

Структура белковой молекулы

А. А. Чиркин, заведующий кафедрой химии, доктор биологических наук, профессор;
Е. О. Данченко, профессор кафедры химии, доктор медицинских наук, доцент
(Витебский государственный университет им. П. М. Машерова)

Белки являются полимерами, которые состоят из *L*- α -аминокислот. Различают 4 уровня структурной организации белка: *первичную, вторичную, третичную и четвертичную*.

1. Первичная структура.

Первичная структура белка — *линейная специфическая* последовательность аминокислот, соединённых между собой пептидными связями. Пептиды и полипептиды состоят менее чем из 50 аминокислот, белки содержат в пептидной цепи более 50 аминокислот.

Пептидные связи образуются между α -аминогруппой одной аминокислоты и α -карбоксильной группой другой аминокислоты. При образовании пептидной связи выделяется молекула воды. Процесс образования пептидной связи является *эндергоничным*, т. е. требует затраты энергии.

1.1. Характеристика пептидной связи.

1. Пептидная связь является ковалентной и стабильной. Разрушение пептидной связи возможно только в присутствии катализаторов.

2. Связь между атомом углерода карбонильной группы и атомом азота имеет *частично двойной характер* из-за *p, π -сопряжения* (сопряжение свободной пары электронов атома азота с π -электронами двойной связи C=O). Поэтому свободное вращение вокруг пептидной связи *невозможно*.

3. *Копланарность* — все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости (рис. 1).

4. Атом водорода аминогруппы и атом кислорода карбонильной группы находятся в *транс-положении*.

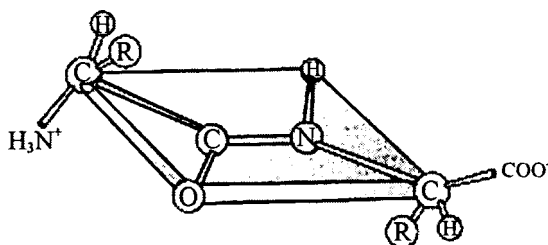
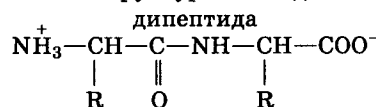


Рис. 1. — Структура пептидной связи



1.2. Роль первичной структуры.

1. Последовательность аминокислот в первичной структуре белка определяет *специфичность* белка.

2. Первичная структура генетически детерминирована и воспроизводится в процессе транскрипции и трансляции.

3. Первичная структура белка является *основой для формирования последующих структур* белка за счёт взаимодействия радикалов аминокислотных остатков полипептидной цепи.

4. Замена аминокислоты *L*-ряда на аминокислоту *D*-ряда может привести к *полному исчезновению биологической активности пептида*.

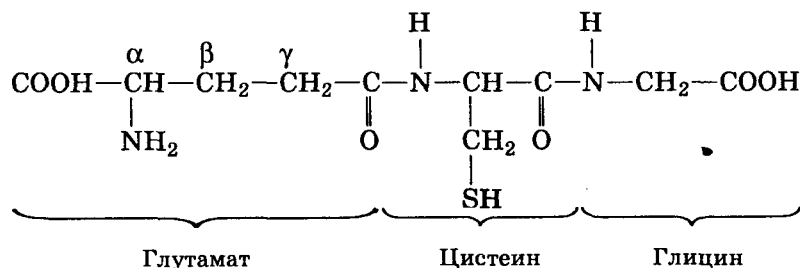
Пептид обозначается и называется начиная с аминокислоты, которая имеет свободную α -аминогруппу и заканчивается аминокислотой, которая имеет свободную α -карбоксильную группу. Для наименования пептида суффикс *-ин* (аланин), *-ан* (триптофан) и *-ат* (глутамат) заменяется на *-ил*, за исключением последней аминокислоты.

1.3. Биологически важные пептиды.

В живых организмах существуют пептиды, которые выполняют важные биологические функции.

1. *Глутатион* — трипептид, состоящий из γ -глутаминовой кислоты, цистеина

и глицина и присутствует в клетке в восстановленной и окисленной формах:



Функции:

— является коферментом для некоторых ферментов (например, глутатион пероксидазы);

— предотвращает окисление сульфгидрильных групп ($-\text{SH}$) белков до дисульфидных ($-\text{S}-\text{S}$), что необходимо для функционирования белков и ферментов;

— восстановленная форма глутатиона предотвращает повреждение эритроцитов и защищает гемоглобин от окисления H_2O_2 ;

— необходим для транспорта аминокислот через мембраны эпителия кишечника и почек (γ -глутамильный цикл).

2. *Тиролиберин* — трипептид. Секретируется гипоталамусом и стимулирует секрецию тиротропина в гипофизе.

3. *Окситоцин*. Синтезируется задней долей гипофиза и стимулирует сокращение матки. Состоит из 9 аминокислот.

4. *Вазопрессин* (антидиуретический гормон). Задерживает жидкость в организме и повышает артериальное давление. Состоит из 9 аминокислот, синтезируется задней долей гипофиза.

5. *Ангиотензины*. Ангиотензин I (декапептид) превращается в ангиотензин II (октапептид), вызывает сокращение сосудов.

6. *Брадикинин* и *каллидин* — нона и декапептид соответственно. Вызывают расслабление гладких мышц и являются продуктами протеолиза специфических α_2 -глобулинов плазмы. Поэтому эти пептиды содержат только протеиногенные аминокислоты. Могут образовываться в крови под действием яда змей.

7. *Грамицидин S* — антибиотик, синтезируемый *B. brevis*. Является циклическим декапептидом, в составе которого, кроме протеиногенных аминокислот, имеется орнитин. Является ионофором, образуя в биологических мембранах каналы, для транспорта ионов металлов.

8. *Аманитины* — токсичные октапептиды ядовитых грибов рода *Amanita*. Типичным представителем аманитинов является α -аманитин. Он блокирует синтез белка в клетках эукариот на стадии транскрипции. Замена в молекуле диоксиизолейцина на лейцин приводит к образованию нетоксичного соединения. В этих же грибах содержится ряд токсичных гептапептидов — *фаллоидинов*, имеющих сходное с аманитинами строение (бициклическое). Фаллоидины необратимо поражают печень млекопитающих. Роль противоядия по отношению к ним выполняет циклический декапептид — *антаманид*, содержащийся в тех же грибах, что и токсин.

1.4. Аминокислотный состав белков.

После выделения белка и определения его молекулярной массы следует изучить его первичную структуру, т. е. последовательность аминокислот в полипептидной цепи. В автоматизированном варианте используют метод Эдмана. Рассмотрим данный процесс на примере простого гексапептида: аспгли-асп-фен-арг-гли. Необходимы следующие этапы.

1. Гидролиз пептида в 6%-ном растворе HCl при 110°C 24 часа.

2. Разделение аминокислот гидролизата методом колоночной ионообменной хроматографии на сульфонированном поли-

стироле (Дауэкс-50); аминокислоты идентифицируют по их выходу с определённым элюционным объёмом (рис. 2).

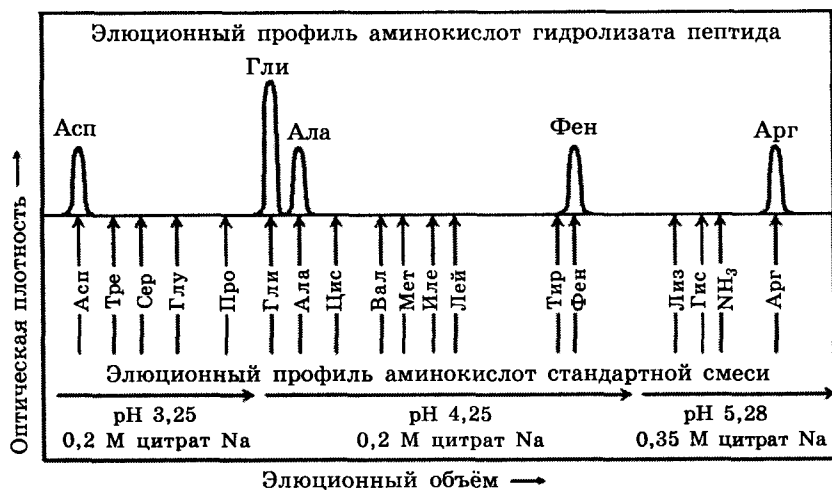
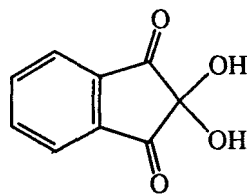


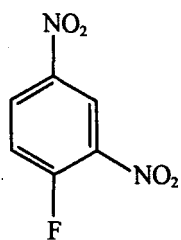
Рис. 2. — Хроматографическое разделение аминокислот

3. Концентрацию аминокислот определяют по реакции с нингидрином (открывает α -аминогруппы). Чувствительность метода составляет 1 мкг (10 нмоль) концентрации протеиногенных аминокислот, кроме пролина. Если требуется повысить чувствительность метода до открытия 1 нг (10 пмоль), то добавляют флуорескамин, связывающийся с α -аминогруппами и дающий флуоресцирующий продукт. В результате получается аминокислотный состав пептида: 2-асп-2-гли-фен-арг.

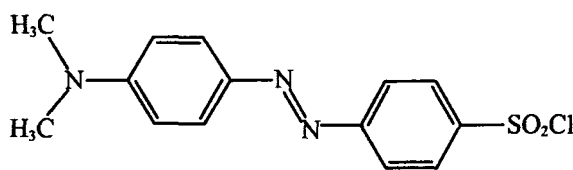


Нингидрин

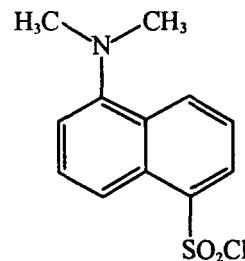
4. Определяют *N*-концевую аминокислоту путём добавления ДНФБ (2,4-динитро-1-фтор-бензол) по Сенджеру. В настоящее время используют дабсил хлорид или дансил хлорид, которые реагируют с незаряженной α -аминогруппой с образованием флуоресцирующего сульфонамидного деривата (производного). После гидролиза в 6%-ном растворе HCl производят хроматографическое разделение аминокислот и выявляют флуоресцирующую аминокислоту в виде дабсил (или дансил)-производного. Этот метод по чувствительности намного превосходит метод с использованием динитрофторбензола. Однако полный гидролиз пептида не позволяет вести анализ аминокислотной последовательности.



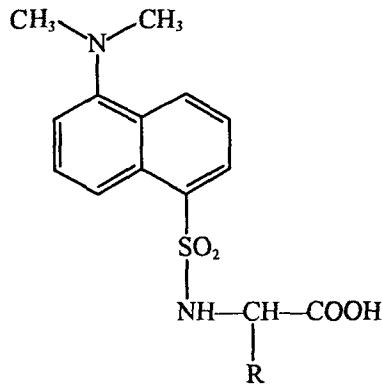
1-фтор-2,4-динитробензол



Дабсилхлорид



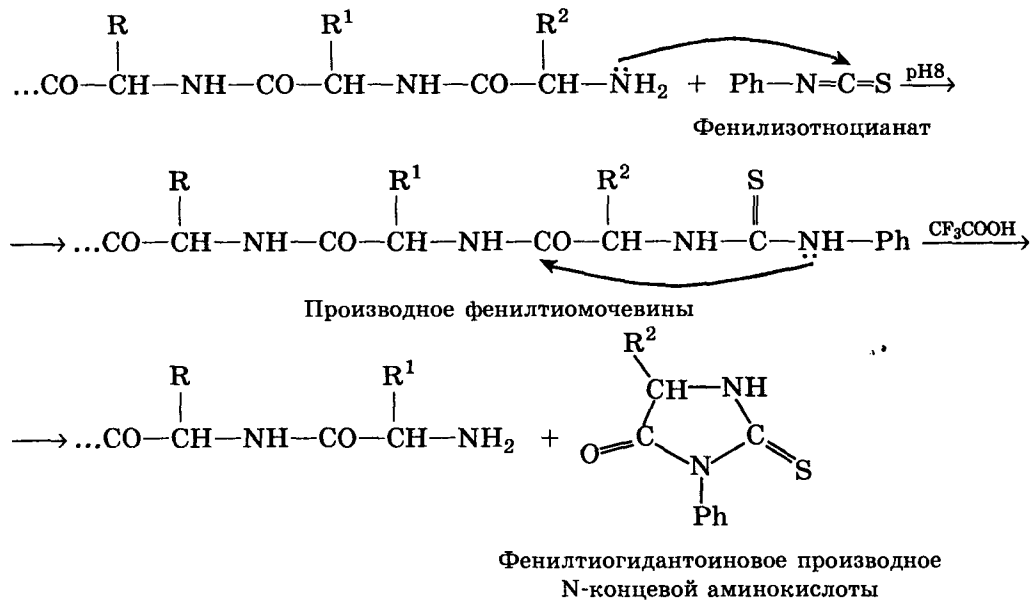
Дансилхлорид



Дансильное производное
N-концевой аминокислоты

5. П. Эдман предложил технику мечения N-концевой аминокислоты и её

отделения без гидролиза остальных пептидных связей в пептиде. Для этого добавляется фенилизотиоцианат, который реагирует с незаряженной α-аминогруппой с образованием фенилтиокарбамового производного, которое отделяется при мягком кислотном гидролизе. Отделившееся циклическое фенилтиогидантоиновое производное концевой аминокислоты определяется хроматографическим методом. Затем вся процедура повторяется с укороченным на 1 аминокислоту пептидом. Этот метод автоматизирован, и на 1 цикл затрачивается примерно 60 минут. Метод Эдмана позволяет анализировать аминокислотную последовательность 50-членного пептида.



Для расщепления полипептидов на фрагменты, доступные для автоматизированного анализа по Эдману, используют:

1) химическое расщепление пептидных связей, образованных карбоксильной группой метионина, с помощью бромциана (BrCN). Так, из белка, содержащего 10 остатков метионина, будет получено 11 пептидов;

2) ферментативный гидролиз трипсином, расщепляющим пептидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина или лизина. Белок, содержащий 9 остатков лизина и 7 остатков

аргинина, гидролизуется трипсином на 17 пептидов;

3) применение другого фермента, например химотрипсина, катализирующего гидролиз других пептидных связей, образованных карбоксильной группой ароматических и с объёмным неполярным радикалом аминокислот, позволяет оценить последовательность расположения в белке пептидов, которые получены после гидролиза трипсином.

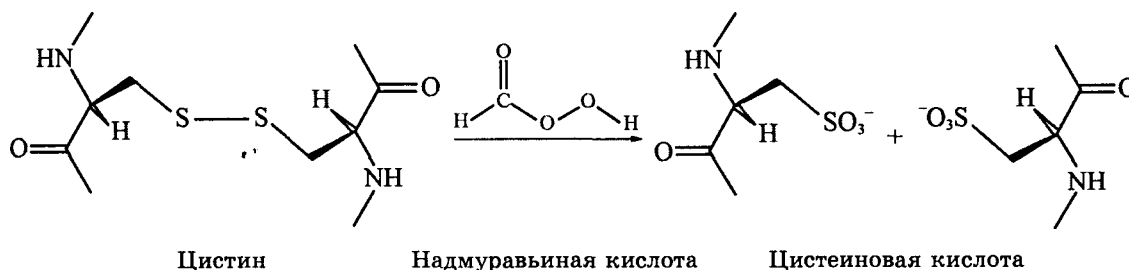
Если анализируется олигомерный белок, то вначале изучают количество цепей, например, с помощью метода двукратного электрофореза в полиакрила-

мидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE). Определяют также количество *N*-концевых аминокислот. Для разделения полипептидных цепей в олигомерном белке (не связаны ковалентными связями) применяют денатурирующие агенты — мочевины или гуанидин гидрохлорид. Полипептидные цепи, связанные дисульфидными связями, разделяют путём их восстановления до сульфгидрильных SH-групп. Для предотвращения повторного образования дисульфидных групп производят ацилирование SH-групп.

Важной задачей анализа структуры белка является определение положения дисульфидных связей. Для этого используют технику диагонального элект-

трофореза изолированных пептидов, содержащих дисульфидные связи:

- 1) расщепляют белок на пептиды с сохранёнными дисульфидными связями;
- 2) смесь пептидов наносят на угол хроматографической бумаги и производят электрофорез в одном направлении;
- 3) после завершения электрофоретического разделения выдерживают бумагу в парах надмуравьиной (пероксимуравьиной) кислоты, которая окисляет остатки каждого цистина до двух остатков цистеиновой кислоты; пептиды ($R-CH_2-S-S-CH_2-R'$) разделяются из-за разрыва дисульфидных связей и становятся более кислыми из-за образования остатков цистеиновой кислоты ($R-CH_2-SO_3^- + R'-CH_2-SO_3^-$);



4) смесь пептидов подвергают второму электрофоретическому разделению в направлении, перпендикулярном первому разделению. Пептиды, в которых не было дисульфидных связей, сохраняют свою электрофоретическую подвижность и располагаются вдоль диагональной линии, а пептиды, содержащие дисульфидные связи, имеют иную электрофоретическую подвижность и будут располагаться вне диагональной линии (рис. 3);

5) выделяют пептиды, локализованные вне диагональной линии, определяют последовательность аминокислот в каждом из них и по положениям остатков цистеина находят положение дисульфидных связей.

Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии существенно повысило разрешающую способность метода исследования последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Современные газофазовые секвенаторы позволяют анализи-

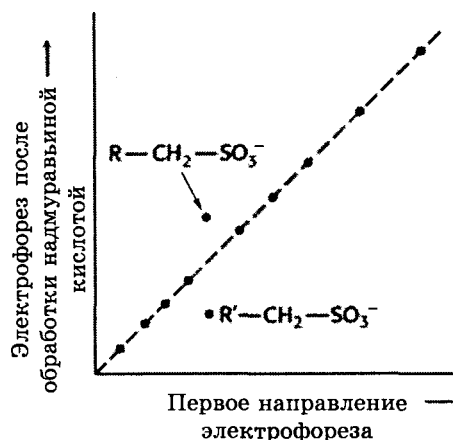


Рис. 3. — Диагональный электрофорез

ровать пептиды и белки в пиколярных концентрациях. Это позволяет анализировать аминокислотную последовательность пептидов, разделённых техникой SDS-PAGE при решении различных задач протеомики.

Применение методов рекомбинантных ДНК (генной инженерии) стало

революционным этапом в исследовании первичных структур белков, содержащих более 1000 аминокислотных остатков. Знание последовательности нуклеотидов в генах позволяет с помощью генетического кода определять исходную первичную последовательность аминокислот в синтезируемой полипептидной цепи. Это важно знать, поскольку после трансляции белок может подвергаться различным модификациям.

1.5. Полиморфизм белков — существование одного и того же белка в нескольких молекулярных формах, отличающихся по первичной структуре, физико-химическим свойствам и проявлениям биологической активности. Причинами полиморфизма белков являются рекомбинации и мутации генов. Изобелки — это множественные молекулярные формы белка, обнаруживаемые в пределах организмов одного биологического вида, как результат наличия более чем одного структурного гена в генофонде вида. Множественные гены могут быть представлены как множественные аллели или как множественные генные локусы.

Полиморфизм белков имеет следующее биологическое значение:

1) полиморфизм белков в филогенезе — существование гомологичных белков у разных видов. У этих белков консервативными (неизменяемыми) остаются участки первичной структуры, отвечающие за функцию белка. Для замещения утраченных белков в организме человека используют такие гомологичные белки животных, в первичной структуре которых имеются минимальные различия (инсулин быка, свиньи, кашалота);

2) полиморфизм белков в онтогенезе — существование гомологичных белков в разные отрезки жизненного цикла организма. У плода имеется гемоглобин F (фетальный гемоглобин ($\alpha_2\gamma_2$)), имеет большое сродство к кислороду). После рождения он заменяется на гемоглобин A₁ ($\alpha_2\beta_2$);

3) тканевой полиморфизм белков. Один и тот же фермент в разных клет-

ках катализирует одну и ту же реакцию, но имеет отличия в первичной структуре — изоферменты. Изоферменты — это эволюционно закреплённые формы одного и того же фермента, приспособленные к функционированию в органах с отличающимися условиями протекания катализируемой химической реакции. Определение изоферментов в крови помогает диагностировать поражение определённой ткани;

4) полиморфизм белков при патологии. Рассмотрим на примере множественных форм гемоглобинов. Они возникают в результате точечных мутаций, передаваемых по наследству. При этом чаще всего происходит замена кислой аминокислоты на основную или нейтральную:

- в Hb C замена 6 глу в β -цепи на лиз;
- в Hb E замена 26 глу в β -цепи на лиз;
- в Hb J замена 16 лиз в β -цепи на асп;
- в Hb S замена 6 глу в β -цепи на вал.

В последнем случае возникает заболевание серповидно-клеточная анемия. Аномальные гемоглобины отличаются от нормального величиной заряда и электрофоретической подвижностью. Физико-химические изменения гемоглобинов сопровождаются нарушением транспортировки кислорода.

2. Вторичная структура белка.

Вторичная структура — способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру. Вторичная структура определяется первичной структурой. Поскольку первичная структура генетически детерминирована, формирование вторичной структуры может происходить при выходе полипептидной цепи из рибосомы. Вторичная структура стабилизируется водородными связями, которые образуются между NH- и CO-группами пептидных связей.

Различают α -спираль, β -структуру и неупорядоченную конформацию (клубок).

2.1. α -Спираль.

Структура α -спирали была теоретически предсказана Полингом и Корн за несколько лет до её обнаружения (рис. 4). Спираль α — это палочкообразная структура, в которой пептидные связи расположены внутри спирали, а боковые радикалы аминокислот — снаружи.

α -Спираль стабилизирована водородными связями, которые параллельны оси спирали и возникают между первым и пятым аминокислотными остатками. Таким образом, в протяжённых спиральных участках каждый аминокислотный остаток принимает участие в формировании двух водородных связей.

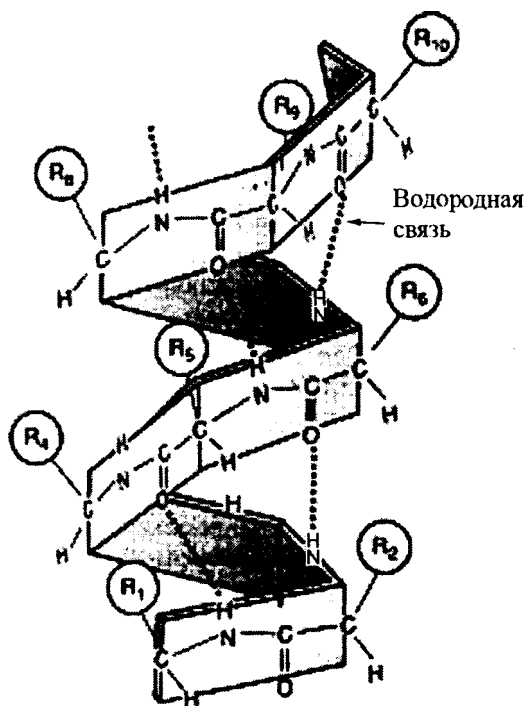


Рис. 4. — Структура α -спирали

На один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали равен 0,54 нм, на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Угол подъёма спирали составляет 26° . Период регулярности α -спирали равен 5 виткам или 18 аминокислотным остаткам. Наиболее распространены правые α -спирали, т. е. закручивание спи-

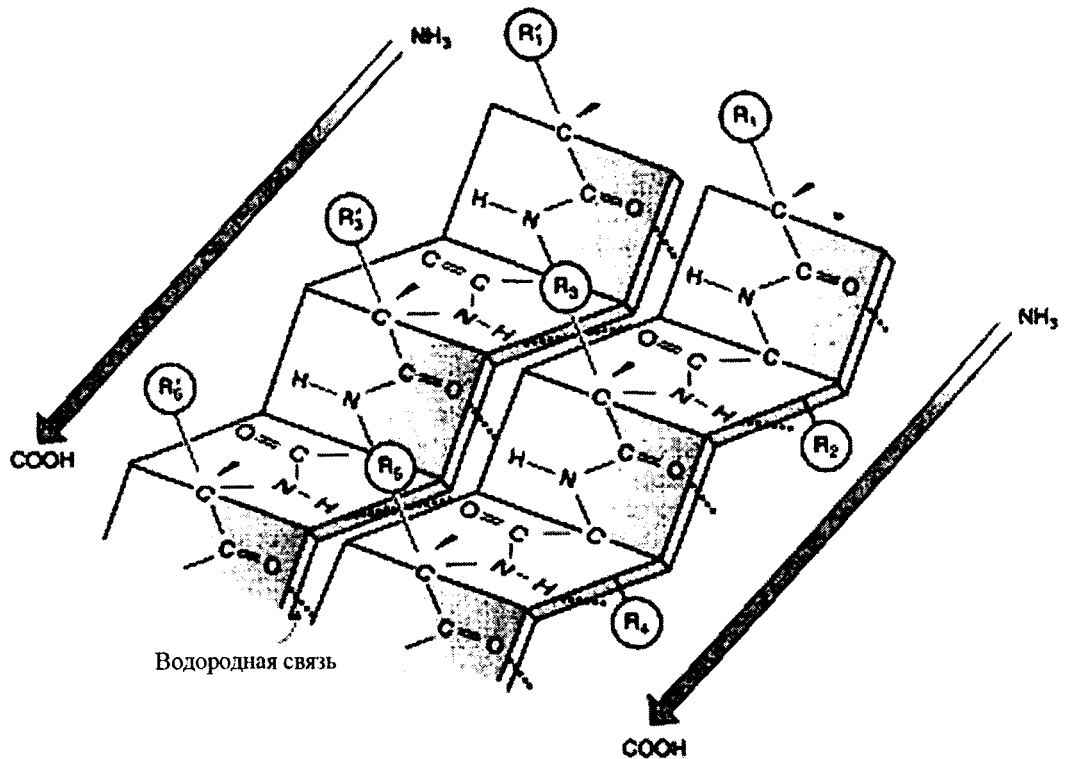
рали идёт по часовой стрелке. Образованию α -спирали препятствует пролин, аминокислоты с заряженным и объёмными радикалами (электростатическое и механическое препятствие).

Другая форма спирали присутствует в коллагене. В организме млекопитающих коллаген — преобладающий в количественном отношении белок: он составляет 25 % общего белка. Коллаген присутствует прежде всего в соединительной ткани. Имеются веские основания полагать, что коллаген повсеместно присутствует в виде правой тройной спирали, скрученной из трёх первичных левых спиралей. Эта левая спираль с шагом 0,96 нм и 3,3 остатка в каждом витке, более пологая по сравнению с α -спиралью. В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь невозможно. Коллаген имеет необычный аминокислотный состав: 1/3 составляет глицин, примерно 10 % — пролин, а также гидроксипролин и гидроксизин. Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путём посттрансляционной модификации. В структуре коллагена постоянно повторяется триплет гли-Х-У, причём положение Х часто занимает пролин, а У — гидроксизин. В тройной спирали каждый третий остаток оказывается в центре, где по стерическим причинам помещается только глицин. Вся молекула коллагена имеет длину около 300 нм.

2.2. β -Структура (β -складчатый слой).

Встречается в глобулярных белках, а также в некоторых фибриллярных белках, например фиброин шёлка (рис. 5).

Полипептидные цепи почти полностью вытянуты, а не туго скручены, как в α -спирали. Плоскости пептидных связей расположены в пространстве подобно равномерным складкам листа бумаги. Стабилизируется водородными связями между СО- и NH-группами пептидных связей соседних полипептидных цепей. Если полипептидные цепи, образующие β -структуру, идут в одном направлении (т. е. совпадают С-

Рис. 5. — Параллельная β -Структура

и N -концы) — *параллельная β -структура*; если в противоположном — *антипараллельная β -структура*. Боковые радикалы одного слоя помещаются между боковыми радикалами другого слоя.

Содержание α -спиралей в белках, изученных к настоящему времени, крайне вариабельно. В некоторых белках, например миоглобине и гемоглобине, α -спираль лежит в основе структуры и составляет 75 %, в лизоциме — 42 %, в пепсине — всего 30 %. Другие белки, например пищеварительный фермент химотрипсин, практически лишены α -спиральной структуры, и значительная часть полипептидной цепи укладывается в слоистые β -структуры.

Доказано, что образованию α -спирали способствуют глутамин, аланин, лейцин, а β -структуры — метионин, валин, фенилаланин; в местах изгиба полипептидной цепи — глицин, пролин, аспаргин.

Простые α -спиральные структуры обычно имеют длину не более 4,5 нм,

но устойчивыми являются более длинные структуры — 100 нм и более (миозин и тропомиозин в мышцах, фибрин кровяного сгустка, кератин волос).

Считают, что шесть сгруппированных остатков, четыре из которых способствуют образованию спирали, можно рассматривать как центр спирализации. От этого центра идет рост спиралей в обоих направлениях до участка — тетрапептида, состоящего из остатков, которые препятствуют образованию этих спиралей. При формировании β -структуры роль затравок выполняют три аминокислотных остатка из пяти, способствующие образованию β -структуры.

В большинстве структурных белков преобладает одна из вторичных структур, что предопределяется их аминокислотным составом. Структурным белком, построенным преимущественно в виде α -спирали, является α -кератин. Волосы (шерсть), перья, иглы, когти и копыта животных состоят главным образом из кератина. В качестве компонента про-

межуточных филаментов кератин (цитокератин) является важнейшей составной частью цитоскелета. В кератинах большая часть пептидной цепи свёрнута в правую α -спираль. Две пептидные цепи образуют единую левую *суперспираль*. Суперспирализованные димеры кератина объединяются в тетрамеры, которые агрегируют с образованием *протофибрилл* диаметром 3 нм. Наконец, восемь протофибрилл образуют *микрофибриллы* диаметром 10 нм.

Волосы построены из таких же фибрилл. Так, в отдельном волокне шерсти диаметром 20 мкм переплетены миллионы фибрилл. Отдельные цепи кератина скреплены поперечно многочисленными дисульфидными связями, что придаёт им дополнительную прочность. При химической завивке происходят следующие процессы: вначале путём восстановления тиолами разрушаются дисульфидные мостики, а затем для придания волосам необходимой формы их высушивают при нагревании. При этом за счёт окисления кислородом воздуха образуются новые дисульфидные мостики, которые сохраняют форму причёски.

Шёлк получают из коконов гусениц тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) и родственных видов. Основной белок шёлка — *фиброин* — обладает структурой антипараллельного складчатого слоя, причём сами слои располагаются параллельно друг другу, образуя многочисленные пласты. Так как в складчатых структурах боковые цепи аминокислотных остатков ориентированы вертикально вверх и вниз, в промежутках между отдельными слоями могут поместиться лишь компактные группировки. Фактически фиброин состоит на 80 % из глицина, аланина и серина, т. е. трёх аминокислот, характеризующихся минимальными размерами боковых цепей. Молекула фиброина содержит типичный повторяющийся фрагмент (гли-ала-гли-ала-гли-сер)_n.

2.3. Неупорядоченная конформация. Участки белковой молекулы, которые не относятся к спиральным или склад-

чатым структурам, называют неупорядоченными.

2.4. Надвторичная структура. α -Спиральные и β -структурные участки в белках могут взаимодействовать друг с другом и между собой, образуя ансамбли. Встречающиеся в нативных белках свёрнутые структуры — энергетически наиболее предпочтительны. К ним относят суперспирализованную α -спираль, в которой две α -спирали скручены относительно друг друга, образуя левую суперспираль (бактериородопсин, гемэритрин); чередующиеся α -спиральные и β -структурные фрагменты полипептидной цепи (например, $\beta\alpha\beta$ -звено по Россману, найдено в НАД⁺-связывающем участке молекул ферментов дегидрогеназ); антипараллельная трёхцепочечная β -структура ($\beta\beta\beta$) называется β -зигзаг и обнаружена в ряде ферментов микроорганизмов, простейших и позвоночных.

3. Третичная структура — способ укладки полипептидной цепи в *трёхмерном пространстве*. По форме третичной структуры белки делятся на глобулярные и фибриллярные. Глобулярные белки имеют эллипсоидную форму, а фибриллярные — нитевидную, вытянутую (форма палочки, веретена). При образовании глобулярных белков гидрофобная часть полипептидной цепи располагается внутри структуры, а гидрофильная — снаружи. Третичная структура стабилизируется связями между *боковыми радикалами аминокислот*. К ним относятся *ковалентная* (дисульфидные) и *нековалентные* (водородные, ионные и гидрофобные).

Каким образом, линейная структура полипептида приобретает уникальную конформацию белка, способного выполнять свою функцию? Как долго длится этот процесс? Цирус Левинталь (Cyrus Levinthal) оценил время, необходимое для создания энергетически оправданной конформации белка, состоящего из 100 аминокислотных остатков. Он подсчитал, что если каждый аминокислотный остаток может быть в трёх различ-

ных конформациях, то общее количество структур будет 3^{100} , или $5 \cdot 10^{47}$. Если время отличия одной структуры от другой принять за 10^{-13} с, то время всего поиска будет $5 \cdot 10^{47} \cdot 10^{-13}$ с, что равно $5 \cdot 10^{34}$ с, или $1,6 \cdot 10^{27}$ лет. В то же время известно, что на образование нативной конформации белка в клетке требуется несколько десятков минут. Такое чудовищное различие во времени перебора возможных конформаций полипептидной цепи и её реального фолдинга (складывания) в клетке получило название парадокса Левинтала.

Для стимуляции образования биологически активной структуры в клетке существуют специфические белки, которые называются *шаперонами*. Они обладают средством к экспонированным гидрофобным участкам полипептидной цепи. Связывание с шаперонами препятствует агрегации с другими белками и тем самым создаёт условия для нормального сворачивания растущего пептида. Взаимодействие с шаперонами — процесс энергозависимый: при освобождении шаперонов гидролизуется АТФ. Шапероны принадлежат к трём белковым семействам, так называемым белкам теплового шока («heat shock proteins», hsp60, hsp70, hsp90), или белкам стресса («stress proteins»). Своё название эти белки получили потому, что их синтез возрастает при повышении температуры и других формах стресса (радиация, тяжёлые металлы, свободные радикалы, токсины и т. д.). При этом они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. Белки — представители семейства hsp70 — связываются на начальной фазе образования растущего пептида. Одни из них контролируют процесс сворачивания белка в цитоплазме, другие — участвуют в переносе белков в митохондрии. Белки hsp60 (шаперонины) охватывают синтезированный полипептид напоподобие бочонка, тем самым обеспечивая условия для принятия правильной конформации.

3.1. Нативная структура белка. Многие белки в третичной структуре име-

ют спирализованные, складчатые и неупорядоченные сегменты. При этом в функциональном и структурном отношении важно взаимное расположение аминокислотных радикалов. *Домены* — анатомически выделяемые участки третичной структуры белка, отвечающие за выполнение определённой функции белка. *Гидрофобные карманы* — полости в третичной структуре, выстланные радикалами гидрофобных аминокислот и необходимые для погружения в молекулу белка гидрофобных лигандов. *Гидрофобные кластеры* — участки поверхности белка, в которых сконцентрированы радикалы гидрофобных аминокислот и служащие для взаимодействия с гидрофобными кластерами других молекул. Каждый белок в *нативном* состоянии имеет *уникальную трёхмерную* структуру (конформация белка), в которой белок выполняет свою биологическую функцию.

Для её выполнения белок приобретает нативную структуру путём уникального складывания полипептидной цепи. Однако многие белки могут модифицироваться путём ковалентного присоединения определённых групп к аминокислотным остаткам полипептидной цепи: 1) присоединение ацетильной группы к концевым аминокислотным остаткам делает белок устойчивым к деградации; 2) присоединение гидроксильной группы к остаткам пролина в коллагене делает коллагеновые фибриллы более прочными; при недостатке витамина С в пище нарушается процесс гидроксирования коллагена и возникают повреждения стенок мелких кровеносных сосудов (кровоточивость и петехии — типичный симптом цинги); 3) для свёртывания крови необходимо образование γ -карбоксиглутамата в протромбине, а при недостатке витамина К этот процесс нарушается, что ведёт к кровоточивости; 4) присоединение олигосахаридных единиц к остаткам аспарагиновой кислоты в белках повышает их гидрофильность и служит для специфического взаимодействия с другими белками; 5) присоединение жирных

кислот к α -аминогруппам аминокислот или сульфгидрильной группе цистеина увеличивает гидрофобность белковой молекулы; 6) многие гормоны (адреналин, глюкагон) регулируют активность ключевых ферментов, запуская процессы их фосфорилирования—дефосфорилирования по остаткам серина и треонина; инсулин запускает процессы фосфорилирования остатков тирозина.

Интересно, что некоторые медузы содержат флуоресцирующий зелёный протеин. За флуоресценцию отвечает трипептид в центре этого белка сертиргли при спонтанном развёртывании и окислении. Такое свойство белка медузы нашло широкое применение при исследовании различных клеток в медицине. Многие белки теряют часть полипептидной цепи при переходе в активное состояние: 1) протеолитический фермент поджелудочной железы трипсин активируется в двенадцатиперстной кишке при отщеплении от трипсиногена шести аминокислотных остатков; 2) при свёртывании крови расщепление пептидных связей ведёт к превращению растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин; 3) ряд гормонов передней доли гипофиза образуется при расщеплении предшественника проопиомеланокортина.

3.2. Денатурация — разрушение третичной и частично вторичной структуры белка с сохранением первичной структуры, т. е. потеря нативной структуры.

1. В зависимости от степени денатурации потеря биологической активности может быть *частичной* или *полной*.

2. При денатурации *изменяются физические свойства* белка, например снижается растворимость и белок выпадает в осадок, поскольку теряются основные факторы устойчивости — заряд и гидратная оболочка. Если после удаления денатурирующего агента восстанавливается нативная структура белковой молекулы, то это называется *ренатурация* (*ренативация*).

3. Денатурированные под действием соляной кислоты белки в желудочно-

кишечном тракте более легко *перевариваются* под действием пищеварительных ферментов.

3.3. Факторы, вызывающие денатурацию.

1. *Химические факторы*: сильные кислоты или щёлочи, органические растворители, детергенты, восстанавливающие агенты, концентрированные соли, тяжёлые металлы.

2. *Физические факторы*: температура, давление, механическое воздействие, ультразвуковое и ионизирующее излучение.

4. Четвертичная структура представляет собой организацию *нескольких полипептидных цепей*, каждая из которых имеет третичную структуру, в единую функциональную молекулу белка. Четвертичной структурой обладают белки с молекулярной массой более 50 000 Да. *Протомер* — отдельная полипептидная цепь в третичной структуре, не выполняющая функцию белка. *Субъединица* — протомер или объединение нескольких протомеров, способных выполнять часть функций белка. *Олигомер* (мультимер) — сочетание протомеров или субъединиц в четвертичной структуре белка, несущих полную функциональную активность белка. Четвертичная структура стабилизируется *нековалентными связями* между *протомерами* (водородные, электростатические, гидрофобные взаимодействия). При разрушении связей, стабилизирующих четвертичную структуру, происходят разделение субъединиц и потеря функции белка.

5. Взаимосвязь структуры и функции.

Рассмотрим на примере двух белков: миоглобина, имеющего третичную структуру и способного запасать кислород, и гемоглобина, имеющего четвертичную структуру (4 субъединицы, каждая из которых напоминает глобулу миоглобина) и способного как связывать, так и транспортировать кислород.

5.1. Миоглобин.

Миоглобин является белком мышечной ткани, который депонирует кислород и транспортирует его к митохондриям. Для выполнения этой функции миоглобин должен обладать способностью связывать кислород при низком парциальном давлении кислорода, когда гемоглобин его отдаёт. Кривая насыщения миоглобина кислородом имеет вид гиперболы (рис. 6). Парциальное давление кислорода pO_2 в ткани, окружающей лёгочные капилляры составляет 100 мм рт. ст. Поэтому миоглобин в лёгких мог бы весьма эффективно насыщаться кислородом. В венозной крови pO_2 равно 40 мм рт. ст., а в активно работающей мышце — около 20 мм рт. ст. Но даже при таком pO_2 степень насыщения миоглобина кислородом будет весьма высокой (около 80 %), и поэтому миоглобин не может отдавать кислород тканям. Однако при кислородном голодании (тяжёлая физическая нагрузка) pO_2 уменьшается до 5 мм рт. ст. и миоглобин может отдавать связанный кислород.

Структура миоглобина. Миоглобин является глобулярным белком (м.м. 17 000 Да), который состоит из 153 аминокислотных остатков. Около 75 % полипептидной цепи спирализовано и образует 8 правых α -спиралей (обозначается буквами от А до Н). Полярные гидрофильные фрагменты расположены снаружи спирали, а неполярные гидрофобные — внутри молекулы (рис. 7).

Гем является простетической группой миоглобина и гемоглобина. Без гема миоглобин не может связывать кислород. Гем состоит из железа (Fe^{2+}) и протопорфиринового кольца — протопорфирин IX. Ион (Fe^{2+}) связан 4 координационными связями с пиррольными кольцами протопорфирина IX. Гем находится в гидрофобном кармане молекулы миоглобина. Пятая координационная связь образуется между атомом железа и остатком гистидина F8 (проксимальный гистидин). Шестая координационная связь образуется с молеку-

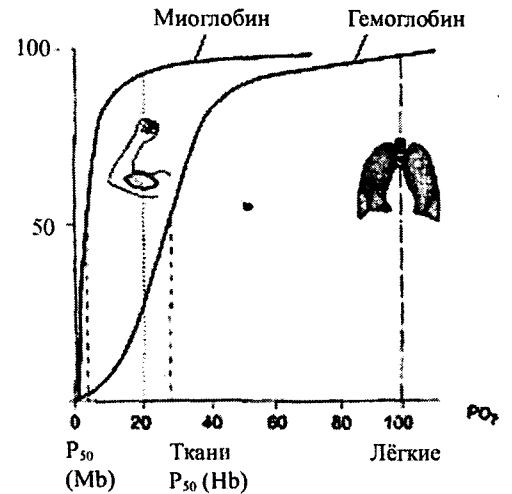


Рис. 6. — Кривая насыщения миоглобина и гемоглобина кислородом

лой кислорода, который встраивается между атомом железа и дистальным гистидином E7. В неокисигенированном миоглобине атом железа на 0,03 нм выступает из плоскости кольца в направлении гистидина F8. При связывании молекулы O_2 с шестой координационной связью железа (оксигенированный миоглобин) атом железа втягивается в плоскость гема и выступает из неё только на 0,01 нм.

Таким образом, связывание O_2 с молекулой миоглобина приводит к перемещению атома железа и перемещающийся атом железа будет изменять положение проксимального гистидина F8, а следовательно, и конформацию α -спирали F и всей глобулы миоглобина.

6. Гемоглобин.

Гемоглобин находится в эритроцитах и участвует в транспорте кислорода от лёгких к тканям и углекислого газа от периферических тканей к лёгким. Гемоглобин обладает способностью связывать кислород при высоком парциальном давлении кислорода (в лёгких) и высвобождать его в периферических тканях.

Гемоглобин — тетрамер, состоящий из четырёх нековалентно связанных субъединиц, которые по структуре на-

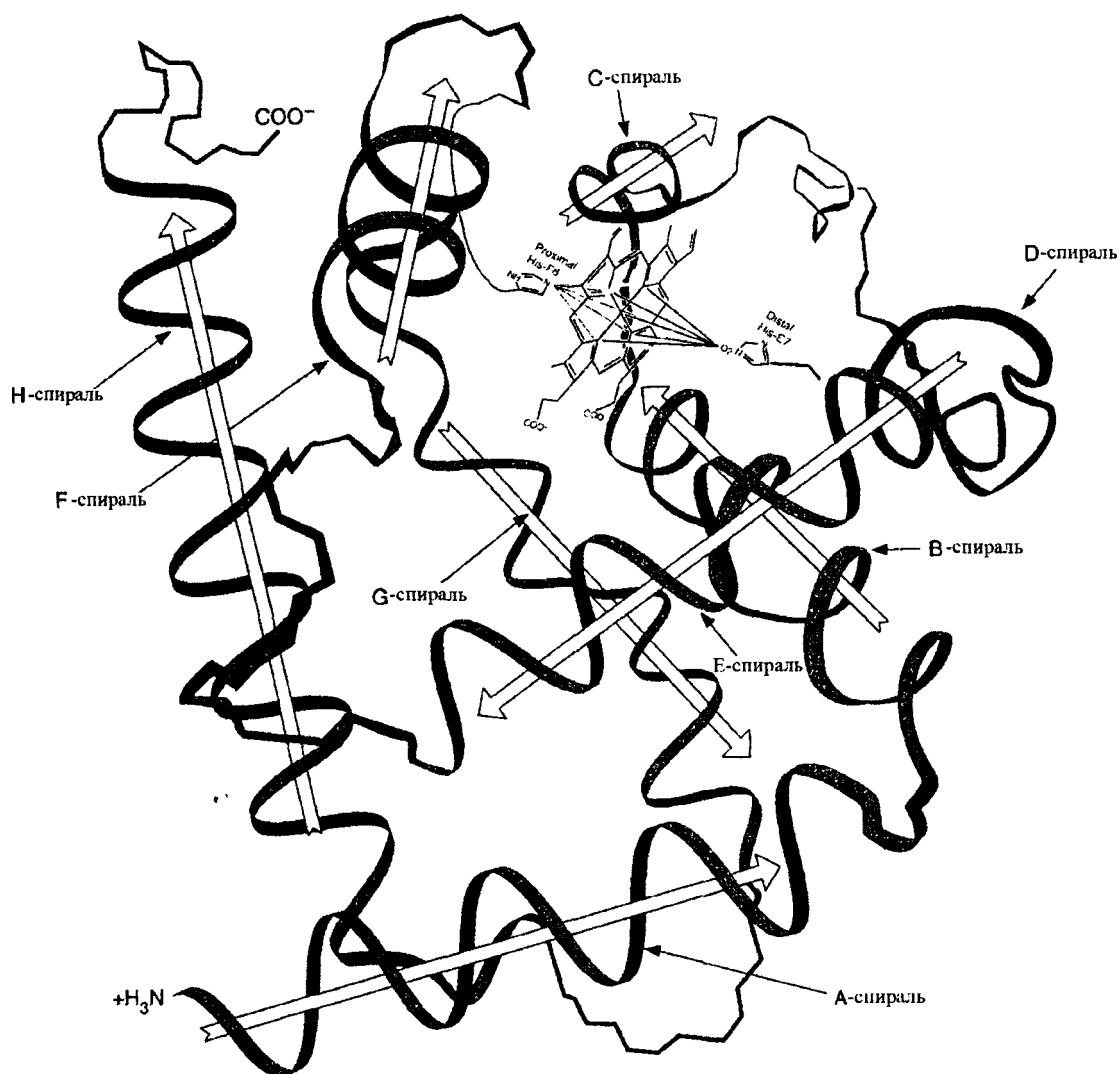


Рис. 7. — Структура миоглобина

поминают миоглобин (гемоглобин A₁ состоит из $\alpha_2\beta_2$). Подобно миоглобину, каждая субъединица имеет гидрофобный карман, в котором находится гем. Кривая насыщения гемоглобина кислородом имеет S-образный (сигмоидный) характер. В сравнении с миоглобином гемоглобин связывает кислород при высоком парциальном давлении кислорода в лёгких и отдаёт его в мышцах, где миоглобин связывает кислород.

Кооперативный эффект. При связывании кислорода с шестой координационной связью железа ион железа втягивается в плоскость кольца. Это приводит к изменению конформации всей поли-

пептидной цепи, что облегчает связывание второй молекулы O₂. В итоге кривая связывания кислорода гемоглобином имеет S-образный вид. Такой тип зависимости определяется кооперативным (совместным) действием всех субъединиц в интересах всей молекулы гемоглобина. Наличие кооперативного эффекта даёт гемоглобину новое свойство транспорта газов: при 100 мм рт. ст. (в лёгких) молекула гемоглобина полностью оксигенируется (получает 4 молекулы O₂). Ниже 80 мм рт. ст. молекула гемоглобина отдаёт O₂. Например, при pO₂ = 20 мм рт. ст. гемоглобин насыщен примерно на 20 % кислородом,

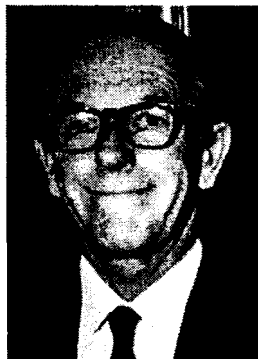
а миоглобин — на 82 %. Очевидно, что оксигемоглобин будет отдавать O_2 , а миоглобин его связывать.

Большинство внутриклеточных белков относятся к олигомерным; внеклеточные белки, как правило, являются мономерами с небольшой молекулярной массой, а белки плазмы крови — крупные мономеры. Почему? *Внутри клеток* преобладают *олигомерные белки*, поскольку они: 1) снижают осмотическое давление; 2) хорошо регулируются эффекторами; 3) при наличии идентичных протомеров для их синтеза требуется меньшее количество генетического материала, а следовательно,

прогнозируется меньшее число ошибок; 4) устранение дефектных молекул возможно методами диссоциации — повторной ассоциации протомеров. *Внеклеточные белки*, например эктоферменты пищеварительных органов, *мономерны*, так как из-за неопределённости их судьбы вне клетки требуется большее количество молекул с относительно низкой молекулярной массой. И наконец, *белки плазмы крови* относятся к *крупным мономерам*, включающим несколько доменов в связи с необходимостью сохранения их в кровеносном русле (такие белки в норме не преодолевают гисто-гематические барьеры).

Список использованной литературы

1. *Филиппович, Ю. Б.* Основы биохимии / Ю. Б. Филиппович. — М.; СПб. : Агар; Флинта, 1999.
2. *Чиркин, А. А.* Биохимия с основами молекулярной биологии : учебно-методический комплекс для студентов биологического факультета / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко. — Витебск : ВГУ, 2006.
3. *Berg, J. M.* Biochemistry / J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. — N.-Y. : W. H. Freeman and Company, 2002.
4. *Ganten, D.* (Eds.) Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine / D. Ganten, K. Ruckpaul. — N.-Y. : Springer, 2006.



Из истории химии

Первым белком, для которого была расшифрована первичная структура, был инсулин. Эту работу проделал в 1953 году Фредерик Сэнгер (**Sanger**), за что был удостоен Нобелевской премии по химии (1958). А спустя почти 40 лет Дороти Кроуфут Ходжкин (Hodgkin) с помощью метода рентгеновской дифракции определила пространственное строение молекулы инсулина. Её работы также отмечены Нобелевской премией (1964).

Подготовила Н. А. Ильина