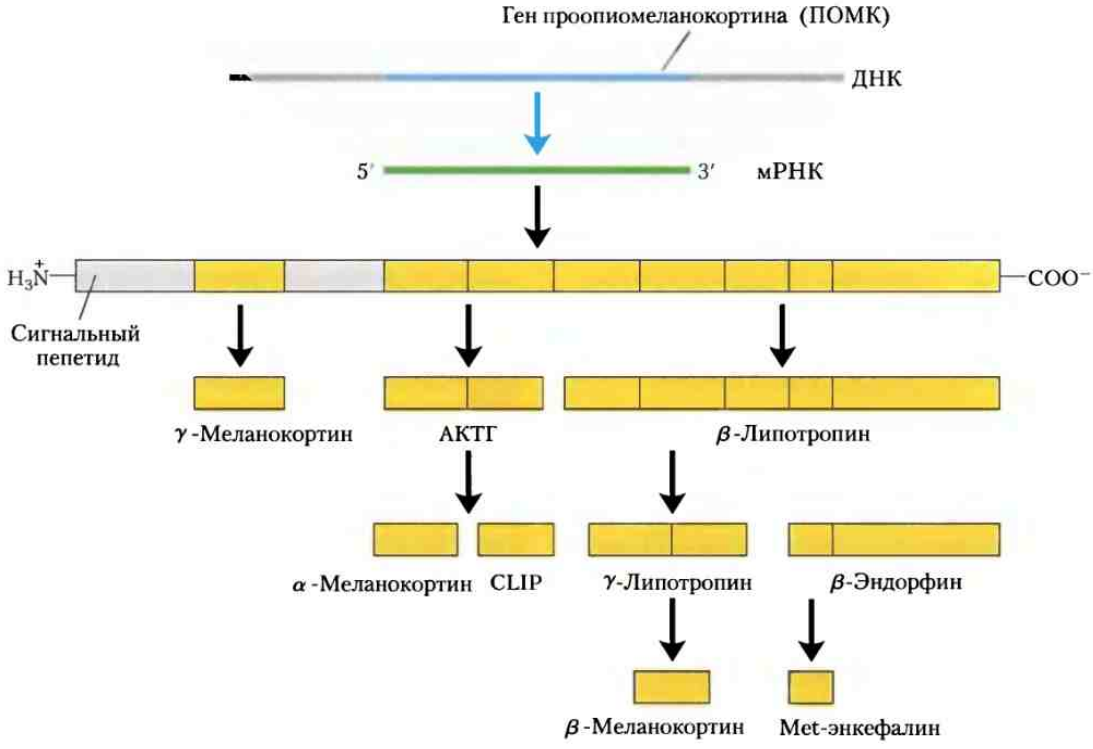


Рис. 23-6. Протеолитический процессинг предшественника проопиомеланокортина (ПОМК). Исходный продукт гена ПОМК — это длинный полипептид, который подвергается расщеплению серией протеаз. Это приводит к образованию АКТГ, β- и γ-липотропинов, α-, β- и γ-МСГ (меланоцитстимулирующих гормонов), CLIP (кортикотропинподобного пептидного интермедиата), β-эндорфина и Met-энкефалина. Места расщепления — между парами аминокислотных остатков Arg–Lys, Lys–Arg, Lys–Lys с основными свойствами.

последовательностью на N-конце, которая и направляет его в секреторные везикулы. (Сигнальные последовательности обсуждаются в гл. 27; см. рис. 27-38, т. 3.) Протеолитическое удаление сигнальной последовательности и образование трех дисульфидных связей приводит к проинсулину, который хранится в секреторных гранулах β-клеток поджелудочной железы. При активации секреции инсулина повышенным уровнем глюкозы накопленный в крови проинсулин превращается в активный инсулин специфическими протеазами, расщепляющими две пептидные связи с образованием зрелой молекулы инсулина.

Но гораздо чаще вместо образования одного большого пептидного гормона из белка-прогормона получается несколько активных гормонов. Яркий пример того, когда несколько гормонов кодированы единственным геном, — это проопиомеланокортин (ПОМК). Ген ПОМК кодирует большой полипептид, который последовательно дробится по крайней мере на девять биологически активных пептидов (**рис. 23-6**). Концевые остатки пептидных гормонов очень часто модифицируются, как, например, в случае TRH (рис. 23-2).

Концентрация пептидных гормонов внутри секреторных гранул такая высокая, что содержимое везикул почти кристаллическое; поэтому когда при экзоцитозе содержимое гранул высвобождается, одновременно появляется большое количество гормона. Эндокринные железы, продуцирующие пептиды, окружены фенестрированными капиллярами (они проницаемы для пептидов), таким образом молекулы гормонов легко проникают в кровоток и транспортируются в клетки-мишени по всему организму. Как

отмечалось ранее, все пептидные гормоны действуют, связываясь с рецепторами на плазматической мембране. При этом образуется вторичный мессенджер, который, попадая в цитозоль, меняет активность определенного внутриклеточного фермента, и тем самым меняя весь клеточный метаболизм.

Катехоламинные гормоны. Водорастворимые вещества **адреналин** и **норадреналин** относят к катехоламинам из-за их структурного сходства с катехолом. Синтезируются они из тирозина.

Тирозин ⟶ L-Дофа ⟶ Дофамин ⟶
⟶ Норадреналин ⟶ Адреналин

Образующиеся в мозге и других тканях нервной системы катехоламины действуют как нейромедиаторы. Но гормоны адреналин и норадреналин синтезируются и секретируются надпочечниками. Как и пептидные гормоны, катехоламины содержатся внутри секреторных везикул в очень высокой концентрации, а высвобождаются посредством экзоцитоза. Действуют они, связываясь с рецепторами на поверхности клеток, что приводит к образованию внутриклеточных вторичных мессенджеров. С помощью катехоламинов осуществляется широкое разнообразие физиологических ответов на сильный стресс (см. табл. 23-6).

Эйкозаноидные гормоны (простагландины, тромбоксаны, лейкотриены) образуются из арахидоновой кислоты (20-углеродная жирная полиненасыщенная кислота).

В отличие от гормонов, о которых мы говорили выше, они не синтезируются заранее и не хранятся, а вырабатываются, только когда нужны. Эйкозаноидные гормоны образуются из архидоновой кислоты, которая высвобождается из мембранных фосфолипидов под действием ферментативной активности фосфолипазы A_2 (см. рис. 10-18, т. 1). В тканях млекопитающих очень широко распространены ферменты, участвующие в биосинтезе простагландинов и тромбоксанов (см. рис. 21-15). Вырабатывать эйкозаноиды и посылать с их помощью сигналы способно большинство клеток, а клетки многих тканей могут отвечать на такие сигналы, активируя специфические рецепторы плазматической мембраны. Паракринные эйкозаноидные гормоны секретируются в тканевую жидкость (а иногда в кровь) и действуют на окружающие клетки.

Простагландины вызывают сокращение гладких мышц, в том числе кишечника и матки (поэтому их можно использовать для усиления схваток при родовспоможении). Эйкозаноиды также можно использовать как средство, снимающее боль и воспаление во всех тканях. Многие противовоспалительные лекарственные препараты действуют, ингибируя некоторые стадии синтеза простагландина (см. рис. 21-5). Тромбоксаны регулируют работу тромбоцитов и таким образом влияют на свертываемость крови. Лейкотриены LTC_4 и LTD_4 действуют на рецепторы плазматической мембраны, вызывая сокращения гладких мышц кишечника, бронхов и трахеи. Они опосредуют анафилактический шок — сильный негативный иммунный ответ. ■

Стероидные гормоны (адренокортикоидные и половые гормоны) синтезируются из холестерина несколькими эндокринными железами.

Связываясь с белками-переносчиками, они транспортируются кровотоком к клеткам-мишеням. В коре надпочечников вырабатывается более 50 кортикостероидных гормонов; в ферментативных реакциях из D-кольца холестерина удаляется боковая цепь и внедряется кислород с образованием кето- и гидроксильных групп. Многие из этих реакций протекают с участием ферментов, содержащих цитохром P-450

(см. доп. 21-1). Существуют два типа стероидных гормонов. Глюкокортикоиды (например, кортизол) преимущественно действуют на метаболизм углеводов, минералокортикоиды (например, альдостерон) регулируют концентрацию электролитов в крови. В семенниках и яичниках синтезируются андрогены (тестостерон) и эстрогены (например, эстрадиол, см. рис. 10-19, т. 1). Их синтез происходит с участием ферментов, содержащих цитохром Р-450. Ферменты отщепляют боковую цепь от холестерина и присоединяют атомы кислорода. Андрогены и эстрогены действуют на половое развитие, половое поведение и на многие другие функции организма, как связанные, так и не связанные с репродуктивной сферой.

Все стероидные гормоны связываются с ядерными рецепторами и изменяют уровень экспрессии специфических генов (с. 643 в т. 1). Они могут действовать и быстрее — через рецепторы на плазматической мембране.

Гормон витамина D. Кальцитриол (1,25-дигидроксихолекальциферол) вырабатывается в печени и почках из витамина D путем ферментативного гидроксилирования (рис. 10-20, *а* в т. 1). Витамин D организм получает с пищей или при фотолизе 7-дегидрохолестерина в коже на солнечном свету.

7-Дегидрохолестерин
↓ УФ-свет
Витамин D_3
(холекальциферол)
↓
25-Гидроксихолекальциферол
↓
1,25-Дегидроксихолекальциферол

Кальцитриол участвует в гомеостазе Ca^{2+} совместно с гормоном паращитовидных желез, регулируя концентрацию ионов кальция в крови и равновесие между запасаемым Ca^{2+} и Ca^{2+}, мобилизованным из костей. Действуя через ядерные рецепторы, кальцитриол активирует синтез Ca^{2+}-связывающего белка в кишечнике, это необходимо для усвоения Ca^{2+}, поступающего с пищей. Неадекватное поступление с пищей витамина D или нарушения в биосинтезе кальцитриола приводят к таким серьезным заболеваниям, как рахиты, при которых кости становятся слабыми и уродливыми (рис. 10-20, *б* в т. 1). ■

Ретиноидные гормоны. Ретиноиды — сильнодействующие гормоны, регулирующие рост и дифференцировку клеток через ядерные ретиноидные рецепторы. Прогормон ретинол синтезируется из витамина А, преимущественно в печени (см. рис. 10-21 в т. 1); во многих тканях ретинол превращается в ретиноевую кислоту.

β-Каротин
↓
Витамин A_1
(ретинол)
↓
Ретиноевая кислота

Ретиноевая кислота действует на все ткани, так как все типы клеток обладают по крайней мере одной формой ядерного ретиноидного рецептора. У взрослых самые главные мишени — роговица, кожа, эпителий легких и трахей и иммунная система. Ретиноевая кислота регулирует синтез белков, играющих большую роль в период роста и в дифференцировке клеток. Излишек витамина А может вызывать врожденные уродства, поэтому беременным женщинам советуют не использовать содержащие ретиноиды кремы, предназначенные для лечения сильной угревой сыпи. ■

Тиреоидные гормоны. Тиреоидные гормоны T_4 (тироксин) и T_3 (трииодтиронин) синтезируются из белка-предшественника тиреоглобулина (M_r 660 000). В щитовидной железе ферментативно иодируется более 20 остатков тирозина в молекуле тиреоглобулина. Затем два остатка иодтирозина соединяются с образованием гормона тироксина. При необходимости он высвобождается путем протеолиза. Моноиодтирозин, соединяясь с дииодтирозином, образует активный гормон T_3, который тоже высвобождается при протеолизе.

Тиреоглобулин–Туг
↓
Тиреоглобулин–Туг-I
(иодированные остатки Туг)
↓ протеолиз
Тироксин (T_4),
трииодтиронин (T_3)

Тиреоидные гормоны действуют через ядерные рецепторы, стимулируя энергетический метаболизм, особенно в печени и в мышцах, усиливая экспрессию генов, кодирующих ключевые фермента катаболизма.

Монооксид азота (NO). Монооксид азота — достаточно стабильный радикал, который синтезируется из молекулы кислорода и азота гуанидина в аргинине (рис. 22-31) по реакции, катализируемой **синтазой NO**.

$$\text{Аргинин} + 1^1/_2\,\text{NADPH} + 2\,O_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow \text{NO} + \text{цитруллин} + 2\,H_2O + 1^1/_2\,\text{NADP}^+$$

Этот фермент обнаружен во многих тканях и в клетках разного типа: в нейронах, макрофагах, гепатоцитах, миоцитах гладких мышц, в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов и почек. Действует NO недалеко от места выделения, проникая в клетки-мишени и активируя в цитоплазме фермент гуанилатциклазу, которая катализирует образование вторичного мессенджера cGMP (см. рис. 12-20 в т. 1).

Высвобождение гормонов регулируется иерархически нейрональными и гормональными сигналами

Изменение концентраций гормонов регулирует клеточные процессы, но что же регулирует уровень самих гормонов? За это ответственна центральная нервная система (ЦНС), которая, получая сигналы, например, об опасности, голоде, приеме пищи, составе и давлении крови от многих внутренних и внешних сенсоров, организует секрецию соответствующих гормонов эндокринными железами. Чтобы разобраться более подробно, рассмотрим основные гормональные системы в организме человека, а также их функциональные взаимосвязи.

Рис. 23-7. Главные эндокринные железы. Железы отмечены красным цветом.

На **рис. 23-7** показано анатомическое расположение главных желез внутренней секреции у человека, **рис. 23-8** представляет «цепь команд» в иерархии гормональной сигнализации. Координационный центр эндокринной системы — это **гипоталамус** — небольшая область в мозге (**рис. 23-9**), где принимаются и интегрируются сообщения от центральной нервной системы. В ответ на сигналы ЦНС гипоталамус вырабатывает регуляторные гормоны (релизинг-факторы), которые проходят прямо к соседней железе гипофизу по специальным кровеносным сосудам и нейронам, соединяющим обе железы (рис. 23-9, *б*). Гипофиз состоит из двух функционально различных частей. **Задняя доля гипофиза** содержит окончания аксонов множества нейронов, тела которых располагаются в гипоталамусе. Эти нейроны вырабатывают короткие пептидные гормоны окситоцин и вазопрессин (**рис. 23-10**), перемещающиеся вниз по аксону к нервным окончаниям в гипофизе, где они накапливаются в секреторных гранулах, ожидая сигнала к высвобождению.

Передняя доля гипофиза отвечает на приносимые кровью гормоны гипоталамуса, вырабатывая **тропные гормоны**, или тропины (от греч. *tropos* — поворот). Это относительно длинные полипептиды, они активируют ряд желез внутренней секреции (рис. 23-8): кору надпочечников, щитовидную железу, яичники и семенники. В ответ эти железы секретируют свои специфические гормоны, которые переносятся кровотоком к клеточным рецепторам в тканях-мишенях. Например, кортикотропин-высвобождающий гормон гипоталамуса стимулирует высвобождение АКТГ передней долей гипофиза, и АКТГ направляется к пучковой зоне коры надпочечников и активирует высвобождение кортизола. Кортизол, последний гормон в этом каскаде, действует через свои рецепторы, изменяя метаболизм в клетках-мишенях разного типа. Один из эффектов кортизола в гепатоцитах — увеличение скорости глюконеогенеза.

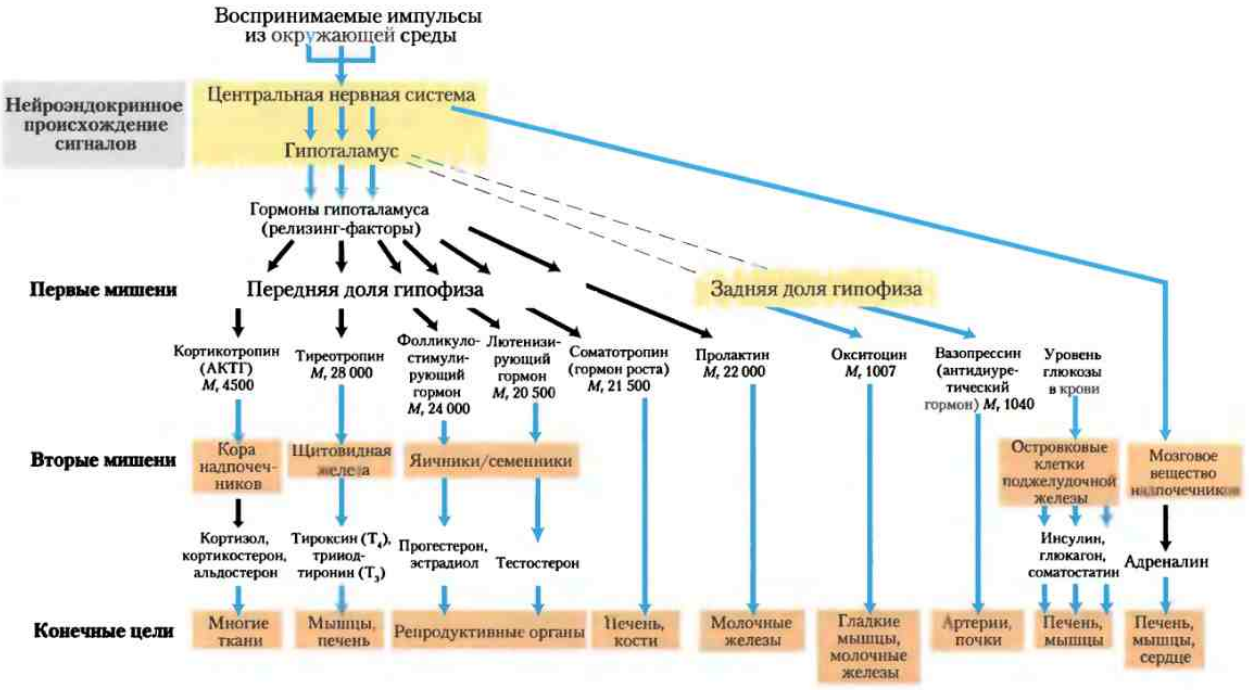


Рис. 23-8. Главные эндокринные системы и их ткани-мишени. Сигналы, формирующиеся в центральной нервной системе (*вверху*), проходят через серию каскадов к конечным тканям-мишеням (*внизу*). Кроме показанных на схеме желез, гормоны секретируют также тимус, эпифиз и группы клеток в желудочно-кишечном тракте. Штриховыми линиями обозначены связи в ЦНС.

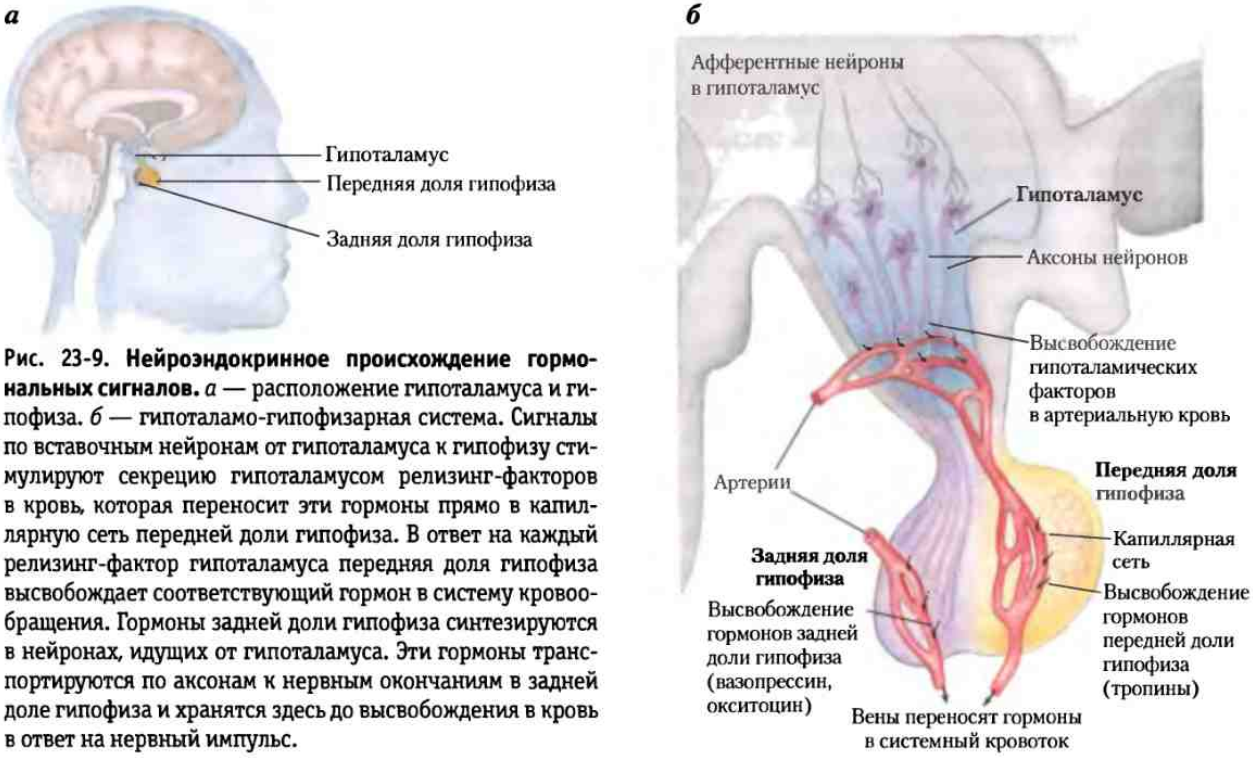
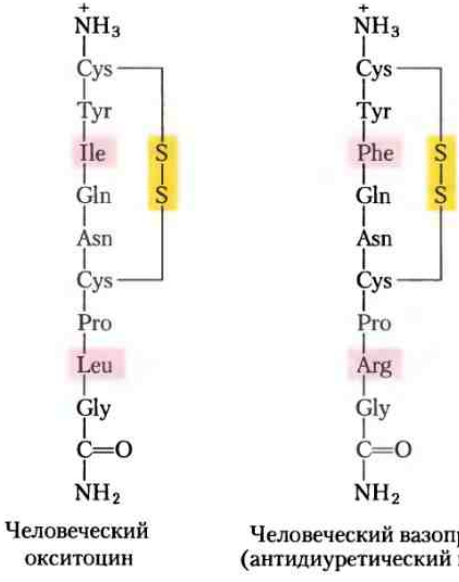


Рис. 23-9. Нейроэндокринное происхождение гормональных сигналов. *а* — расположение гипоталамуса и гипофиза. *б* — гипоталамо-гипофизарная система. Сигналы по вставочным нейронам от гипоталамуса к гипофизу стимулируют секрецию гипоталамусом релизинг-факторов в кровь, которая переносит эти гормоны прямо в капиллярную сеть передней доли гипофиза. В ответ на каждый релизинг-фактор гипоталамуса передняя доля гипофиза высвобождает соответствующий гормон в систему кровообращения. Гормоны задней доли гипофиза синтезируются в нейронах, идущих от гипоталамуса. Эти гормоны транспортируются по аксонам к нервным окончаниям в задней доле гипофиза и хранятся здесь до высвобождения в кровь в ответ на нервный импульс.



Человеческий окситоцин

Человеческий вазопрессин (антидиуретический гормон)

Рис. 23-10. Два гормона задней доли гипофиза. На С-концах обоих пептидов находится глицинамид $-NH-CH_2-CONH_2$ (амидирование С-концов характерно для коротких пептидных гормонов; см. рис. 23-2). Эти два гормона по составу идентичны, кроме двух остатков (выделены розовым), но они обладают очень разным биологическим действием. Окситоцин влияет на гладкие мышцы матки и на молочные железы, вызывая сокращение матки во время родов и выделение молока при лактации. Вазопрессин (антидиуретический гормон) увеличивает всасывание воды в почках и вызывает сужение кровеносных сосудов, таким образом повышая кровяное давление.

Гормональные каскады, ведущие к высвобождению кортизола и адреналина, вызывают значительное усиление начального сигнала и позволяют очень тонко и точно регулировать поступление конечного гормона каскада (**рис. 23-11**). На каждом уровне каскада «малый» сигнал усиливается до «большего» ответа. Первоначальный электрический импульс, пришедший в гипоталамус, ведет к выделению нескольких *нанограммов* кортикотропин-высвобождающего гормона, который усиливает сигнал, вызывая высвобождение нескольких *микрограммов* кортикотропина. Кортикотропин действует на кору надпочечников, стимулируя выделение нескольких *миллиграммов* кортизола, в результате происходит амплификация сигнала по крайней мере в миллион раз.

На каждом уровне гормонального каскада возможно ингибирование ранних стадий по механизму обратной связи — завышенный сверх необходимого уровень конечного гормона или одного

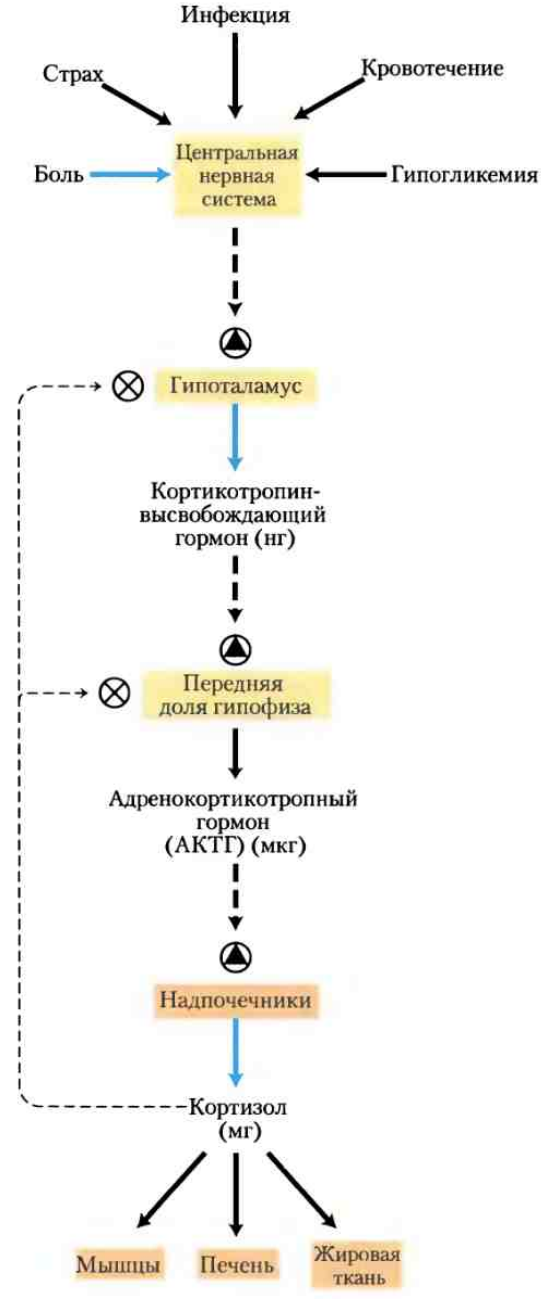


Рис. 23-11. Каскад высвобождения гормонов после импульса из центральной нервной системы в гипоталамус. В каждой эндокринной железе сигнал с более высокого уровня принимается, амплифицируется и приводит к высвобождению следующего в каскаде гормона. Каскад на нескольких уровнях чувствителен к регуляции по механизму обратной связи путем ингибирования конечным гормоном (в случае кортизола). Иными словами, продукт регулирует свое собственное образование, как это происходит по механизму обратной связи путем ингибирования биосинтеза внутри клетки.

из промежуточных гормонов ингибирует высвобождение предыдущих гормонов каскада. Здесь механизм обратной связи приводит к тому же результату, что и механизм, лимитирующий образование продукта в путях биосинтеза (ср. рис. 23-11 и рис. 6-28 в т. 1): продукт синтезируется (или высвобождается) только до тех пор, пока не будет достигнута необходимая концентрация.

Краткое содержание раздела 23.1 ГОРМОНЫ: РАЗЛИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ ДЛЯ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИЙ

- Гормоны — химические посредники, секретируемые определенными тканями в кровь или тканевую жидкость, служащие для регуляции активности других клеток или тканей.
- Радиоиммунный анализ (РИА) и иммунофлуоресцентный анализ (ИФА) — два очень чувствительных метода для обнаружения и количественного определения уровня гормонов.
- Пептидные гормоны, эйкозаноидные гормоны и аминогормоны действуют снаружи клетки-мишени на специфические рецепторы плазматической мембраны, изменяя уровень внутриклеточного вторичного мессенджера.
- Стероидные гормоны, ретиноидные гормоны, витамин D и гормоны щитовидной железы проникают в клетки-мишени и взаимодействуют со специфическими ядерными рецепторами.
- Гормональные каскады, в которых катализатор активирует катализатор, усиливают (амплифицируют) первоначальный стимул в несколько раз, часто за очень короткое время (за секунды).
- Нервные импульсы стимулируют гипоталамус для отправки определенных гормонов к гипофизу, стимулируя (или ингибируя) тем самым высвобождение тропных гормонов. Эти гормоны в свою очередь стимулируют другие железы внутренней секреции (щитовидную железу, надпочечники, поджелудочную железу) для секреции их собственных гормонов, которые уже стимулируют ткани-мишени.

23.2. Тканеспецифичный метаболизм: разделение функций

Каждая ткань человеческого тела обладает специализированными функциями, что находит отражение в анатомии и метаболической активности (**рис. 23-12**). Скелетные мышцы осуществляют направленное движение; жировая ткань сохраняет и выделяет энергию в форме жиров, которые служат топливом для всего тела; клетки мозга транспортируют ионы, создавая электрические сигналы. Печень играет центральную обрабатывающую и распределяющую роль в метаболизме и поставляет по кровотоку во все другие органы и ткани необходимую смесь питательных веществ. Центральная функциональная роль печени подтверждается ее взаимосвязями со всеми другими внепеченочными, или периферическими, тканями и органами. Поэтому наше обсуждение разделения метаболических функций начнем с превращений углеводов, аминокислот и жиров в печени млекопитающих. Далее рассмотрим и кратко охарактеризуем основные метаболические функции жировой, мышечной и мозговой тканей, а также крови — посредника между всеми тканями организма.

Процессы в печени и распределение питательных веществ

У млекопитающих в процессе пищеварении три основных класса питательных веществ (углеводы, белки и жиры) подвергаются ферментативному гидролизу, приводящему к расщеплению их на менее сложные соединения. Расщепление необходимо, так как через эпителиальные клетки, выстилающие стенки кишечника, всасываются только относительно небольшие молекулы. Многие жирные кислоты и моноацилглицерины, высвобождаемые при переваривании жиров в кишечнике, превращаются в эпителиальных клетках снова в триацилглицерины.

После того как произошло всасывание основных количеств сахаров и аминокислот, а некоторое количество триацилглицеринов было перенесено кровотоком к печени, оставшиеся триацилглицерины с лимфой поступают в жировую ткань. «Воротами» из пищеварительной системы в печень служит воротная вена. Поэтому-то печень — первый орган, которого достигают все питательные вещества пищи на своем

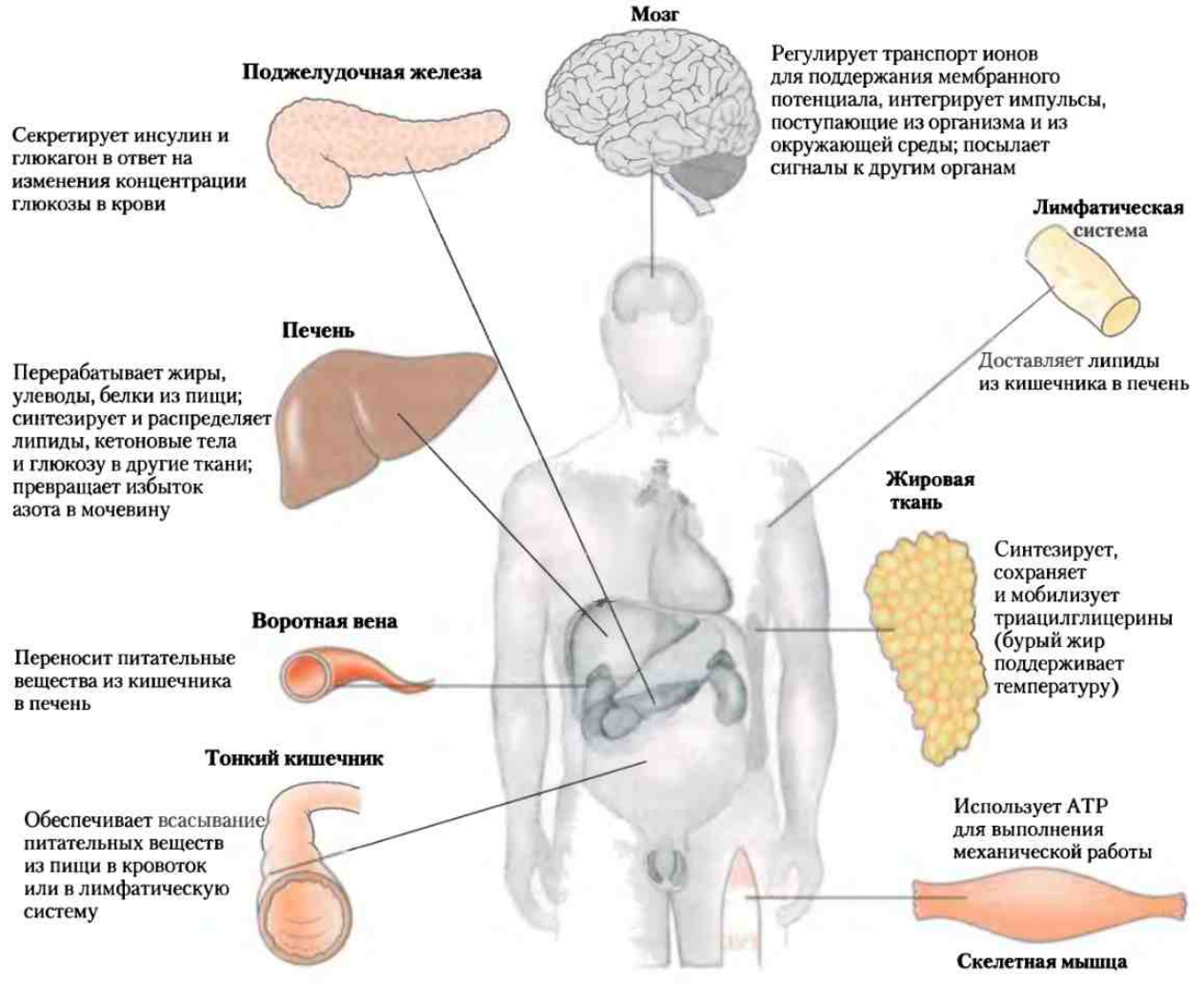


Рис. 23-12. Специализированные метаболические функции тканей млекопитающих.

пути. Печень содержит в основном клетки двух типов. Звездчатые эндотелиоциты — это фагоциты, выполняющие иммунную функцию. Но сейчас нас больше интересуют гепатоциты. Они превращают полученные из пищи питательные вещества в топливные молекулы и биосинтетические предшественники, необходимые другим тканям, и выделяют их в кровь. Разнообразие и количество поступающих в печень питательных веществ варьируют в зависимости от нескольких факторов, включая рацион питания и время между приемами пищи. Потребность разных органов и тканей в энергии и молекулах-предшественниках также различается в зависимости от уровня активности человека и его конституции.

Чтобы учесть эти постоянно меняющиеся параметры, печень обладает значительной метаболической пластичностью. Например, при богатой белками диете уровень ферментов для расщепления аминокислот и глюконеогенеза в гепатоцитах становится очень высоким. Если в пище много углеводов, то буквально в течение нескольких часов концентрации этих ферментов начинают снижаться, а гепатоциты увеличивают производство ферментов, необходимых для метаболизма углеводов и синтеза жиров. Оборот ферментов печени (их синтез и распад) в 5–10 раз выше скорости ферментативного оборота в других тканях, например в мышцах. Внепеченочные ткани тоже могут приспоса-

бливать свой метаболизм к текущим условиям, но в нашем организме нет органа, более способного к адаптации, чем печень, и играющего такую же важную роль в общем метаболизме. Далее мы рассмотрим возможные пути метаболизма сахаров, аминокислот и липидов, приносимых в печень кровотоком. Для наглядности метаболических превращений главные пути и процессы суммированы в табл. 23-2, там же приведены номера рисунков, где каждый путь представлен подробно. Здесь мы только обобщаем данные об этих путях, указывая номер стадии на рис. 23-13–23-15.

Сахара. Переносчик глюкозы в гепатоцитах (GLUT2) столь эффективен, что обеспечивает внутри гепатоцита практически такую же концентрацию глюкозы, как в крови. Глюкоза, проникающая в гепатоцит, фосфорилируется гексокиназой IV (глюкокиназой) до глюкозо-6-фосфата. Глюкокиназа имеет настолько высокую константу K_M (мМ), что не ингибируется продуктом своей реакции — глюкозо-6-фосфатом, успешно подавляющим изоферменты гексокиназы в других клетках (с. 141). В присутствии глюкокиназы гепатоциты продолжают фосфорилирование глюкозы, даже

Таблица 23-2 Метаболические пути углеводов, аминокислот и жиров, обсуждаемые в предыдущих главах

Путь	Номер рисунка
Цикл лимонной кислоты: ацетил-CoA → 2 CO_2	16-7
Окислительное фосфорилирование: синтез ATP	19-20
Катаболизм углеводов	
Гликогенолиз: гликоген → глюкозо-1-фосфат → глюкоза крови	15-25; 15-26
Включение гексоз в гликолиз: фруктоза, манноза, галактоза → глюкозо-6-фосфат	14-10
Гликолиз: глюкоза → пируват	14-2
Пируватдегидрогеназная реакция: пируват → ацетил-CoA	16-2
Молочнокислое брожение: глюкоза → лактат + ATP	14-3
Пентозофосфатный путь: глюкозо-6-фосфат → пентозофосфаты + NADPH	14-21
Анаболизм углеводов	
Глюконеогенез: интермедиаты цикла Кребса → глюкоза	14-16
Глюкозо-аланиновый цикл: глюкоза → пируват → аланин → глюкоза	18-9
Синтез гликогена: глюкозо-6-фосфат → глюкозо-1-фосфат → гликоген	15-30
Метаболизм аминокислот и нуклеотидов	
Расщепление аминокислот: аминокислоты → ацетил-CoA, интермедиаты цикла Кребса	18-15
Синтез аминокислот	22-9
Цикл мочевины: NH_3 → мочевина	18-10
Глюкозо-аланиновый цикл: аланин → глюкоза	18-9
Синтез нуклеотидов: аминокислоты → пурины, пиримидины	22-33; 22-36
Синтез гормонов и нейромедиаторов	22-29
Катаболизм жиров	
β-*Окисление жирных кислот*: жирные кислоты → ацетил-CoA	17-8
Окисление кетоновых тел: β-гидроксибутират → ацетил-CoA → CO_2 в цикле Кребса	17-19
Анаболизм жиров	
Синтез жирных кислот: ацетил-CoA → жирные кислоты	21-6
Синтез триацилглицеринов: ацетил-CoA → жирные кислоты → триацилглицерины	21-18; 21-19
Образование кетоновых тел: ацетил-CoA → ацетоацетат, β-гидроксибутират	17-18
Синтез холестерина и эфиров холестерина: ацетил-CoA → холестерин → эфиры холестерина	21-33–21-37
Синтез фосфолипидов: жирные кислоты → фосфолипиды	21-17; 21-23–21-28

когда концентрация глюкозы увеличивается настолько, что активность других гексокиназ была бы давно подавлена. Большая величина K_M глюкокиназы также обеспечивает фосфорилирование глюкозы при очень низкой ее концентрации в гепатоцитах, не позволяя самой печени потреблять глюкозу и использовать ее в гликолизе. Таким образом глюкоза экономится для других тканей. Фруктоза, галактоза и манноза, которые всасываются в тонком кишечнике, тоже превращаются в глюкозо-6-фосфат в ферментативных путях, рассмотренных в гл. 14. Глюкозо-6-фосфат — ключевая молекула в нескольких путях углеводного метаболизма печени **(рис. 23-13)**, а метаболический путь выбирается в зависимости от текущих потребностей организма. С помощью различных аллостерически регулируемых ферментов и через гормональную регуляцию синтеза и активности ферментов печень направляет поток глюкозы по одному или нескольким из этих путей.

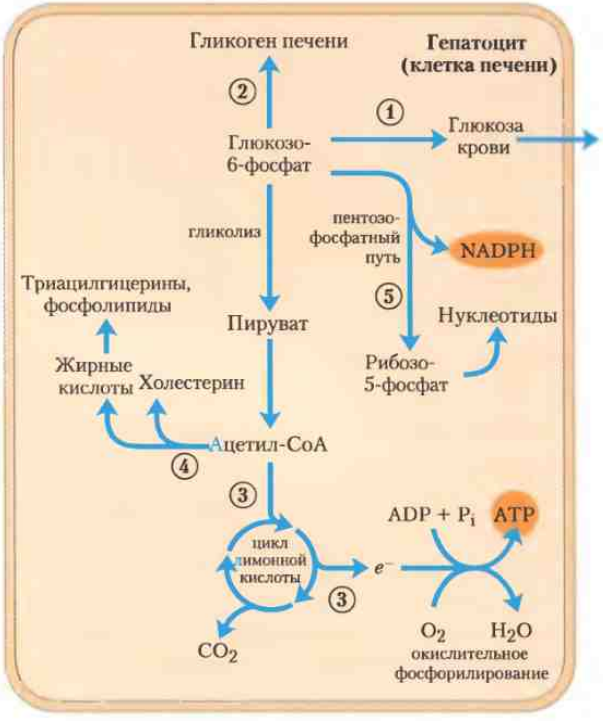


Рис. 23-13. Метаболические пути глюкозо-6-фосфата в печени. Здесь и на рис. 23-14 и 23-15 анаболические пути показаны стрелкой вверх, а катаболические пути — стрелкой вниз, при распределении к другим органам — горизонтальные стрелки. Процессы описаны в тексте под соответствующим номером.

① Глюкозо-6-фосфат дефосфорилируется глюкозо-6-фосфатазой до высвобождения свободной глюкозы (см. рис. 15-28), которая затем дополняет уровень глюкозы крови. Когда запас глюкозо-6-фосфата ограничен, происходит преимущественно его экспорт, потому что для обеспечения мозга и других тканей необходимым количеством энергии концентрация глюкозы в крови должна поддерживаться на достаточно высоком уровне (4 мМ). ② Глюкозо-6-фосфат, который не используется немедленно для образования глюкозы и выделения ее в кровь, превращается в гликоген печени или же попадает в один из нескольких других путей. Последующее расщепление глюкозо-6-фосфата происходит при гликолизе и декарбоксилировании пирувата (в пируватдегидрогеназной реакции), ③ образованный при этом ацетил-CoA может быть окислен с выделением энергии в цикле лимонной кислоты с последующим переносом электрона и окислительным фосфорилированием, при котором происходит синтез ATP. (Но обычно для получения энергии в гепатоцитах служат жирные кислоты). ④ Ацетил-CoA также может служить предшественником жирных кислот, которые включаются в состав триацилглицеринов, фосфолипидов и холестерина. Основные количества липидов, синтезированных в печени, транспортируются в другие ткани кровотоком как липопротеины. ⑤ Наконец, глюкозо-6-фосфат может поступать в пентозофосфатный путь, где участвует в образовании NADPH, необходимого при биосинтезе жирных кислот и холестерина, или в образовании D-рибозо-5-фосфата, предшественника в биосинтезе нуклеотидов. Кроме того, NADPH играет существенную роль также в детоксикации и выведении многих лекарств и ксенобиотиков, метаболизируемых печенью.

Аминокислоты. Аминокислоты, попадающие в печень, отправляются по нескольким важным метаболическим путям **(рис. 23-14)**. ① Они служат предшественниками для синтеза белков; этот процесс обсуждается в гл. 27. Печень постоянно обновляет свои собственные белки, которые имеют относительно высокую скорость оборота (среднее время их полужизни — несколько дней), а также синтезирует большинство белков плазмы крови. ② Аминокислоты переносятся кровотоком к другим органам для использования в био-

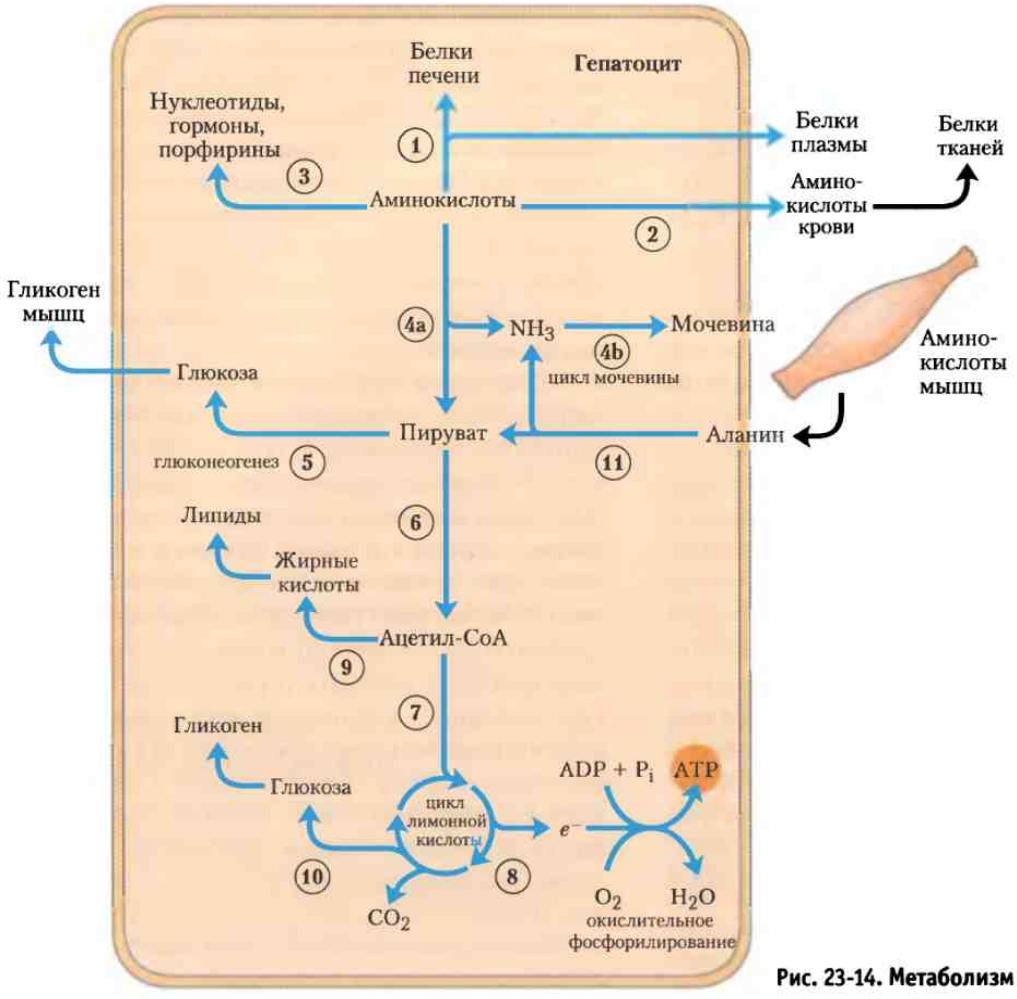


Рис. 23-14. Метаболизм аминокислот в печени.

синтезе белков тканей. ③ Другие аминокислоты являются предшественниками в биосинтезе нуклеотидов, гормонов и азотсодержащих веществ в печени и других тканях.

④а. Аминокислоты, не использованные как предшественники в биосинтезе, трансаминируются или дезаминируются и расщепляются с образованием пирувата и интермедиатов цикла лимонной кислоты (с различными судьбами). ④б. Высвобождаемый аммиак превращается в выделяемый из организма продукт — мочевину. ⑤ Пируват превращается в глюкозу и гликоген в ходе глюконеогенеза или ⑥ он может быть превращен в ацетил-CoA, у которого тоже несколько дальнейших путей превращения. ⑦ Он может быть окислен в цикле лимонной кислоты и ⑧ при окислительном фосфорилировании образовать АТР или ⑨ превращен в липиды для хранения. ⑩ Интермедиаты цикла лимонной кислоты могут быть перекачаны в синтез глюкозы с помощью глюконеогенеза.

Печень также метаболизирует аминокислоты, которые приходят из других тканей. Глюкоза поступает в кровь сразу после переваривания и всасывания углеводов пищи или между приемами пищи при превращении гликогена печени в глюкозу крови. Во время перерывов между приемами пищи, особенно продолжительных, до аминокислот расщепляется некоторое количество белков мышц. Эти аминокислоты предоставляют свои аминогруппы (с помощью реакции трансаминирования) продукту гликолиза пирувату, образуя аланин, который ⑪ транспортируется в печень и там дезаминируется. Гепатоциты превращают

получившийся пируват в глюкозу крови (в процессе глюконеогенеза ⑤), а аммиак — в мочевину для выведения из организма ㊻. Важное свойство этого глюкозо-аланинового цикла (рис. 18-9) — сглаживание колебаний уровня глюкозы крови между приемами пищи. В мышцах дефицит аминокислот восстанавливается после нескольких приемов пищи.

Липиды. У проникающих в гепатоциты жирных кислот, которые входят в состав липидов, тоже возможно несколько путей превращения **(рис. 23-15)**. ① Некоторые превращаются в липиды печени. ② Большинство жирных кислот в печени окисляется с выделением энергии. Свободные жирные кислоты могут быть активированы и окислены с образованием ацетил-CoA и NADPH. ③ Ацетил-CoA далее окисляется в цикле лимонной кислоты, и ④ продукты окисления участвуют в синтезе ATP при окислительном фосфорилировании. ⑤ Избыток ацетил-CoA (неиспользованный) превращается в печени в ацетоацетат и β-гидроксибутират; эти кетоновые тела с кровотоком поступают в другие ткани и могут использоваться в качестве топлива в цикле лимонной кислоты. Кетоновые тела можно считать транспортной формой ацетильных групп. В некоторых внепеченочных тканях именно так запасается во время продолжительного голодания значительная часть энергии — до $^1/_3$ в сердце и более чем 60–70% в мозге. ⑥ Некоторое количество ацетил-CoA, образованного из жирных кислот (и из глюкозы), используется для биосинтеза холестерина, который необходим для построения мембран. Кроме того, холестерин служит предшественником всех стероидных гормонов и желчных солей, которые необходимы для переваривания и всасывания липидов.

Два других пути превращения липидов используются в специализированных механизмах транспорта нерастворимых липидов с кровотоком. ⑦ Жирные кислоты превращаются в фосфолипиды и триацилглицерины липопротеинов крови, которые доставляют липиды в жировую ткань для хранения в виде триацилглицеринов. ⑧ Некоторые свободные жирные кислоты связываются с сывороточным альбумином и направляются к сердцу и скелетным мышцам, где свободные жирные кислоты поглощаются и используются путем окисления как основной источник энергии. Сывороточный альбумин — самый распространенный белок плазмы крови; а одна его молекула может переносить до 10 молекул свободных жирных кислот.

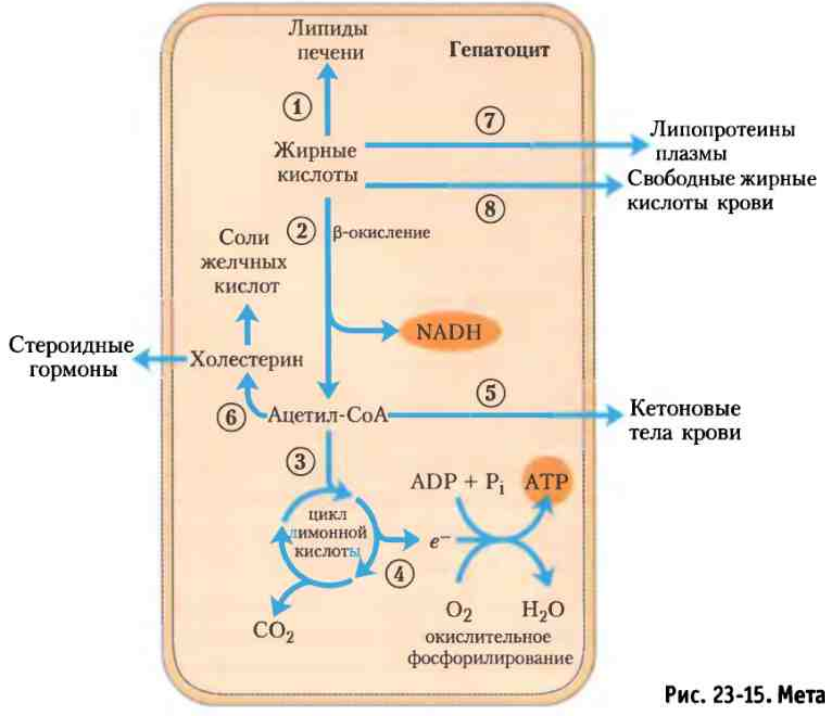


Рис. 23-15. Метаболизм жирных кислот в печени.

Таким образом, в организме печень служит распределяющим центром, который экспортирует питательные вещества в нужных пропорциях ко всем органам, сглаживая колебания концентраций веществ, возникающие между приемами пищи, и перерабатывает избыток аминогрупп в мочевину и другие продукты, которые выводятся через почки. В печени хранятся определенные питательные вещества, включая ионы железа и витамин А. Кроме того, печень обезвреживает чужеродные органические вещества, такие как лекарства, пищевые добавки, консерванты и другие потенциально вредные вещества, не имеющие пищевой ценности. При детоксикации часто происходит гидроксилирование с участием цитохрома Р-450 малорастворимых органических соединений, что делает их более растворимыми и доступными для дальнейших реакций деградации и для выведения из организма (см. доп. 21-1).

Жировая ткань запасает и поставляет жирные кислоты

Существуют два типа жировой ткани — белая и бурая, выполняющие в организме разные функции; сначала мы поговорим о той, которая присутствует в организме в большем количестве. **Белая жировая ткань (рис. 23-16, *а*)** имеет аморфную структуру и локализуется в органах и различных частях тела — в коже, вокруг глубоких кровеносных сосудов, а также в области живота. **Адипоцит** белой жировой ткани — крупная клетка сферической формы (диаметр от 30 до 70 мкм); он почти полностью заполнен большой каплей жира (триацилглицерина), который составляет ~65% массы клетки и сдвигает митохондрии и ядро клетки в узкое свободное от жира пространство вблизи плазматической мембраны (рис. 23-16, *б*). В организме взрослого здорового человека на белую жировую ткань приходится около 15% общей массы тела. Адипоциты метаболически очень активны, быстро отвечают на гормональные сигналы между печенью, скелетными мышцами и сердцем.

Как и другие типы клеток, адипоциты активно осуществляют гликолиз, используют цикл лимонной кислоты для окисления пирувата и жирных кислот и проводят окислительное фосфорилирование до конца. При интенсивном потреблении углеводов жировая ткань может превращать глюкозу (через пируват и ацетил-CoA) в жирные кислоты, жирные кислоты переводить в триацилглицерины и хранить их в виде больших жировых капель, хотя у человека синтез жиров происходит главным образом в гепатоцитах. Запасы триацилглицеринов в адипоцитах пополняются из печени (переносятся кровью в виде ЛПОНП; см. рис. 21-40, *а*) и из кишечного тракта (переносятся в хиломикронах), особенно после приема пищи, богатой жирами.

При уменьшении количества топливных молекул липазы в адипоцитах гидролизуют хранящиеся триацилглицерины до свободных жирных

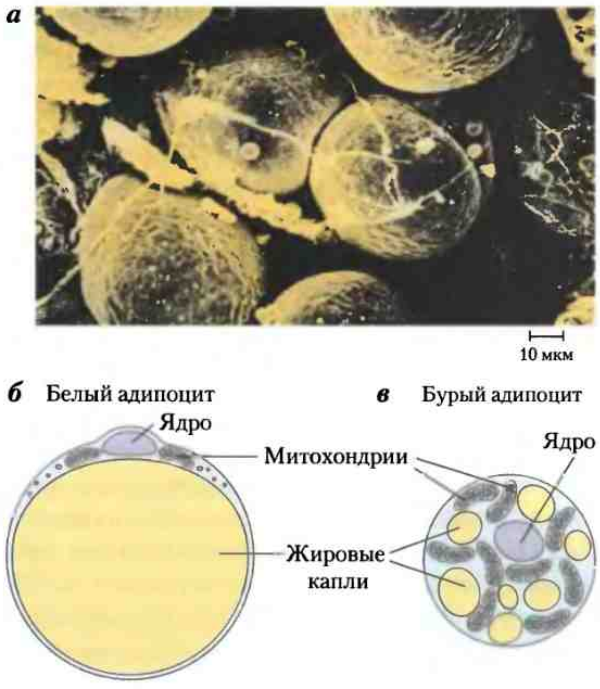


Рис. 23-16. Адипоциты белой и бурой жировой ткани. *а* — раскрашенное изображение адипоцитов человека в белой жировой ткани, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. В жировой ткани сферические адипоциты окружены сетью капилляров и коллагеновых волокон. Почти весь объем этих метаболически активных клеток занят каплей жира. *б* — типичный адипоцит белой жировой ткани и *в* — типичный адипоцит бурой жировой ткани. В клетках бурой жировой ткани митохондрии гораздо более заметны, ядро располагается вблизи центра клетки, просматриваются многочисленные отдельные капельки жира. Адипоциты белой жировой ткани крупнее и содержат по одной большой капле жира, прижимающей митохондрии и ядро к плазматической мембране.

кислот, которые могут переноситься кровотоком к скелетным мышцам и сердцу. Высвобождение жирных кислот из адипоцитов очень сильно ускоряется адреналином, который стимулирует cAMP-зависимое фосфорилирование перилипина; это дает триацилглицеринлипазе доступ к триацилглицеринам в липидных каплях. Липаза, чувствительная к адреналину, стимулируется также фосфорилированием, но это не главная причина увеличения липолиза (см. рис. 17-3). Инсулин уравновешивает действие адреналина, снижая активность липазы.

Распад и синтез триацилглицеринов в жировой ткани объединены в субстратный цикл; до 70% жирных кислот, высвобожденных триацилглицеринлипазой, вновь этерифицируются в адипоцитах, образуя триацилглицерины. Мы уже встречали такой субстратный цикл в гл. 15; он позволяет осуществлять хорошую регуляцию скорости и направления потока интермедиатов по этому пути в обе стороны. Глицерин, высвобождаемый триацилглицеринлипазой в жировой ткани, не может быть вновь использован в синтезе триацилглицеринов, так как в адипоцитах отсутствует фермент глицеринкиназа. Вместо этого необходимый для синтеза триацилглицеринов глицеринфосфат образуется из пирувата в ходе глицеронеогенеза с помощью цитозольного фермента ФЕП-карбоксикиназы (см. рис. 21-22).

Кроме функции запасания топливных молекул жировая ткань играет важную роль в качестве эндокринного органа, синтезируя и выделяя гормоны, передающие информацию о состоянии энергетических запасов и координирующие метаболизм жиров и углеводов во всем организме. Мы вернемся к этой функции жировой ткани позже, когда будем обсуждать гормональную регуляцию массы тела.

Термогенная функция бурой жировой ткани

У мелких позвоночных и впадающих в зимнюю спячку животных значительную долю жировой ткани составляет **бурый жир**; по сравнению с адипоцитами белого жира адипоциты бурого жира меньше по размеру (от 20 до 40 мкм) и имеют другую форму (многогранник, а не сфера). Как и клетки белой жировой ткани, адипоциты бурого жира запасают триглицерины, однако не в одной крупной капле жира, а в нескольких мелких жировых капельках (рис. 23-16, *в*). Клетки бурой жировой ткани содержат больше митохондрий и лучше снабжаются кровью, чем клетки белой жировой ткани. Цитохромы в митохондриях и гемоглобин в капиллярах придают бурой жировой ткани ее характерный цвет. Особенность адипоцитов бурой жировой ткани — в высоком уровне экспрессии гена *UNC1*, кодирующего **термогенин** — разобщающий митохондриальный белок (см. рис. 19-34). Именно с активностью термогенина связана основная функция клеток бурой жировой ткани — **термогенез**.

Жирные кислоты, запасенные в жировых капельках адипоцитов бурой жировой ткани, высвобождаются и проникают в митохондрии, где подвергаются полному превращению в CO_2 в процессе β-окисления и в цикле лимонной кислоты. Образующиеся при этом восстановленные $FADH_2$ и NADH передают электроны по дыхательной цепи на молекулярный кислород. В белой жировой ткани протоны, выкаченные из митохондрий в процессе передачи электронов, вновь проникают в матрикс с помощью АТР-синтазы, а энергия от передачи электронов запасается в форме АТР. Термогенин, присутствующий в бурой жировой ткани, создает другую возможность для возврата протонов в матрикс — без участия АТР-синтазы. В этом случае энергия протонного градиента рассеивается в виде тепла, что позволяет поддерживать оптимальную температуру тела (особенно нервной системы и внутренних органов) при понижении температуры окружающей среды.

У плода человека дифференцировка преадипоцитов (малодифференцированных фибробластов) в клетки бурой жировой ткани начинается на 20-й неделе беременности, а в момент рождения клетки бурой жировой ткани составляют 1% массы тела младенца. Отложения бурой жировой ткани образуются там, где выделяемое в процессе термогенеза тепло необходимо для поддержания функций жизненно важных тканей (магистральных сосудов головы, основных кровеносных сосудов брюшной полости, а также поджелудочной железы, надпочечников и почек), что существенно при попадании новорожденного в окружающую среду с более низкой температурой, чем была в организме матери (**рис. 23-17**).

После рождения в организме младенца начинает развиваться белая жировая ткань, а бурая жировая ткань постепенно исчезает. В организме

взрослого человека не встречается оформленных отложений бурой жировой ткани, а отдельные адипоциты бурой жировой ткани остаются вкрапленными в белую жировую ткань, составляя в общей сложности только ~1% всех адипоцитов организма. У взрослых, кроме того, имеются преадипоциты, которые могут превращаться в адипоциты бурой жировой ткани при длительной адаптации к холоду. У больных с феохромоцитомой (опухолью надпочечников) образуется повышенное количество адреналина и норадреналина, из-за этого, в частности, преадипоциты дифференцируют в адипоциты бурой жировой ткани, которая локализуется приблизительно так же, как в организме новорожденных. В адаптации к холоду и в нормальной дифференцировке клеток белой и бурой жировой ткани важную роль играет ядерный фактор транскрипции PPARγ, о котором будет сказано ниже.

Рис. 23-17. Распределение бурой жировой ткани в организме новорожденного. Бурая жировая ткань распределяется в организме новорожденного так, как показано здесь, ведь она защищает от охлаждения главные кровеносные сосуды и важные внутренние органы. Со временем бурая жировая ткань исчезает; в организме взрослых людей нет больших запасов бурых адипоцитов.

Мышцы используют АТР для механической работы

В клетках скелетных мышц **миоцитах** метаболизм специализируется на выработке АТР как источника энергии для сокращения мышц. Более того, скелетные мышцы приспособлены для выполнения механической работы в различном режиме. При необходимости скелетная мышца может короткое время работать на своей максимальной мощности, например при спринте на 100 м; а может выполнять и более продолжительную работу — бег на марафонскую дистанцию.

Существуют два вида мышечной ткани, которые различаются по своей физиологической роли и по энергетическому обмену. Медленно сокращающиеся мышечные волокна, так называемые красные мышцы, производят относительно слабое сокращение, но они долго не утомляются. Они образуют АТР с помощью медленного, но постоянного процесса окислительного фосфорилирования. Красные мышцы исключительно богаты митохондриями и обслуживаются очень плотной сетью кровеносных сосудов, которые приносят кислород, необходимый для синтеза АТР. Характерный красный цвет этой ткани придают цитохромы митохондрий и гемоглобин крови. Быстросокращающиеся мышечные волокна, или белые мышцы, содержат меньше митохондрий, чем красные мышцы, и в меньшей степени окружены кровеносными сосудами, но они могут развивать большее усилие и делать это намного быстрее. Белые мышцы быстрее устают, потому что во время активной работы они используют АТР быстрее, чем могут восстанавливать его запас. Соотношение красных и белых мышц у человека во многом индивидуально и генетически обусловлено; но путем тренировок выносливость быстросокращающихся мышц можно улучшить.

Скелетные мышцы в зависимости от мышечной активности могут использовать для получения энергии свободные жирные кислоты, кетоновые тела или глюкозу (**рис. 23-18**). В состоянии покоя преимущественно расходуются свободные жирные кислоты из жировой ткани и кетоновые тела из печени. Они окисляются и расщепляются с образованием ацетил-CoA, который поступает в цикл лимонной кислоты для окисления до CO_2. Следующий переносчик электронов к O_2 поставляет энергию для синтеза АТР при окислительном фосфорилировании. Мышцы средней

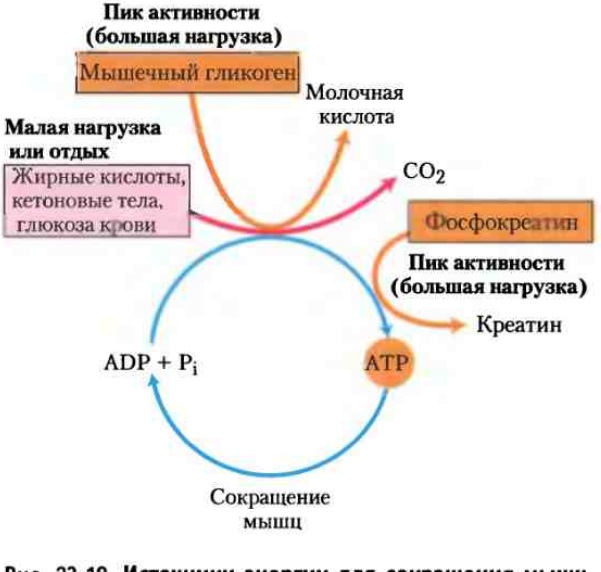
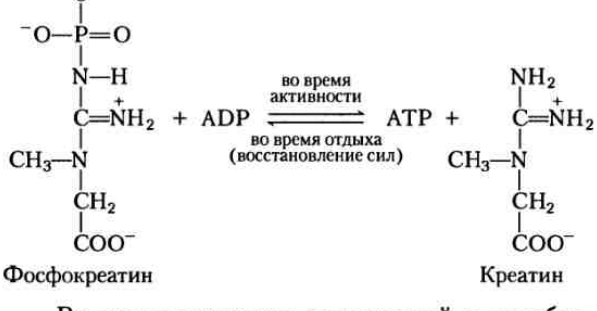


Рис. 23-18. Источники энергии для сокращения мышц. Во время пиковой физической нагрузки и при малой активности или в покое для синтеза АТР используются различные виды топлива. Фосфокреатин может быстро восстанавливать АТР.

активности наряду с жирными кислотами и кетоновыми телами используют глюкозу крови. Глюкоза фосфорилируется, затем расщепляется в ходе гликолиза до пирувата, который превращается в ацетил-CoA и окисляется в цикле лимонной кислоты и при окислительном фосфорилировании.

При максимальной активности быстрых скелетных мышцах их потребность в АТР так велика, что кровоток не справляется с быстрой доставкой O_2 и энергетических субстратов. Снабжение необходимым количеством АТР происходит только с помощью аэробного дыхания. В этих условиях запасенный в мышцах гликоген расщепляется до лактата ферментативным путем (с. 69). Каждая единица глюкозы, расщепляясь, дает три молекулы АТР, а так как при фосфоролизе гликогена образуется глюкозо-6-фосфат (через глюкозо-1-фосфат), это позволяет экономить АТР, который обычно тратится в гексокиназной реакции. Ферментативный путь образования молочной кислоты отвечает на увеличение потребности мышц в АТР быстрее, чем окислительное фосфорилирование. Благодаря этому пути поддерживается необходимый уровень АТР, который получается при аэробном фосфорилировании других энергетических субстратов в цикле лимонной кислоты и дыхательной цепи. Использование глюкозы крови и мышечного гликогена как источников энергии для мышечной активности значительно увеличивается при секреции адреналина, который стимулирует высвобождение глюкозы из гликогена печени и расщепление гликогена в мышечной ткани.

Относительно малое содержание гликогена в организме (около 1% общей массы скелетных мышц) ограничивает количество энергии, которое может дать гликолиз во время самых больших физических нагрузок. Более того, накопление лактата и последующее падение pH в максимально активных мышцах снижает эффективность гликолиза. Но у скелетных мышц есть и другой источник АТР — фосфокреатин (10–30 мМ), который может быстро регенерировать АТР из ADP с помощью креатинкиназной реакции:



Фосфокреатин Креатин

Во время активных сокращений и преобладания гликолиза эта реакция проходит преимущественно в направлении синтеза АТР; во время восстановления сил после нагрузки этот же фермент снова синтезирует фосфокреатин из креатина, расходуя АТР. Учитывая сравнительно высокий уровень АТР и фосфокреатина в мышцах, эти вещества можно детектировать в интактной мышечной ткани в реальном времени с помощью метода ЯМР-спектроскопии (**рис. 23-19**).

Чтобы увеличить количество кислорода воздуха, идущего на окислительное фосфорилирование в печени, необходимо продолжать усиленно дышать после интенсивной мышечной активности. Образованный АТР используется для глюконеогенеза из лактата, перенесенного кровью из мышц. Образованная глюкоза вновь возвращается в мышцы для пополнения запаса гликогена, замыкая цикл Кори (рис. 23-20; см. также доп. 15-4).

При активном сокращении скелетных мышц выделяется тепло — побочный продукт неполного сопряжения химической энергии АТР и механической работы при сокращении мышц. При

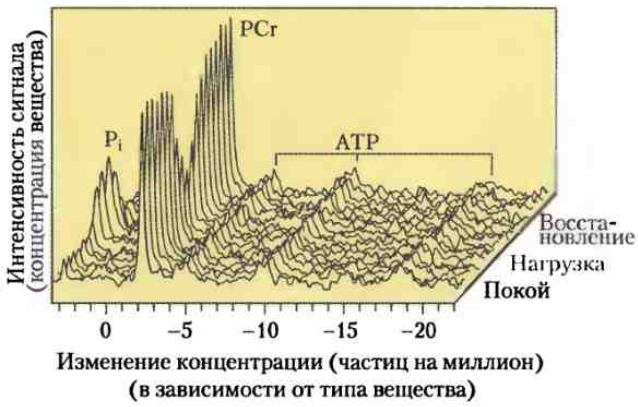


Рис. 23-19. Фосфокреатин позволяет поддерживать концентрацию ATP при физической нагрузке. ЯМР-спектр (^{31}P): пики соответствуют неорганическому фосфату (P_i), фосфокреатину (PCr) и ATP (каждая фосфатная группа которого дает свой сигнал). На спектре виден переход от состояния покоя к физической нагрузке и к последующему восстановлению. Обратите внимание, что сигнал ATP почти не изменяется при физической нагрузке, поддерживаясь на высоком уровне за счет дыхательной цепи и запаса фосфокреатина, количество которого снижается при нагрузке. Во время восстановления сил (отдыха), когда образование ATP в реакциях катаболизма выше его расхода мышцами, находящимися в состоянии покоя, запас фосфокреатина восполняется.

низкой температуре окружающей среды эта способность мышц выделять тепло может сослужить хорошую службу: скелетные мышцы осуществляют **сократительный термогенез** — быстро повторяющиеся мышечные сокращения (дрожь), что позволяет организму получать тепло практически без движения и помогает поддерживать температуру тела в норме, т. е. около 37 °C.

Сердечная мышца отличается от скелетной мышцы тем, что она активна долгое время в регулярном ритме сокращения–расслабления, ее метаболизм всегда только аэробный. В ней намного больше митохондрий, чем в скелетной мышце, — митохондрии составляют больше половины объема клетки (**рис. 23-21**). Сердце использует в качестве основного энергетического источника свободные жирные кислоты, но также и некоторое количество глюкозы и кетоновых тел, поставляемых кровью; эти энергетические источники для синтеза ATP окисляются в цикле лимонной кислоты и при окислительном фосфорилировании. Как и скелетная мышца, сердечная мышца не запасает в больших количествах липиды или гликоген. Есть небольшие запасы доступной энергии в виде фосфокреатина, и этого достаточно для нескольких секунд сокращения. Сердце — аэробный орган, оно получает энергию при окислительном фосфорилировании, поэтому недостаток кислорода в определенном

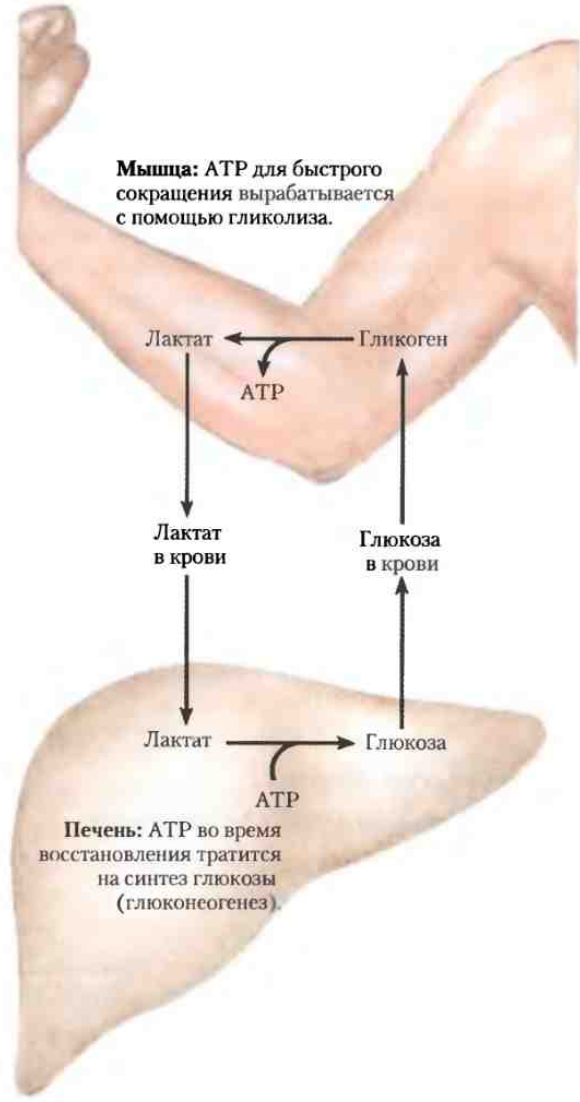


Рис. 23-20. Метаболическая взаимосвязь между скелетными мышцами и печенью. При пиковой активности мышцы используют в качестве источника энергии гликоген, образуя в процессе гликолиза лактат (молочную кислоту). Во время восстановления некоторое количество молочной кислоты переносится в печень и превращается в глюкозу в ходе глюконеогенеза. Глюкоза высвобождается в кровь и возвращается в мышцы для восстановления запасов гликогена в них. Весь путь глюкоза → молочная кислота (лактат) → глюкоза составляет цикл Кори.

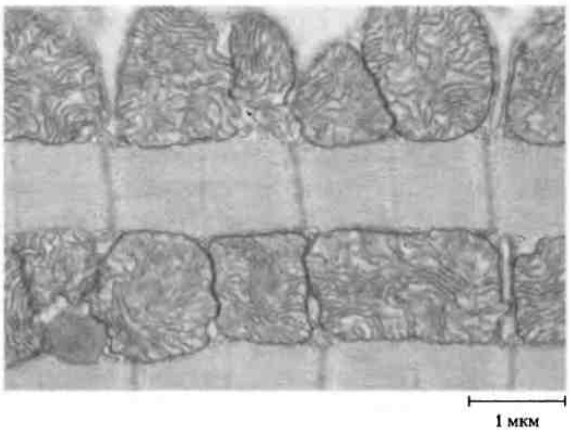


Рис. 23-21. Электронная микрофотография сердечной мышцы. В тканях сердца для синтеза ATP в огромном количестве митохондрий окисляются пируват, жирные кислоты и кетоновые тела. Постоянный аэробный метаболизм позволяет человеческому сердцу качать кровь со скоростью ~6 л/мин или ~350 л/ч, т. е. за 70 лет сердце перекачивает $200 \cdot 10^6$ л.

участке сердечной мышцы, возникающий, когда кровеносные сосуды блокированы липидными бляшками (при артеросклерозе) или кровяными сгустками (при коронарном тромбозе), может вызывать смерть этого участка сердечной мышцы. Так происходит при инфаркте миокарда (часто говорят о разрыве сердца). ■

Мозг использует энергию для передачи электрических импульсов

В мозге обмен веществ имеет характерные особенности. Нейроны головного мозга взрослого млекопитающего в норме используют в качестве источника энергии только глюкозу (**рис. 23-22**). (Астроциты, другой главный тип клеток мозга, могут окислять жирные кислоты.) Мозг обладает очень активным дыхательным метаболизмом (**рис. 23-23**); он использует кислород с довольно постоянной скоростью и потребляет почти 20% общего количества O_2, необходимого организму в покое. Поскольку содержание гликогена в мозге очень мало, мозг постоянно зависит от поступления глюкозы из крови. Если содержание глюкозы в крови уменьшается значительно ниже критического уровня даже на короткое время, в работе мозга могут произойти очень существенные и иногда необратимые изменения.

Хотя нейроны мозга не могут использовать непосредственно из крови свободные жирные кислоты как источник энергии, когда необходимо, они могут использовать β-гидроксибутират (кетоновое тело), который образуется из жирных кислот в печени. Способность мозга окислять β-гидроксибутират через ацетил-CoA приобретает большое значение во время продолжительного голодания или полного истощения, т. е. после того как гликоген печени истрачен; в этих условиях мозг может использовать как источник энергии запас жиров. Во время сильного истощения единственным источником глюкозы для мозга становятся запасные мышечные белки (благодаря глюконеогенезу в печени).

Нейроны окисляют глюкозу в цикле лимонной кислоты, и благодаря потоку электронов от окисления через дыхательную цепь образуется почти весь ATP, используемый этими клетками. Энергия необходима для создания и поддержания электрического потенциала на плазматической мембране нейронов. Мембрана содержит электрогенный ATP-зависимый антипортер Na^+/K^+-ATPазу, которая одновременно перекачивает 2 иона K^+ внутрь и 3 иона Na^+ наружу ней-

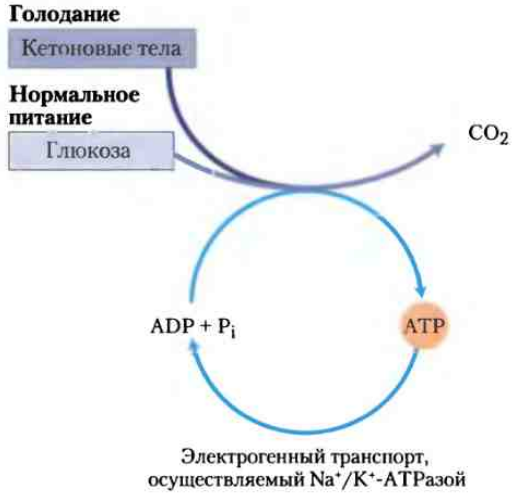


Рис. 23-22. Источники топлива, поставляющие ATP в мозг. Источник энергии, который использует головной мозг, зависит от характера питания. Кетоновые тела, используемые во время голодания, представляют собой β-гидроксибутират. Электрогенный транспорт, осуществляемый Na^+/K^+-ATPазой, поддерживает трансмембранный потенциал, необходимый для передачи информации между нейронами.

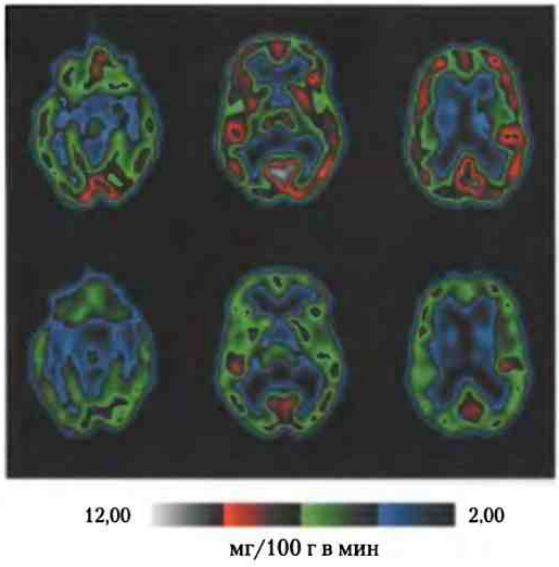


Рис. 23-23. Метаболизм глюкозы в головном мозге. Метаболическая активность специфических зон мозга показана с помощью метода сканирующей позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ). Результаты исследования ПЭТ позволяют увидеть в реальном времени меченную изотопами глюкозу в точно локализованных зонах мозга живого человека. Меченый аналог глюкозы 2-[^{18}F]-фтор-2-дезокси-D-глюкоза вводят в кровяное русло; через несколько секунд ПЭТ-сканер показывает, какое количество глюкозы поглощено каждой зоной мозга — это позволяет измерить метаболическую активность. Здесь представлены результаты ПЭТ передне-задних срезов мозга на трех уровнях, верх (*слева*) — низ (*справа*). Сравнивается метаболизм глюкозы (в мг на 100 г/мин), когда обследуемый отдыхает (*а*) и лишен сна в течение 48 ч (*б*).

рона (см. рис. 11-37 в т. 1). Возникающий трансмембранный потенциал меняется, по мере того как электрический сигнал (потенциал действия) проходит от одного конца нейрона к другому (см. рис. 12-25 в т. 1). Потенциал действия — основной механизм передачи информации в нервной системе, поэтому истощение запаса АТР в нейронах подавляет все активности, координируемые нейрональной сигнализацией.

Переносчики кислорода, метаболиты и гормоны крови

Кровь опосредует метаболические взаимодействия всех тканей. Она транспортирует питательные вещества от тонкого кишечника к печени и от печени и жировой ткани к другим органам; она же переносит выделяемые продукты из тканей к почкам. Кислород переносится кровотоком от легких к тканям, а CO_2 возвращается кровотоком из тканей в легкие для выдыхания. Кровь передает гормональные сигналы от одной ткани к другой. В этой роли передатчика сигнала кровеносная система напоминает нервную систему — обе регулируют и интегрируют активности разных органов.

В организме взрослого человека в среднем 5–6 л крови. Почти половину объема крови приходится на клетки трех типов (**рис. 23-24**): **эритроциты** (красные кровяные клетки), содержащие гемоглобин и специализирующиеся на переносе кислорода и CO_2; намного меньше в

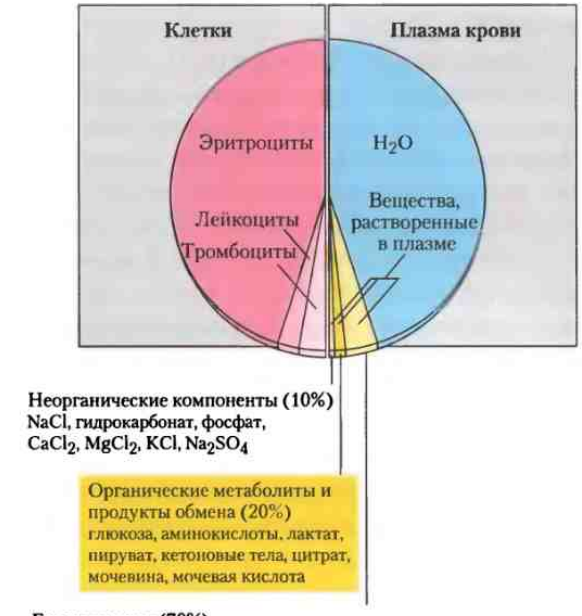


Рис. 23-24. Состав крови. Цельную кровь с помощью центрифугирования можно разделить на плазму крови и клетки. Около 10% плазмы крови — это растворенные вещества, из которых 10% составляют неорганические соли, 20% — малые органические молекулы и 70% — белки плазмы. Приведены основные растворимые компоненты. Кровь содержит много других веществ, часто в следовых количествах, в том числе другие метаболиты, ферменты, гормоны, витамины, микроэлементы и желчные пигменты. Измерения концентраций компонентов плазмы крови важно для диагностики и лечения многих болезней.

крови **лейкоцитов** (белых кровяных клеток) разных типов (включая **лимфоциты**) — основных клеток иммунной системы, защищающих организм от инфекций; и **тромбоциты**, которые помогают осуществлять свертывание крови. Жидкая часть крови — это **плазма крови**, которая на 90% состоит из воды и лишь 10% в ней солей. В плазме растворено или суспендировано большое разнообразие белков, липопротеинов, питательных веществ, метаболитов, продуктов выделения, неорганических ионов и гормонов. Более 70% твердых компонентов плазмы — это **белки плазмы**, преимущественно иммуноглобулины (циркулирующие антитела), сывороточный альбумин, аполипопротеины, участвующие в транспорте липидов, трансферрин (переносит железо) и белки свертывания крови, такие как фибриноген и протромбин.

Растворенные в плазме крови небольшие ионы и молекулы — непостоянные ее компоненты; они непрерывно циркулируют между кровью и различными тканями. Количество поступающих с пищей неорганических ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+} (главных электролитов крови и цитоплазмы) уравновешивается их выведением с мочой. Для многих компонентов крови достигается подобие динамического равновесия: концентрация компонентов меняется мало, хотя между пищеварительным трактом, кровью и мочой происходит постоянный обмен. Содержание ионов Na^+, K^+ и Ca^{2+} в плазме остаются почти постоянным и составляет 140, 5 и 2,5 мМ соответственно; при поступление с пищей содержание этих электролитов в крови меняется незначительно. Заметные отклонения от этих показателей — симптомы серьезных заболеваний (иногда с летальным исходом). В поддержании ионного баланса исключительно важную роль играют почки, они селективно отфильтровывают продукты распада и избыток ионов из крови и в то же время предотвращают потерю необходимых питательных веществ и ионов.

В ходе дифференцировки эритроциты человека утрачивают ядро и митохондрии, поэтому для синтеза АТР могут использовать только гликолиз. Получающийся в результате гликолиза лактат возвращается в печень, где путем глюконеогенеза превращается в глюкозу и запасается в виде гликогена или поступает в периферические ткани. Эритроцитам постоянно доступна глюкоза крови.

Концентрация глюкозы в плазме жестко регулируется. Мозг постоянно потребляет глюкозу, а печень поддерживает нормальный уровень глюкозы крови: 60–90 мг/100 мл цельной крови (~4,5 мМ). (Поскольку эритроциты составляют значительную долю всего объема крови, после их удаления с помощью центрифугирования остается жидкий супернатант — плазма, содержащая «глюкозу крови» в меньшем объеме. Для перехода к концентрации глюкозы в плазме концентрацию глюкозы крови надо умножить на 1,14.) Когда уровень глюкозы крови падает до 40 мг/100 мл (гипогликемия), человек испытывает дискомфорт и спутанность сознания (**рис. 23-25**); дальнейшее уменьшение этого показателя вызывает кому, судороги, а при сильной гипогликемии наступает смерть. Поддержание нормальной концентрации глюкозы крови, таким образом, высокоприоритетно для организма, и для этого существуют различные регуляторные механизмы. Среди наиболее важных регуляторов уровня глюкозы крови — гормоны инсулин, глюкагон и адреналин (см. разд. 23.3). ■

Рис. 23-25. Физиологические последствия низкого уровня глюкозы крови у человека. Уровни глюкозы крови 40 мг/100 мл и ниже означают сильную гипогликемию.

Краткое содержание раздела 23.2 ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ: РАЗДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИЙ

- У млекопитающих метаболические функции выполняют специализированные ткани и органы. Печень — центральный орган, распределяющий и обрабатывающий питательные вещества. Сахара и аминокислоты, образующиеся при переваривании пищи, проходят через кишечный эпителий в кровь, которая переносит их в печень. Некоторые триацилглицерины из расщепленных липидов также направляются в печень, где их жирные кислоты используются в различных процессах.

- Глюкозо-6-фосфат — ключевой интермедиат углеводного метаболизма. Он может быть полимеризован в гликоген, дефосфорилирован в глюкозу крови или превращен в жирные кислоты через ацетил-CoA. Он может подвергаться окислению в гликолизе, в цикле лимонной кислоты и в дыхательной цепи с образованием ATP или поступать в пентозофосфатный путь для образования пентоз и NADPH.

- Аминокислоты используются для синтеза белков печени и плазмы крови или же их углеродный скелет превращается в глюкозу и в гликоген путем гликонеогенеза; аммиак, образуемый при дезаминировании, превращается в мочевину.

- Печень превращает жирные кислоты в триацилглицерины, фосфолипиды или в холестерин и эфиры холестерина — для транспорта липопротеинов кровотоком в жировую ткань для хранения. Жирные кислоты также могут быть окислены с образованием ATP или кетоновых тел, которые кровоток переносит к другим тканям.

- В белой жировой ткани хранятся большие запасы триглицеринов, которые высвобождаются в кровь в ответ на сигнал — адреналин или глюкагон. Специфической функцией бурой жировой ткани является термогенез в результате окисления жирных кислот в разобщенных митохондриях.

- Скелетные мышцы высокоспециализированы для образования и использования ATP при механической работе. При напряженной мышечной активности единственным источником энергии служит гликоген, обеспечивающий образование ATP с помощью ферментативных превращений до молочной кислоты. В период отдыха молочная кислота опять превращается в печени (путем глюконеогенеза) в гликоген и глюкозу. Во время активного сокращения промежуточным источником ATP выступает фосфокреатин.

- Сердечная мышца получает почти весь необходимый ATP в результате окислительного фосфорилирования.

- Нейроны мозга в качестве источника энергии используют только глюкозу и β-гидроксибутират, при голодании или истощении роль последнего становится самой важной. Почти весь свой ATP мозг использует для активного транспорта Na^+ и K^+ с целью поддержания мембранного потенциала нейронов.

- Кровь переносит питательные вещества и продукты обмена, а также передает гормональные сигналы между органами.

23.3. Гормональная регуляция энергетического метаболизма

Регуляция, поддерживающая концентрацию глюкозы крови на уровне ~4,5 мМ, происходит с помощью постоянного комбинированного воздействия инсулина, глюкагона, адреналина и кортизола на метаболические процессы во многих тканях тела, но особенно в печени, в мышцах и в жировой ткани. Инсулин дает сигнал этим тканям, что уровень глюкозы крови выше необходимого; в результате клетки забирают избыток глюкозы из крови и превращают его в запас гликогена и триацилглицеринов. Глюкагон сигнализирует, что уровень глюкозы в крови слишком низкий, — в ответ ткани начинают получать глюкозу из гликогена, расщепляя гликоген, и путем глюконеогенеза (в печени), а также путем окисления жиров, чтобы снизить использование глюкозы.

Таблица 23-3 Влияние инсулина на уровень глюкозы крови: потребление глюкозы клетками и хранение в виде триацилглицеринов и гликогена

Метаболический эффект	Фермент-мишень
↑ Потребление глюкозы (мышцы, жировая ткань)	↑ Транспортер глюкозы (GLUT4)
↑ Потребление глюкозы (печень)	↑ Глюкокиназа (усиление экспрессии)
↑ Синтез гликогена (печень, мышцы)	↑ Гликогенсинтаза
↓ Расщепление гликогена (печень, мышцы)	↓ Гликогенфосфорилаза
↑ Гликолиз, образование ацетил-CoA (печень, мышцы)	↑ PFK-1 (с помощью ↑ PFK-2) ↑ Пируватдегидрогеназный комплекс
↑ Синтез жирных кислот (печень)	↑ Ацетил-CoA-карбоксилаза
↑ Синтез триацилглицеринов (жировая ткань)	↑ Липопротеинлипаза

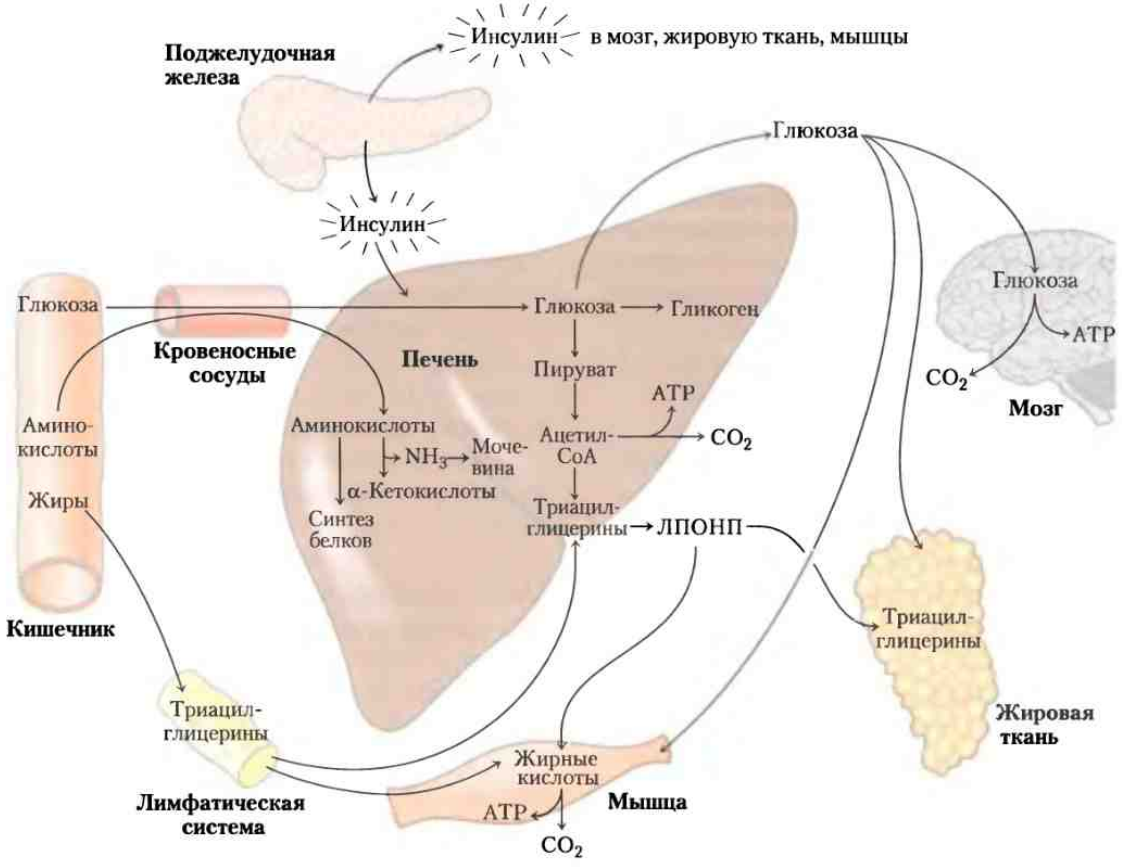


Рис. 23-26. При усиленном питании в печени синтезируются жиры. Сразу после потребления высококалорийной пищи в печень направляются глюкоза, жирные кислоты и аминокислоты. Инсулин, выделяющийся в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови, стимулирует поглощение глюкозы тканями. Некоторое количество глюкозы отправляется для обеспечения питания мозга, а часть — к адипоцитам и мышечной ткани. В печени оставшая глюкоза окисляется до ацетил-CoA, который идет на синтез жирных кислот, для экспорта ЛПОНП в виде триацилглицеринов в адипоциты и мышечную ткань. Необходимый для синтеза липидов NADPH образуется при окислении глюкозы по пентозофосфатному пути. Избыток аминокислот превращается в пируват и ацетил-CoA, которые также используются в синтезе липидов. Жиры пищи в виде хиломикронов транспортируются лимфой от кишечника к мышечной и жировой тканям.

Адреналин выделяется в кровь для подготовки мышц, легких и сердца к резкому повышению активности. Кортизол опосредует ответ организма на продолжительный стресс. Обсудим эти схемы гормональной регуляции в трех метаболических состояниях — у хорошо питающегося человека, человека, временно воздерживающегося от приема пищи, и человека, длительно голодающего, и поговорим о последствиях для метаболизма такого заболевания, как сахарный диабет, возникающего в результате нарушения контролирующих метаболизм глюкозы сигнальных путей.

Инсулин препятствует чрезмерному повышению уровня глюкозы крови

Действуя через рецепторы плазматической мембраны (см. рис. 12-15 и 12-16 в т. 1), инсулин стимулирует захват глюкозы мышечной и жировой тканями (табл. 23-3), где глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат. В печени инсулин активирует гликогенсинтазу и инактивирует гликогенфосфорилазу, так что основное количество глюкозо-6-фосфата переходит в гликоген.

В жировой ткани инсулин стимулирует запасание избытка таких энергетически богатых веществ, как жиры (**рис. 23-26**). В печени он активирует окисление глюкозо-6-фосфата до пирувата в ходе гликолиза и окисление пирувата до ацетил-CoA. Если ацетил-CoA не окисляется далее для получения энергии, он используется для синтеза жирных кислот в печени, а жирные кислоты в виде триацилглицеринов экспортируются липопротеинами (ЛПОНП) плазмы крови в жировую ткань. В адипоцитах инсулин стимулирует синтез триацилглицеринов из жирных кислот, высвобождаемых из триацилглицеринов фракции ЛПОНП. Эти жирные кислоты вырабатываются только из избытка глюкозы, который поступает из крови в печень. Таким образом, действие инсулина направлено в основном на превращение избытка глюкозы крови в формы для ее хранения: гликоген (в печени и мышцах) и триацилглицерины (в жировой ткани) (табл. 23-3).

Кроме прямого влияния на мышцы и печень, изменяющего метаболизм углеводов и жиров, инсулин также воздействует на головной мозг, посылая через него опосредованный сигнал этим тканям (см. далее).

Поджелудочная железа секретирует инсулин или глюкагон в ответ на изменения уровня глюкозы крови

Когда после приема богатой углеводами пищи глюкоза попадает из кишечника в кровоток, происходит увеличение секреции инсулина (и уменьшение секреции глюкагона). Инсулин, секретируемый поджелудочной железой, в основном регулируется уровнем глюкозы крови, снабжающей поджелудочную железу. Пептидные гормоны инсулин, глюкагон и соматостатин вырабатываются кластерами специализированных клеток поджелудочной железы — островками Лангерганса (**рис. 23-27**). Каждый тип клеток в островках продуцирует определенный гормон: α-клетки — глюкагон; β-клетки — инсулин; δ-клетки — соматостатин.

Как показано на **рис. 23-28**, при увеличении уровня глюкозы крови ① GLUT2-транспортеры переносят глюкозу в β-клетки, где она с помощью гексокиназы IV (глюкокиназы) немедленно превращается в глюкозо-6-фосфат и вступает в гликолиз (рис. 23-25). С повышением скорости

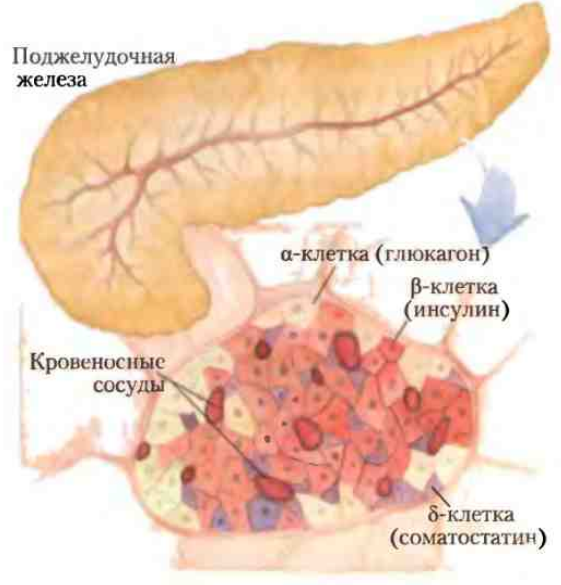


Рис. 23-27. Эндокринные клетки поджелудочной железы. В поджелудочной железе присутствуют и экзокринные клетки (рис. 18-3, *б*), которые секретируют пищеварительные ферменты зимогены, и кластеры эндокринных клеток — островки Лангерганса. Островки содержат α-, β- и δ-клетки (также известные как A-, B- и D-клетки соответственно), каждый тип клеток секретирует специфический полипептидный гормон.

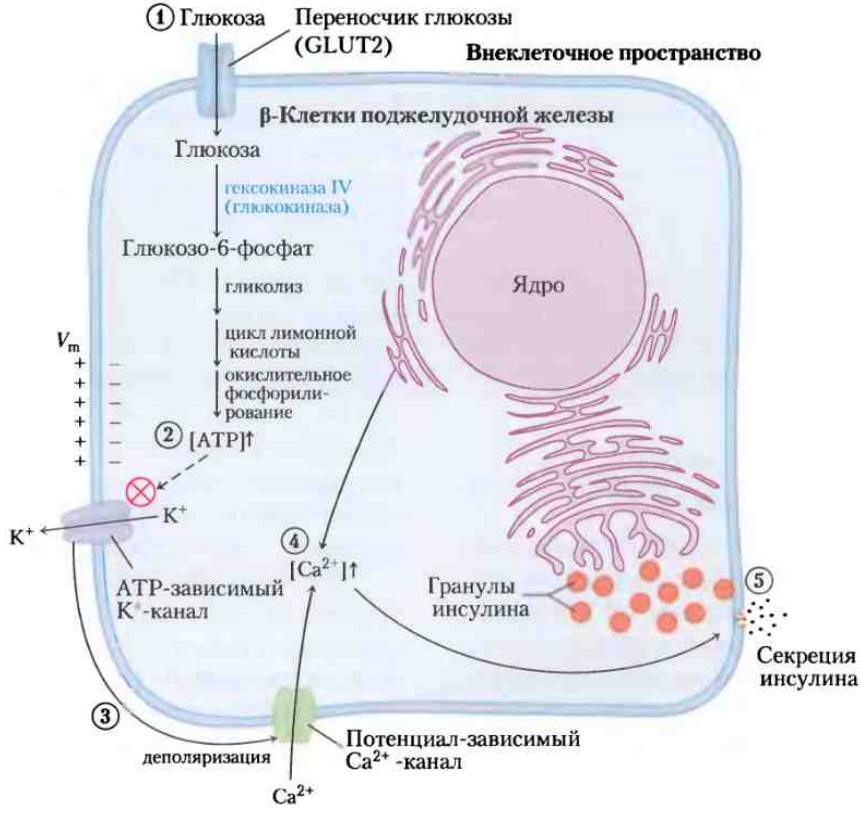
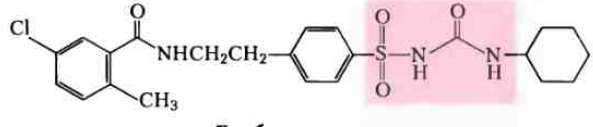


Рис. 23-28. Регуляция секреции инсулина β-клетками поджелудочной железы уровнем глюкозы. При высоком уровне глюкозы крови активный метаболизм глюкозы в β-клетках увеличивает внутриклеточную концентрацию АТР, что приводит к закрыванию K^+-каналов в плазматической мембране и тем самым к деполяризации мембраны. В ответ на изменение мембранного потенциала потенциал-зависимые Ca^{2+}-каналы плазматической мембраны открываются, позволяя Ca^{2+} проходить в клетку и таким образом повышая концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме до тех пор пока не будет инициировано высвобождение инсулина путем экзоцитоза. (Кроме того, Ca^{2+} высвобождается из эндоплазматического ретикулума в ответ на исходное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле.) После этого уровень ионов Ca^{2+} в цитозоле становится достаточным, чтобы вызвать высвобождение инсулина путем экзоцитоза. Процессы, обозначенные цифрами, обсуждаются в тексте.

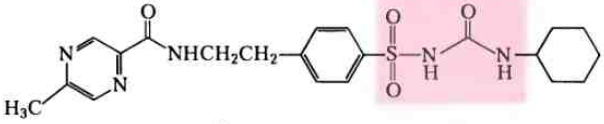
распада глюкозы ② увеличивается концентрация АТР, вызывая закрывание АТР-зависимых K^+-каналов в плазматической мембране. ③ Снижение потока K^+ деполяризует мембрану. (Вспомните, что выход ионов K^+ из открытых калиевых каналов гиперполяризует мембрану, а закрывание K^+-каналов эффективно деполяризует мембрану; см. разд. 12.6, т. 1). Деполяризация мембраны вызывает открывание потенциал-чувствительных Ca^{2+}-каналов, и ④ как следствие увеличение концентрации ионов кальция, ⑤ что инициирует высвобождение инсулина путем экзоцитоза. На секрецию инсулина также влияют сигналы парасимпатической и симпатической нервной системы (стимулирующие и ингибирующие соответственно). Ограничивает секрецию гормона в кровь простая петля обратной связи: инсулин снижает уровень глюкозы крови, стимулируя поглощение глюкозы тканями; снижение глюкозы крови детектируется β-клетками как уменьшенный поток веществ через гексокиназную реакцию; это замедляет или останавливает секрецию инсулина. Такая регуляция по типу обратной связи поддерживает концентрацию глюкозы крови примерно постоянной, несмотря на значительные колебания ее поступления с пищей.

Действие **АТР-зависимых калиевых каналов** играет ключевую роль в регуляции секреции инсулина β-клетками. Эти каналы построены из восьми субъединиц: четырех идентичных субъединиц Kir6.2 и четырех идентичных субъединиц SUR1; они устроены приблизительно так же, как и калиевые каналы бактерий и других эукариотических клеток (см. рис. 11-48, 11-49 и 11-50 в т. 1). Четыре субъединицы Kir6.2 образуют конус вокруг калиевого канала и выступают в роли селективного фильтра, действие которого связано с концентрацией АТР **(рис. 23-29)**. При повышении концентрации АТР (что соответствует повышению уровня глюкозы крови) K^+-каналы закрываются, это приводит к деполяризации плазматической мембраны и секреции инсулина, как показано на рис. 23-28.

Лекарственные препараты, относящиеся к группе производных **сульфонилмочевины** и применяемые перорально для лечения сахарного диабета II типа, связываются с субъединицами SUR1 (*sulfonylurea receptor*) калиевых каналов, закрывая их и стимулируя высвобождение инсулина. Препараты первого поколения (например, толбутамид) появились в 1950-х гг. Препараты второго поколения, включая глибурид (Микроназ), глипизид (Глюкотрол) и глимепирид (Амарил), оказались более мощными и более безопасными. В структуре препаратов остаток сульфонилмочевины выделен розовым цветом. Иногда препараты этой группы используют в сочетании с инъекциями инсулина, однако часто их одних достаточно для контроля заболевания.



Глибурид



Глипизид

К счастью, мутации белков АТР-зависимых калиевых каналов в β-клетках встречаются редко. Мутации белка Kir6.2, приводящие к тому, что калиевые каналы постоянно *открыты* (красные аминокислотные остатки на рис. 23-29, *б*),

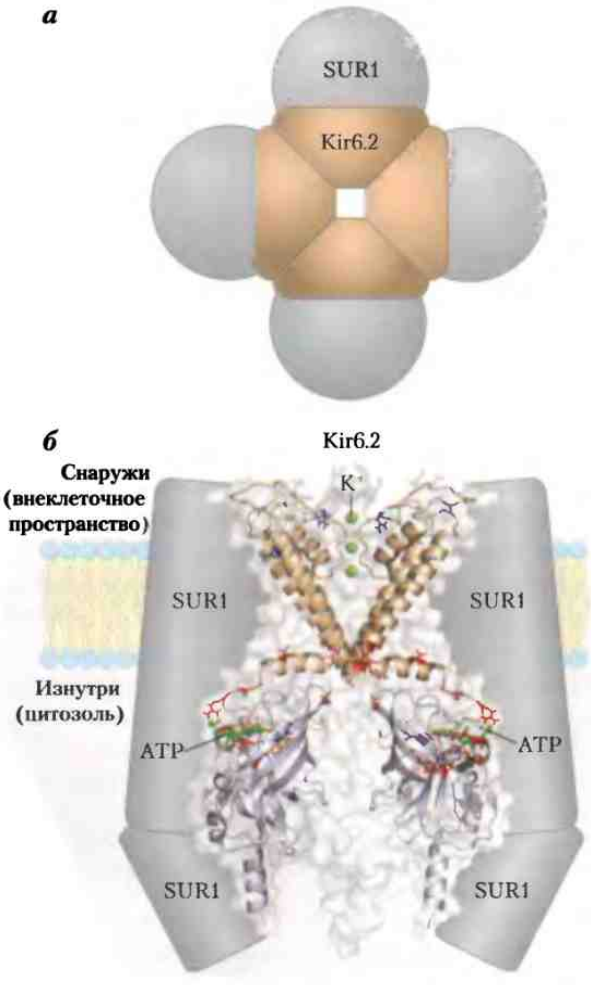


Рис. 23-29. АТР-зависимые калиевые каналы в β-клетках. *а* — октамерная структура канала (вид в перпендикулярном к клеточной мембране направлении). Канал образован четырьмя идентичными субъединицами Kir6.2 и четырьмя идентичными внешними субъединицами SUR1 (рецепторы сульфонилмочевины). *б* — структура субъединиц Kir6.2 (вид в плоскости мембраны). Для простоты представлены лишь два трансмембранных домена и два цитозольных домена. В области селективного фильтра изображены три иона калия (зеленые). Мутации некоторых аминокислотных остатков (красные) приводят к развитию неонатального сахарного диабета; мутации других аминокислот (синие) — причина гипогликемии у детей. Эта структура (любезно предоставленная Франс Эшфорд с коллегами из Оксфордского университета) была получена непрямым кристаллографическим методом, а с помощью наложения известной последовательности Kir6.2 на кристаллическую структуру бактериального канала Kir (KirBac1.1; PDB ID 1P7B), а также N- и C-концевых доменов другого белка — Kir3.1 (PDB ID 1U4E). Сравните эту структуру с регулируемым калиевым каналом, изображенным на рис. 11-50 в т. 1.

вызывают неонатальный сахарный диабет новорожденных; это заболевание сопровождается тяжелой формой гипергликемии и требует лечения инсулином. Другие мутации Kir6.2 или SUR1 (синие остатки на рис. 23-19, *б*) приводят к постоянно *закрытому* состоянию K^+-каналов и постоянной выработке инсулина. Если таких больных не лечить, у них разовьется гиперинсулинемия (гипогликемическая болезнь). Избыток инсулина приводит к тяжелой гипогликемии (пониженному содержанию глюкозы в крови), что может вызвать необратимое поражение головного мозга. Одним из эффективных способов лечения является хирургическое удаление части поджелудочной железы, что позволяет снизить выработку инсулина. ■

Глюкагон препятствует чрезмерному понижению уровня глюкозы крови

Через несколько часов после поступления углеводов пищи уровень глюкозы крови немного снижается из-за окисления глюкозы в мозге и других органах и тканях. Низкий уровень глюкозы крови индуцирует секрецию глюкагона и уменьшает выделение инсулина (**рис. 23-30**).

Существует несколько способов повышения концентрации глюкозы в крови за счет глюкагона (табл. 23-4). Как и адреналин, он стимулирует только распад гликогена печени, активируя гликогенфосфорилазу и инактивируя гликогенсинтазу; оба эффекта возникают в результате фосфорилирования регулируемых глюкагоном ферментов, которые активируются cAMP. Глюкагон инги-

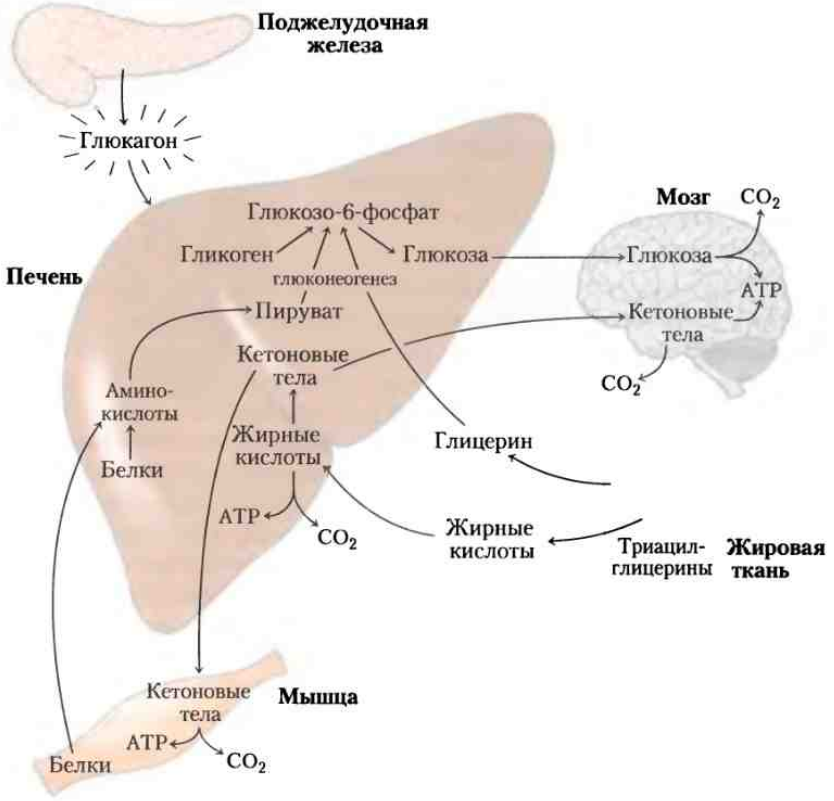


Рис. 23-30. Состояние голода: печень образует глюкозу. После нескольких часов без поступления пищи основным источником энергии для мозга становится печень. Гликоген печени расщепляется, и образованный глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, затем в свободную глюкозу, которая высвобождается в кровоток. Аминокислоты из расщепленных белков и глицерин, полученный при разрушении триацилглицеринов в жировой ткани, используются для глюконеогенеза. Жирные кислоты служат в печени основным видом топлива, а избыток ацетил-CoA превращается в кетоновые тела, которые экспортируются в другие ткани для получения энергии; когда глюкозы запасено мало, мозг особенно зависит от этого источника энергии (см. рис. 23-22).

Таблица 23-4 Влияние глюкагона на уровень глюкозы крови: образование и высвобождение глюкозы в печени

Метаболический эффект	Влияние на метаболизм глюкозы	Фермент-мишень
↑ Расщепление гликогена (печень)	Гликоген → глюкоза	↑ Гликогенфосфорилаза
↓ Синтез гликогена (печень)	Меньше глюкозы сохраняется в виде гликогена	↓ Гликогенсинтаза
↓ Гликолиз (печень)	Меньше глюкозы используется в качестве топлива в печени	↓ PFK-1
↑ Глюконеогенез (печень)	Аминокислоты, Глицерин, Оксалоацетат → глюкоза	↑ FBPаза-2 ↓ Пируваткиназа ↑ ФЕП-карбоксикиназа
↑ Мобилизация жирных кислот (жировая ткань)	Меньше глюкозы используется в качестве топлива в печени и в мышцах	↑ Гормончувствительная липаза ↑ PKA (перилипин–Ⓟ)
↑ Кетогенез	Другой (не глюкоза) источник энергии для мозга	↓ Ацетил-CoA-карбоксилаза

бирует расщепление глюкозы с помощью гликолиза в печени и стимулирует синтез глюкозы в глюконеогенезе. Это влияние обусловлено снижением концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата, аллостерического ингибитора фермента глюконеогенеза 1,6-бисфосфатазы (FBPаза-1) и активатора фосфофруктокиназы-1. Концентрация фруктозо-2,6-бисфосфата контролируется только cAMP-зависимой протеинфосфатазной реакцией (см. рис. 15-17). Кроме того, глюкагон ингибирует гликолитический фермент пируваткиназу (стимулируя его cAMP-зависимое фосфорилирование), таким образом блокируя превращение фосфоенолпирувата в пируват и предупреждая окисление пирувата в цикле лимонной кислоты. В итоге, накопление фосфоенолпирувата усиливает глюконеогенез. Это воздействие глюкагона дополняется тем, что он стимулирует синтез фермента глюконеогенеза ФЕП-карбоксикиназы. Способствуя расщеплению гликогена, которое предотвращает гликолиз и усиливает глюконеогенез в гепатоцитах, глюкагон облегчает для печени экспорт глюкозы и поддерживает уровень глюкозы крови в пределах нормы.

Хотя первая мишень глюкагона — это печень, но он (как и адреналин) также действует и на жировую ткань, активируя распад триацилглицеринов путем cAMP-зависимого фосфорилирования перилипина и гормончувствительной липазы. Активированная липаза высвобождает свободные жирные кислоты, которые переносятся в печень и другие ткани в качестве источников энергии, экономя глюкозу для мозга. Собственно эффект глюкагона — это стимуляция синтеза глюкозы и ее высвобождение печенью, а также мобилизация жирных кислот из жировой ткани, чтобы они были использованы как энергоносители для других тканей, в том числе для мозга (табл. 23-4). Все эти действия глюкагона опосредуются cAMP-зависимым фосфорилированием белков.

Во время голодания и при истощении метаболизм переключается на обеспечение энергией мозга

У здорового человека можно выделить три типа запасенной энергии: (1) гликоген в печени и относительно малые количества — в мышцах; (2) большие количества триацилглицеринов в жировой ткани; (3) белки тканей, которые расщепляются, когда необходимо снабдить организм топливом в отсутствие других источников (табл. 23-5).

Через несколько часов после приема пищи уровень глюкозы крови немного уменьшается, и ткани получают глюкозу, высвобождаемую из гликогена печени. Синтез липидов происходит очень ослабленно или вообще отсутствует. При голодании через 24 ч после приема пищи уровень глюкозы крови падает еще ниже, секреция инсулина замедляется, а секреция глюкагона увеличивается. Эти гормональные сигналы мобилизуют триацилглицерины, которые становятся преобладающим источником энергии для мышц и печени. Ответы на продолжительное голодание представлены на **рис. 23-31**. ① Для обеспечения мозга глюкозой печень расщепляет те белки, которые имеют наименее короткий срок существо-

Таблица 23-5 Доступное метаболическое топливо в организме человека с нормальной массой тела (70 кг) и у человека с ожирением (140 кг) в начале голодания

Топливные молекулы	Масса (кг)	Энергетический эквивалент, ккал (кДж)	Приблизительное время выживания, мес.*
Человек с нормальной массой тела, 70 кг			
Триацилглицерины (жировая ткань)	15	141 (589)	
Белки (преимущественно мышцы)	6	24 (100)	
Гликоген (мышцы, печень)	0,225	0,90 (3,8)	
Вещества, циркулирующие в крови (глюкоза, жирные кислоты, триацилглицерины и др.)	0,023	0,10 (0,42)	
Итого		166 (694)	3
Человек с ожирением, 140 кг			
Триацилглицерины (жировая ткань)	80	752 (3,140)	
Белки (преимущественно мышцы)	8	32 (134)	
Гликоген (мышцы, печень)	0,23	0,92 (3,8)	
Вещества, циркулирующие в крови	0,025	0,11 (0,46)	
Итого		785 (3280)	14

* Время выживания подсчитано на основании предположения о том, что минимальные необходимые затраты энергии составляют 1800 ккал/сут.

вания в организме, и могут быть без вреда разрушены в организме, не получающем питания. Их незаменимые аминокислоты трансаминируются или дезаминируются (гл. 18), и ② аминогруппы превращаются в мочевину, которая переносится кровотоком в почки и выводится.

Кроме того, в печени трехуглеродный скелет аминокислот, участвующих в образовании глюкозы, превращается в пируват или интермедиаты цикла лимонной кислоты. ③ Интермедиаты (такие как глицерин, образующийся в жировой ткани из триацилглицеринов) обеспечивают стартовый материал для глюконеогенеза в печени, ④ поставляя глюкозу мозгу. ⑤ Жирные кислоты окисляются до ацетил-CoA, но из-за расходования в глюконеогенезе интермедиатов цикла лимонной кислоты запасы оксалоацетата истощаются, ⑥ ингибируя вхождение в цикл ацетил-CoA, и ацетил-CoA накапливается. Ацетил-CoA, получающийся при окислении жирной кислоты, теперь преимущественно накапливается. ⑦ Это способствует образованию из ацетил-CoA ацетоацетил-CoA и кетоновых тел. После нескольких дней голодания концентрация кетоновых тел в крови увеличивается (**рис. 23-32**), так как эти энергетические субстраты экспортируются из печени в сердце, скелетные мышцы и мозг, которые используют их вместо глюкозы (рис. 23-31, ⑧).

Ацетил-CoA — это важнейший регулятор превращений пирувата; он аллостерически ингибирует дегидрогеназу и стимулирует пируваткарбоксилазу (см. рис. 15-20). В этих путях ацетил-CoA не допускает образования новых молекул ацетил-CoA из пирувата, стимулируя первую стадию глюконеогенеза — превращение пирувата в оксалоацетат.

У взрослого человека с нормальной массой тела в жировой ткани хранится столько триацилглицеринов, что их хватит для поддержания минимального уровня метаболизма в течение примерно трех месяцев; очень тучный взрослый человек обладает достаточным запасом веществ для того, чтобы голодать больше года (табл. 23-5). Когда заканчивается накопленный жир, начинается расщепление белков; это ведет к потере работоспособности сердца и печени, и, наконец, к смерти. Во время голодания или жесткой диеты запасы жиров могут обеспечивать необходимую энергию, но витамины и минеральные вещества должны поступать извне. Кроме того, глюкогенные аминокислоты белков расходуются в ходе глюконеогенеза, поэтому тоже нуждаются в пополнении из пищи. По этой причине пищевой рацион с целью снижения массы тела дополняют витаминами, минеральными веществами и аминокислотами или белками.

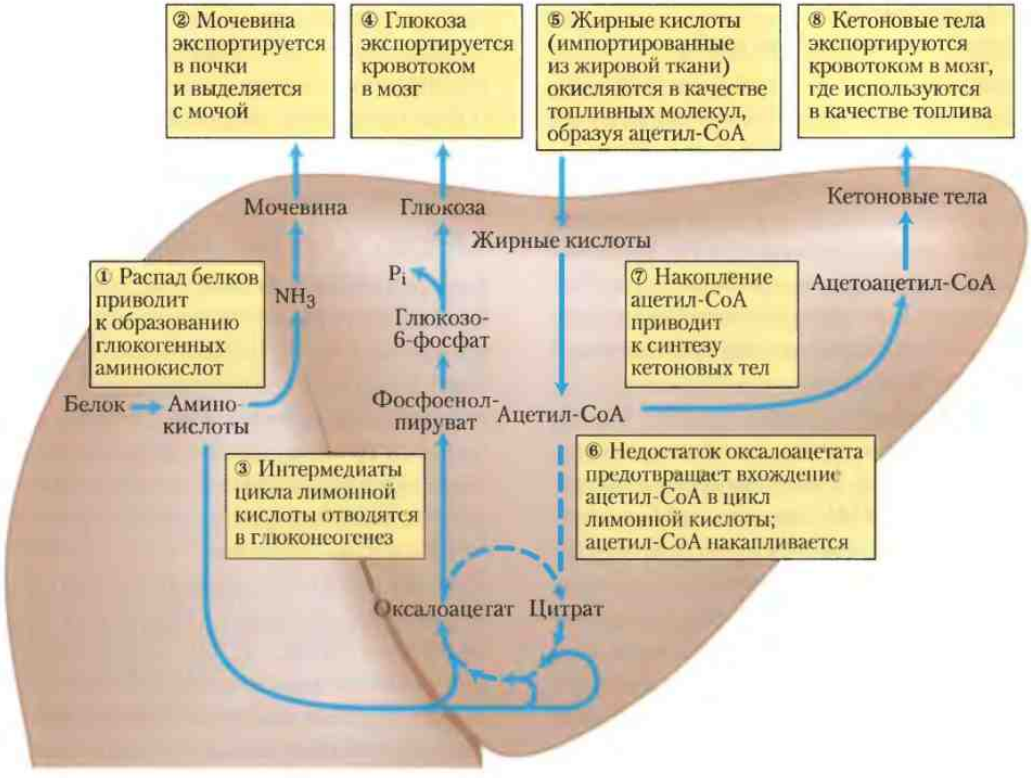


Рис. 23-31. Метаболизм топливных молекул в печени при длительном голодании или при неконтролируемом сахарном диабете. После исчерпания запасов углеводов важным источником глюкозы становятся белки; глюкоза образуется из глюкогенных аминокислот в процессе глюконеогенеза (①–④). Жирные кислоты, поступающие из жировой ткани, превращаются в кетоновые тела и направляются в головной мозг (⑤–⑧). Пунктирными стрелками показаны те реакции, которые в этих условиях ослабевают. Стадии процесса обсуждаются далее в тексте.

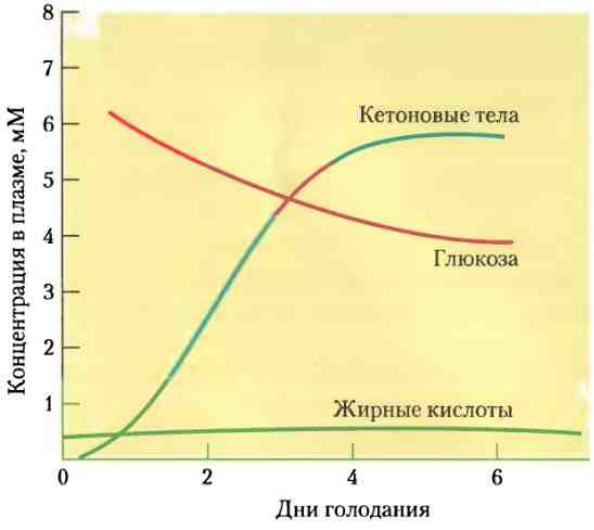


Рис. 23-32. Концентрации жирных кислот, глюкозы и кетоновых тел в плазме крови во время первой недели голодания. Несмотря на гормональный механизм поддержания нормального уровня глюкозы крови, после двух дней голодания количество глюкозы начинает уменьшаться. Кетоновые тела, почти отсутствующие в крови перед голоданием, резко накапливаются после 2–4 дней режима голодания. Во время длительного голодания кетоны ацетоацетат и β-гидроксибутират, растворимые в воде, служат дополнительным источником энергии. Жирные кислоты не могут служить топливом для мозга — они не могут проникать через гематоэнцефалический барьер.

Адреналин сигнализирует о предстоящей физической нагрузке

Когда животное попадает в стрессовую ситуацию и нуждается в увеличении активности (борьба–бегство), нервные импульсы из мозга инициируют высвобождение адреналина или норадреналина надпочечниками. Оба гормона усиливают дыхание для ускорения поглощения O_2, увеличивают частоту и силу сердечных сокращений, повышают кровяное давление, таким образом увеличивая поступление O_2 и топливных молекул к тканям (табл. 23-6).

Адреналин действует преимущественно на мышцы, жировую ткань и печень. Он активирует гликогенфосфорилазу и инактивирует гликогенсинтазу с помощью cAMP-зависимого фосфорилирования ферментов, стимулируя превращение гликогена печени в глюкозу крови, что необходимо для анаэробной работы мышц. Адреналин активирует также анаэробный распад гликогена в мышцах в ходе ферментативных превращений молочной кислоты, стимулируя гликолитическое образование АТР. Усиление гликолиза сопровождается увеличением концентрации фруктозо-2,6-бисфосфата, потенциального аллостерического активатора ключевого гликолитического фермента фосфофруктокиназы-1 (см. рис. 15-16, 15-17). Адреналин стимулирует мобилизацию жиров в жировой ткани, активируя (с помощью cAMP-зависимого фосфорилирования) гормончувствительную липазу, отщепляет перилипин с поверхности жировых капель (см. рис. 17-3). Наконец, адреналин стимулирует секрецию глюкагона и ингибирует секрецию инсулина, усиливая их эффект на мобилизацию топливных молекул и препятствуя запасанию последних.

Кортизол сигнализирует о стрессе, в том числе о низком уровне глюкозы

Стресс (тревога, боль, страх, лихорадка, инфекции, низкий уровень глюкозы крови, истощение организма) стимулирует высвобождение корой надпочечников кортикостероидного гормона **кортизола**. Кортизол действует на мышцы, печень и жировую ткань, стимулируя обеспечение организма топливными молекулами и помогая противостоять стрессу. Этот гормон действует относительно медленно путем изменения метаболизма — набора и концентрации определенных ферментов, которые синтезируют его клетки-мишени, а также путем регуляции активности уже существующих молекул ферментов.

В жировой ткани кортизол приводит к увеличению высвобождения жирных кислот из запаса триацилглицеринов. Жирные кислоты экспортируются в другие ткани, чтобы обеспечить там клетки энергией, а глицерин используется для глюконеогенеза в печени. Кортизол стимулирует распад мышечных белков и экспорт аминокислот в печень, где они служат предшественниками в глюконеогенезе. В печени кортизол усиливает глюконеогенез, стимулируя синтез ключевого фермента ФЕП-карбоксикиназы (см. рис. 14-17, *б*); такое

Таблица 23-6 Физиологические и метаболические эффекты адреналина: подготовка к активным действиям

Непосредственный эффект	Общий эффект
Физиологический	
↑ Частота сердечных сокращений ↑ Кровяное давление ↑ Расширение дыхательных путей	Увеличение доставки O_2 к тканям (к мышцам)
Метаболический	
↑ Расщепление гликогена (в мышцах, печени) ↓ Синтез гликогена (в мышцах, печени) ↑ Глюконеогенез (в печени)	Увеличение образования глюкозы с целью получения энергии
↑ Гликолиз (в мышцах)	Увеличение образования АТР в мышцах
↑ Мобилизация жирных кислот (в жировой ткани)	Увеличение доступности жирных кислот как топливных молекул
↑ Секреция глюкагона ↓ Секреция инсулина	Усиление метаболических эффектов адреналина

же действие оказывает глюкагон, а инсулин создает противоположный эффект. Глюкоза, образуемая в этом пути, накапливается в печени в форме гликогена или немедленно экспортируется в ткани, нуждающиеся в энергии. Эти изменения метаболизма необходимы для поддержания нормального уровня глюкозы крови и для увеличения запасов гликогена, который легко доступен для обеспечения ответа на стресс — борьба–бегство. Эффект кортизола, таким образом, уравновешивает действие инсулина. При длительном стрессе постоянный выброс кортизола перестает играть положительную адаптационную роль и начинает наносить вред мышечной и костной ткани, а также нарушать эндокринную и иммунную функции организма.

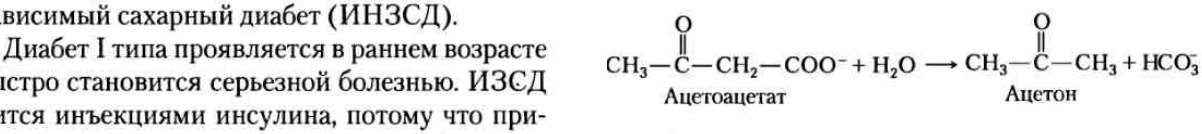
Сахарный диабет развивается из-за нарушений образования инсулина или дефектов его действия

Сахарный диабет — весьма распространенное заболевание: примерно у 60% населения США наблюдаются некоторые отклонения в метаболизме глюкозы, свидетельствующие о развитии диабета или о склонности к нему. В клинической практике выделяют две главные формы диабета: **диабет I типа**, или инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД), и **диабет II типа**, или инсулиннезависимый сахарный диабет (ИНЗСД).

Диабет I типа проявляется в раннем возрасте и быстро становится серьезной болезнью. ИЗСД лечится инъекциями инсулина, потому что причина залючается в недостаточности β-клеток поджелудочной железы, которые не способны вырабатывать нужное количество инсулина. Такой больной нуждается в инсулиновой терапии и внимательном, в течение всей жизни, контроле за балансом между поступлением пищи и дозой инсулина. Характерные симптомы сахарного диабета I типа (и II типа) — сильная жажда и частое мочеиспускание (полиурия), что приводит к потреблению большого количества воды (полидипсия). («Сахарный диабет» означает «чрезмерное выделение сладкой мочи».) Эти симптомы появляются из-за того, что в мочу выделяется много глюкозы (**глюкозурия**).

Диабет II типа развивается медленно (обычно в пожилом возрасте, у тучных людей), симптомы проявляются слабо, часто в первый период болезнь развивается незаметно. Это целая группа заболеваний, при которых инсулин вырабатывается, но нарушается регуляторная активность инсулина. Больные ИНЗСД не чувствительны к инсулину. Связь между диабетом II типа и полнотой (это обсуждалось ранее) в настоящее время активно исследуется.

При любой форме диабета человек не способен эффективно получать глюкозу из крови; вспомните, что инсулин инициирует перемещение транспортера глюкозы GLUT4 к плазматической мембране в мышечной и жировой тканях (см. рис. 12-16 в т. 1). Кроме того, при диабете происходит очень интенсивное, но неполное окисление жирных кислот в печени. Ацетил-CoA, образованный при β-окислении, не может быть полностью окислен в цикле лимонной кислоты, потому что в результате β-окисления создается большая величина отношения концентраций [NADH]/[NAD^+], что ингибирует цикл (NADH превращается в NAD^+ в три стадии). Накопление ацетил-CoA ведет к избыточному образованию кетоновых тел ацетоацетата и β-гидроксибутирата, которые не могут быть использованы внепеченочными тканями так же быстро, как они синтезируются печенью. Кроме β-гидроксибутирата и ацетоацетата кровь больных диабетом содержит ацетон, который образуется при спонтанном декарбоксилировании ацетоацетата:



Ацетон — летучее вещество с характерных запахом, и при неконтролируемом диабете в дыхании больного легко улавливается запах ацетона, иногда по ошибке принимаемый за запах этанола. Больному диабетом, у которого из-за высокого уровня глюкозы крови наступает спутанность сознания, нередко ставят неправильный диагноз алкогольной интоксикации, и эта ошибка может оказаться фатальной. Избыточное образование кетоновых тел, называемое **кетозом**, приводит к значительному возрастанию концентрации кетоновых тел в крови (кетонемия) и в моче (кетонурия).

Кетоновые тела представляют собой карбоновые кислоты, которые при диссоциации образуют протоны. При неконтролируемом диабете закисление может превысить емкость бикарбонатной буферной системы крови, вызывая

уменьшение pH, называемое **ацидозом**, или, в сочетании с кетозом, **кетоацидозом**; эти явления потенциально опасны для жизни.

Для диагностики и лечения диабета очень важно сделать биохимический анализ крови и анализ мочи. Информативным показателем служит **тест на толерантность к глюкозе**. Пациент голодает ночь, затем пьет тестовую дозу 100 г глюкозы, растворенной в стакане воды. Уровень глюкозы крови измеряют перед приемом тестовой дозы и далее в течение нескольких часов через интервалы времени в 30 мин. Здоровый человек усваивает глюкозу быстро, уровень глюкозы крови увеличивается не более чем до 9–10 мМ, в моче глюкозы немного или она отсутствует. Больные диабетом усваивают тестовую дозу глюкозы плохо; уровень глюкозы крови многократно увеличивается и очень медленно снижается до исходной концентрации. Поскольку уровень глюкозы крови намного превышает почечный порог (около 10 мМ), глюкоза обнаруживается в моче. ■

Краткое содержание раздела 23.3 ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА

- Концентрация глюкозы в крови регулируется гормонально. Колебания уровня глюкозы крови (в норме от 60 до 90 мг/100 мл, или ~4,5 мМ) при приеме пищи или при активной работе исправляются разнообразными изменениями метаболизма в отдельных органов под действием гормонов.

- Высокий уровень глюкозы крови усиливает высвобождение инсулина, который ускоряет поглощение глюкозы тканями и благоприятствует запасанию энергии в виде гликогена и триацилглицеринов и в то же время ингибирует мобилизацию жирных кислот в жировой ткани.

- Низкий уровень глюкозы вызывает выделение глюкагона, который стимулирует высвобождение глюкозы из гликогена печени и сдвигает энергетический метаболизм в печени и в мышцах к окислению жирных кислот и к экономии глюкозы для мозга. При продолжительном голодании триацилглицерины становятся решающим видом топлива; печень превращает жирные кислоты в кетоновые тела для экспорта в другие ткани, в том числе и в мозг.

- Адреналин подготавливает организм к увеличенной нагрузке, мобилизуя глюкозу из гликогена и других предшественников и выделяя ее в кровь.

- Кортизол, высвобождаемый в ответ на различные виды стресса (включая низкий уровень глюкозы крови), стимулирует глюконеогенез из аминокислот и глицерина в печени, таким образом увеличивая уровень глюкозы крови и уравновешивая воздействие инсулина.

- При диабете инсулин или не вырабатывается, или же не распознается тканями, и поглощение глюкозы из крови затрудняется. При высоком уровне глюкозы крови глюкоза выводится из организма. В результате ткани становятся энергетически зависимыми от жирных кислот (вырабатываются кетоновые тела), а также происходит расщепление клеточных белков, что обеспечивает появление глюкогенных аминокислот для синтеза глюкозы. Поэтому неконтролируемый диабет характеризуется высоким уровнем глюкозы крови и в моче, а также образованием и выделением кетоновых тел.

23.4. Ожирение и регуляция массы тела

В США 30% взрослого населения страдает ожирением, а еще у 35% избыточный вес. (Для определения ожирения рассчитывают специальный показатель — индекс массы тела (ИМТ или англ. BMI)

$$\text{ИМТ} = \text{масса тела (кг)} / (\text{рост человека})^2\,(\text{м})^2$$

	ИМТ
В норме	<25
Избыточный вес	25–30
Ожирение	>30

Ожирение опасно для жизни; оно значительно увеличивает вероятность развития диабета II типа, инфаркта миокарда, инсульта, а также

злокачественных опухолей толстой кишки, молочной железы, простаты и эндометрия. Поэтому очень важно понимать, каким образом осуществляется регуляция массы тела и происходит накопление жиров в жировой ткани. ■

Упрощенно можно сказать, что ожирение — это результат поступления с пищей бóльшего количества калорий, чем это было необходимо для организма. Организм может использовать лишнюю энергию тремя способами: 1) запасать в виде жиров и хранить в жировой ткани, 2) расходовать избыток энергии при экстремальных нагрузках, и 3) превратить энергию в тепло (термогенез), разобщая дыхательную цепь митохондрий. У млекопитающих целый набор сигналов от эндокринной и нервной систем контролирует баланс поступления энергии и затраты организма таким образом, что количество жировой ткани поддерживается на нужном уровне. Чтобы эффективно бороться с ожирением необходимо понимать, как это равновесие регулируется в норме и как эти механизмы гомеостаза могут нарушаться.

Рис. 23-33. Модель механизма поддержания постоянной массы. При увеличении массы жировой ткани высвобождается лептин; он снижает аппетит и ингибирует синтез жиров, а также стимулирует окисление жирных кислот. При уменьшении массы жировой ткани образование лептина снижается; это приводит к тому, что пищи поглощается больше, а скорость окисления жирных кислот уменьшается.

Жировая ткань выполняет важную эндокринную функцию

Поддержание постоянной массы тела удобно объяснять на модели механизма обратной связи в адипоцитах. Согласно этой модели, в организме действует механизм ингибирования пищевого поведения и увеличения потребления энергии, когда масса тела превышает определенную величину. При снижении масса тела до определенной величины ингибирование ослабляется (**рис. 23-33**). Сигнал обратной связи приходит из жировой ткани в мозговые центры, контролирующие пищевое поведение и метаболическую и двигательную активность организма. Из факторов патогенеза первым был открыт лептин в 1994 г., а последующие исследования показали, что жировая ткань служит важным эндокринным органом, где синтезируются пептидные гормоны, названные **адипокинами**. Адипокины могут вызывать локальный эффект (аутокринное и паракринное действие) или системный эффект (эндокринное действие), передавая информацию о состоянии энергетических резервов (триацилглицеринов) в жировой ткани другим тканям и в головной мозг. В норме адипокины регулируют изменения метаболизма топливных молекул и потребность организма в питании, благодаря чему восстанавливаются необходимые запасы энергетических веществ и поддерживается нормальная масса тела. При избытке или недостатке адипокинов регуляция нарушается, что может стать смертельно опасным.

Адипокин **лептин** (от греч. *leptos* — тонкий) (167 аминокислотных остатков) поступает в головной мозг, действует на рецепторы в гипоталамусе, что вызывает снижение аппетита. Лептин впервые был идентифицирован у лабораторных мышей как продукт гена *OB* (от англ. *obese* — тучный). У мышей с генотипом *ob/ob*, т. е. с двумя дефектными копиями этого гена (строчными буквами обозначают мутантную форму гена), проявляются поведенческие и физиологические реакции, характерные для животных, находящихся в состоянии постоянного голодания. У них повышен уровень кортизола в плазме крови. Они не способны сохранять тепло, у них наблюдаются отклонения в размерах, они не размножаются и обладают неограниченным аппетитом. Из-за этого у таких мышей быстро развивается сильное ожирение, масса их

Рис. 23-34. Ожирение вызывается нарушениями в выработке лептина. Обе эти мыши одного возраста и обе дефектны по гену *OB*. *Справа* — мышь, ежедневно получающая инъекции очищенного лептина; масса этой мыши 35 г. *Слева* — мышь, не получающая лептин, поэтому она ела больше пищи, была менее активна; масса этой мыши 67 г.

тела в 3 раза превышает норму (**рис. 23-34**). У них нарушен метаболизм; как и больные диабетом, эти мыши не чувствительны к инсулину. Если мышам с генотипом *ob/ob* инъецировать лептин, они теряют в весе, у них увеличивается локомоторная активность и образование тепла.

Обнаружен и второй мышиный ген *DB* (диабетический), который играет роль в регуляции аппетита. Мыши с двумя дефектными копиями (*db/db*) страдают ожирением и больны диабетом. Ген *DB* кодирует рецептор лептина, а если рецептор лептина дефектен, сигнальная функция лептина теряется.

Рецептор лептина преимущественно экспрессируется в нейронах аркуатных ядер гипоталамуса — регуляторов пищевого поведения (**рис. 23-35, *а***). Лептин передает информацию о больших запасах жира. Принятый тканями сигнал приводит к снижению потребления жира и увеличению расходования энергии. Взаимодействие лептина с рецептором в гипоталамусе изменяет нервные сигналы в зоны мозга, регулирующие аппетит. Кроме того, лептин стимулирует симпатическую нервную систему, вызывая повышение кровяного давления и частоты сердечных сокращений, а также усиливает образование тепла, разобщая в митохондриях адипоцитов процесс переноса электронов и синтез АТР (рис. 23-35, *б*). Вспомним, что термогенин (разобщающий белок UCP) образует канал во внутренней мембране митохондрий, что позволяет протонам вновь проникать в митохондриальный матрикс без прохождения через АТР-синтазный комплекс. Это дает возможность непрерывно продолжать окисление энергоемких молекул (жирных кислот в адипоцитах) без синтеза АТР, переводя всю энергию в тепло, и использовать энергию пищи или запасенного жира в очень больших количествах.

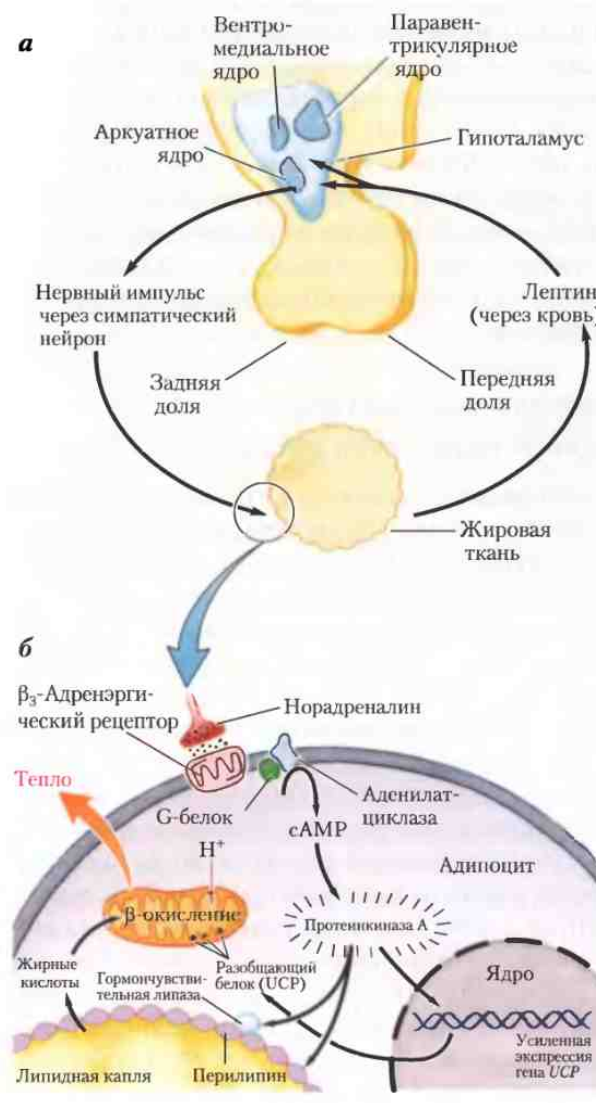


Рис. 23-35. Гипоталамическая регуляция потребления пищи и энергии. *а* — анатомия гипоталамуса. *б* — взаимосвязи между гипоталамусом и жировыми клетками, описано ниже в тексте.

Лептин стимулирует образование пептидных гормонов, снижающих аппетит

В аркуатном ядре гипоталамуса нейроны двух типов контролируют поглощение источников энергии и метаболизм (**рис. 23-36**). **Орексигенные** (стимулирующие аппетит) нейроны стимулируют прием пищи, вырабатывая и высвобождая **нейропептид Y (NPY)**, в результате чего следующий в цепи нейрон посылает сигнал в мозг: «Есть!». Во время голодания уровень NPY в крови уве-

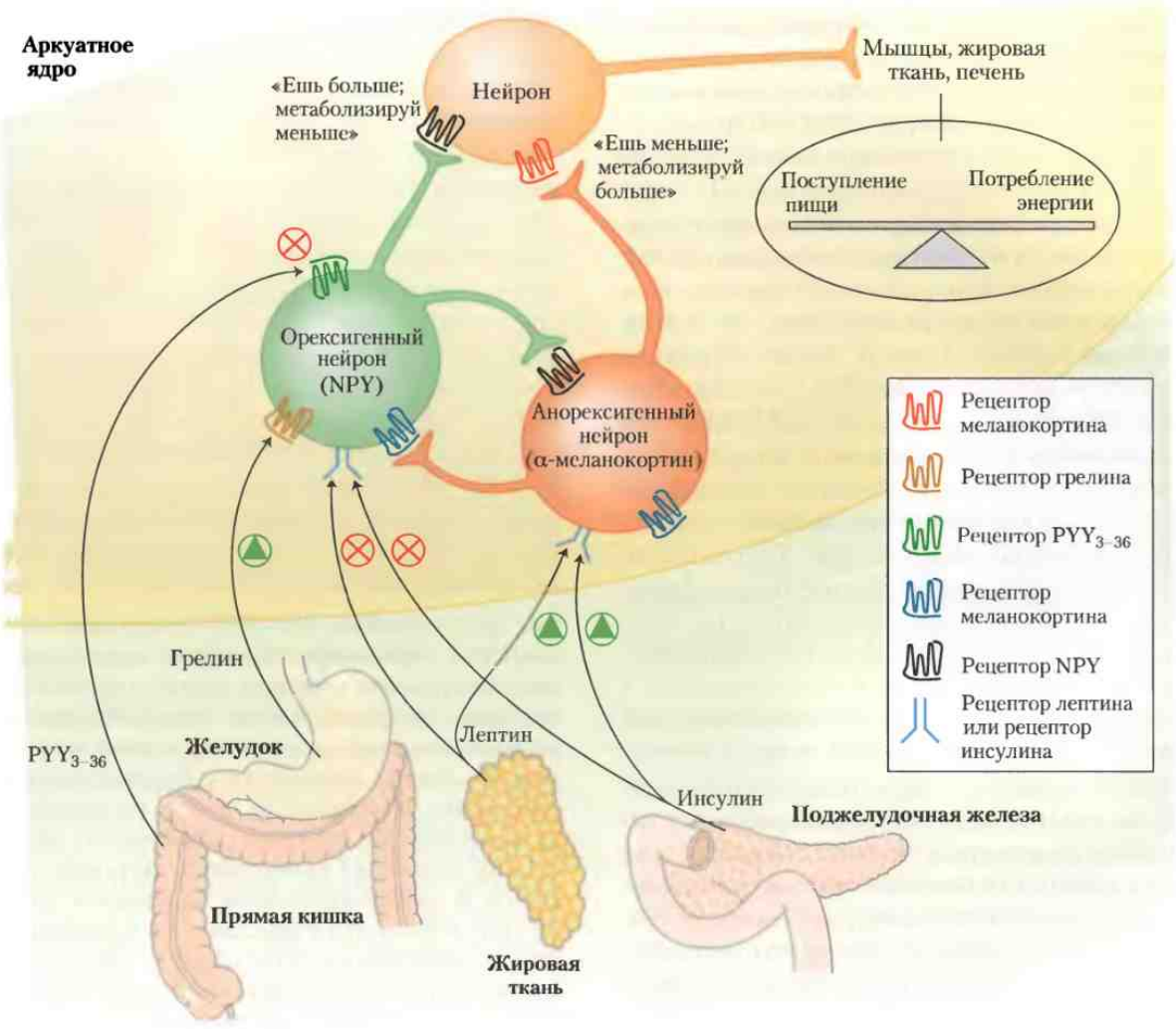


Рис. 23-36. Гормоны, контролирующие пищевое поведение. В аркуатном ядре гипоталамуса есть два набора нейросекреторных клеток, которые воспринимают гормональный сигнал и передают нервные импульсы клеткам мышц, жировой ткани и печени. Лептин и инсулин высвобождаются из жировой ткани и поджелудочной железы (соответственно) пропорционально массе жира в теле. Эти два гормона действуют на анорексигенные нейросекреторные клетки (красный), инициируя выделение α-МСГ; таким образом формируются сигналы «есть меньше и метаболизировать больше энергетических запасов». Лептин и инсулин действуют и на орексигенные нейросекреторные клетки (зеленый цвет), ингибируя высвобождение NPY и уменьшая сигнал «есть» тканям. Как описано в тексте, желудочный гормон грелин *стимулирует* аппетит, активируя экспрессирующие NPY клетки, а PYY_{3-36}, синтезируемый в прямой кишке, *ингибирует* эти нейроны, и таким образом снижает аппетит. Нейросекреторные клетки любого из этих двух типов ингибируют выработку гормонов друг у друга, некоторые стимулы, активирующие орексигенные клетки, инактивируют анорексигенные клетки, и наоборот. Это усиливает эффект стимулирующих сигналов.

личивается; он повышен и у мышей с генотипом *ob/ob* и *db/db*. У мышей, у которых нет чувства насыщения, главная причина ожирения тоже связана с высоким уровнем NPY.

Анароксигенные (подавляющие аппетит) нейроны в аркуатном ядре гипоталамуса вырабатывают **α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ**, или меланокортин), образующийся из полипептидного предшественника проопиомеланокортина (ПОМК; рис. 23-6). При высвобождении α-МСГ следующий нейрон в цикле посылает в мозг сигнал: «Перестать есть!».

От количества и размеров адипоцитов зависит количество лептина, выделяемого жировой тканью. Когда в результате потери веса снижается масса липидной ткани, то и концентрация лептина в крови падает, образование NPY угнетается — процесс, показанный на рис. 23-35, обращается. В ответ на уменьшение интенсивности cAMP-зависимой сигнализации разобщение угнетается, замедляя повышение температуры; при этом жиры запасаются, а мобилизация жиров уменьшается. Употребление большего количества пищи при более эффективном усвоении жиров приводит к пополнению запасов жира, и система опять возвращается в состояние равновесия.

Кроме того, лептин, вероятно, необходим для нормального развития нервных связей в гипоталамусе. У мышей рост нервной ткани аркуатного ядра на раннем этапе формирования мозга замедляется в отсутствие лпетина; это влияет и на орексигенные, и (в меньшей степени) на анорексигенные нейроны гипоталамуса. Возможно, уровень лептина во время формирования этих связей определяет детали строения самой регуляторной системы.

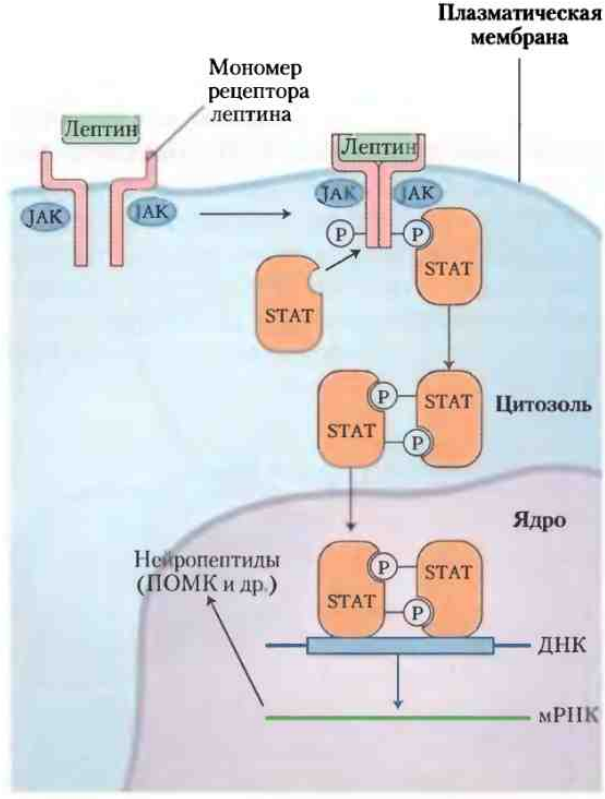


Рис. 23-37. Механизм JAK–STAT трансдукции сигнала лептина в гипоталамус. Связывание лептина индуцирует димеризацию рецептора лептина, после которой происходит фосфорилирование остатков Tyr-рецептора, катализируемое янус-киназой (JAK). Белки STAT через свои SH_2-домены связываются с фосфорилированным лептиновым рецептором, после чего фосфорилируются по остаткам Tyr благодаря специфической активности JAK. Затем STAT димеризуются, связываясь друг с другом по фосфорилированным тирозиновым остаткам (Ⓟ–Tyr), и проникают в ядро. Здесь они взаимодействуют со специфическими регуляторными участками ДНК и меняют экспрессию определенных генов. В итоге продукты этих генов влияют на пищевое поведение и потребление организмом энергии.

Лептин включает сигнальный каскад, регулирующий экспрессию генов

Лептиновый сигнал преобразуется с помощью JAK–STAT-механизма, который также используется рецептором интерферона и рецептором фактора роста (**рис. 23-37**; см. также рис. 12-18 в т. 1). Рецептор лептина обладает единственным трансмембранным участком. При связывании лептина с внеклеточным доменом двух мономеров рецептора происходит их димеризация. Оба мономера фосфорилируются с помощью **янус-киназы (JAK)** по тирозиновому остатку внутриклеточного домена. Остатки Ⓟ-Tyr становятся местами стыковки для трех белков–активаторов транскрипции (STAT 3, 5 и 6). Прикрепленные белки STAT затем фосфорилируются по остаткам Tyr с помощью той же самой JAK. После фосфорилирования белки STAT димеризуются, затем входят в ядро, где связываются со специфическими последова-

тельностями ДНК и стимулируют экспрессию генов-мишеней, в том числе и ген ПОМК, из которого образуется α-МСГ.

Одна из причин усиления катаболизма и повышения тепловыделения, запускаемых лептином, — увеличение синтеза в адипоцитах белка термогенина, разобщителя дыхательной цепи митохондрий (продуцируется геном *UCP1*). Лептин стимулирует синтез термогенина, изменяя синаптическую передачу от нейронов в аркуатном ядре в жировую и другие ткани. В этих тканях лептин вызывает увеличение выделения норадреналина, который, взаимодействуя с β_3-адренорецепторами, стимулирует транскрипцию гена *UCP1*. В результате происходящего разобщения электрон-транспортной цепи с окислительным фосфорилированием расходуются жиры и выделяется тепло (рис. 23-35).

Может ли ожирение быть связано с неэффективным образованием лептина? Можно ли в таком случае вылечить его инъекциями лептина? Но на самом деле концентрация лептина в крови у животных (и людей) с ожирением *выше*, чем у особей с нормальной массой тела (за исключением, конечно, животных с *ob/ob*-генотипом, которые не могут вырабатывать лептин). У ожиревших особей в системе ответа на лептин должны быть дефектными некоторые последовательные стадии, и повышение уровня лептина, по-видимому, является результатом безуспешной попытки организма вернуть чувствительность к лептину. В очень редких случаях у людей с чрезвычайно сильным ожирением дефектен ген лептина (*OB*). При этом инъекции лептина должны приводить к значительной потере веса. Но у подавляющего большинства страдающих ожирением ген *OB* не поврежден. В клинической практике инъекции лептина не оказывают на людей эффекта снижения веса, наблюдаемого у ожиревших мышей с генотипом *ob/ob*. Очевидно, у людей в большинстве случаев ожирения наряду с лептином существенную роль играют какие-то другие факторы.

Лептиновая система участвует в регуляции ответа на истощение

Вероятно, лептин возник в процессе эволюции для адаптации активности и метаболизма животных в периоды голода, а не как средство, ограничивающее увеличение массы тела. *Снижение* уровня лептина при недостаточном питании приводит к обращению процесса термогенеза (рис. 23-35) и позволяет сохранить энергетические запасы организма. Лептин (действующий в гипоталамусе) также вызывает снижение образования тиреоидных гормонов (ослабляя основной метаболизм), снижение уровня синтеза половых гормонов (предотвращая репродукцию), а также стимулирует выработку глюкокортикоидов (мобилизуя энергетические ресурсы организма). Таким образом, опосредованный лептином ответ, приводящий к снижению расхода энергии и стимуляции использования эндогенных источников энергии, позволяет организму пережить затяжные периоды голодания. В печени и мышцах лептин стимулирует **AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK)**, что приводит к ингибированию синтеза жирных кислот и активации окисления жирных кислот и в итоге способствует протеканию процессов получения энергии.

Инсулин действует в аркуатном ядре, регулируя питание и запасание энергии

Секреция инсулина регулирует как объем запасов жира (тучность), так текущее энергетическое состояние организма (уровень глюкозы крови). Инсулин действует на инсулиновые рецепторы в гипоталамусе, снижая аппетит (рис. 23-36). Рецепторы инсулина в орексигенных нейронах в аркуатном ядре *ингибируют* высвобождение NPY, а рецепторы инсулина в анорексигенных нейронах *стимулируют* образование α-МСГ, снижая тем самым поглощение топливных молекул и влияя на метаболизм жирных кислот и углеводов в печени и в мышцах. Адипонектин увеличивает выработку тепла. С помощью механизмов, обсуждаемых в разд. 23.3, инсулин также сигнализирует мышцам, печени и жировой ткани о необходимости увеличения интенсивности превращения глюкозы в ацетил-CoA, тем самым обеспечивая исходный материал для синтеза жиров.

Лептин увеличивает чувствительность клеток печени и мышц к инсулину. Возможно, этот эффект обусловлен взаимодействием между протеин-тирозинкиназами, активируемыми лептином, и киназами, активируемыми инсулином

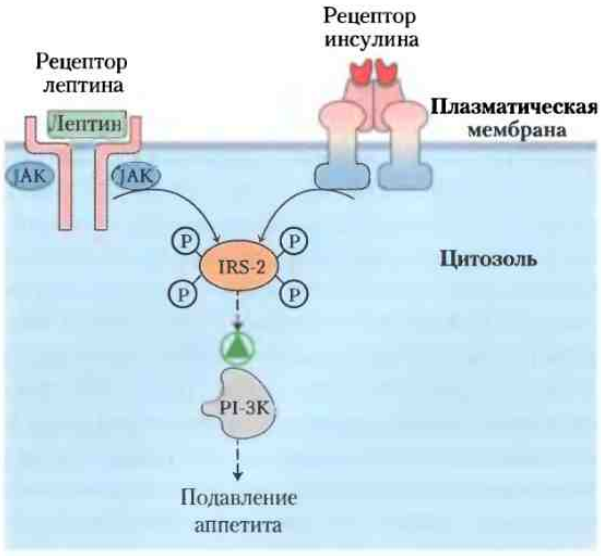


Рис. 23-38. Вероятный механизм взаимодействия между рецепторами инсулина и лептина. Рецептор инсулина обладает собственной тирозинкиназной активностью (см. рис. 12-15 в т. 1), а лептиновый рецептор при связывании своего лиганда фосфорилируется растворимой формой тирозинкиназы (JAK). Одно из возможных объяснений наблюдаемого взаимодействия между лептином и инсулином состоит в том, что они оба могут фосфорилировать один и тот же субстрат; здесь это комплекс инсулин–рецептор–субстрат-2 (IRS-2). В фосфорилированном виде IRS-2 активирует PI-3K, участвующую в последовательности событий, включающей подавление аппетита. IRS-2 суммирует импульсы от обоих рецепторов.

(рис. 23-38); общие вторичные мессенджеры в двух сигнальных путях позволяют лептину инициировать некоторые события, которые запускаются также инсулином через комплекс инсулин–рецептор–субстрат-2 (IRS-2) и фосфоинозитид-3-киназу (PI-3K) (см. рис. 12-16 в т. 1).

Адипонектин увеличивает чувствительность к инсулину, действуя через AMPK

Адипонектин — пептидный гормон (224 аминокислотных остатка), синтезируемый почти исключительно в жировой ткани; этот адипокин повышает чувствительность других органов к действию инсулина, предотвращает развитие атеросклероза и ингибирует воспалительный ответ (адгезию моноцитов, трансформацию макрофагов, а также пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток сосудов). Адипонектин увеличивает поглощение миоцитами жирных кислот из крови, а также увеличивает скорость β-окисления жирных кислот в мышцах. Он также блокирует синтез жирных кислот и глюконеогенез в гепатоцитах и стимулирует поглощение глюкозы и ее катаболизм в мышцах и печени.

Это действие адипонектина осуществляется не непосредственно, и отдельные элементы этой системы еще предстоит изучить, однако известно, что многие из процессов происходят при участии AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK). Вспомните (см. рис. 15-6), что AMPK активируется под действием факторов, сигнализирующих о необходимости изменить метаболизм от биосинтеза в сторону образования энергии **(рис. 23-39)**. Активированная AMPK фосфорилирует ключевые в метаболизме липидов и углеводов белки, вызывая системные эффекты в метаболизме организма **(рис. 23-40)**. Рецепторы адипонектина также присутствуют в головном мозге; гормон активирует AMPK в гипоталамусе, стимулируя аппетит и снижая расход энергии.

Один из регулируемых AMPK ферментов в печени и белой жировой ткани — ацетил-CoA-карбоксилаза, образующая малонил-CoA, первый промежуточный продукт в биосинтезе жирных кислот. Малонил-CoA — это мощный ингибитор фермента карнитинацилтрансферазы I, начинающей процесс β-окисления, осуществляя транспорт жирных кислот в митохондрии (рис. 17-6).

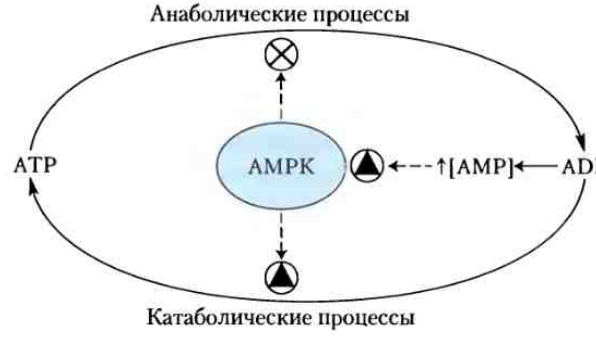


Рис. 23-39. Роль AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) в регуляции метаболизма ATP. Образующийся в реакциях синтеза ADP превращается в AMP под действием аденилаткиназы. AMP активирует AMPK, которая регулирует процессы анаболизма и катаболизма путем фосфорилирования ключевых ферментов (см. рис. 23-40).

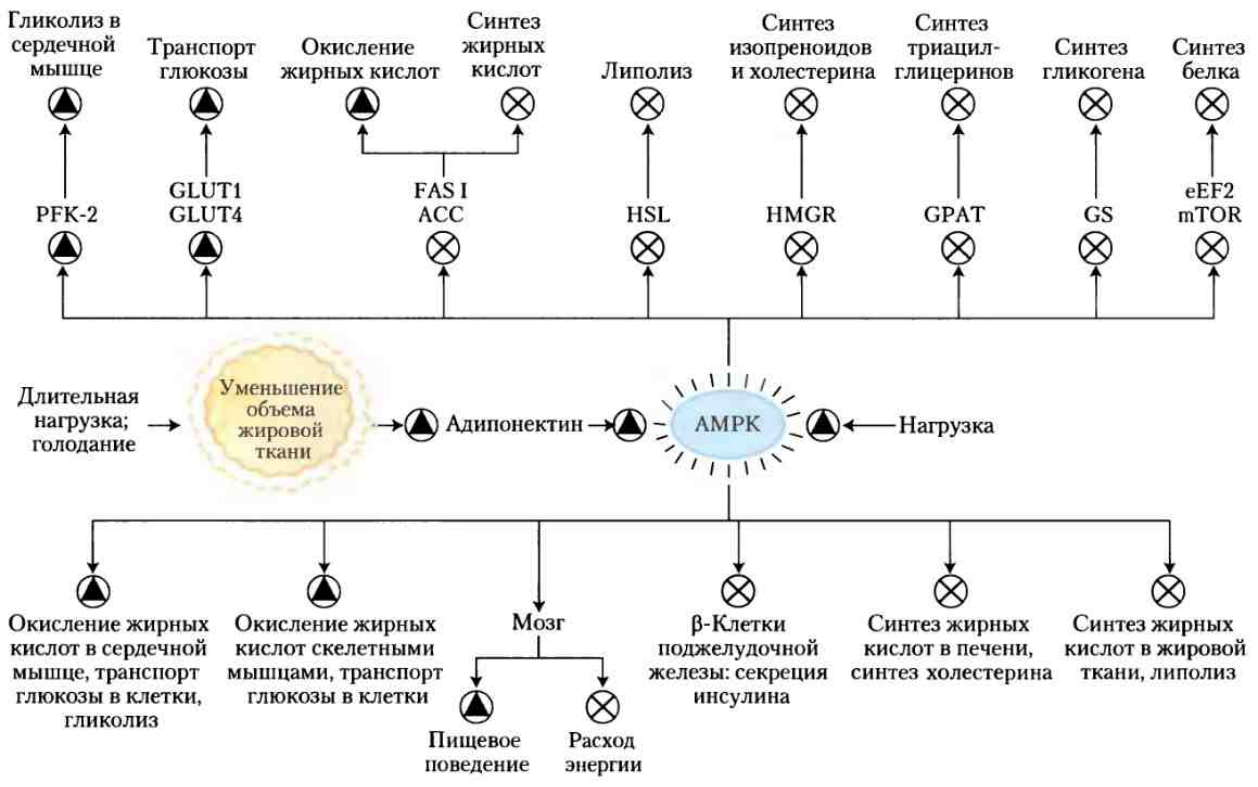


Рис. 23-40. Образование адипонектина и его действие через AMPK. При длительном голодании запасы триглицеринов в жировой ткани сокращаются, что стимулирует синтез адипонектина и его высвобождение из адипоцитов. Адипонектин плазмы крови воздействует на специфические рецепторы в плазматической мембране самых разных клеток и органов, ингибируя процессы, протекающие с большими затратами энергии, и стимулируя процессы, приводящие к накоплению энергии. В головном мозге адипонектин действует через свои рецепторы, стимулируя организм к приему пищи, ингибируя энергозатратные виды физической активности, а также ингибируя термогенез в бурой жировой ткани. Этот гормон осуществляет свое действие путем активации AMPK, которая регулирует (через фосфорилирование) специфические ферменты в ключевых метаболических процессах (см. рис. 15-6). Принятые сокращения: PFK-2 — фосфофруктокиназа-2; GLUT1 и GLUT4 — переносчики глюкозы; FAS I — синтаза жирных кислот типа I; ACC — ацетил-CoA-карбоксилаза; HSL — гормончувствительная липаза; HMG-CoA-редуктаза — 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктаза; GPAT — глицерофосфат-ацилтрансфераза; GS — гликогенсинтетаза; eEF2 — эукариотический фактор элонгации 2 (необходим для синтеза белка, см. гл. 27); mTOR — мишень рапамицина у млекопитающих (протеинкиназа, регулирующая синтез белка в зависимости от доступности питательных веществ). Лекарственные препараты из группы тиазолидиндионов активируют фактор транскрипции PPARγ (см. рис. 23-41 и 23-42), который включает синтез адипонектина, опосредованно активируя AMPK. Физическая нагрузка (результат — превращение ATP в ADP и AMP) также стимулирует AMPK.

Путем фосфорилирования и инактивации ацетил-CoA-карбоксилазы AMPK ингибирует синтез жирных кислот, так как ослабляет (с помощью малонил-CoA) ингибирование β-окисления (см. рис. 17-12). Синтез холестерина также ингибируется при действии AMPK, которая фосфорилирует и инактивирует HMG-CoA-редуктазу — один из ферментов реакций биосинтеза холестерина (см. рис. 21-34). Кроме того, AMPK ингибирует синтазу жирных кислот и ацилтрансферазу, эффективно блокируя синтез триглицеринов.

Мыши с дефектным геном адипонектина менее чувствительны к инсулину, чем носители гена дикого типа, и они плохо переносят повышение уровня глюкозы. Эти нарушения метаболизма имеют симптомы, очень похожи на диабет II типа (когда нарушается **чувствительность к инсулину** — инсулин-независимый диабет, ИНЗД). При этом происходит также снижение уровня глюкозы крови, но только медленнее. Действительно, у людей с ожирением или у больных диабетом II типа уровень глюкозы крови ниже, чем у пациентов контрольной группы без ожирения. Более того, препараты группы тиазолидиндионов розглитазон (Avandia) и пиоглитазон (Actos), используемые при лечении диабета II типа (с. 470), повышают экспрессию мРНК адипонектина в жировой ткани и увеличивают уровни адипонектина у экспериментальных животных. Эти лекарства активируют также AMPK (рис. 23-40). (В 2007 г. была пересмотрена безопасность препарата Авандия в связи с повышенным риском инфаркта миокарда.) Вполне возможно, что адипонектин опосредует связи ожирения с диабетом II типа; ожирение — один из главных факторов риска развития диабета. ■

Экспрессия генов, играющих главную роль в поддержании массы тела, регулируется рационом питания

На изменения содержания липидов в диете реагирует семейство белков лиганд-активируемые факторы транскрипции, которые представлены **пероксисомными рецепторами, активируемыми пролифераторами** (англ. *peroxisome proliferator-activated receptors*, ***PPARs***). Они влияют на экспрессию генов, участвующих в метаболизме жиров и углеводов. Сначала была установлена роль этих факторов транскрипции при осуществлении синтезов в пероксисомах, соответственно этому они и были названы. Их обычными лигандами являются жирные кислоты или их производные, но они способны также связывать и синтетические агонисты. Эти факторы транскрипции можно активировать в лабораторных условиях с помощью генетических манипуляций. PPARα, PPARδ и PPARγ входят в суперсемейство ядерных рецепторов. Они действуют в ядре, формируя гетеродимеры с другим ядерным рецептором RXR (рецептор ретиноидов X), связанным с регуляторными областями ДНК, которые расположены вблизи контролируемых ими генов и изменяют скорость транскрипции этих генов (**рис. 23-41**).

Рецепторы **PPARγ** экспрессируются в основном в печени и жировой ткани и участвуют в регуляции генов, определяющих дифференцировку фибробластов в адипоциты, и генов, кодирующих белки, необходимые для синтеза и хранения липидов в адипоцитах (**рис. 23-42**). PPARγ активируются препаратами группы тиазолидиндионов, которые используются для лечения диабета II типа.

Рецепторы **PPARα** экспрессируются в печени, почках, сердце, скелетных мышцах и бурой жировой ткани. К лигандам, активирующим этот фактор транскрипции, относятся эйкозаноиды, свободные жирные кислоты, а также лекарственные препараты из группы фибратов, такие как фенофибрат (Трайкор) и ципрфибрат (Модалим), которые применяются при лечении ИБС с целью повышения уровня ЛПВП и снижения

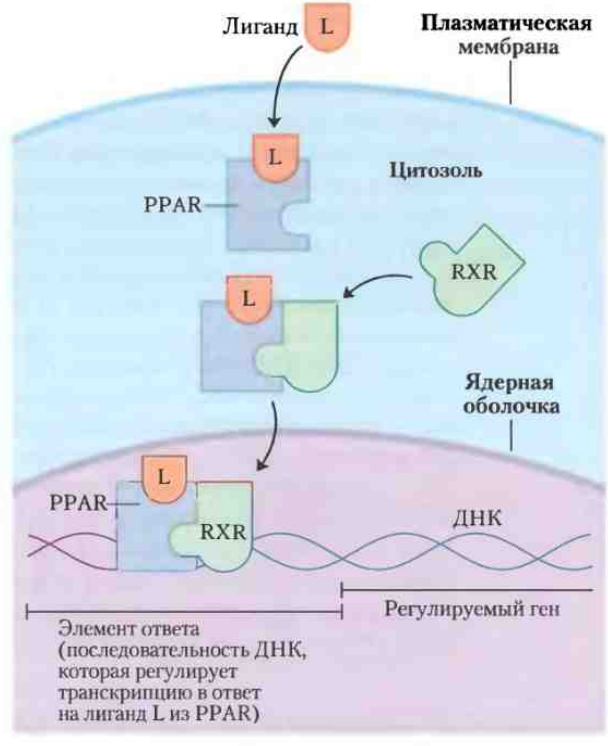


Рис. 23-41. Механизм действия PPAR. При связывании своих лигандов PPAR образуют гетеродимеры с ядерным рецептором RXR. Димер связывает специфические участки ДНК — элементы ответа, стимулируя транскрипцию генов в этих участках.

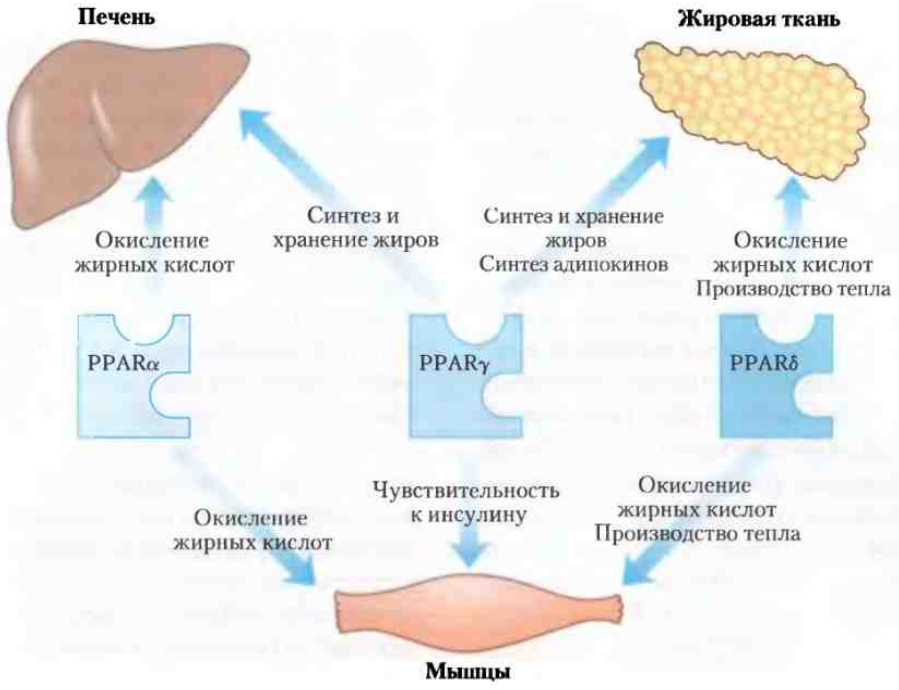


Рис. 23-42. Метаболическая функция изоформ PPAR. Три изоформы PPAR регулируют гомеостаз жиров и глюкозы путем координированного влияния на экспрессию генов в печени, мышцах и жировой ткани. Формы PPARα и PPARδ (и близкородственная им форма PPARβ) регулируют усвоение жиров; PPARγ регулирует запасание жиров и чувствительность различных тканей к инсулину.

уровня триглицеринов крови. В гепатоцитах PPARα включает гены, необходимые для усвоения питательных веществ и для β-окисления жирных кислот и образования кетоновых тел во время голодания.

Рецепторы **PPARδ** (и очень близкая к нему изоформа PPARβ) — ключевые регуляторы окисления липидов, изменяющие чувствительность тканей к количеству липидов в пище. Они действуют в печени и мышцах, стимулируя транскрипцию по крайней мере девяти генов, кодирующих ферменты β-окисления и высвобождения энергии посредством разобщения дыхательной цепи митохондрий. Если нормальных мышей перекормить большим количеством жиров, они набирают много бурого и белого жира, а накопление жиров в печени у них снижается. Но когда эти же эксперименты с перееданием проводят на мышах с постоянно активным вследствие генетических изменений PPARδ, такого накопления жиров не происходит. У мышей с дефектным лептиновым рецептором (*db/db*) активированный PPARδ предотвращает развитие ожирения, которое происходит, если PPARδ не активирован (рис. 23-34). Стимулируя распад жирных кислот в разобщенных дыхательных цепях митохондрий, PPARδ вызывает расщепление жиров, потерю веса и выделение тепла. С учетом вышесказанного можно сделать вывод, что выделение тепла в равной степени важно и для поддержания температуры тела, и для предупреждения ожирения. Несомненно, что при лечении ожирения рецепторы PPARδ вполне подходят как мишень для лекарственных средств.

Влияние грелина и PYY_{3-36} на кратковременное пищевое поведение

Грелин — это пептидный гормон (28 аминокислот), вырабатываемый клетками слизистой оболочки желудка. Первоначально он был обнаружен как стимулятор высвобождения гормона роста (*ghre*, праиндоевропейский корень 'grow'); впоследствии было показано, что он заметно повы-

шает аппетит и работает на более коротких промежутках времени, чем лептин и инсулин (между приемами пищи). Грелиновые рецепторы расположены в гипофизе (вероятно, они опосредуют высвобождение гормона роста) и в гипоталамусе (контроль аппетита), а также в сердечной мышце и в жировой ткани. Между приемами пищи концентрация грелина в крови значительно варьирует, достигая максимума перед приемом пищи и резко падая сразу после приема пищи (**рис. 23-43**). Инъекции грелина немедленно вызывают у человека чувство сильного голода. При синдроме Прадера–Вилли уровень грелина крови исключительно высокий, у больных неконтролируемый аппетит, что приводит к чрезвычайному ожирению и часто является причиной преждевременной смерти до 30 лет.

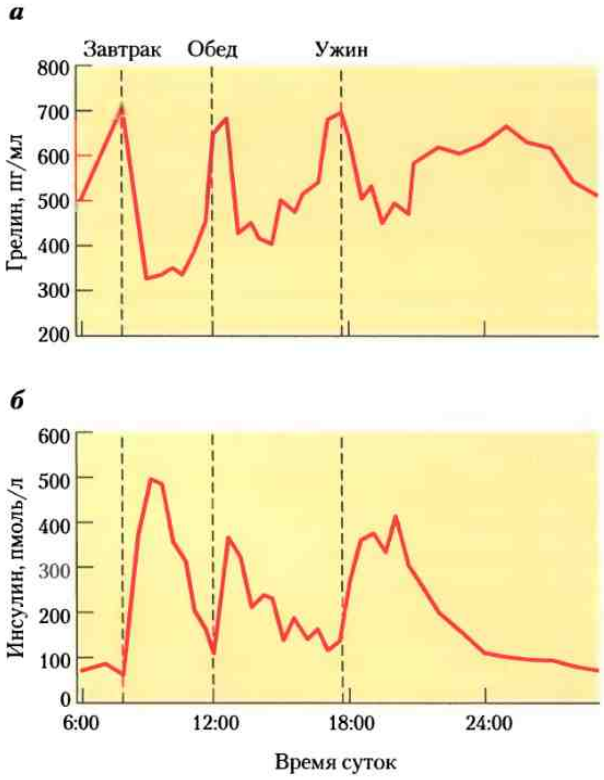


Рис. 23-43. Изменения в уровнях грелина и инсулина связаны с временем приема пищи. *а* — концентрация грелина в плазме резко увеличивается непосредственно перед привычным временем приема пищи (завтрак 7:00, обед 12:00, ужин 17:30) и резко падает сразу после приема пищи; при этом кажется, что чувство голода нарастает. *б* — концентрация инсулина увеличивается сразу после каждого приема пищи, это происходит в ответ на увеличение содержания глюкозы в крови.

PYY_{3-36} — это пептидный гормон (34 аминокислоты), секретируемый эндокринными клетками слизистой тонкого кишечника и прямой кишки в ответ на прохождение пищи из желудка. Уровень PYY_{3-36} в крови увеличивается после приема пищи и остается высоким в течение нескольких часов. С кровотоком PYY_{3-36} достигает аркуатного ядра, где воздействует на орексигенные нейроны, ингибируя высвобождение NPY и притупляя чувство голода (рис. 23-36). Люди, которым инъецировали PYY_{3-36}, ощущают голод очень слабо, они едят меньше нормы в течение примерно 12 ч после инъекции.

Итак, нейроэндокринная система контролирует потребление пищи и метаболизм, преимущественно обеспечивая защиту от истощения и сверхпродуктивного накопления жира (экстремальное ожирение). Характерные трудности, которые испытывают многие люди, старающиеся снизить вес, свидетельствуют о высокой эффективности этих видов контроля.

Краткое содержание раздела 23.4
ОЖИРЕНИЕ И РЕГУЛЯЦИЯ МАССЫ ТЕЛА

- Число людей, страдающих ожирением, непрерывно увеличивается, и это общая проблема развитых стран. Ожирение заметно снижает качество жизни и сопряжено с другими опасными заболеваниями.

- Жировая ткань вырабатывает лептин — гормон, регулирующий пищевое поведение и расходование энергии так, чтобы поддерживать адекватные запасы жира. Образование лептина и его высвобождение увеличиваются прямо пропорционально количеству и размерам адипоцитов (жировых клеток).

- Лептин действует на рецепторы в аркуатном ядре гипоталамуса, вызывая высвобождение анорексигенных пептидов, в том числе α-МСГ, который действует в мозге, подавляя аппетит. Лептин также стимулирует действие симпатической нервной системы на адипоциты, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования в митохондриях и последующему выделению тепла.

- Механизм передачи сигнала лептина связан с фосфорилированием системы JAK–STAT. При фосфорилировании с помощью JAK белки STAT могут связываться с регуляторными участками ядерной ДНК и изменять экспрессию генов ферментов, которые устанавливают уровень метаболической активности и пищевое поведение. Инсулин действует на рецепторы в аркуатном ядре с таким же результатом, как и лептин.

- Гормон адипонектин стимулирует поглощение жирных кислот и их окисление, а также ингибирование синтеза жирных кислот. Это осуществляется с помощью AMPK, которая активируется также при низкой концентрации AMP и при физических нагрузках.

- Гормон грелин вырабатывается в желудке, а действует на орексигенные нейроны в аркуатном ядре гипоталамуса, формируя чувство голода перед приемом пищи. Пептидный гормон кишечника PYY_{3-36} действует там же, но он подавляет чувство голода после приема пищи.

23.5. Ожирение, метаболический синдром и диабет II типа

В развитых странах, где потребляется избыточное количество пищевых продуктов, растет число людей с ожирением и связанным с ним диабетом II типа. От диабета (главным образом, II типа) в мире страдают от 150 до 170 млн человек. Согласно оценкам, число этих больных в 2010 г. может составить до 220 млн, а в 2030 г. – 360 млн. К патологическим последствиям диабета относятся сердечно-сосудистые заболевания, почечная недостаточность, слепота, ампутация конечностей в результате плохого заживления ран, а также нефропатия. В 2000 г. от диабета умерло 2,9 млн человек, и надо ожидать увеличение случаев летального исхода. В связи с этим понятно, почему так остро стоит проблема установления причин развития диабета II типа и его связей с ожирением; очень важно также разработать меры, позволяющие предотвратить или обратить последствия этого заболевания. ■

При диабете II типа потеряна чувствительность тканей к инсулину

При диабете II типа развивается устойчивость (резистентность) к инсулину; в этом состоянии для достижения того же биологического эффекта, который производит в норме определенное количество инсулина, требуется больше этого гормона. На ранних стадиях болезни β-клетки поджелудочной железы секретируют достаточные количества инсулина, так что снижение чувствительности печени и мышц к инсулину удается преодолеть. Однако с развитием заболевания β-клетки погибают, и недостаточность инсулина приводит к неспособности организма регулировать уровень глюкозы крови. Промежуточную стадию, предшествующую появлению сахарного диабета II типа, иногда называют **метаболическим синдромом**, или **синдромом X**. Типичные симптомы этого состояния – ожирение (особенно появление жировых отложений в области живота), гипертензия (повышенное кровяное давление), аномальное содержание липидов в крови (высокий уровень триацилглицеринов и ЛПНП и низкий уровень ЛПВП), немного завышенный уровень глюкозы крови и изменение динамики в тесте на толерантность к глюкозе. При метаболическом синдроме часто обнаруживается изменение белкового состава крови, ассоциированное с аномальным свертыванием (высокая концентрация фибриногена) или с воспалением (высокая концентрация С-реактивного белка, при воспалительном процессе этот показатель обычно повышается). В США около 27% взрослого населения имеют симптомы метаболического синдрома!

В соответствии с теорией «липидной нагрузки», объясняющей возникновение диабета II типа, в норме действие рецепторов PPARγ на адипоцитах поддерживает в клетках готовность синтезировать и накапливать триацилглицерины; такие адипоциты чувствительны к инсулину и синтезируют лептин, что приводит к постоянному накоплению триацилглицеринов внутри клетки. Однако у людей с ожирением адипоциты целиком заполнены триацилглицеринами, так что жировая ткань уже не может увеличить их накопление. Адипоциты и их предшественники (преадипоциты) становятся менее чувствительными к инсулину. При ожирении экспрессия генов (например, генов факторов транскрипции SREBP1 и PPARγ),

	Норма			Лишний вес		
	Жировая ткань	Печень	Мышечная ткань	Жировая ткань	Печень	Мышечная ткань
Экспрессия PPARγ	+++	+	+/–	+	+++	+++
Экспрессия SREBP1	+++	+	+/–	+/–	+++	+++
Способность синтезировать и запасать липиды	+++	+/–	+/–	+/–	+++	+++
Чувствительность к инсулину	+++	+++	+++	+	+	+

Рис. 23-44. Теория «липидной нагрузки» для описания развития сахарного диабета II типа. В норме адипоциты обладают резервной емкостью для запасания триацилглицеринов и поддерживаются в таком состоянии благодаря экспрессии фактора транскрипции PPARγ. При ожирении способность жировой ткани запасать триацилглицерины исчерпана. Активность аппарата, синтезирующего липиды и поддерживаемого SREBP1, ослабевает по мере снижения экспрессии этого фактора транскрипции в адипоцитах и повышения его экспрессии в печени и мышцах. В результате именно в этих двух тканях начинают накапливаться триацилглицерины. Некоторые люди неплохо переносят такое аномальное накопление жиров, а другие хуже. Если эктопические запасы жиров, которые как раз и приводят к диабету II типа, связаны с генетическими особенностями, то организм может лучше справляться с патологическими последствиями этой болезни.

в норме связанных с развитием новых адипоцитов, *снижается* в адипоцитах, но *повышается* в других тканях, включая скелетные мышцы и печень, в которых начинают запасаться триацилглицерины (**рис. 23-44**). Значительное количество триацилглицеринов запасается «эктопически», т. е. в необычных местах. Более того, в соответствии с данной теорией, избыток запасенных жирных кислот и триацилглицеринов оказывает токсическое действие на печень и мышцы. Некоторые люди генетически хуже подготовлены к такой «ноше» аномально локализованных липидов, и их клетки сильнее подвержены повреждениям, которые в итоге приводят к диабету II типа. Возможно, устойчивость к инсулину развивается в результате нарушения нескольких механизмов, с помощью которых инсулин должен выполнять свою метаболическую функцию: изменение количества этого белка, изменение активности сигнальных ферментов и факторов транскрипции. Например, синтез адипонектина в адипоцитах, а также его содержание в крови снижаются при ожирении и повышаются при снижении массы тела.

Типичный признак ожирения — хроническое воспаление жировой ткани. Происходит повышение экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, и усиление активности макрофагов, поэтому при ожирении в жировой ткани часто обнаруживают макрофаги. Кроме того, в нагруженных жирами адипоцитах происходит липоапоптоз — программированная клеточная смерть, вызванная аномально высокой концентрацией жиров.

Известно, что некоторые лекарственные препараты, назначаемые при диабете II типа, повышают чувствительность к инсулину, действуя на специфические белки сигнальных путей, и эффект от приема этих веществ согласуется с концепцией липотоксичности. Тиазолидиндионы связываются с рецепторами PPARγ, ассоциированными со специфическими генами адипоцитов и дифференцировкой преадипоцитов в мелкие адипоциты, что повышает всасывание жирных кислот из пищи и увеличивает их запасание в виде триацилглицеринов.

Очевидно, что существуют генетические факторы, предрасполагающие к развитию диабета II типа. Хотя 80% людей с диабетом II типа тучные, далеко не у всех тучных людей развивается диабет. Учитывая сложные регуляторные механизмы, которые мы обсуждали в данной главе, не вызывает удивления тот факт, что генетические закономерности возникновения диабета сложные и включают в себя взаимодействия

между разнообразными генами, а также факторы окружающей среды, такие как питание и образ жизни. Развитие диабета II типа ассоциируется с не менее чем 10 генными локусами; вариации некоторых из этих «диабетогенных» генов лишь незначительно повышают вероятность развития диабета II типа. Например, у людей с вариантом рецептора PPARγ, в котором остаток Ala в положении 12 заменен остатком Pro, несколько повышен риск развития диабета II типа. ■

Помочь больным диабетом II типа могут диета, физическая нагрузка и лекарственная терапия

Исследования показывают, что поддержание здоровья больных диабетом II типа зависит от трех факторов: строгая диета, регулярные физические упражнения и прием лекарств, повышающих чувствительность тканей к инсулину или выработку инсулина. Соблюдение диеты (снижение массы тела обязательно!) уменьшает общую нагрузку по жирным кислотам. Жировой состав принимаемой пищи через PPAR и другие факторы транскрипции влияет на экспрессию генов, кодирующих белки, которые участвуют в окислении жирных кислот и расходовании энергии в процессе термогенеза. Физическая нагрузка активирует AMPK, подобно адипонектину; AMPK сдвигает метаболизм в сторону окисления жирных кислот и ингибирует синтез жиров.

Для лечения диабета II типа используют лекарственные препараты нескольких групп; некоторые из этих препаратов обсуждались выше (см. табл. 23-7). Бигуаниды, такие как метформин (Глюкофаж), активируют AMPK, имитируя действие адипонектина. Тиазолидиндионы действуют через факторы транскрипции PPAR, повышая концентрацию адипонектина в плазме крови и стимулируя дифференцировку адипоцитов, что позволяет клеткам накапливать больше триацилглицеринов. Препараты из группы сульфонилмочевины действуют на ATP-зависимые калиевые каналы в β-клетках, стимулируя высвобождение инсулина. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) предотвращают протеолитическое расщепление глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) — пептидного гормона, синтезируемого в кишечнике и стимулирующего секрецию инсулина поджелудочной железой. Ингибирование

Таблица 23-7 Лечение сахарного диабета II типа

Лечение	Непосредственная мишень	Лечебный эффект
Снижение массы тела	Жировая ткань; снижение уровня триацилглицеринов	Снижение липидной нагрузки; увеличение способности жировой ткани к запасанию липиды; восстановление чувствительности к инсулину
Физическая нагрузка	AMPK, активация увеличением [AMP]/[ATP]	См. рис. 23-40; способствует снижению массы тела
Производные сульфонилмочевины: глипизид (Глюкотрол), глибурид (различные торговые названия), глимепирид (Амарил)	β-Клетки поджелудочной железы; блокирование K^+-каналов	Стимуляция секреции инсулина поджелудочной железой
Бигуаниды: метформин (Глюкофаж)	AMPK, активация	Усиление захвата глюкозы мышцами; ослабление синтеза глюкозы в печени
Тиазолидиндионы: троглитазон (Резулин)*, росиглитазон (Авандия)**, пиоглитазон (Актос)	PPARγ	Стимуляция экспрессии генов, усиливающих действие инсулина в печени, мышцах, жировой ткани; повышение расхода глюкозы; ослабление синтеза глюкозы в печени
Модуляторы ГПП-1: экзенатид (Баета), ситаглиптин (Янувия)	Глюкагоноподобный пептид-1, дипептидилпептидаза-4	Усиление секреции инсулина поджелудочной железой

* Снят с производства из-за побочного действия.

** Выявлено побочное действие и применение пересматривается.

ДПП-1 продлевает время действия ГПП-1, эффективно повышая секрецию инсулина.

Понятно, что снижение массы тела в сочетании с физической нагрузкой — предпочтительный вариант лечения для *предотвращения* развития метаболического синдрома и диабета II типа. В недавних исследованиях была обнаружена интересная возможность, помогающая снизить массу тела и уменьшить количество триацилглицеринов, которое клетки могли бы запасать. Белок PRDM16 активно экспрессируется в клетках бурой жировой ткани и только в них. Точная функция белка неизвестна, однако известно, что в последовательности этого белка есть мотив «цинкового пальца», который часто встречается в белках, взаимодействующих с ДНК и влияющих на транскрипцию (см. рис. 28-12 в т. 3). Повышение экспрессии PRDM16 в жировой ткани мыши стимулирует дифференцировку преадипоцитов в белой жировой ткани в *бурые* адипоциты, для которых характерен высокий уровень термогенина и разобщенное дыхание. Такие клетки, в принципе, могут поглощать больше жирных кислот, чем нужно для образования АТР, превращая энергию окисления в тепло. С учетом того, что число больных диабетом II типа увеличивается во всех странах, наиболее востребованы сейчас исследования, направленные на предотвращение этого заболевания или его последствий. ■

Краткое содержание раздела 23.5
ОЖИРЕНИЕ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ И ДИАБЕТ II ТИПА

- Метаболический синдром, симптомами которого являются ожирение, гипертензия, повышенный уровень липидов крови и устойчивость тканей к инсулину, часто развивается в диабет II типа.

- Устойчивость тканей к инсулину, характеризующая диабет II типа, может быть следствием аномального запасания жиров в мышцах и печени, поскольку жировая ткань не справляется с накоплением поступающего в организм количества жиров.

- Экспрессия ферментов, участвующих в синтезе жиров, находится под строгим и сложным контролем. Факторы транскрипции генов PPAR определяют скорость синтеза многих ферментов, задействованных в метаболизме жиров и дифференцировке адипоцитов.

- Эффективное лечение диабета II типа должно быть комплексным и включать в себя физические упражнения, правильную диету и прием лекарств, повышающих чувствительность тканей к инсулину или увеличивающих выработку инсулина.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

AMP-зависимая протеинкиназа (AMPK) 609
PPAR (пероксисомный рецептор, активируемый пролифераторами) 612
PYY_{3-36} 614
STAT (передатчик сигнала и активатор транскрипции) 608
α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ) 608
адипокины 605
адипоцит 585
адреналин 574
анализ Скэтчарда 570
анорексигенный нейрон 608
АТР-зависимые K^+-каналы 597
аутокринные гормоны 571
ацидоз 604
белая жировая ткань 585
белки плазмы 592
бурая жировая ткань 586
гепатоцит 599
гипоталамус 577
глюкозурия 603
гормон витамина D 575
грелин 613
диабет I типа 603
диабет II типа 603
задняя доля гипофиза 577
инсулин 572
катехоламины 574
кетоацидоз 604
кетоз 603
кортизол 602
лейкоцит 592
лептин 605
лимфоцит 592
метаболический синдром 615
миоцит 587
монооксид азота (NO) 576
нейропептид Y (NPY) 607
нейроэндокринная система 566
норадреналин 574
ожирение 604
орексигенный нейрон 607
паракринные гормоны 571
передняя доля гипофиза 577
плазма крови 592
радиоиммунный анализ (РИА) 569
ретиноидные гормоны 575
рецептор лептина 606
сахарный диабет 603
синтаза NO 576
стероидные гормоны 574
термогенез 586
термогенин (разобщающий белок) 586
тест на толерантность к глюкозе 604
тиреоидные гормоны 575
тромбоцит 592
тропины 577
тропные гормоны 577
эйкозаноидные гормоны 574
эндокринные гормоны 571
эритроцит 591
янус-киназа (JAK) 608

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература и история вопроса

Chew, S. L. & Leslie, D. (2006) *Clinical Endocrinology and Diabetes: An Illustrated Colour Text*, Churchill Livingstone, Edinburgh.

Litwack, G. & Schmidt, T. J. (2006) Biochemistry of hormones. In *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th edn (Devlin, T.M., ed.), pp. 891–948, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Melmed, S. & Conn, P. M. (eds). (2005) *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*, 2nd edn, Humana Press, Totowa, NJ.

Yalow R. S. (1978) Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biological systems. *Science* **200**, 1236–1245.

История развития радиоиммунного анализа; нобелевская лекция.

Тканеспецифичный метаболизм

Avram, A. S., Avram, M. M., & James, W. D. (2005) Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. J. *Am. Acad. Dermatol.* **53**, 671–683.

Cannon, B. & Nedergaard, K. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359.

Elia, M. (1995) General integration and regulation of metabolism at the organ level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 213–234.

Randle, P. J. (1995) Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *Proc. Nutr. Soc.* **54**, 317–327.

Гормональная регуляция энергетического метаболизма

Ashcroft, F. M. (2005) ATP-sensitive potassium channelopathies: focus on insulin secretion. *J. Clin. Invest.* **115**, 2047–2058.

Attie, A. D. & Raines, R. T. (1995) Analysis of receptor-ligand in actions. *J. Chem. Educ.* **72**, 119–123.

Cahill, G. F., Jr. (2006) Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* **26**, 1–22.

Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* **86**, 465–514.

Feige, J. N. & Auwerx, J. (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol.* **17**, 292–301.

Hardie, D. G. & Sakamoto, K. (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology* **21**, 48–60.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K. (2006) Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 1784–1792.

Kola, B., Boscaro, M., Rutter, G.A., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2006) Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 205–215.

Kraemer, D. K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P. M., & Krook, A. (2007) Role of AMP kinase and PPARδ in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **282**, 19 313–19 320.

Nichols, C. G. (2006) K_{ATP} channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature* **440**, 470–476.

Steinberg, G. R. & Kemp, B. E. (2007) Adiponectin: starving for attention. *Cell Metab.* **6**, 3–4.

Контроль массы тела

Ahima, R. S. (2005) Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 307–313.

Снижение количества лептина как важный сигнал переключения метаболизма с режима накопления на режим траты.

Ahima, R. S. (2006) Ghrelin — a new player in glucose homeostasis? *Cell Metab.* **3**, 301–307.

Biddinger, S. B. & Kahn, C. R. (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 123–158.

Обзор разобщающих белков — строение, работа и роль.

Friedman, J. M. (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr. Rev.* **60**, S1–S14.

Обзор всех аспектов лептиновой системы.

Jequier, E. & Tappy, L. (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* **79**, 451–480.

Детальный обзор роли лептина в регуляции веса тела; контроль приема пищи и роль тканей белого и бурого жира в расходовании энергии.

Marx, J. (2003) Cellular warriors at the battle of the bulge. *Science* **299**, 846–849.

Краткий обзор биохимических механизмов контроля веса. Предисловия к статьям по ожирению в том же выпуске *Science*.

Ожирение, метаболический синдром и диабет II типа

Barish, G. D., Narkar, V. A., & Evans, R. M. (2006) PPARδ: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **116**, 590–597.

Clee, S. M. & Attie, A. D. (2007) The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrinol. Rev.* **28**, 48–83.

Hofbauer, K. G., Nicholson, J. R., & Boss, O. (2007) The obesity epidemic: current and future pharmacological treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 565–592.

Kasuga, M. (2006) Insulin resistance and pancreatic β cell failure. *J. Clin. Invest.* **116**, 1756–1760.

Предисловия к обзорам по диабету II типа в этом номере журнала.

Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., & Fasshauer, M. (2006) Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 26–32.

Обзор среднего уровня сложности.

Muoio, D. M. & Newgard, C. B. (2006) Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 367–401.

Nadler, S. T. & Attie, A. D. (2001) Please pass the chips: genomic insights into obesity and diabetes. *J. Nutr.* **131**, 2078–2081.

Четкие подтверждения гипотезы «липидной нагрузки» в развитии диабета II типа.

Powell, K. (2007) The two faces of fat. *Nature* **447**, 525–527.

Сигналы от клеток жировой ткани напрямую стимулируют нечувствительность к инсулину и запускают развитие воспаления, которые могут стать причиной диабета II типа и сердечно-сосудистых заболеваний, а также повышать риск возникновения опухолей и других связанных с ожирением проблем.

Qatanani, M. & Lazar, M. A. (2007) Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* **21**, 1443–1455.

Savage, D. B., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2007) Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520.

Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burtt, N. P., de Bakker, P. I. W., Chen, H., Roix, J. J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J. N., Daly, M. J., et al. (2007) Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* **316**, 1331–1336.

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., & Spiegelman, B. M. (2007) Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6**, 38–54.

Усиленная экспрессия PRDM16 приводит к образованию бурой жировой ткани.

Semple, R. K., Chatterjee, V. K. K., & O'Rahilly, S. (2006) PPARδ and human metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 581–589.

Sharma, A. M. & Staels, B. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor γ and adipose tissue – understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 386–395.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., & Chen, H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **11**, 1821–1830.

Вопросы и задачи

1. Активность пептидных гормонов. Объясните, почему два таких похожих по структуре пептидных гормона, как окситоцин и вазопрессин, оказывают в организме столь разное действие (см. рис. 23-10).

2. ATP и фосфокреатин – источники энергии для мышц. Во время мышечного сокращения концентрация фосфокреатина в скелетных мышцах падает, а концентрация ATP остается довольно постоянной. Однако в классическом эксперименте Роберт Дэвис показал, что обработка мышцы 1-фтор-2,4-динитробензолом (с. 144, 145 в т. 1) вызывает быстрое снижение концентрации ATP, а уровень фосфокреатина не изменяется во время серии сокращений. Предложите объяснение.

3. Метаболизм глутамата в мозге. Ткани мозга поглощают глутамат из крови, преобразуют его в глутамин и выделяют в кровь. Что достигается этим метаболическим обменом? Как он происходит? Количество глутамина, вырабатываемого в мозге, может существенно превышать количество глутамата, приходящего из крови. Как происходит такое значительное увеличение количества глутамина? *Подсказка.* Обратитесь к обзору катаболизма аминокислот в гл. 18; помните, что NH_4^+ очень токсичен для мозга.

4. Белки в качестве топливных молекул при голодании. При голодании происходит катаболизм белков скелетных мышц. Какова судьба образующихся при этом аминокислот?

5. Отсутствие глицеринкиназы в жировой ткани. Для биосинтеза триацилглицеринов необходим глицерин-3-фосфат. Жировые клетки, специализированные для синтеза и распада триацилглицеринов, не могут использовать глицерин, потому что в них отсутствует глицеринкиназа, которая катализирует реакцию:

$$\text{Глицерин} + \text{ATP} \rightarrow \text{глицерин-3-фосфат} + \text{ADP}$$

Как в таком случае жировая ткань получает глицерин-3-фосфат, необходимый для синтеза триацилглицеринов?

6. Потребление кислорода во время физической нагрузки. Сидящий взрослый потребляет ~0,05 л O_2 за 10 с. Спринтер на дистанции 100 м потребляет 1 л O_2 за 10 с. После пробега спринтер продолжает дышать с повышенной (но снижающейся) частотой в течение нескольких минут, потребляя на 4 л O_2 больше, чем сидящий человек.

а) Почему потребление O_2 значительно возрастает при беге?

б) Почему потребность в O_2 остается высокой после завершения пробежки?

7. Дефицит тиамина и работа мозга. При дефиците тиамина у разных людей проявляются сходные неврологические признаки и характерные симптомы, включая потерю рефлексов, повышенную тревожность и провалы в памяти. Почему дефицит тиамина может приводить к изменениям работы мозга?

8. Возможности гормонов. В норме мозговое вещество надпочечников секретирует адреналин ($C_9H_{13}NO_3$) с такой скоростью, которая обеспечивает поддержание в кровотоке концентрации адреналина 10^{-10} М. Чтобы вы представляли, что значит эта концентрация, рассчитайте диаметр круглого плавательного бассейна с глубиной воды 2,0 м, который необходим для растворения 1,0 г (около 1 чайной ложки) адреналина с получением концентрации, равной концентрации адреналина в крови.

9. Регуляция уровней гормонов крови. Время полужизни большинства гормонов крови относительно короткое. Например, когда животному инъецируют радиоактивно меченный инсулин, половина введенного количества исчезает из крови в течение 30 мин.

а) Зачем нужна относительно быстрая инактивация циркулирующих гормонов?

б) Как при такой быстрой инактивации поддерживается в норме постоянный уровень циркулирующих гормонов?

в) Какими путями организм обеспечивает быстрые изменения в уровне циркулирующих гормонов?

10. Сравнение водорастворимых и жирорастворимых гормонов. По физиологическим свойствам гормоны можно разделить на два типа: 1) хорошо растворимые в воде и нерастворимые в жирах (например, адреналин); 2) плохо растворимые в воде, но хорошо растворимые в жирах (например, стероидные гормоны). Большинство водорастворимых гормонов регулируют клеточную активность, не проникая в клетку-мишень. Липофильные (жирорастворимые) гормоны, напротив, могут проникать в свои клетки-мишени и действовать в ядре. Какова взаимосвязь между растворимостью, локализацией рецепторов и механизмом действия этих двух типов гормонов?

11. Метаболические различия между мышцами и печенью в ситуации «борьба–бегство». В этой ситуации выделение адреналина вызывает расщепление гликогена в печени, сердце и в скелетных мышцах. Конечный продукт распада гликогена в печени — глюкоза; в скелетных мышцах — пируват.

а) Какова причина образования разных продуктов расщепления гликогена в этих двух тканях?

б) В чем заключается польза для организма, который должен бороться или убегать, в этих двух специфических путях распада гликогена?

12. Секреция избытка инсулина: гиперинсулинизм. При некоторых злокачественных опухолях поджелудочной железы β-клетки вырабатывают избыточные количества инсулина. При такой патологии наблюдается тремор и дрожь, слабость и утомляемость, потливость и повышенное чувство голода.

а) Как действует гиперинсулинизм на метаболизм углеводов, аминокислот и липидов в печени?

б) Что вызывает наблюдаемые симптомы? Предположите, почему такие нарушения, если они продолжительны, ведут к повреждениям мозга.

13. Выделение тепла, вызванное гормонами щитовидной железы. Гормоны щитовидной железы тесно связаны с регуляцией общей скорости метаболизма. При избытке тироксина в ткани печени животных происходит увеличение скорости потребления O_2 и увеличение отдачи тепла (термогенез), однако концентрация ATP в тканях остается нормальной. Было предложено несколько объяснений термогенного эффекта тироксина. Есть мнение, что избыток тироксина вызывает разобщение окислительного фосфори-

лирования в митохондриях. Как это согласуется с экспериментальными наблюдениями? Однако по другой гипотезе, при стимуляции тироксином термогенез в тканях происходит благодаря увеличению скорости потребления АТР. Приемлемо ли такое объяснение? Почему?

14. Функция прогормонов. Каково возможное преимущество синтеза гормонов в виде прогормонов?

15. Источник глюкозы при голодании. Взрослый человек в среднем использует 160 г глюкозы в сутки, из которых 120 г потребляет мозг. Запаса глюкозы в организме (в кровотоке циркулирует ~20 г глюкозы и ~190 г гликогена) достаточно примерно на 1 сут. Как организм получит глюкозу после истощения запасов во время голодания?

16. Парабиотические мыши с генотипом *ob/ob*. С помощью тонких хирургических операций исследователи смогли соединить кровеносные системы двух мышей так, что их кровь циркулировала через тела обоих животных. У таких парабиотических мышей вещества, выделенные в кровь одним животным, попадали и к другому животному через общую систему кровообращения. Оба животных ели независимо друг от друга. Что должно случиться с массой каждой мыши, если сделать парабиотическими две мыши: мышь с генотипом *ob/ob* (обе копии гена *OB* дефектны) и нормальную мышь с генотипом *OB/OB* (две активные копии гена *OB*)?

17. Расчет индекса массы тела. Тучный профессор биохимии весит 260 фунтов (118 кг) при росте 5 футов и 8 дюймов (173 см). Каков его индекс массы тела? На сколько килограммов ему следует похудеть, чтобы его индекс массы тела пришел в норму (25 и ниже)?

18. Секреция инсулина. Предскажите изменения секреции инсулина β-клетками поджелудочной железы при воздействии калиевой соли ионофора валиномицина. Объясните свои рассуждения.

19. Отсутствие рецептора инсулина. Выяснилось, что у чистой линии мышей, у которых искусственно удалены инсулиновые рецепторы гепатоцитов, при голодании наблюдается повышение содержания глюкозы в крови (уровень глюкозы крови 132 мг/дл по сравнению с 101 мг/дл в контрольной группе) и выраженная гипергликемия при нормальном питании. У таких мышей повышен уровень глюкозо-6-фосфата в клетках печени и уровень инсулина крови. Объясните эти наблюдения.

20. Безопасность лекарственных препаратов. Лекарственный препарат росиглитазон (Авандия) эффективно снижает уровень глюкозы крови при диабете II типа. Однако выяснилось, что прием этого препарата сопряжен с повышенным риском инфаркта миокарда. Если бы вам предстояло сделать выбор — продолжить выпуск препарата (указав в его описании возможность нежелательного побочного действия) или снять его с производства — какими бы критериями вы пользовались при принятии решения?

21. Действие лекарств, направленных на лечение диабета II типа. Препараты акарбоза (Прекоза) и миглитол (Глисет), используемые для лечения сахарного диабета II типа, ингибируют α-глюкозидазы в щеточной каемке тонкой кишки. Эти ферменты расщепляют олигосахариды, образующиеся из гликогена или крахмала, на отдельные моносахариды. Объясните механизм лечебного эффекта этих препаратов на больных диабетом. Каким побочным действием (если такое имеется) мог бы сопровождаться прием этих препаратов? Почему? *Подсказка.* Обратитесь к материалу по непереносимости лактозы, с. 88.

Анализ экспериментальных данных

22. Клонирование рецептора сульфонилмочевины из β-клеток поджелудочной железы. Глибурид, препарат из группы производных сульфонилмочевины, описанных на с. 599, используется для лечения диабета II типа. Он связывается с АТР-зависимыми калиевыми каналами (см. рис. 23-28 и 23-29) и блокирует их работу.

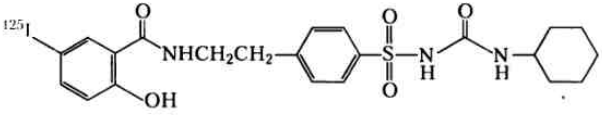
а) Учитывая механизм, изображенный на рис. 23-28, предскажите, приведет ли прием глибурида к повышению или к понижению секреции инсулина β-клетками поджелудочной железы. Объясните свои рассуждения.

б) Как глибурид помогает ослабить симптомы диабета II типа?

в) Как вы считаете, поможет ли глибурид в лечении диабета I типа? Объясните свои рассуждения.

Агиляр-Брайан с соавторами (1995) клонировали ген рецептора сульфонилмочевины (SUR) из ATP-зависимого калиевого канала клеток хомячка. Ученым пришлось провести множество исследований, чтобы убедиться в том, что клонированный ген действительно кодировал SUR. Здесь мы опишем путь, который пришлось им проделать, чтобы показать, что они клонировали именно этот ген, а не какой-либо другой.

Первым этапом было получение чистого белка SUR. Уже было известно, что такие препараты, как глибурид, связываются с SUR с очень высоким сродством (K_d<10 нМ), и что белок SUR имеет молекулярную массу от 140 до 170 кДа. Агиляр-Брайан с соавторами использовали высокое сродство связывания с глибуридом, чтобы ввести в белок SUR радиоактивную метку, которая служила бы маркером при выделении белка из клеточного экстракта. Они синтезировали меченное радиоактивной меткой производное глибурида, используя радиоактивный иод (^{125}I):



[^{125}I]5-Иод-2-гидроксиглибурид

г) В ранних исследованиях было показано, что у меченного радиоактивным иодом производного глибурида (далее будем обозначать его [^{125}I]глибурид) то же значение константы K_d и те же характеристики связывания, что и у обычного глибурида. Зачем нужно было это подтверждать? (Какие альтернативные возможности были при этом исключены?)

Даже при высоком сродстве связывания [^{125}I]глибурида с SUR следовало учитывать, что значительная часть меченого препарата может отщепляться от белка SUR в процессе выделения. Чтобы предотвратить эту возможность, следовало присоединить [^{125}I]глибурид к белку ковалентной связью. Существует множество методов получения ковалентных поперечных сшивок; Агиляр-Брайан с соавторами выбрали метод, заключающийся в обработке ультрафиолетовым светом. При обработке ароматических соединений коротковолновым ультрафиолетовым излучением происходит их переход в возбужденное состояние, в результате чего они легко образуют ковалентные связи с соседними молекулами. Ковалентное присоединение радиоактивного глибурида к белку SUR позволило исследователям следить за присутствием этого белка в процессе очистки по наличию радиоактивности ^{125}I.

Агиляр-Брайан с соавторами обработали HIT-клетки хомячка (в которых экспрессируется SUR) меченым глибуридом, подействовали УФ-излучением, выделили ^{125}I-меченый белок с молекулярной массой 140 кДа и определили последовательность 25 аминокислотных остатков на его N-конце. Последовательность оказалась следующей: PLAFCGTENHSAAYRVDQGVLNNGC. Далее были получены антитела, которые связывались с двумя короткими участками из этой последовательности: одни — с последовательностью PLAFCGTE, а другие — с последовательностью HSAAYRVDQGV. Наконец, было показано, что оба типа антител связываются с очищенным ^{125}I-меченым белком, имеющим молекулярную массу 140 кДа.

д) Зачем нужно было проверять связывание белка с антителами?

Далее исследователи синтезировали праймеры для ПЦР, основываясь на приведенной выше последовательности, и клонировали из кДНК-библиотеки ген хомячка, кодирующий белок, содержащий данную последовательность (соответствующие методы биотехнологии описаны в гл. 9, т. 1). Предполагаемую клонированную последовательность кДНК гена *SUR* гибридизовали с мРНК подходящей длины из клеток, в которых содержался белок SUR. Предполагаемая кДНК *SUR* не гибридизовалась ни с какой фракцией мРНК из гепатоцитов, в которых белок SUR не экспрессировался.

е) Зачем нужно было проводить анализ гибридизации предполагаемой кДНК *SUR* с мРНК?

Наконец, клонированный ген встраивали и экспрессировали в клетках COS, которые в норме не экспрессируют ген *SUR*. Клетки смешивали с [^{125}I]глибуридом в присутствии избытка не-

меченого глибурида и без него, воздействовали УФ-излучением и измеряли радиоактивность образовавшегося белка, имеющего молекулярную массу 140 кДа. Результаты эксперимента представлены в таблице.

Эксперимент	Тип клеток	Добавили кДНК предполагаемого SUR?	Добавили избыток немеченого глибурида?	Метка ^{125}I в белке с M_r 140 кДа
1	HIT	Нет	Нет	+++
2	HIT	Нет	Да	–
3	COS	Нет	Нет	–
4	COS	Да	Нет	+++
5	COS	Да	Да	–

ж) Почему в эксперименте 2 не было обнаружено меченого белка с молекулярной массой 140 кДа?

з) Как на основании данных таблицы показать, что выделенная кДНК кодирует белок SUR?

и) Какая дополнительная информация нужна для получения полной уверенности в том, что клонирован именно ген *SUR*?

Литература

Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P. IV, Boyd, A. E. III, González, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., & Nelson, D. A. (1995) Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423–426.

II БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

13 Основы биоэнергетики. Типы химических реакций 11

13.1. Биоэнергетика и термодинамика 12
Преобразования энергии в биологических системах подчиняются законам термодинамики 12
Клеткам необходимы источники свободной энергии 14
Изменение стандартной свободной энергии непосредственно связано с константой равновесия 14
Изменения свободной энергии в реальных системах зависят от концентраций исходных веществ и продуктов реакции 17
Изменения стандартной свободной энергии аддитивны 18
Краткое содержание 19

13.2. Химические основы биохимических реакций 20
Биохимические и химические уравнения вовсе не одно и то же 27
Краткое содержание 28

13.3. Перенос фосфатных групп и ATP 28
При гидролизе ATP изменение свободной энергии выражается отрицательным числом, большим по абсолютной величине 29
Свободная энергия других фосфорилированных соединений и тиоэфиров тоже велика 32
ATP поставляет энергию благодаря переносу групп, а не просто гидролиза 35
ATP отдает фосфорильную, пирофосфорильную и аденильную группы 37
Дополнение 13-1. ATP поставляет энергию для светляков 39
Для сборки информационных макромолекул необходима энергия 40
ATP обеспечивает энергию для активного транспорта и для сокращения мышц 40
Во всех типах клеток происходит трансфосфорилирование между нуклеотидами 40
Неорганические полифосфаты — потенциальные доноры фосфорильных групп 42
Краткое содержание 43

13.4. Окислительно-восстановительные реакции в биологических системах 43
Поток электронов может выполнять биологическую работу 43
Окислительно-восстановительные процессы можно представить в виде полуреакций 44
Биологические процессы окисления часто включают и дегидрирование 45
Восстановительный потенциал — мера сродства к электронам 47
Стандартные восстановительные потенциалы можно использовать для расчета изменений свободной энергии 48
Для окисления глюкозы до углекислого газа в клетках необходимы специальные переносчики электронов 49
Некоторые коферменты и белки служат универсальными переносчиками электронов 49
NADH и NADPH действуют совместно с дегидрогеназами — растворимыми переносчиками электронов 50
Дефицит в пище ниацина, витаминной формы NAD и NADP, вызывает пеллагру 53
Флавиннуклеотиды прочно связываются с флавопротеинами 54
Краткое содержание 55
Ключевые термины 56
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 56
Вопросы и задачи 58
Анализ экспериментальных данных 63

14 Гликолиз, глюконеогенез и пентозофосфатный путь 65

14.1. Гликолиз 66
Гликолиз протекает в две стадии 67
На подготовительной стадии гликолиза расходуется ATP 71
На второй стадии гликолиза образуются ATP и NADH 75
Выигрыш в ATP заметен при составлении полного баланса гликолиза 80
Гликолиз находится под строгим контролем 80
Дополнение 14-1. *Медицина*. Высокая скорость гликолиза в опухолевых тканях лежит в основе методов химиотерапии при некоторых онкологических заболеваниях и облегчает постановку диагноза 81
Нарушение потребления глюкозы клетками при сахарном диабете I типа 85
Краткое содержание 85

14.2. Метаболические пути, питающие гликолиз 86
Полисахариды и дисахариды пищи разлагаются до моносахаридов 86
Эндогенные гликоген и крахмал разлагаются в результате фосфоролиза 87
Другие моносахариды включаются в гликолиз на разных участках пути 88
Краткое содержание 90

14.3. Превращение пирувата в анаэробных условиях: брожение 90
Пируват является последним акцептором электронов при молочнокислом брожении 91
Дополнение 14-2. Спортсмены, аллигаторы и целаканты: гликолиз при пониженном содержании кислорода 92
Этанол — восстановленный продукт спиртового брожения 93
Тиаминпирофосфат переносит «активные» ацетальдегидные группы 93
Дополнение 14-3. Спиртовое брожение: пивоварение и производство биотоплива 94
С помощью брожения получают многие продукты питания и химические реагенты 96
Краткое содержание 97

14.4. Глюконеогенез 97
Превращение пирувата в фосфоенолпируват протекает в две экзергонические стадии 100
Второй обходной путь — превращение фруктозо-1,6-бисфосфата в фруктозо-6-фосфат 103
Третий обходной путь — образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата 103
Глюконеогенез необходим, но сопряжен с большими энергетическими затратами 103
Интермедиаты цикла лимонной кислоты и некоторые аминокислоты являются глюкогенными 104
Млекопитающие не могут превращать жирные кислоты в глюкозу 105
Гликолиз и глюконеогенез взаимно регулируются 105
Дополнение 14-4. *Медицина*. Почему пифагорейцы не ели фалафель: дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 106
Краткое содержание 106

14.5. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы 107
На окислительном этапе образуются пентозофосфаты и NADPH 109
На неокислительном этапе пентозофосфаты превращаются в глюкозо-6-фосфат 109
Синдром Вернике–Корсакова усугубляется дефектом транскетолазы 112
Глюкозо-6-фосфат распределяется между гликолизом и пентозофосфатным путем 112
Краткое содержание 113
Ключевые термины 113
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 113
Вопросы и задачи 115
Анализ экспериментальных данных 119

15 Принципы регуляции метаболизма 121

15.1. Регуляция метаболических путей 123

Клетки и организмы существуют в динамическом стационарном состоянии 123

Регулируется не только количество ферментов, но и их каталитическая активность 124

Обычно в клетке регулируются реакции, далекие от состояния равновесия 128

Адениновые нуклеотиды играют особую роль в регуляции метаболизма 129

Краткое содержание 132

15.2. Теория контроля метаболизма 132

Вклад каждого фермента в поток метаболитов можно измерить экспериментально 133

Дополнение 15-1. *Практическая биохимия.* Теория контроля метаболизма: количественные аспекты 134

Коэффициент управления C определяет влияние ферментативной активности на поток метаболитов через метаболический путь 135

Коэффициент эластичности ϵ связан с откликом фермента на изменения концентраций метаболитов или регуляторов 136

Коэффициент отклика R отражает действие внешнего регулятора на поток через метаболический путь 136

Приложение теории контроля метаболизма к метаболизму углеводов дало неожиданные результаты 137

Теория контроля метаболизма предлагает общий метод для усиления потока в метаболическом пути 138

Краткое содержание 138

15.3. Согласованная регуляция гликолиза и глюконеогенеза 139

Дополнение 15-2. Изоферменты: разные белки, катализирующие одну и ту же реакцию 140

Глюкозо-6-фосфат по-разному влияет на гексокиназы печени и мышц 140

Регуляция гексокиназы IV (глюкокиназы) и глюкозо-6-фосфатазы осуществляется на уровне транскрипции 143

Фосфофруктокиназа-1 и фруктозо-1,6-бисфосфотаза взаимно регулируются 143

Фруктозо-2,6-бисфосфат — мощный регулятор гликолиза и глюконеогенеза 144

Ксилулозо-5-фосфат — ключевой регулятор метаболизма углеводов и жиров 146

Гликолитический фермент пируваткиназа подвержен аллостерическому ингибированию со стороны ATP 147

Превращение пирувата в фосфоенолпируват в процессе гликолиза регулируется несколькими способами 148

Регуляция гликолиза и глюконеогенеза на уровне транскрипции изменяет количество фермента 149

Дополнение 15-3. *Медицина.* Мутации, приводящие к возникновению редких форм сахарного диабета 153

Краткое содержание 154

15.4. Метаболизм гликогена в клетках животных 154

Расщепление гликогена катализирует гликогенфосфорилаза 155

Глюкозо-1-фосфат может подвергаться гликолизу или, претерпевая превращения в печени, пополнять запасы глюкозы в крови 157

Сахаронуклеотид UDP-глюкоза участвует в синтезе гликогена 158

Дополнение 15-4. Карл и Герти Кори — пионеры исследований метаболизма гликогена и связанных с ним заболеваний 159

Гликогенин обеспечивает связывание первых остатков сахара при синтезе гликогена 163

Краткое содержание 164

15.5. Согласованная регуляция синтеза и распада гликогена 165
Гликогенфосфорилаза подвержена аллостерической и гормональной регуляции 165
Регуляция гликогенсинтазы также осуществляется путем фосфорилирования–дефосфорилирования 168
Действие инсулина опосредовано киназой 3 гликогенсинтазы 168
Центральная роль фосфопротеинфосфатазы 1 в метаболизме гликогена 169
Аллостерические и гормональные сигналы координируют метаболизм углеводов 170
Метаболизм углеводов и жиров связаны гормональными и аллостерическими механизмами регуляции 173
Краткое содержание 173
Ключевые термины 174
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 174
Вопросы и задачи 176
Анализ экспериментальных данных 179

16 Цикл лимонной кислоты 181

16.1. Образование ацетил-CoA — активированного ацетата 182
Пируват окисляется до ацетил-CoA и CO_2 183
В работе пируватдегидрогеназного комплекса участвуют пять коферментов 183
Пируватдегидрогеназный комплекс состоит из трех разных ферментов 184
Промежуточные вещества, образующиеся в процессе превращения субстрата, не покидают поверхности фермента 186
Краткое содержание 187

16.2. Реакции цикла лимонной кислоты 188
Цикл лимонной кислоты осуществляется в восемь стадий 190
Дополнение 16-1. Ферменты со скрытой функцией 193
Дополнение 16-2. Синтазы и синтетазы, лигазы и лиазы, киназы, фосфатазы и фосфорилазы. Да такие названия кого угодно могут сбить с толку! 197
Дополнение 16-3. Цитрат: симметричная молекула с реакциями асимметричной природы 199
Выделяющаяся в цикле лимонной кислоты энергия эффективно сохраняется 201
Почему окисление ацетата осуществляется так сложно? 202
Компоненты цикла лимонной кислоты — важные интермедиаты биосинтеза 203
Анаплеротические реакции служат для восполнения затрат интермедиатов цикла лимонной кислоты 204
Дополнение 16-4. Цитратсинтаза, газированные напитки и запасы продовольствия 204
Биотин в составе пируваткарбоксилазы переносит группы CO_2 205
Краткое содержание 207

16.3. Регуляция цикла лимонной кислоты 208
Образование ацетил-CoA под действием пируватдегидрогеназного комплекса регулируется аллостерическими и ковалентными взаимодействиями 208
Регуляция цикла лимонной кислоты осуществляется на трех экзергонических стадиях 209
В цикле лимонной кислоты может происходить туннелирование субстрата, характерное для полиферментных комплексов 210
Некоторые мутации генов ферментов, участвующих в цикле лимонной кислоты, способствуют развитию рака 211
Краткое содержание 211

16.4. Глиоксилатный цикл 211
В глиоксилатном цикле из ацетата образуются четырехуглеродные соединения 212
Цикл лимонной кислоты и глиоксилатный цикл регулируются согласованно 213
Краткое содержание 215

Ключевые термины 215
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 215
Вопросы и задачи 217
Анализ экспериментальных данных 222

17 Катаболизм жирных кислот 225

17.1. Расщепление, активация и транспорт жиров 226
Жиры пищи всасываются в тонкой кишке 226
Активацию запасенных триацилглицеринов инициируют гормоны 228
Жирные кислоты активируются и переносятся в митохондрии 230
Краткое содержание 232

17.2. Окисление жирных кислот 232
β-Окисление насыщенных жирных кислот проходит в четыре основные стадии 233
Ацетил-CoA и ATP образуются при повторении четырех реакций β-окисления 235
Дополнение 17-1. У медведей во время зимней спячки происходит β-окисление жиров 236
В дальнейшем ацетил-CoA может окисляться в цикле трикарбоновых кислот 237
Для окисления ненасыщенных жирных кислот требуются две дополнительные реакции 237
Для полного окисления жирных кислот с нечетным числом атомов углерода требуются три дополнительные реакции 239
Дополнение 17-2. Кофермент B_{12}: «радикальное» решение сложной задачи 240
Окисление жирных кислот строго регулируется 241
Синтезу белков, необходимых для катаболизма липидов, способствуют факторы транскрипции 243
Генетические нарушения в ацил-CoA-дегидрогеназах — причина серьезных заболеваний 245
Пероксисомы тоже участвуют в β-окислении 245
Пероксисомы и глиоксисомы растений используют ацетил-CoA, полученный при β-окислении, как предшественник в биосинтезе 247
Ферменты β-окисления из разных органелл в ходе эволюции приобрели отличия 247
ω-Окисление жирных кислот происходит в эндоплазматическом ретикулуме 249
Фитановая кислота подвергается α-окислению в пероксисомах 250
Краткое содержание 250

17.3. Кетоновые тела 251
Кетоновые тела, образующиеся в печени, экспортируются в другие органы в качестве источников энергии 252
При диабете и голодании кетоновые тела образуются сверх нужного количества 253
Краткое содержание 254
Ключевые термины 254
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 254
Вопросы и задачи 255
Анализ экспериментальных данных 259

18 Окислительное расщепление аминокислот и образование мочевины 261

18.1. Метаболические пути аминогрупп 262
Белки пищи подвергаются ферментативному расщеплению до аминокислот 264
Пиридоксальфосфат участвует в переносе α-аминогруппы на α-кетоглутарат 266
В печени аминогруппа глутамата высвобождается в виде аммиака 269
Дополнение 18-1. *Медицина*. Диагностика повреждений органов 269
В кровотоке аммиак транспортируется глутамином 270
Аланин переносит аммиак из скелетных мышц в печень 271
Аммиак токсичен для животных 272
Краткое содержание 272

18.2. Выделение азота и цикл мочевины 273
Мочевина образуется из аммиака в пяти ферментативных реакциях 273
Цикл лимонной кислоты и цикл мочевины могут быть взаимосвязанными 275
Ферментативные активности в цикле мочевины регулируются на двух уровнях 276
Взаимосвязи путей уменьшают энергетическую цену синтеза мочевины 277
Генетические дефекты цикла мочевины могут нести угрозу для жизни 277
Краткое содержание 279

18.3. Пути деградации углеродного скелета аминокислот 279
Одни аминокислоты превращаются в глюкозу, другие — в кетоновые тела 280
В катаболизме аминокислот важную роль играют несколько коферментов 281
Шесть аминокислот расщепляются до пирувата 285
Семь аминокислот распадаются до ацетил-CoA 288
Катаболизм фенилаланина у некоторых людей может быть нарушен 291
Пять аминокислот превращаются в α-кетоглутарат 292
Превращение четырех аминокислот происходит до сукцинил-CoA 294
Дополнение 18-2. *Медицина.* Ученые нашли объяснение загадочного убийства 295
Разветвленные аминокислоты не деградируют в печени 296
Аспарагин и аспартат расщепляются до оксалоацетата 297
Краткое содержание 298
Ключевые термины 299
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 299
Вопросы и задачи 300
Анализ экспериментальных данных 303

19 Окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование 305

ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

19.1. Реакции переноса электронов в митохондриях 306
Электроны переносят универсальные акцепторы электронов 307
Электроны проходят через цепь встроенных в мембрану переносчиков 309
Переносчики электронов в дыхательной цепи митохондрий образуют полиферментные комплексы 313
Митохондриальные комплексы могут образовывать ассоциаты — «респирасомы» 320
Энергия, высвобождаемая при переносе электронов в дыхательной цепи, запасается в виде протонного градиента (электрохимического потенциала) 322
При окислительном фосфорилировании образуются активные формы кислорода (АФК) 324
Дополнение 19-1. Горячие растения с отвратительным запахом и альтернативные пути переноса электронов 325
В митохондриях растений окисление NADH протекает по другим механизмам 326
Краткое содержание 326

19.2. Синтез ATP 327
Фермент ATP-синтаза состоит из двух главных компонентов — F_1 и F_0 331
Молекулы ATP связаны с поверхностью ферментного комплекса F_1 прочнее, чем молекулы ADP 331
Протонный градиент выступает движущей силой для высвобождения ATP с поверхности фермента 333
Каждая β-субъединица ATP-синтазы может существовать в трех различных конформациях 333
Механизм вращательного катализа — ключ к пониманию изменений селективности связывающих центров 336

Хемиосмотическая теория допускает дробные значения для соотношения между количеством поглощенного O_2 и количеством образованного ATP 338
Протон-движущая сила используется для активного транспорта веществ через мембрану 339
В окислении внемитохондриального NADH участвуют челночные системы 340
Краткое содержание 342

19.3. Регуляция окислительного фосфорилирования 343
Образование ATP при окислительном фосфорилировании регулируется энергетическими потребностями клетки 343
При гипоксии гидролиз ATP в клетках блокируется белковым ингибитором 344
Гипоксия приводит к образованию АФК и некоторым адаптационным реакциям 345
Все стадии синтеза ATP при катаболизме углеводов координируются взаимосвязанными регуляторными механизмами 346
Краткое содержание 346

19.4. Роль митохондрий в термогенезе, синтезе стероидов и апоптозе 347
Разобщение дыхания и фосфорилирования в митохондриях бурого жира позволяет генерировать тепло 348
Митохондриальные ферменты системы P-450 катализируют гидроксилирование стероидов 348
Митохондрии играют важную роль в инициировании апоптоза 350
Краткое содержание 351

19.5. Митохондриальные гены: происхождение и мутации 351
Митохондрии возникли в результате эндосимбиоза 352
На протяжении жизни организма в митохондриальной ДНК накапливаются мутации 353
Мутации митохондриальных генов вызывают заболевания человека 354
Диабет может возникать из-за дефекта митохондрий в β-клетках поджелудочной железы 355
Краткое содержание 356

ФОТОСИНТЕЗ: ПОГЛОЩЕНИЕ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ

19.6. Основные особенности фотофосфорилирования 357
Фотосинтез растений происходит в хлоропластах 358
Свет индуцирует поток электронов в хлоропластах 359
Краткое содержание 359

19.7. Поглощение света 359
При фотосинтезе световую энергию поглощают хлорофиллы 361
Вспомогательные пигменты расширяют диапазон длин волн поглощаемого света 361
Хлорофиллы передают энергию света реакционным центрам путем переноса экситона на соседние молекулы 365
Краткое содержание 367

19.8. Основной фотохимический процесс — это индуцированный светом перенос электронов 367
У бактерий присутствует один из двух типов фотохимических реакционных центров 367
Кинетические и термодинамические факторы, препятствующие потере энергии 371
У растений две реакционные фотосистемы взаимодействуют между собой 372
Антенные молекулы хлорофиллов образуют с переносчиками электронов функциональные комплексы 374
Цитохромный комплекс b_6f связывает фотосистемы I и II 376
Циклический поток электронов между ФСI и цитохромным комплексом b_6f увеличивает продукцию ATP по сравнению NADPH 377

Перестройка фотосинтетического аппарата изменяет распределение светопоглощающего комплекса II между двумя фотосистемами 377
Вода расщепляется кислород-образующим комплексом 379
Краткое содержание 381

19.9. Синтез ATP в процессе фотофосфорилирования 381
Протонный градиент связывает процессы фосфорилирования и переноса электронов 382
Установлена стехиометрия процесса фотофосфорилирования 383
ATP-синтаза хлоропластов по строению и функциям напоминает ферментативный комплекс в митохондриях 384
Краткое содержание 385

19.10. Эволюция оксигенного фотосинтеза 385
Хлоропласты возникли в результате эволюционного развития эндосимбиоза бактерий 386
У галофильных бактерий один и тот же белок поглощает энергию солнечного света и перекачивает протоны из клетки, создавая движущую силу для синтеза ATP 387
Краткое содержание 388
Ключевые термины 390
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 390
Вопросы и задачи 395
Анализ экспериментальных данных 401

20 Биосинтез углеводов у растений и бактерий 403

20.1. Фотосинтез углеводов 404
Пластиды — уникальные органеллы растительных клеток и водорослей 405
Ассимиляция углекислого газа происходит в три стадии 406
Синтез каждого триозофосфата из CO_2 требует шесть NADPH и девять ATP 415
Транспортная система выводит триозофосфаты из хлоропласта и импортирует фосфат 417
Четыре фермента цикла Кальвина косвенно активируются светом 418
Краткое содержание 419

20.2. Фотодыхание, C_4- и CAM-пути 420
Фотодыхание — следствие оксигеназной активности рубиско 420
Усвоение фосфоглицерата обходится клетке весьма дорого 421
У C_4-растений фиксация CO_2 и активность рубиско пространственно разделены 422
У CAM-растений фиксация CO_2 и активность рубиско разделены во времени 426
Краткое содержание 426

20.3. Биосинтез крахмала и сахарозы 426
ADP-глюкоза — субстрат для синтеза крахмала в пластидах растений и гликогена у бактерий 426
UDP-глюкоза является субстратом для синтеза сахарозы в цитозоле клеток листьев 428
Превращение триозофосфатов в сахарозу и крахмал жестко регулируется 429
Краткое содержание 430

20.4. Синтез полисахаридов клеточной стенки: целлюлоза растений и пептидогликан бактерий 431
Целлюлоза синтезируется надмолекулярными структурами в плазматической мембране 432
Олигосахариды, которые связаны с липидами, — предшественники бактериальной клеточной стенки 433
Краткое содержание 434

20.5. Интеграция углеводного метаболизма в растительной клетке 435
В прорастающих семенах жиры и белки превращаются в глюкозу в ходе глюконеогенеза 436

Метаболические пути в различных органеллах связывают пулы общих интермедиатов 437
Краткое содержание 438
Ключевые термины 438
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 439
Вопросы и задачи 440
Анализ экспериментальных данных 443

21 Биосинтез липидов 445

21.1. Биосинтез жирных кислот и эйкозаноидов 445
Малонил-CoA образуется из ацетил-CoA и гидрокарбоната 446
Синтез жирных кислот происходит в повторяющихся реакционных циклах 447
Синтаза жирных кислот млекопитающих содержит несколько активных центров 449
Синтаза жирных кислот присоединяет ацетильную и малонильную группы 450
Реакции, катализируемые синтазой жирных кислот, повторяются до образования пальмитата 452
Синтез жирных кислот у многих организмов происходит в цитозоле, а у растений — в хлоропластах 453
Ацетат выводится из митохондрий в виде цитрата 455
Биосинтез жирных кислот жестко регулируется 455
Длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты синтезируются из пальмитата 457
Для десатурации жирных кислот требуются оксидазы со смешанной функцией 458
Дополнение 21-1. Оксидазы со смешанной функцией, оксигеназы и цитохром P-450 459
Эйкозаноиды образуются из содержащих 20 углеродных атомов полиненасыщенных жирных кислот 461
Краткое содержание 464

21.2. Биосинтез триацилглицеринов 464
Триацилглицерины и глицерофосфолипиды синтезируются из одних и тех же предшественников 464
Биосинтез триацилглицеринов у животных регулируется гормонами 466
Жировая ткань генерирует глицерин-3-фосфат путем глицеронеогенеза 468
Тиазолидиндионы применяют при диабете II типа для увеличения глицеронеогенеза 469
Краткое содержание 470

21.3. Биосинтез мембранных фосфолипидов
Клетки используют две стратегии присоединения полярных головок фосфолипидов 470
Для синтеза фосфолипидов у *E. coli* служат CDP-диацилглицерины 472
Эукариоты синтезируют анионные фосфолипиды из CDP-диацилглицеринов 472
У эукариот метаболические пути образования фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина взаимосвязаны 472
Синтез плазмалогенов требует образования связанного простой эфирной связью жирного спирта 476
В синтезах сфинголипидов и глицерофосфолипидов некоторые предшественники и некоторые механизмы общие 476
Полярные липиды локализуются в специальных клеточных мембранах 478
Краткое содержание 479

21.4. Биосинтез холестерина, стероидов и изопреноидов 479
Холестерин производится из ацетил-CoA в четыре стадии 480
Соединения холестерина в организме 484
Холестерин и другие липиды переносят липопротеины плазмы крови 485

Дополнение 21-2. *Медицина*. Аллели apoE определяют частоту возникновения болезни Альцгеймера 487
Эфиры холестерина попадают в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза 490
Несколько уровней регуляции биосинтеза холестерина 491
Дополнение 21-3. *Медицина*. Липидная гипотеза и создание статинов 493
Стероидные гормоны образуются путем расщепления боковой цепи холестерина и его окисления 495
Промежуточные продукты биосинтеза холестерина участвуют во многих других метаболических путях 496
Краткое содержание 497
Ключевые термины 497
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 498
Вопросы и задачи 499
Анализ экспериментальных данных 501

22 Биосинтез аминокислот, нуклеотидов и родственных соединений 505

22.1. Общий обзор метаболизма азота 506
В круговороте азота поддерживается пул биологически доступного азота 506
Дополнение 22-1. Необычный стиль жизни многочисленных, но загадочных существ 507
Азот фиксируется ферментным комплексом нитрогеназой 510
Аммоний включается в биомолекулы через глутаминовую кислоту (глутамат) и глутамин 513
Глутаминсинтетаза — основной регуляторный пункт в метаболизме азота 515
Несколько типов реакций, играющих особую роль в биосинтезе аминокислот и нуклеотидов 517
Краткое содержание 517

22.2. Биосинтез аминокислот 518
α-Кетоглутарат — предшественник глутаминовой кислоты, глутамина, пролина и аргинина 519
Серин, глицин и цистеин — производные 3-фосфоглицерата 519
На основе оксалоацетата и пирувата синтезируются три заменимые и шесть незаменимых аминокислот 523
Хоризмат — ключевое соединение в синтезе триптофана, фенилаланина и тирозина 523
При биосинтезе гистидина используются предшественники пуринового биосинтеза 529
Биосинтез аминокислот регулируется аллостерически 529
Краткое содержание 532

22.3. Производные аминокислот 532
Глицин — предшественник порфиринов 532
Дополнение 22-2. Биохимия у королей и вампиров 534
Гем — источник желчных пигментов 535
Аминокислоты —предшественники креатина и глутатиона 536
D-Аминокислоты найдены главным образом у бактерий 538
Ароматические аминокислоты — предшественники многих растительных веществ 538
Биологические амины — продукты декарбоксилирования аминокислот 538
Дополнение 22-3. *Медицина*. Лечение африканской сонной болезни биохимическим «троянским конем» 540
Аргинин — предшественник оксида азота в биологическом синтезе 542
Краткое содержание 543

22.4. Биосинтез и деградация нуклеотидов 543
Синтез нуклеотидов *de novo* начинается с PRPP 544
Биосинтез нуклеотидов регулируется по механизму отрицательной обратной связи 547

Пиримидиновые нуклеотиды образуются из аспартата, PRPP и карбамоилфосфата 547
Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов регулируется по механизму отрицательной обратной связи 549
Нуклеозидмонофосфаты превращаются в нуклеозидтрифосфаты 550
Рибонуклеотиды служат предшественниками дезоксирибонуклеотидов 550
Тимидилат образуется из dCDP и dUMP 554
При распаде пуринов и пиримидинов образуются мочевая кислота и мочевина 555
Пуриновые и пиримидиновые основания повторно используются в путях реутилизации 556
Избыток мочевой кислоты вызывает подагру 557
Большинство ферментов, служащих мишенями химиотерапевтических препаратов, относятся к пути биосинтеза нуклеотидов 558
Краткое содержание 560
Ключевые термины 560
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 561
Вопросы и задачи 561
Анализ экспериментальных данных 563

23 Гормональная регуляция и интеграция метаболизма млекопитающих 565

23.1. Гормоны: различные структуры для различных функций 566
Для обнаружения и очистки гормонов необходимы биологические исследования 567
Дополнение 23-1. *Медицина.* Как открывали гормоны. Тяжелый путь к чистому инсулину 568
Гормоны действуют через специфические клеточные рецепторы с высоким сродством 570
Гормоны химически разнообразны 571
Высвобождение гормонов регулируется иерархическими нейрональными и гормональными сигналами 576
Краткое содержание 579

23.2. Тканеспецифичный метаболизм: разделение функций 579
Процессы в печени и распределение питательных веществ 579
Жировая ткань запасает и поставляет жирные кислоты 585
Термогенная функция бурой жировой ткани 586
Мышцы используют ATP для механической работы 587
Мозг использует энергию для передачи электрических импульсов 590
Переносчики кислорода, метаболиты и гормоны крови 591
Краткое содержание 593

23.3. Гормональная регуляция энергетического метаболизма 593
Инсулин препятствует чрезмерному повышению уровня глюкозы в крови 595
Поджелудочная железа секретирует инсулин или глюкагон в ответ на изменения уровня глюкозы крови 595
Глюкагон препятствует чрезмерному понижению уровня глюкозы крови 598
Во время голодания и при истощении метаболизм переключается на обеспечение энергией мозга 599
Адреналин сигнализирует о предстоящей физической нагрузке 602
Кортизол сигнализирует о стрессе, в том числе о низком уровне глюкозы 602
Сахарный диабет развивается из-за нарушений образования инсулина или дефектов его действия 603
Краткое содержание 604

23.4. Ожирение и регуляция массы тела 604
Жировая ткань выполняет важную эндокринную функцию 605

Лептин стимулирует образование пептидных гормонов, снижающих аппетит 607
Лептин включает сигнальный каскад, регулирующий экспрессию генов 608
Лептиновая система участвует в регуляции ответа на истощение 609
Инсулин действует в аркуатном ядре, регулируя питание и запасание энергии 609
Адипонектин увеличивает чувствительность к инсулину, действуя через AMPK 610
Экспрессия генов, играющих главную роль в поддержании массы тела, регулируется рационом питания 612
Влияние грелина и PYY_{3-36} на кратковременное пищевое поведение 613
Краткое содержание 614

23.5. Ожирение, метаболический синдром и диабет II типа 615
При диабете II типа потеряна чувствительность тканей к инсулину 615
Помочь больным диабетом II типа могут диета, физическая нагрузка и лекарственная терапия 617
Краткое содержание 618
Ключевые термины 618
Дополнительная литература для дальнейшего изучения 619
Вопросы и задачи 620
Анализ экспериментальных данных 622