

И. В. ШУГАЛЕЙ, А. В. ГАРАБАДЖИУ, И. В. ЦЕЛИНСКИЙ

ХИМИЯ БЕЛКА

Учебное пособие



Санкт-Петербург

2010

Рецензенты:

ISBN

Шугалей, И. В.

Химия белка : учебное пособие / И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджиу, И. В. Целинский. — СПб.: Проспект Науки, 2010. — 200 с.

Приведены закономерности построения и классификация белковых молекул, их свойства и функции белков в живом организме. Описаны свойства аминокислот и пептидов. Систематизирован материал по радикальным и радикально-цепным реакциям с участием белковых молекул. Рассмотрены важнейшие аспекты аналитической и препаративной химии белков. Изложены основные направления развития белковой химии.

Книга предназначена для студентов вузов по специальностям «Биотехнология», «Химическая технология органических соединений азота» и «Безопасность технологических процессов и производств». Будет полезна аспирантам и исследователям, интересующимся химией живого, биохимией и экологией.

ISBN

© И. В. Шугалей, А. В. Гарабаджиу, И. В. Целинский, 2010
© ООО «Проспект Науки», 2010

Содержание

Введение	7
1. Белки — особый вид биополимеров, носителей жизни	9
2. Содержание белка в различных биологических материалах	10
3. Биологические функции белков	10
4. Основные характеристики белка	14
Молекулярная масса белковых молекул	14
Элементный состав белков. Белки — важнейшие азотсодержащие биомолекулы	15
5. Аминокислоты — основные структурные звенья белковой молекулы	15
5.1. Пептидная связь и ее характеристики	15
5.2. Качественные реакции на пептидную связь	17
5.3. Протеиногенные аминокислоты и особенности их строения	17
5.4. Обозначения аминокислот	25
5.5. Оптическая изомерия аминокислот	25
5.6. Классификация протеиногенных аминокислот	27
5.7. Получение α -аминокислот	28
5.8. Свойства протеиногенных аминокислот	32
Кислотно-основные свойства	32
Химические свойства α -аминокислот. Способность α -аминокислот к комплексообразованию	36
Химические свойства α -аминокислот, обусловленные наличием карбоксильной группы	37
Химические свойства α -аминокислот, обусловленные наличием аминогруппы	42
5.9. Качественные реакции на α -аминокислоты	47
Общая качественная реакция на α -аминокислоты	47
Специфические качественные реакции на группы протеиногенных аминокислот и отдельные α -аминокислоты	47
5.10. Непротеиногенные аминокислоты	53
5.10.1. Отдельные представители непротеиногенных аминокислот	55
γ -Аминомасляная кислота (ГАМК)	55
β -Аланин	56
D-аминокислоты	56
6. Пептиды	57
6.1. Номенклатура пептидов и белков	57
6.2. Биологические функции пептидов	58
6.3. Структурная классификация пептидов	61
6.3.1. Канонические и неканонические пептиды	61
6.3.2. Неканонические пептиды	62
6.3.2.1. Представители модифицированных малых пептидов	62
6.3.2.2. Небольшие линейные пептиды. Глутатион	63

6.3.2.3. Циклические дипептиды (2,5-диоксопиперазины)	65
6.3.2.4. Циклические гомодетные пептиды	65
6.3.2.5. Циклические гетеродетные пептиды	67
6.3.2.6. Крупные модифицированные пептиды	69
7. Уровни структуры полипептидов и белков	70
7.1. Первичная структура белков	70
7.1.1. Гомологичные белки	73
Признаки гомологичных белков	73
Антитела как гомологичные белки	74
7.2. Высшие уровни структуры белковой молекулы	75
7.2.1. Вторичная структура белковой молекулы	75
α -Спираль — одна из форм вторичной структуры	75
β -Складчатая структура белковых молекул	77
7.2.2. Третичная структура белка. Форма белковых молекул	79
7.2.2.1. Фибриллярные белки	80
7.2.2.2. Глобулярные белки	81
7.2.3. Четвертичная структура белка	83
Гемоглобин как представитель олигомерных белков	85
7.3. Характеристика связей, участвующих в структурной организации пептидов и белков	86
8. Денатурация белка	88
8.1. Химические денатурирующие агенты	89
8.2. Ренатурация	91
8.3. Свойства денатурированных белков	92
8.4. Денатурация как предельный вариант функционально-конформационных переходов в молекуле белка	92
9. Кислотно-основные свойства пептидов и белков как свойства, определяемые только их первичной структурой	94
9.1. Наиболее вероятные кислотно-основные превращения белков и пептидов	94
9.2. Понятие об изоэлектрической точке белка	95
10. Основные принципы классификации белков	96
Классификация по выполняемым функциям	96
10.1. Физико-химическая классификация белков	96
10.2. Классификация белков по полярным признакам	97
10.3. Классификация белков по структурным признакам	97
10.3.1. Простые белки	98
Протамины и гистоны	98
Гистоны	98
Протамины	99
Растительные белки: проламины и глютелины	99
Проламины	100
Глютелины	101
Альбумины и глобулины	101
Альбумины	102
Альбумин плазмы крови	102
Глобулины	103
Протеиноиды	105
Относительность понятия «простой белок»	105

10.3.2. Белок-небелковые комплексы или сложные белки	105
10.3.2.1. Нуклеопротеиды	105
Вирус табачной мозаики как представитель нуклеопротеидов	106
10.4.2.2. Фосфопротеиды	107
Казеиноген как представитель фосфопротеидов	107
Гликопротеиды	109
Протеогликаны	112
10.3.2.4. Липопротеиды	115
10.3.2.5. Металлопротеиды	118
10.3.2.6. Хромопротеиды	120
Гемопропротеиды	120
Неферментные гемопропротеиды	121
Миоглобин как представитель неферментных гемсодержащих белков	121
Гемоглобин как представитель неферментных гемсодержащих белков	123
Ферментные гемопропротеиды	127
Каталаза	127
Цитохромы	128
Пероксидазы	129
Хлорофилл	129
10.4.2.6.2. Флавопротеиды	132
Сукцинатдегидрогеназа	134
11. Белок-белковые взаимодействия	135
Молекулярные шапероны	135
Катепсины	136
Белки теплового шока	136
Цитокины	137
12. Фолдинг белков	137
13. Некоторые аспекты препаративной и аналитической химии белка	139
13.1. Основные этапы выделения белка из биологического материала	139
13.2. Некоторые методы очистки и фракционирования белков	140
13.2.1. Диализ	141
Высаливание	142
Электрофоретические методы разделения белка	143
Изоэлектрическое фокусирование белков	144
Иммуноэлектрофорез	144
Хроматографическое разделение белков	145
Гель-хроматография (гель-фильтрация)	146
Аффинная хроматография	147
Распределительная хроматография	147
13.3. Методы количественного определения белка в биологическом материале	148
Биуретовый метод	148
Метод Лоури	149
Определение белка по азоту. Метод Кьельдаля	150
13.4. Иммуноферментный анализ	151
13.5. Определение аминокислотной последовательности полипептидной цепи	152
Определение N-концевой аминокислоты Метод Сенгера	152
Действие аминопептидазы	152
Определение C-концевой аминокислоты	152

Определение аминокислотной последовательности полипептидной цепи	152
Метод Эдмана	153
13.6. Определение молекулярной массы белков	154
Метод гель-хроматографии на колонках	154
Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия	155
14. Гидролиз белка	156
Ферментативный гидролиз	157
15. Применение растворов аминокислот, белков и пептидов, а также белковых гидролизатов в медицине	159
15.1. Короткие природные и синтетические пептиды как новые перспективные лекарственные средства	160
15.2. Препараты гидролизатов белков	161
15.3. Растворы белков	161
16. Некоторые аспекты модификации и деструкции белковых систем	163
16.1. Некоторые реакции модификации простетических групп сложных белков на примере гемоглобина	163
Вырожденно-разветвленная реакция метгемоглобинообразования под действием нитрита натрия	164
Цепные процессы метгемоглобинообразования, не осложненные вырожденным разветвлением цепей	165
16.2. Пероксидное повреждение белков	166
16.3. Пероксидное повреждение липопротеидов	174
17. Синтетические пептиды и белки	175
Основные методы наращивания полипептидной цепи	176
18. Функциональные аналоги белков	181
18.1. Пептидомиметики как ингибиторы ферментов	182
18.2. Пептидо-нуклеиновые кислоты	184
Заключение	186
Литература	187

Введение

Сегодня привлекательным выглядит утверждение о революции в науках о живых системах. Очевидно, что фундаментальные прорывы в этой области знаний связаны с формированием на стыке биологии и химии комплекса наук, среди которых центральное место занимают молекулярная биология, биоорганическая химия, биотехнология. Сопоставляя цели, задачи и объекты исследований этих областей знаний, мы с легкостью можем обнаружить, что общим, объединяющим объектом исследования являются биополимеры — белки и пептиды, нуклеиновые кислоты и полинуклеотиды, липиды, полисахариды и т. д.

Тот факт, что большинство наиболее тонких биологических процессов — обмен веществ, структура и функции каждой клетки в решающей степени определяются белками, обуславливает пристальный интерес к ним современной науки. Белки — высокомолекулярные соединения, полностью или большей частью построенные из аминокислот, составляют основную часть органических веществ, содержащихся в клетке. Причем, если клетка кишечной палочки *Escherichia coli* содержит около 3 000 различных белков, то человеческий организм — более 1 000 000, а молекулярные массы белков охватывают интервал от 6 000 до 1 000 000 и более. Многообразие функций белков поражает самое смелое воображение. Структурные и каркасные белки являются важнейшими элементами защитных и соединительных тканей; иммуноглобулины играют решающую роль в иммунной системе организма, фибриноген и тромбин действуют как факторы свертывания крови. Особые белки принимают участие в построении мембраны и тем самым ответственны за отделение клетки от внешней среды и разделение внутриклеточного пространства. Белки — переносчики осуществляют, например, электронный перенос при дыхании и фотосинтезе, в других случаях они транспортируют продукты обмена веществ. Кислород в крови переносится гемоглобином, железо — трансферрином, медь — альбумином и т. д. Резервные белки, такие как альбумин яичного белка или казеиноген молока образуют запас аминокислот для растущего эмбриона и организма. Сократительные белки — актин и миозин действуют совместно в двигательном процессе мышечного сокращения. Рецепторные белки способствуют специфическому связыванию активного вещества с соответствующей «мишенью». Белки с антивирусными свойствами, интерфероны, образовываясь после первичной вирусной инфекции в организме, подавляют дальнейшее размножение вирусов. Таким образом, даже такой беглый обзор функциональных особенностей белков, дает представление о центральной роли в организме этого класса веществ.

История химии белка необычайно увлекательна и уходит своими корнями в XVIII век. Белок попал в число объектов химических исследований более чем 270 лет назад, когда итальянский ученый Я. Беккари в 1728 г. получил из пшеничной муки первый препарат белкового вещества — клейковину. Он подверг клейковину сухой перегонке и обнаружил, что продукт такой перегонки был щелочным. Он опубликовал результаты своей работы в 1745 г. Это была первая работа о белке.

Первые экспериментальные анализы белков были проведены Ж. Гей-Люссаком и А. Тенаром в 1810 г., причем для белков растительного и животного происхождения результаты оказались достаточно близкими. В 1836 г. голландец Г. Мульдер высказал

мнение, что все белки содержат один и тот же радикал, названный им протеином (от греческого слова «первенствую»). Позже, в 1838 г. Г. Мульдер опубликовал формулу белков, построенную на основании теории протеина. Однако данные об элементарном составе белковых веществ, вычисляемые эмпирические формулы белков практически ничего не дали науке для познания зависимости свойств белков от их состава. К тому же проверка аналитических данных Г. Мульдера, выполненная Ю. Либихом и его учениками, показала, что никакого «белкового радикала» не существует. Однако дискуссия между сторонниками и противниками теории протеина усилила интерес к аналитическому исследованию белков и способствовала укреплению нового, физиолого-химического подхода к процессам разложения белков в ходе пищеварения. В середине XIX века были разработаны методы экстракции белковых веществ, очистки и выделения их путем осаждения в растворах нейтральных солей, наконец, в 1847 г. К. Рейхерт открыл способность белков образовывать кристаллы. Выделенные и описанные им кристаллы гемоглобина, были первыми достоверно обнаруженными кристаллами белков.

К шестидесятым годам XIX века многочисленные исследования показали, что под действием разлагающих ферментов (протеаз) белки распадаются на фрагменты, получившие название пептонов. При этом было установлено, что среди продуктов разложения накапливаются вещества, которые не подвергаются дальнейшему действию ферментов. Часть подобных веществ была несомненными пептонами, однако, часть относилась к известному уже с начала века классу соединений — аминокислот. Как показали дальнейшие исследования, это имело решающее значение для установления физической и химической природы белков.

Остановившись на этой стадии истории химии белка, авторы вправе отослать читателя к известным обзорам, и вернуться к не менее увлекательным современным исследованиям по химии белка.

На пороге XXI века был завершен гигантский проект «геном человека», длившийся около 10 лет. Вложение примерно 3 миллиардов долларов в решение этой проблемы привело к тому, что прочитано три миллиарда оснований нуклеиновых кислот. В результате этого картированы все 23 хромосомы человека, стали известны десятки, даже сотни генов, которые ответственны за развитие наследственных заболеваний. Человеческий геном расшифрован, но чтобы воспользоваться плодами нового знания, произвести переворот в медицинской диагностике и терапии, нужны знания о структуре и функции белков. Ведь не будь белков, генетический код никогда бы не заработал. Таким образом, если гены — «душа» наследственности, то белки — ее «плоть и кровь».

Итак, на наших глазах из геномики выросла новая наука — протеомика, задача которой «инвентаризация» белков. Это потребует титанических усилий научного сообщества, поскольку структура белковых молекул гораздо сложнее структуры полинуклеотидов, а функции гораздо разнообразнее. Через изучение химии белков мировое научное сообщество придет к возможности улучшить здоровье человечества, победить многие наследственные и тяжелые заболевания, получит новые материалы с уникальными свойствами, научится управлять многими биологическими процессами на молекулярном уровне.

Предлагаемое вниманию читателей издание представляет собой значительно расширенный раздел курса «Биологическая химия», читаемого для студентов факультета тонкого химического и микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета), может быть полезно аспирантам и исследователям, интересующимся химией живого, биохимией и экологией.

1. БЕЛКИ — ОСОБЫЙ ВИД БИОПОЛИМЕРОВ, НОСИТЕЛЕЙ ЖИЗНИ

Белками называются высокомолекулярные азотсодержащие органические вещества, состоящие из остатков α -аминокислот, соединенных в цепи с помощью пептидных связей и имеющие сложную структурную организацию. Белки являются линейными неразветвленными полимерами.

Белки, или протеины (от греч. «protos» — первый, важнейший), являются важнейшей составной частью клеток любого живого организма. Они не встречаются в неживой природе. Белкам принадлежит решающая роль во всех процессах жизнедеятельности.

Белки составляют материальную основу химической активности клетки и всегда привлекали пристальное внимание исследователей.

Химия белка имеет более чем двухсотлетнюю историю. Это особая область, которая всегда соединяла в себе идеи и методы биологии, медицины, химии и физики.

Идеи глубокого всестороннего изучения белков лежат в основе нового направления в биохимии — протеомики. Впервые термин протеомика был введен в 1995 году. Наука протеомика преследует цель инвентаризации всех белков, закодированных в геноме определенного организма, и их взаимодействий между собой. В настоящее время мы далеки от понимания всего многообразия белковых структур живой клетки.

Одним из важнейших проектов, который уже реализуется, является создание банка всех природных белковых структур. Такая инвентаризация может быть проведена на основе международной кооперации и систематизации данных о структуре различных белков. В 2001 году Международным консорциумом ученых, бизнесменов и политиков создана новая организация NPO (National Proteome Organization), целью которой является инвентаризация всех белков человека, построение молекулярных белковых атласов клеток, органов и тканей, схем белок-белковых взаимодействий, специальных баз данных и поиск новых маркеров патологических процессов. Изучение структуры белка ведется также с целью создания лекарственных средств, с целью ранней диагностики тяжелых заболеваний. В последнее время установлено, что нарушения высших уровней структуры белка и развитие таких заболеваний как рак и болезнь Паркинсона, тесно связаны между собой.

Так, метастазирование связано с функционированием специфических, имеющих белковую природу рецепторов плазматической мембраны — интегринов.

Молекула такого рецептора представляет собой гетеродимер, состоящий из единичных нековалентными связями α - и β -субъединиц. Роль интегринов состоит в проведении сигналов от матрикса к внутриклеточным структурам, контролирующим движение клеток, их пролиферацию, дифференцировку и апоптоз (запрограммированную клеточную гибель).

Показано, что конформационные изменения белков данной группы способны привести к глубокому изменению клеточного цикла. Высокие темпы накопления информации по структуре белков, связи их конформационных изменений с развитием серьезных заболеваний требуют всесторонней систематизации материала. База данных белковых структур формируется в Европейском институте биоинформатики (Великобритания).

2. СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКА В РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ

Белки, составляющие материальную основу жизни, присутствуют во всех клеточных организмах и обеспечивают разнообразные жизненные функции организмов всех уровней сложности, начиная от вирусов и кончая теплокровными животными.

Белки составляют значительную часть тканей живого организма: до 25 % сырой и до 45–50 % сухой их массы. В растительных тканях белков значительно меньше, чем в животных, но даже малое количество белков в некоторых клетках не говорит о том, что их роль в жизнедеятельности невелика.

Распределение белков между субклеточными структурами неравномерно: больше всего их в клеточном соке (гиалоплазме) (таблица 1).

Таблица 1

Примерное распределение белка (в % от общего белка клетки) в субклеточных фракциях клеток печени

Клеточный компартмент	Процент общего белка клетки
ядро	12,0
митохондрии	20,0
лизосомы	2,0
микросомы	20,0
пероксисомы	2,5
плазматическая мембрана	1,5
гиалоплазма (внутриклеточный сок)	40,0
прочие частицы	2,0

3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Трудно назвать биологические процессы, в которых белки не принимают участия. Лишь генетическая функция принадлежит не белкам, а нуклеиновым кислотам.

Для удобства систематизации материала по биологическим функциям белков основные примеры представлены в виде таблицы (таблица 2).

Таблица 2

Биологические функции белков и их характеристика

Функция	Характеристика функции	Примеры белков, осуществляющих данную функцию
Каталитическая или ферментативная	Биологические катализаторы химических реакций (все ферменты — белки)	Открыто более 2000 ферментов (<i>малатдегидрогеназа</i> , <i>фумараза</i> , <i>ацетилхлинэстераза</i>)

Функция	Характеристика функции	Примеры белков, осуществляющих данную функцию
Регуляторная (гормональная)	Регуляция обмена веществ внутри клеток и интеграция обмена в рамках целого организма	<i>Инсулин</i> — участвует в регуляции углеводного, белкового, жирового и других обменов; <i>Паратиреоидный гормон</i> — регулирует транспорт ионов Ca^{+2} и фосфатов; <i>Белки-репрессоры</i> — регулируют биосинтез белков в клетках;
Рецепторная	Избирательное связывание различных регуляторов (гормонов, медиаторов, циклических нуклеотидов) на поверхности клеточных мембран или внутри клетки (цитозольные рецепторы)	<i>Цитозольный рецептор эстрадиола</i> — связывает эстрадиол внутри клеток, например слизистой матки; <i>Глюкагоновый рецептор</i> — связывает гормон глюкагон на поверхности клеточной мембраны, например печени; <i>Регуляторная субъединица протеинкиназы</i> — связывает ц-АМФ внутри клеток; <i>Родопсин</i> — светочувствительный белок сетчатки глаза, регулирующий остроту зрительного восприятия и световую адаптацию <i>Никотиновый холинорецептор</i> — мембранный белок, участвующий в формировании совместной зависимости от никотина и этанола. <i>Белки мембранных каналов</i> — регулируют клеточный транспорт. Молекула белка Na^{+} — канала — гликопротеид с $M = 300000$
Транспортная	Связывание и транспорт веществ между тканями и через мембраны клеток	<i>Липопротеиды</i> — участвуют в переносе липидов между тканями организма; <i>Транскортин</i> — переносит кортикостероиды (гормоны коры надпочечников) в крови; <i>Гемоглобин</i> — транспорт O_2 от легких к тканям и CO_2 от тканей к легким; <i>Трансферрин</i> — перенос ионов железа (Fe^{+2})
Структурная	Участвуют в построении различных клеточных структур	<i>Структурные белки митохондрий, плазматической мембраны, белки рибосом и т. д.</i>
Опорная или механическая	Близкая по значению к структурной. Обеспечивает прочность опорных тканей, участвует в построении внеклеточных структур	<i>Коллаген</i> — структурный элемент опорного каркаса костной ткани, сухожилий; <i>Фиброин</i> — участвует в построении оболочки кокона шелкопряда; <i>Кератин</i> — структурная основа волос, чешуи, шерсти, ногтей, перьев, панциря, рогов, копыт

Функция	Характеристика функции	Примеры белков, осуществляющих данную функцию
Резервная, трофическая	Использование белков как запасного материала для питания развивающихся клеток	<i>Проламины и глютелины</i> — запасной материал семян; <i>Овальбумин</i> — белок куриного яйца (используется при развитии зародыша)
Субстратно-энергетическая	Белок используется как субстрат (при распаде) для получения энергии: 1 г белка дает 17,1 кДж энергии	<i>Все белки</i> (поступающие с пищей и внутриклеточные) распадаются в процессе их использования как энергетического сырья до CO ₂ , H ₂ O и мочевины
Механическая или сократительная	Сокращение (механический процесс) с использованием химической энергии	<i>Миозин</i> — закрепленные нити в миофибриллах, обеспечивающие мышечные сокращения; <i>Актин</i> — движущиеся нити в миофибриллах при мышечном сокращении
Электроосмотическая	Участие в образовании электрических зарядов и градиента концентраций ионов на мембране	<i>K⁺, Na⁺ -АТФаза</i> — фермент, участвующий в создании разности концентраций K ⁺ и Na ⁺ и электрического заряда на клеточной мембране
Энерготрансформирующая	Трансформация электрической и осмотической энергии в химическую энергию АТФ	<i>АТФ-синтетаза</i> — осуществляет синтез АТФ за счет разности электрических потенциалов или осмотической концентрации ионов на сопрягающей мембране
Геннорегуляторная	Способность некоторых белков участвовать в регуляции матричных функций нуклеиновых кислот и переносе генетической информации	<i>Гистоны</i> — белки, участвующие в регуляции репликации и частично транскрипции участков ДНК; <i>Кислые белки</i> — участвуют в регуляции процесса транскрипции отдельных участков ДНК
Когенетическая	Вспомогательная генетическая функция белков (приставка «ко» в переводе с латинского означает совместное действие). Сами белки не являются генетическим (наследственным) материалом, но помогают нуклеиновым кислотам реализовать способность к самовоспроизведению и переносу информации	<i>ДНК-полимераза</i> — фермент, участвующий в репликации ДНК; <i>ДНК-зависимая РНК-полимераза</i> — фермент, участвующий в переносе информации от ДНК к РНК

Функция	Характеристика функции	Примеры белков, осуществляющих данную функцию
Иммунологическая или анти-токсическая	Антитела участвуют в обезвреживании чужеродного материала путем образования комплекса антиген — антитело	<i>Иммуноглобулины</i> — А, М, G и другие обеспечивают связывание чужеродных организму субстанций; <i>Комплемент</i> — белок, способствующий образованию комплекса антиген — антитело; <i>Интерлейкин</i> — белок, участвующий в активации Т-лимфоцитов, играющих центральную роль в клеточном иммунитете
Защитная	Обеспечивают способность биологических жидкостей сохранять реологические свойства при изменении условий окружающей среды	<i>Специальные белки со свойствами антифриза</i> , предохраняющие кровь рыб от замерзания
Токсигенная	Некоторые белки и пептиды, выделяемые одними организмами, являются ядовитыми для других	<i>Ботулинический токсин</i> — пептид, выделяемый палочкой ботулизма; <i>Дифтерийный токсин</i> — выделяется дифтерийной палочкой; <i>Змеиные яды</i>
Обезвреживающая	Белки способны связывать токсические соединения (тяжелые металлы, алкалоиды), обезвреживая их	<i>Альбумины</i> — связывают тяжелые металлы, алкалоиды, многие лекарства, органические яды
Гемостатическая	Участвуют в образовании тромба и остановке кровотечения	<i>Фибриноген</i> — белок плазмы крови, полимеризуется с образованием сетчатой структуры, составляющей структурную основу тромба
Лекарственная	Экзогенные пептиды, синтезируемые микроорганизмами, используются как лекарственные средства	<i>Многие антибиотики</i>

В качестве дополнительных примеров, иллюстрирующих многообразие функций, выполняемых белками, можно привести хемокины — группу небольших белков, M = 800–1200, вызывающих миграцию клеток. Первый представитель этой группы открыт около 25 лет назад. Сейчас известно 44 хемокина и 19 белков-рецепторов хемокинов. Они управляют миграцией лейкоцитов к месту воспаления. С их функционированием связаны процессы развития атеросклероза. Эти белки могут функционировать как ангиогенные и ангиостатические факторы, то есть управлять процессом роста сосудов.

Также следует подчеркнуть когенетическую функцию белков. В эукариотических клетках контроль транскрипции осуществляется сложной системой активато-

ров и факторов транскрипции (ФТ), включающей как высокомолекулярные ФТ, так и низкомолекулярные полипептиды и олигопептиды. По мере накопления новых экспериментальных данных увеличивается число белков и пептидов, участвующих в контроле, активации и транскрипции генов. Выявлено более 300 участников этих процессов, имеющих пептидную природу.

В настоящее время идентифицированы антигенные белки различных патогенов, ответственных за индукцию в инфицированном организме иммунного ответа.

В качестве одной из разновидностей транспортной функции белков можно рассматривать формирование белковых каналов.

Белковые каналы образуются с участием одного из наиболее распространенных классов интегральных белков мембран. Их важнейшей структурной особенностью является то, что, находясь в мембранном окружении, они формируют трансмембранные поры, существенно облегчающие перенос ионов и небольших полимерных молекул как внутрь клетки, так и наружу.

Ряд белков выполняет роль тонких регуляторов продолжительности клеточного цикла. Установлено, что цитохром с, прокаспазы, фактор индукции апоптоза являются индукторами запрограммированной клеточной гибели (апоптоза).

Функция белка может меняться в зависимости от его локализации в клеточном компартменте. Например фермент — цитохром с, локализованный в норме в митохондриях, участвует в производстве энергии. Однако после выхода в цитоплазму он взаимодействует со специфическими белками — активаторами протеаз. Образующийся комплекс стимулирует процесс программируемой гибели клетки.

4. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКА

Молекулярная масса белковых молекул

Большая молекулярная масса — важнейший признак белков (таблица 3).

Различают:

- Пептиды — $M < 1000$;
- Полипептиды — $1000 < M < 4000$;
- Собственно белки — $M > 4000$.

Однако такое деление является искусственным и достаточно условным.

Таблица 3

Молекулярная масса некоторых белков

Белок	Масса	Белок	Масса
Глюкагон	4000	Альбумин сыворотки крови человека	69000
Инсулин	6000	Церулоплазмин	160000
Рибонуклеаза	13700	Фибриноген	341000
Трипсин	23800	Глутаматдегидрогеназа из печени быка	1000000
Эритропоэтин	34000	Гемоцианин улитки	9000000
Гемоглобин	64800		

Несмотря на то, что белки — чрезвычайно крупные молекулы, в настоящее время многие из них выделены в кристаллической форме. Получены кристаллы миоглобина, гемоглобина и других белков. Кристаллы различных белков изучены методом

рентгеноструктурного анализа. Однако до сих пор остается неясным, как белковые молекулы упаковываются в кристаллы.

При формировании кристаллов имеет место процесс агрегации с образованием олигомеров. Например, канаванин образует тримеры. Свина аденилатциклаза при кристаллизации образует димеры. Далее такие ансамбли соединяются в кристаллы.

Кристаллы белков имеют различную форму. Например, свиная аденилатциклаза имеет кристаллы ромбической формы.

Элементный состав белков.

Белки — важнейшие азотсодержащие биомолекулы

Белки — важнейшие природные азотсодержащие полимеры. Для них характерно довольно высокое и относительно постоянное содержание азота (~16 % от сухой массы) (таблица 4). Однако в мире белков существуют исключения. Так, в одном из видов белков — протаминх содержание азота достигает 30 %.

Таблица 4

Элементный состав белков (в % от сухой массы белка)

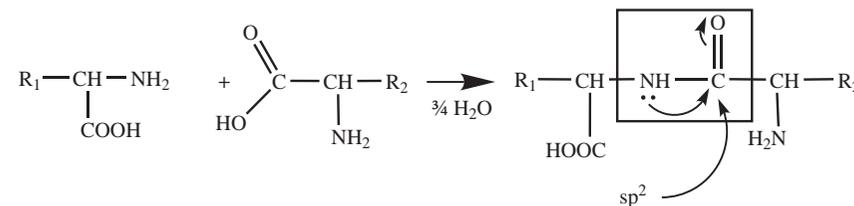
Углерод	51—55	Водород	6—7
Кислород	21—23	Сера	0,3—2,5
Азот	15—18	Зола	0—0,5

5. АМИНОКИСЛОТЫ — ОСНОВНЫЕ СТРУКТУРНЫЕ ЗВЕНЬЯ БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ

Остатки α-аминокислот являются мономерными звеньями белков и пептидов. При построении белковой молекулы аминокислоты соединяются друг с другом пептидной (амидной) связью с выделением молекулы воды.

5.1. Пептидная связь и ее характеристики

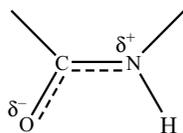
Пептидная связь образована аминогруппой одной аминокислоты и карбоксильной группой другой.



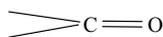
В пептидной группе атом углерода находится в sp^2 -гибризованном состоянии.

Атомы С, О, N пептидной связи расположены в одной плоскости. Неподделенная пара электронов атома азота находится в сопряжении с π -электронами двойной связи группы $>C=O$ (n - π -сопряжение).

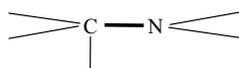
В результате сопряжения происходит некоторое выравнивание длин связей:



Двойная связь

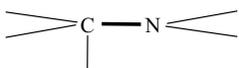


удлиняется до 0,124 нм против обычной длины 0,121 нм, а связь



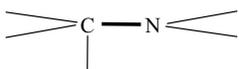
становится короче — 0,132 нм по сравнению с 0,147 нм в случае ординарной связи.

Наличие плоской сопряженной системы в пептидной группе является причиной важного обстоятельства — затруднения вращения вокруг связи

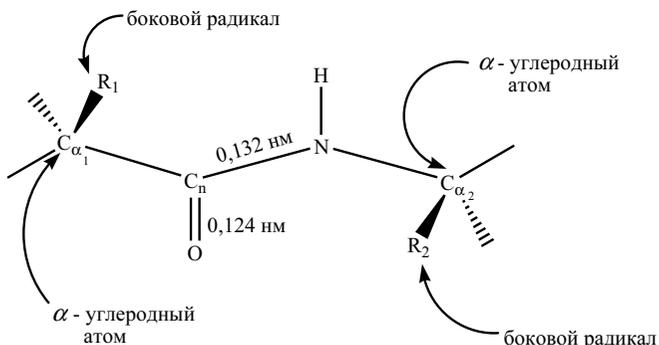


Таким образом, электронное строение предопределяет плоскую жесткую структуру пептидной группы.

C_{α_1} и C_{α_2} — углеродные атомы двух аминокислотных остатков — располагаются в плоскости пептидной группы по разные стороны от связи



т. е. в более выгодном транс-положении:



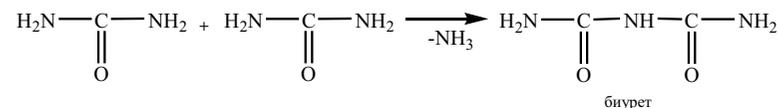
При этом боковые радикалы R_1 и R_2 аминокислотных остатков в пространстве будут максимально удалены друг от друга, что обеспечивает наиболее термодинамически выгодное состояние системы.

Вращение вокруг ординарных связей $C_n - C_{\alpha_1}$ и $N - C_{\alpha_2}$ ограничено вследствие затруднений в пространственном размещении боковых радикалов аминокислотных остатков.

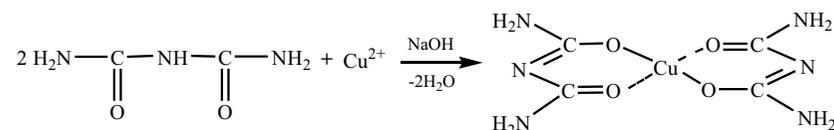
Таким образом, конфигурация пептидной группы предопределяет удивительно однообразное минорное строение полипептидной цепи в целом, вне зависимости от участвующих в ее построении аминокислотных звеньев, что имеет огромное значение при формировании высших уровней структуры белка.

5.2. Качественные реакции на пептидную связь

Характерной для пептидов и белков является биуретовая реакция, которая служит для обнаружения пептидных связей. В биуретовую реакцию вступают пептиды, содержащие по меньшей мере две пептидные связи. При смешении раствора пептида или белка со щелочным раствором сульфата меди наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

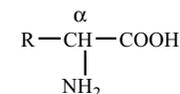


Простейшим соединением, содержащим амидную связь, и вступающим в описанную выше реакцию, является биурет. Его взаимодействие с катионом меди может быть представлено следующей схемой:



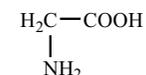
5.3. Протеиногенные аминокислоты и особенности их строения

Все многообразие пептидов и белков построено из α -аминокислот. α -Аминокислоты — гетерофункциональные соединения, в которых группы $-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_2$ находятся у одного и того же углеродного атома (α):



Общее число α -аминокислот, найденное в пептидах и белках, близко к 70. Среди них выделяется группа из 20 наиболее важных α -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках. Иногда эту группу расширяют до 22–25 за счет включения родственных производных. Кроме того, существует еще постоянно пополняющаяся группа редких аминокислот, обнаруженных в крайне ограниченном круге белков, а иногда встречающихся только в белке одного вида.

Простейшей протеиногенной аминокислотой является глицин:



Все остальные протеиногенные аминокислоты могут быть рассмотрены как производные глицина, полученные заменой атома водорода в его молекуле на различные радикалы (таблица 5).

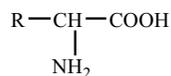
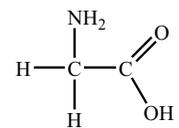
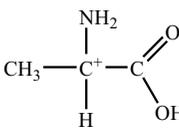
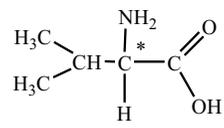
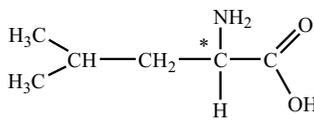
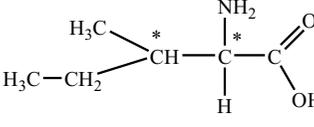
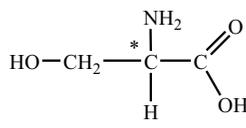
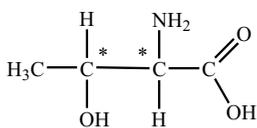
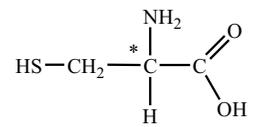
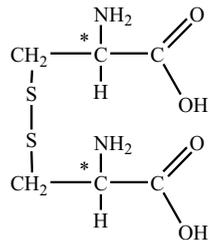
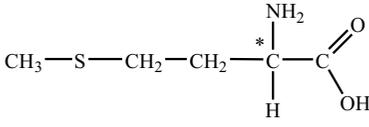
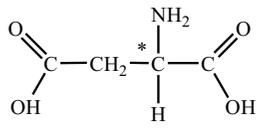
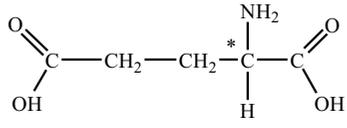
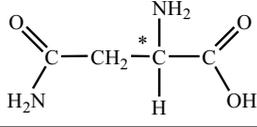
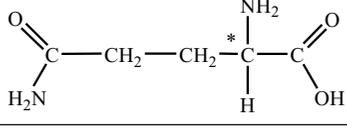
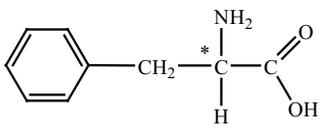
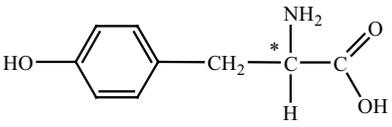
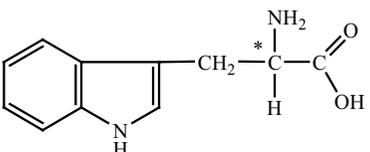
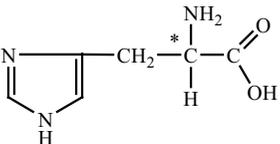
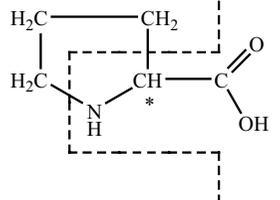


Таблица 5

Строение основных протеиногенных аминокислот

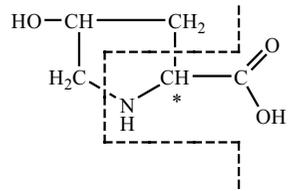
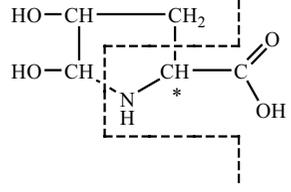
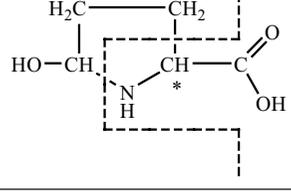
Формула	Название
I. Ациклические аминокислоты	
1. Алифатические незамещенные аминокислоты (моноаминомонокарбоновые кислоты)	
	Глицин (гликокол); α-аминоуксусная кислота
	Аланин; α-аминопропионовая кислота
	Валин; α-аминоизовалериановая кислота
	Лейцин; α-аминоизокапроновая кислота
	Изолейцин; α-амино-β-метил-β-этилпропионовая кислота
2 Алифатические функционально-замещенные аминокислоты	
а) Гидроксиаминокислоты	
	Серин; α-амино-β-гидрокси-пропионовая кислота

Формула	Название
	Треонин; α-амино-β-гидрокси-масляная кислота
б) Тиаминокислоты	
	Цистеин; α-амино-β-тиопропионовая кислота
	Цистин; ди-α-амино-β-тиопропионовая кислота
	Метионин; α-амино-γ-метилтио-масляная кислота
в) Карбоксиаминокислоты (моноаминодикарбоновые кислоты)	
	Аспарагиновая; (аминояantarная) кислота
	Глутаминовая; (α-аминоглутаровая) кислота
	Аспарагин; γ-амид-α-аминояantarной кислоты
	Глутамин; δ-амид-α-амино-глутаровой кислоты

Формула	Название
г) Диаминокислоты (диаминомонокарбоновые кислоты)	
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	Лизин; α, ε-диаминокапроновая кислота
д) Гуанидиноаминокислоты	
$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	Аргинин; α-амино-γ-гуанидино-валериановая кислота
II. Циклические аминокислоты	
1. Ароматические аминокислоты	
	Фенилаланин; α-амино-β-фенилпропионовая кислота
	Тирозин; α-амино-β-гидроксифенилпропионовая кислота
2. Гетероциклические аминокислоты	
	Триптофан; α-амино-β-индолилпропионовая кислота
	Гистидин; α-амино-β-имидазолпропионовая кислота
	Пролин; Пирролидин-α-карбоновая кислота

* — обозначение хиральных центров в молекуле аминокислот.

Редкие аминокислоты

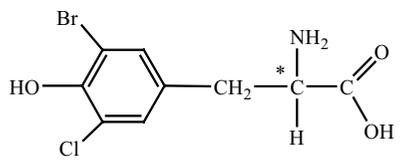
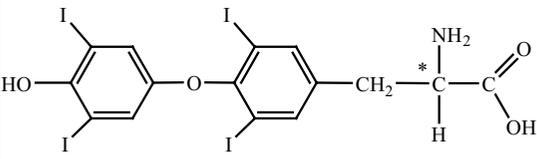
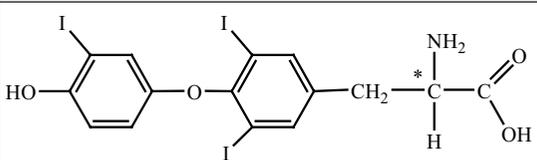
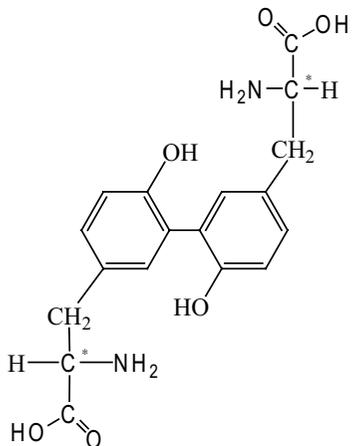
Формула	Название	Источник выделения
	3-гидроксипролин; γ-гидрокси-пирролидин-α-карбоновая кислота	Коллаген
	3,4-дигидроксипролин	Клеточная стенка диатомовых водорослей
	4-гидроксипролин	Желатин
$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	ε-метиллизин; ε-N-метиламино-α-аминокапроновая кислота	Миозин, флагеллин из <i>Salmonella</i> , гистон тимуса телят
$(\text{CH}_3)_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	ε-диметиллизин; ε-N-метиламино-α-аминокапроновая кислота	Гистон тимуса телят
$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	ε-триметиллизин; ε-N,N,N-триметиламмоний-α-аминокапроновая кислота	Гистон тимуса телят
$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{NH}_2}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$	ε-триметил-δ-гидроксилизин; ε-N,N,N-триметиламмоний-δ-гидрокси-α-аминокапроновая кислота	Клеточная стенка диатомовых водорослей

Продолжение табл. 6

Формула	Название	Источник выделения
	изодезмозин; 2(4'-карбоксии-3'-аминобутил)-3,5-бис(3'-карбоксии-3'-аминопропил), 1(5'-карбоксии-5'-аминопентил)-пиридиний	Эластин
	δ-гидроксилизин; α,ε-диамино-β-гидроксикапроновая кислота	Коллаген
	аминолимонная кислота α-амино-β-гидрокси-β-карбоксиглутаровая кислота	Эластин
	γ-карбоксиглутаминовая кислота; α-амино-γ-карбоксии глутаровая кислота	Протромбин и другие Ca ²⁺ -связывающие белки
	десмозин; 3,5-бис(3'-карбоксии-3'-аминопропил) 4(4'-карбоксии-4'-аминобутил)-1-(5'-карбоксии-5'-аминопентил)-пиридиний	Эластин

Продолжение табл. 6

Формула	Название	Источник выделения
	N,N'-диметиларгинин; α-амино-δ-(N,N'-диметилгуанидино) валериановая кислота	Энцефалогенный белок быка
	N,N-диметиларгинин; α-амино-δ-(N,N-диметилгуанидино) валериановая кислота	Энцефалогенный белок быка
	3-йодтирозин; α-амино-β-(3'-йод-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Тироглобулин
	3,5-дийодтирозин; α-амино-β-(3,5'дйод-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Тироглобулин
	3-бромтирозин; α-амино-β-(3'-бром-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Тироглобулин
	3-хлортирозин; α-амино-β-(3'-хлор-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Склеропротейн горгонии, склеропротейн волнистого рожка, кутикулярный белок саранчи обыкновенной
	3,5-дихлортирозин; α-амино-β-(3,5'дихлор-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Кутикулы Limulus

Формула	Название	Источник выделения
	3-бром-5-хлортирозин; α-амино-β-(3',5'-дихлор-4'-гидроксифенил)-пропионовая кислота	Склеропротеин волнистого рожка
	Тироксин; α-амино-β-(3,5-дидиод-4'-(3'',5''-дидиод-4''-гидроксифенокси)-фенил)-пропионовая кислота	Тироглобулин
	3,3',5'-трийодтирозин; α-амино-β-(3',5'-дидиод-4'-(3''-иод-4''-(3''-иод-4''-гидроксифенокси)-фенил)пропионовая кислота	Тироглобулин
	Дитирозин 3,3'-бис(2-карбок-2-аминоэтил)-2,2'-дигидрокси-бифенил	Реадилин

* — обозначение хиральных центров в молекуле аминокислот.

Следует отметить, что для аминокислот характерны исторические названия, прежде всего связанные с источниками первичного выделения.

Цистеин выделен из камней желчного пузыря (от греч. «цистис» — пузырь), лейцин получен из молочного белка — казеиногена (казеина) (от греч. «лейкос» — белый), аспарагиновая кислота выделена из ростков спаржи (от греч. «аспарагус» — спаржа).

5.4. Обозначения аминокислот

Для удобства записи структуры белков и пептидов предложены три основных способа сокращенного обозначения протеиногенных аминокислот (таблица 7).

Таблица 7

Обозначения аминокислот

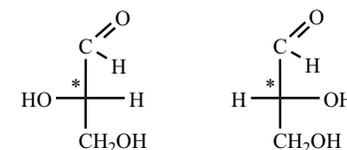
Аминокислота	Трехбуквенное обозначение		Однобуквенное обозначение
	русское	латинское	
Глицин	гли	Gly	G
Аланин	ала	Ala	A
Валин	вал	Val	V
Лейцин	лей	Leu	L
Изолейцин	иле	Ile	I
Пролин	про	Pro	P
Фенилаланин	фен	Phe	F
Триптофан	три; трп	Trp	W
Метионин	мет	Met	M
Серин	сер	Ser	S
Треонин	тре	Thr	T
Аспарагин	асн	Asn	N
Глутамин	глн	Gln	Q
Лизин	лиз	Lys	K
Аргинин	арг	Arg	R
Гистидин	гис	His	H
Аспарагиновая кислота	асп	Asp	D
Глутаминовая кислота	глу	Glu	E
Цистеин	цис	Cys	C
Тирозин	тир	Tyr	Y

5.5. Оптическая изомерия аминокислот

Все протеиногенные аминокислоты кроме глицина — оптически активны и имеют как минимум один хиральный центр (хиральные центры обозначены * в таблицах 5 и 6) и принадлежат к L-ряду.

Интересно отметить, что L-аминокислоты имеют сладкий вкус, а D-изомеры безвкусны или горькие.

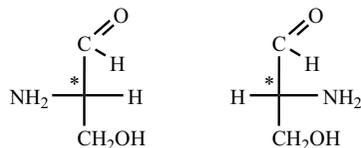
Принадлежность аминокислот к L- или D-ряду определяется по расположению функциональных групп у хирального атома углерода, несущего аминогруппу, в сравнении с глицириновым альдегидом.



L-ряд

D-ряд

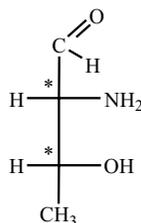
В соответствии с принятыми обозначениями соответственно



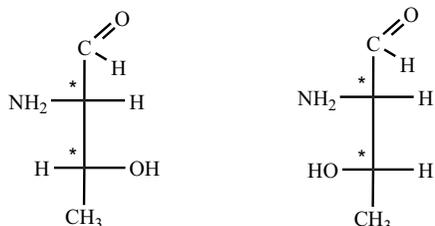
L-аланин

D-аланин

Однако ряд протеиногенных аминокислот имеет несколько хиральных центров и несколько оптических изомеров может принадлежать к L-ряду. Однако лишь один из них обнаруживается в составе белков. Так, например, треонин



имеет два хиральных центра ($n = 2$) и соответственно $2^n = 2^2 = 4$ оптических изомера.

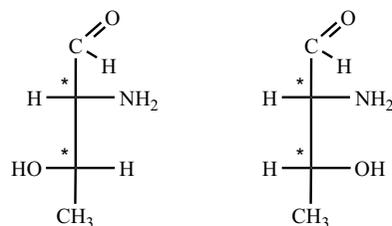


L-треонин

L-алло-треонин (алло-другой)

Из этих двух оптических изомеров именно L-треонин входит в состав природных белков.

Еще два оптических изомера треонина относятся к D-ряду и в составе белков не обнаруживаются:



D-треонин

D-алло-треонин

5.6. Классификация протеиногенных аминокислот

В настоящее время приняты три основных типа классификации аминокислот.

- **Структурная** — по строению бокового радикала;
- **Биологическая или физиологическая** — по степени незаменимости аминокислот для организма;
- **Электрохимическая** — по кислотно-основным свойствам аминокислот.

Структурная классификация подробно показана в таблице 5, где все протеиногенные аминокислоты рассмотрены как производные простейшей аминокислоты — глицина.

В соответствии с биологической или физиологической классификацией аминокислоты подразделяются на три группы:

- незаменимые;
- полузаменимые;
- заменимые.

Незаменимые аминокислоты не могут синтезироваться организмом из других соединений, поэтому они обязательно должны поступать извне (с пищей). Абсолютно незаменимых аминокислот для человека восемь: валин, лейцин, изолейцин, треонин, лизин, метионин, фенилаланин, триптофан.

Выделяют группу полузаменимых аминокислот, которые образуются в организме, но в недостаточном количестве, поэтому частично должны поступать с пищей. Для организма человека такими аминокислотами являются аргинин, тирозин, гистидин.

К заменимым аминокислотам относятся аминокислоты, синтезируемые в организме в достаточном количестве из незаменимых аминокислот или других соединений.

Организм может обходиться без них долгое время, если конечно, с пищей поступают вещества, из которых эти аминокислоты могут быть синтезированы. К заменимым аминокислотам относятся остальные аминокислоты, кроме вышеперечисленных.

Приведенная физиологическая классификация аминокислот универсальна, в отличие от первых двух классификаций, и до некоторой степени условна, поскольку действительна только для организмов данного вида (таблица 8).

Однако абсолютная незаменимость восьми аминокислот универсальна для всех видов организмов.

Таблица 8

Заменимые (-), незаменимые (+) и полузаменимые (±) аминокислоты в белках организмов различных видов

Аминокислоты	Человек	Крыса	Мышь	Курица	Лосось	Москит	Пчела
Глицин	—	—	—	±	—	+	—
Аланин	—	—	—	—	—	—	—
Валин	+	+	+	+	+	+	+
Лейцин	+	+	+	+	+	+	+
Изолейцин	+	+	+	+	+	+	+
Цистеин	—	—	—	—	—	—	—
Метионин	+	+	+	+	+	+	+
Серин	—	—	—	—	—	—	—

Аминокислоты	Человек	Крыса	Мышь	Курица	Лосось	Москит	Пчела
Треонин	+	+	+	+	+	+	+
Аспаргиновая	—	—	—	—	—	—	—
Глутаминовая	—	—	—	—	—	—	—
Лизин	+	+	+	+	+	+	+
Аргинин	±	±	±	+	+	+	+
Фенилаланин	+	+	+	+	+	+	+
Тирозин	±	±	±	+	—	—	—
Гистидин	±	+	+	+	+	+	+
Триптофан	+	+	+	+	+	+	+
Пролин	—	—	—	—	—	—	—

Следует отметить, что набор протеиногенных аминокислот сформировался на достаточно длинном эволюционном отрезке времени.

Считается, что заменимые аминокислоты, по сравнению с незаменимыми, эволюционно более молоды, т. е. они возникли уже в окислительной атмосфере и поэтому содержат большее число атомов электроотрицательных элементов (O, N, S).

Согласно электрохимической классификации, аминокислоты делятся на три группы в зависимости от физико-химических свойств радикала: кислые, основные и нейтральные.

Подробно этот вид классификации будет рассмотрен в разделе «Физико-химические свойства аминокислот».

5.7. Получение α-аминокислот

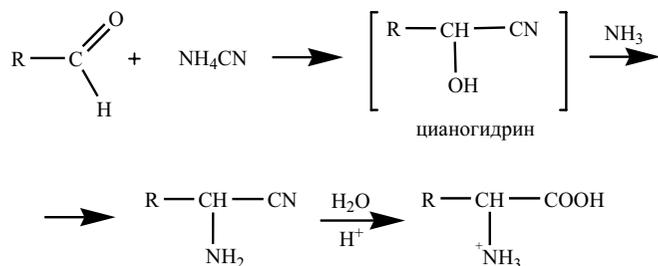
Методы получения аминокислот подразделяются на биологические и химические.

Основным способом получения аминокислот является микробиологический синтез. В процессе ферментации непосредственно синтезируются L-аминокислоты. Именно таким способом получают незаменимую аминокислоту — лизин.

Кроме микробиологического синтеза, аминокислоты можно получить путем гидролиза природного белоксодержащего животного и растительного сырья.

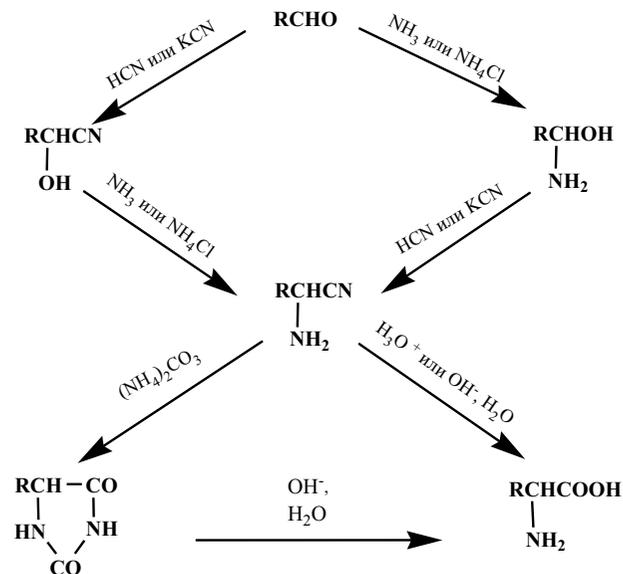
Достаточно эффективным является химический синтез аминокислот, который может быть осуществлен по целому ряду схем. Ниже приводится лишь некоторые из них.

В лабораторных условиях синтез α-аминокислот можно осуществить путем циангидринового синтеза (реакция Зелинского — Стадника).

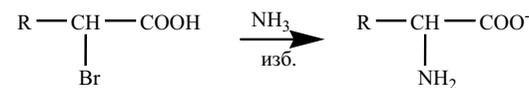


Однако данный метод не является единственным.

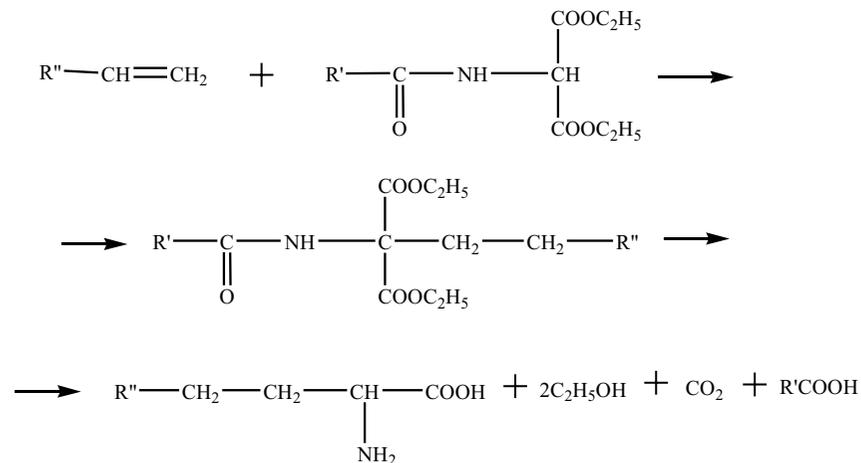
Следует отметить, что карбонильное производное как предшественник α-аминокислоты может быть трансформировано в целевой продукт несколькими путями:



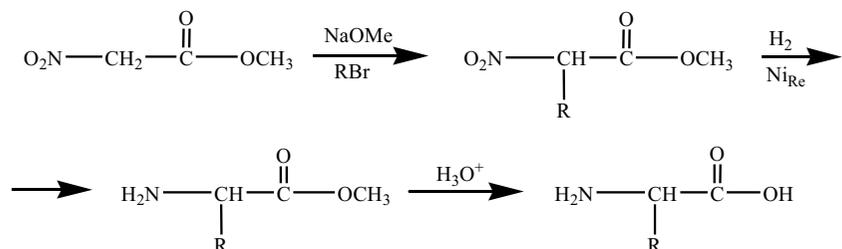
Простым методом синтеза α-аминокислот является прямой аммонолиз α-галогенкарбоновых кислот:



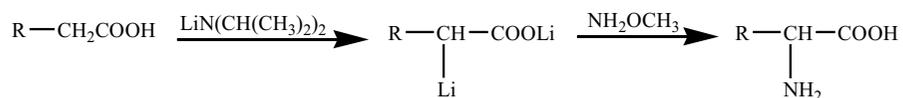
Хорошие результаты дают методы, основанные на реакции Михаэля:



Достаточно простая схема получения α-аминокислот включает реакцию алкилирования метилнитроацетата алкилгалогенидами с последующим восстановлением нитрогруппы водородом в присутствии никеля Ренея:



Как метод получения α-аминокислот представляет интерес прямое аминирование одноосновных карбоновых кислот через промежуточное образование α-литиевых солей:



Данный метод приводит к получению α-аминокислот с приемлемым выходом (~30 %).

Однако основным недостатком химического синтеза является получение продуктов в виде рацематов. В настоящее время еще недостаточно развиты эффективные и дешевые пути разделения аминокислот на оптические изомеры, поэтому химический синтез рационально применять для получения в значительных количествах тех аминокислот, которые могут быть использованы в виде рацематов.

Тем не менее, существуют методы физического, физико-химического, химического и биохимического разделения рацемических смесей аминокислот.

К физическим методам относится разделение путем механического отбора кристаллов по их форме. Этот почти не используемый на практике способ всегда упоминается в литературе как исторически первый.

В настоящее время активно развивается физико-химический метод непосредственного разделения оптических изомеров — метод аффинной хроматографии на оптически активных сорбентах.

Химический метод основан на переводе энантиомеров в диастереомеры.

Энантиомеры — хиральные химические соединения, являющиеся зеркальным отображением друг друга, имеющие одинаковые физические и химические свойства и вращающие плоскость поляризованного луча света на определенный угол во взаимно противоположных направлениях.

Диастереомеры — это стереоизомеры, которые не являются зеркальными изображениями и отличаются по своим физическим и химическим свойствам.

Для осуществления химического разделения проводят реакцию энантиомеров с одним оптическим изомером хирального реагента. При этом получают производное, имеющее большее число хиральных центров и представляющее собой смесь диастереомеров, которые различаются по своим физическим и химическим свойствам. Раз-

деление последних можно осуществить физико-химическими методами, например ионообменной хроматографией.

Общая схема разделения рацемических смесей кислот может быть представлена следующим образом (рисунок 1):

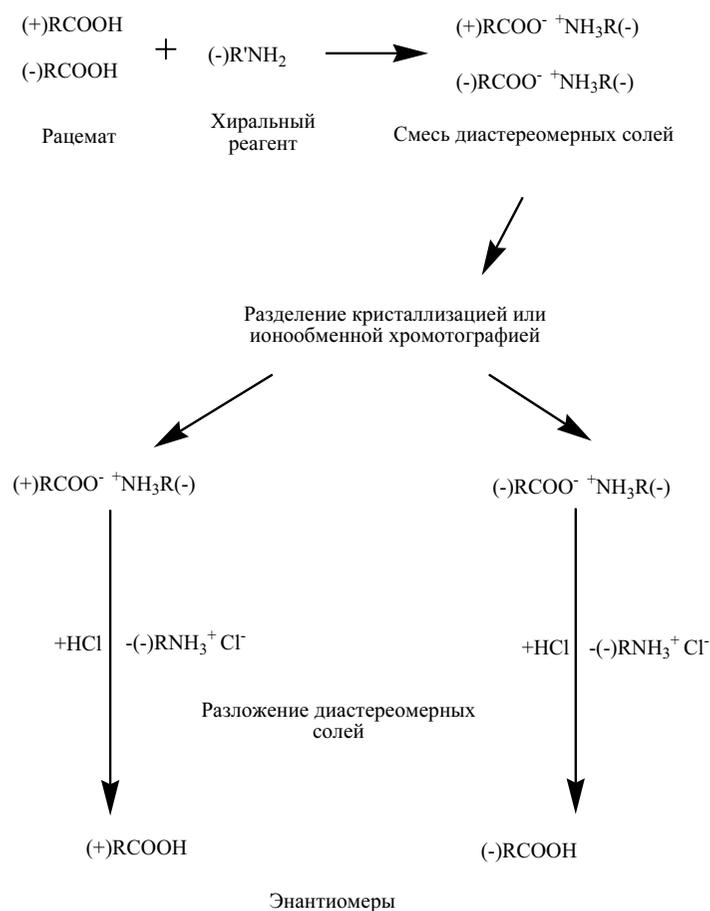


Рис. 1. Общая схема разделения рацемических смесей аминокислот

Рацемические кислоты разделяют с помощью оптически активных оснований, а рацемические основания — с помощью оптически активных кислот.

В качестве оптически активных оснований обычно используют растительные алкалоиды: хинин и другие, а из оптически активных кислот: винную и яблочную.

Однако более предпочтительным является биохимический ферментативный способ расщепления с использованием фермента ацилазы (рисунок 2), выделяемого из почек свиньи, способного гидролизовать N-ацетил-L-α-аминокислоты.

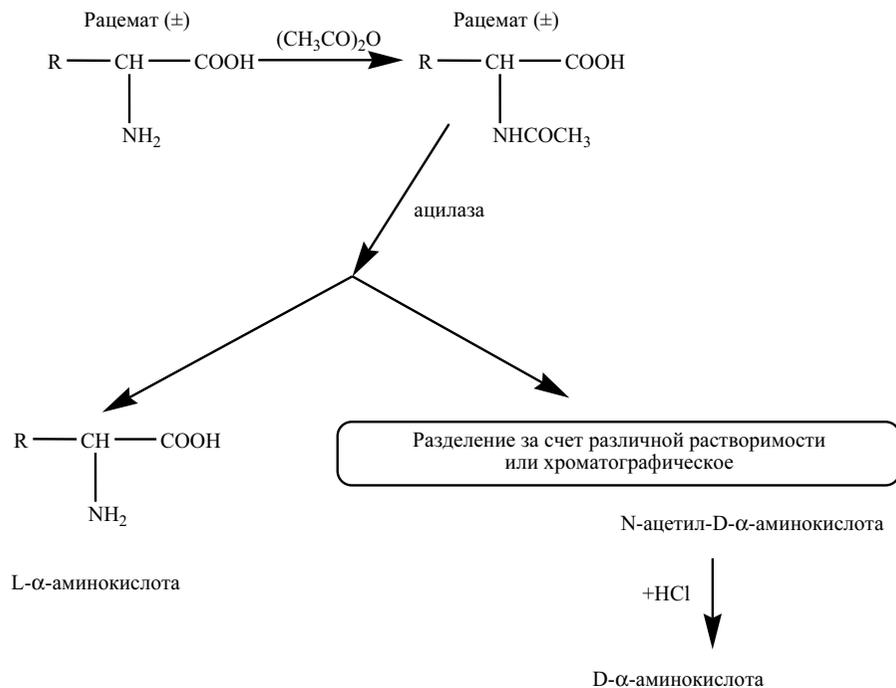


Рис. 2. Схема разделения рацемической смеси с использованием фермента — ацилазы

5.8. Свойства протеиногенных аминокислот

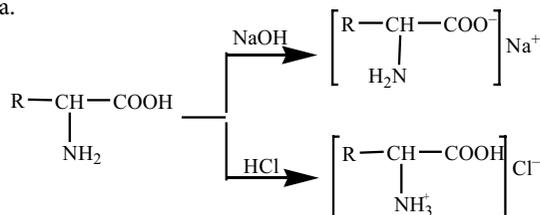
Физические свойства

α -Аминокислоты — кристаллические вещества. Они имеют высокую температуру плавления (более 200 °C), нелетучи, нерастворимы в неполярных органических растворителях, хорошо растворимы в воде.

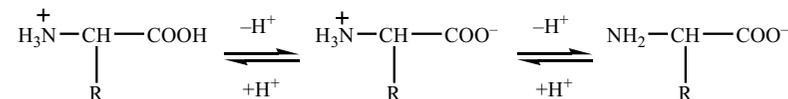
Хорошая растворимость в воде — важный фактор, обеспечивающий полноценную всасываемость и транспорт аминокислот в организме.

Кисотно-основные свойства

Аминокислоты являются амфотерными соединениями, что обусловлено наличием в их молекуле функциональных групп кислотного ($-\text{COOH}$) и основного ($-\text{NH}_2$) характера.



В водном растворе α -аминокислота существует в виде равновесной смеси биполярного иона, катионной или анионной форм. Положение равновесия в системе зависит от pH среды.



Полностью протонированная аминокислота (катионная форма) по теории Бренстеда является двухосновной кислотой со значениями $pK_{a1}(-\text{COOH})$ и $pK_{a2}(-\text{NH}_3^+)$.

Значение pH, при котором суммарный заряд молекулы аминокислоты равен нулю, называется изоэлектрической точкой (ИЭТ, pI). $pI = \frac{1}{2}(pK_{a1} + pK_{a2})$

Аминокислоты, которые могут существовать только в трех формах: нейтральная молекула, катион и анион, — называются нейтральными. Из 20 природных аминокислот 13 — нейтральные: аланин, аспарагин, валин, глицин, глутамин, изолейцин, лейцин, метионин, пролин, серин, треонин, триптофан, фенилаланин.

Все нейтральные аминокислоты имеют близкие кислотно-основные показатели $pK_{a1} = 2,0-3,0$; $pI = 5,5-6,5$; $pK_{a2} = 9,0-10,5$.

По значениям кислотно-основных характеристик нейтральных аминокислот можно установить, в виде каких частиц находится любая из этих кислот при данном значении pH ее водного раствора (рисунок 3).

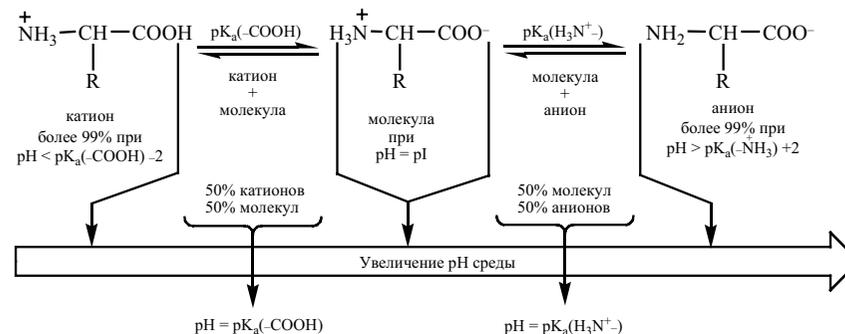
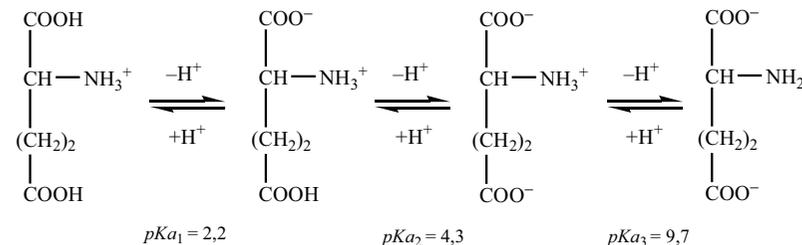


Рис. 3. Соотношение различных форм аминокислот в зависимости от кислотности среды

Аминокислоты, имеющие в составе радикала дополнительную карбоксильную группу, полностью в протонированной форме находятся в сильно кислой среде. По Бренстеду, они являются трехосновными кислотами, характеризуемыми тремя значениями pK_a , как показано на примере глутаминовой кислоты:



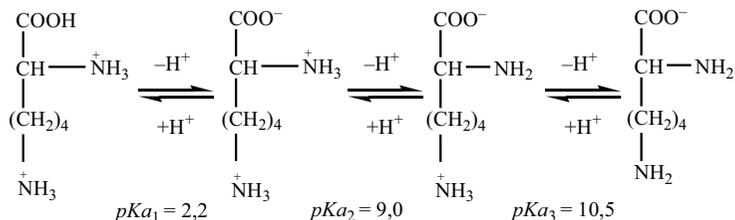
У кислых α-аминокислот изоэлектрическая точка находится при pH много ниже 7 (глутаминовая кислота — $pI = 3,22$; аспарагиновая — $pI = 2,77$).

В организме при физиологических значениях pH (pH крови = $7,2 \div 7,4$) эти аминокислоты находятся в анионной форме, т. к. у них диссоциированы обе карбоксильные группы.

В водных растворах по мере уменьшения кислотности среды, т. е. возрастания pH, эти аминокислоты могут находиться в четырех формах: катиона, нейтральной молекулы, моноаниона и дианиона.

У основных α-аминокислот изоэлектрическая точка лежит в области pH выше 7. К основным аминокислотам относят лизин, аргинин и гистидин.

В сильнокислой среде они также представляют собой трехосновные кислоты, этапы диссоциации которых видны на примере лизина:



Лизин, аргинин, гистидин в водных растворах по мере уменьшения кислотности среды могут находиться в четырех формах: дикатиона, монокациона, нейтральной молекулы и аниона.

В организме основные α-аминокислоты имеют суммарный единичный положительный заряд (находятся в виде цвиттер-ион-аммониевых катионов), т. е. у них протонированы обе аминогруппы, причем лизин и аргинин на 100 %, а гистидин — около 1 %.

Знание типа частиц, в форме которых данная аминокислота преимущественно присутствует в физиологических условиях, чрезвычайно важно, т. к. каждой из указанных частиц присущи специфические биологические функции.

Поэтому изоэлектрическая точка — важнейшая физико-химическая характеристика аминокислот (таблица 9).

Вычислить pI в общем случае для всех типов аминокислот можно по формуле:

$$pI = \frac{pK_n + pK_{n+1}}{2},$$

где n — максимальное число положительных зарядов в полностью протонированной аминокислоте.

В качестве примера рассмотрим приведенные ниже аминокислоты:

а) глутаминовая кислота: $n = 1$, $pI = 1/2(2,2 + 4,3) = 3,2$;

б) валин: $n = 1$, $pI = 1/2(2,3 + 9,6) = 5,95$;

в) лизин: $n = 2$, $pI = 1/2(9,0 + 10,5) = 9,8$;

Таблица 9

Значения pI для протеиногенных аминокислот

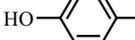
Аминокислота	pI	Аминокислота	pI
гли	5,97	асн	5,41
ала	6,00	глн	5,65
вал	5,96	лиз	9,74
лей	5,98	арг	10,76
иле	6,02	фен	5,48

Аминокислота	pI	Аминокислота	pI
сер	5,68	тир	5,66
тре	5,60	три	5,89
цис	5,07	гис	7,59
мет	5,74	про	6,30
асп	2,77	опр	5,80
глу	3,22		

Помимо основных протоногенных групп аминокислот ($-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_3^+$) в их боковых радикалах могут содержаться и другие ионогенные группы, способные диссоциировать по кислотному типу при различных значениях pH (таблица 10).

Таблица 10

Некоторые протеогенные группы боковых радикалов аминокислот

Аминокислота	Фрагмент	pK_a фрагмента
Гистидин		6,0
Цистеин	HS—	8,33
Тирозин		10,07

Понимание особенностей кислотно-основных свойств аминокислот крайне необходимо для объяснения многих свойств пептидов и белков.

Своеобразие кислотно-основных свойств аминокислот проявляется при изучении этих свойств методом потенциометрического титрования щелочью.

Для нейтральных аминокислот кривая титрования имеет следующий вид (рисунок 4):

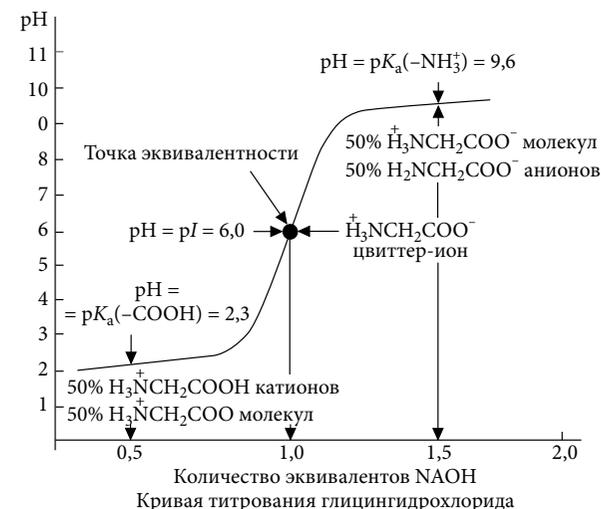


Рис. 4. Кривая титрования аминокислоты щелочью

Кривая титрования позволяет установить значение pI , значение pK_{a_1} и pK_{a_2} .

Значение pK_{a_1} устанавливают по кривой титрования по величине pH системы, содержащей 0,5 экв. щелочи, т. к. в этот момент в растворе находится 50 % катионов и 50 % молекул аминокислоты.

Значение pK_{a_2} устанавливают также на основании кривой титрования, но по величине pH системы, содержащей 1,5 экв. щелочи, т. к. в этот момент в растворе находится 50 % молекул и 50 % анионов аминокислоты.

В области значений $pH = pK_{a_1} \pm 0,5$ и $pH = pK_{a_2} \pm 0,5$ растворы аминокислот обладают буферными свойствами.

Следует отметить, что свободные протонноактивные фрагменты боковых радикалов аминокислот ($—OH$, $—SH$ и $>NH$ фрагмент имидазольного кольца гистидина) способны обеспечивать буферные свойства полипептидов и белков. Фрагменты тирозина и цистеина проявляют буферную активность при значениях $pH = 10,07 \pm 0,5$ и $pH = 8,33 \pm 0,5$ соответственно, далеких от физиологических значений.

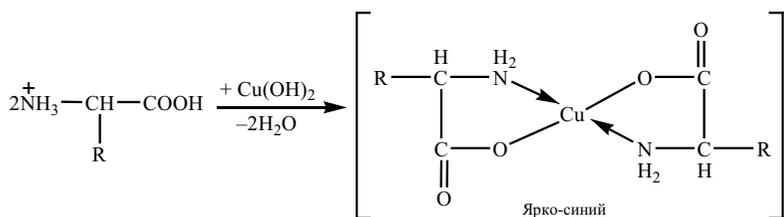
Лишь гистидин в области $pH = 6,0 \pm 0,5$, близких к физиологическим значениям, обладает заметной буферной емкостью. Гистидином богат гемоглобин и именно в связи с этим гемоглобин обладает буферными свойствами. Гемоглобиновая буферная система участвует в поддержании pH крови.

Кислотно-основные свойства аминокислот широко используются при их аналитическом определении. На кислотно-основных свойствах аминокислот основаны методы их разделения, идентификации и количественного определения.

Химические свойства α -аминокислот.

Способность α -аминокислот к комплексообразованию

Все аминокислоты, отдавая протон, образуют как полидентатные лиганды хелатные комплексы с катионами d -металлов. При этом донорами электронных пар выступают как аминогруппы, так и ионизированные карбонильные группы аминокислот. Все α -аминокислоты со свежеприготовленным $Cu(OH)_2$ образуют растворимый электронейтральный хелатный комплекс, окрашенный в ярко-синий цвет:



Данная реакция может быть использована в качестве неспецифического метода обнаружения α -аминокислот.

Необходимо отметить существенное отличие в строении комплекса, образованного индивидуальными аминокислотами и пептидами (Раздел 5.2).

Кислые и основные α -аминокислоты, содержащие дополнительные протондонорные или протонакцепторные группы, являются более активными лигандами, чем нейтральные аминокислоты.

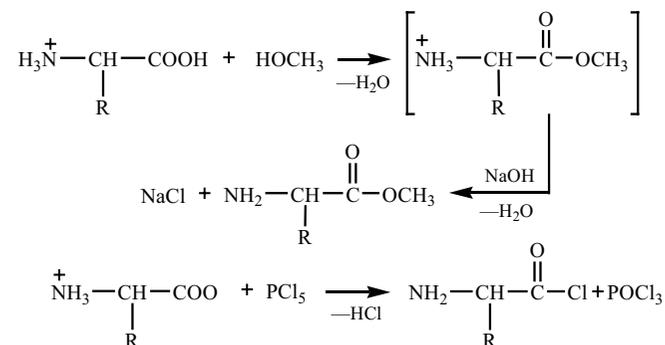
Цистеин и гистидин проявляют наибольшую активность в процессах комплексообразования, т. к. содержат легкополяризуемые («мягкие») группы: тиольную и имидазольную соответственно, которые образуют достаточно прочные связи с «мягкими» катионами биометаллов.

Высокая комплексообразующая способность этих аминокислот за счет активных групп заместителя сохраняется в пептидах и белках, их содержащих.

Знание комплексообразующих свойств аминокислот позволяет понять соответствующие свойства пептидов и белков.

Химические свойства α -аминокислот, обусловленные наличием карбоксильной группы

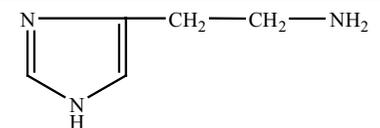
Аминокислоты вступают в традиционные химические реакции, присущие карбоновым кислотам. Они образуют соли, сложные эфиры и галогенангидриды

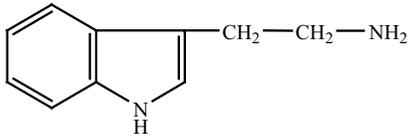
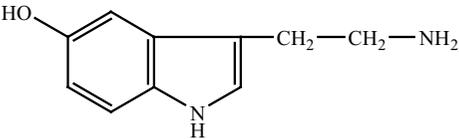
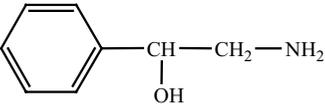
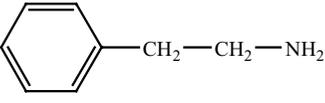
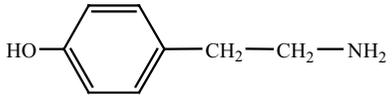
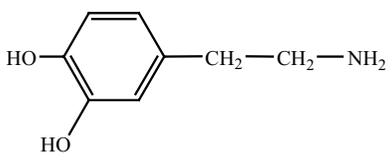
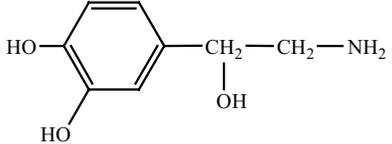
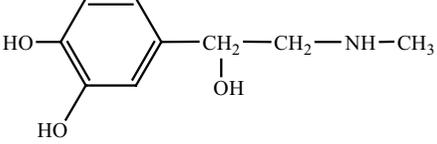


α -Аминокислоты сравнительно легко подвергаются декарбоксилированию, т. к. связь $C—C$ сильно поляризована ввиду существования аминокислоты в форме цвиттер-иона. При декарбоксилировании α -аминокислот в организме синтезируются биогенные амины (таблица 11), выполняющие важные биологические функции.

Таблица 11

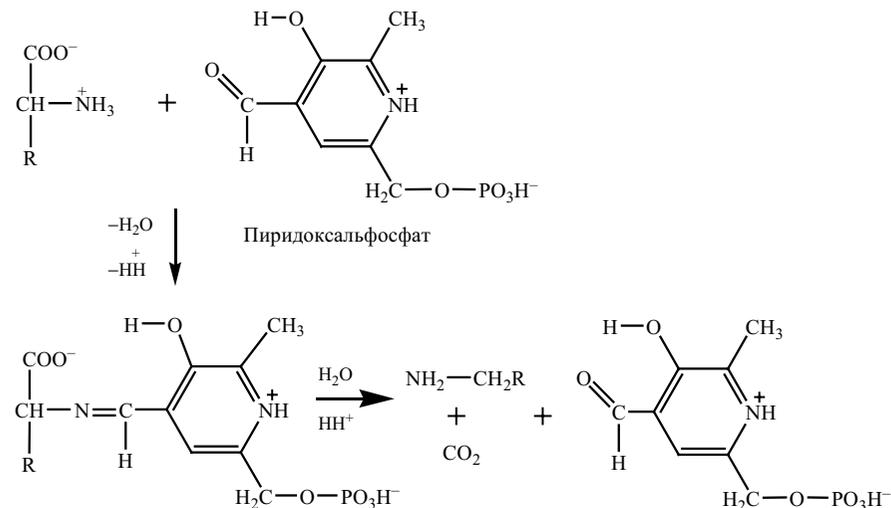
Некоторые представители биогенных аминов

Исходная α -аминокислота	Биогенный амин	
	Название	Формула
Серин	2-аминоэтанол (коламин)	$H_2NCH_2-CH_2OH$
Цистеин	2-аминоэтантиол (цистамин)	$H_2NCH_2CH_2SH$
Лизин	Пентаметилендиамин (кадаверин)	$H_2N-(CH_2)_5NH_2$
Аспарагиновая кислота	β -аланин	$H_3N^+CH_2CH_2COO^-$
Глутаминовая кислота	γ -аминомасляная кислота	$H_3N^+CH_2CH_2CH_2COO^-$
Гистидин	Гистамин	

Исходная α-аминокислота	Биогенный амин	
	Название	Формула
Триптофан	Триптамин	
	5-гидрокситриптамин (серотонин)	
Цистеин	Таурин	$^{-}\text{OSO}_2\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---NH}_3^{+}$
Фенил-аланин	Фенилэтаноламин	
	Фенилэтиламин	
Тирозин	Тирамин	
	Дофамин	
	Норадреналин	
	Адреналин	

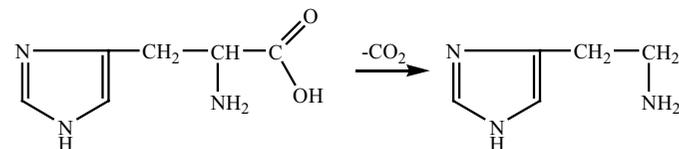
В живых системах процесс декарбоксилирования α-аминокислот является ферментативным и катализируется специфическими ферментами (декарбоксилазами), содержащими в качестве кофермента пиридоксальфосфат (ПАЛФ — производное витамина В₆).

В процессе ферментативного декарбоксилирования α-аминокислота сначала реагирует с альдегидной группой пиридоксальфосфата, образуя альдимин, с последующим отщеплением CO₂ и регенерацией пиридоксальфосфата:



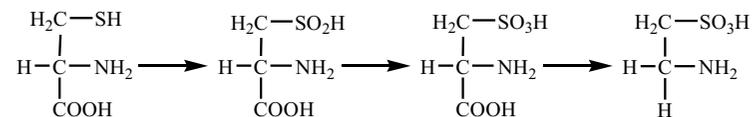
Именно путем ферментативного декарбоксилирования синтезируется большинство нейромедиаторов, типичными представителями которых являются γ-аминомасляная кислота (ГАМК), серотонин, дофамин, норадреналин и таурин. Ниже рассмотрены отдельные представители биогенных аминов и некоторые особенности их биосинтеза.

Важнейший биогенный амин — гистамин синтезируется из гистидина под действием гистидиндекарбоксилазы и является медиатором аллергических реакций:



Синтез серотонина из триптофана включает стадию предварительного гидроксирования с последующим декарбоксилированием образовавшегося продукта (рисунок 5).

Образование таурина из цистеина включает в себя процесс окисления тиолового фрагмента с последующим декарбоксилированием:



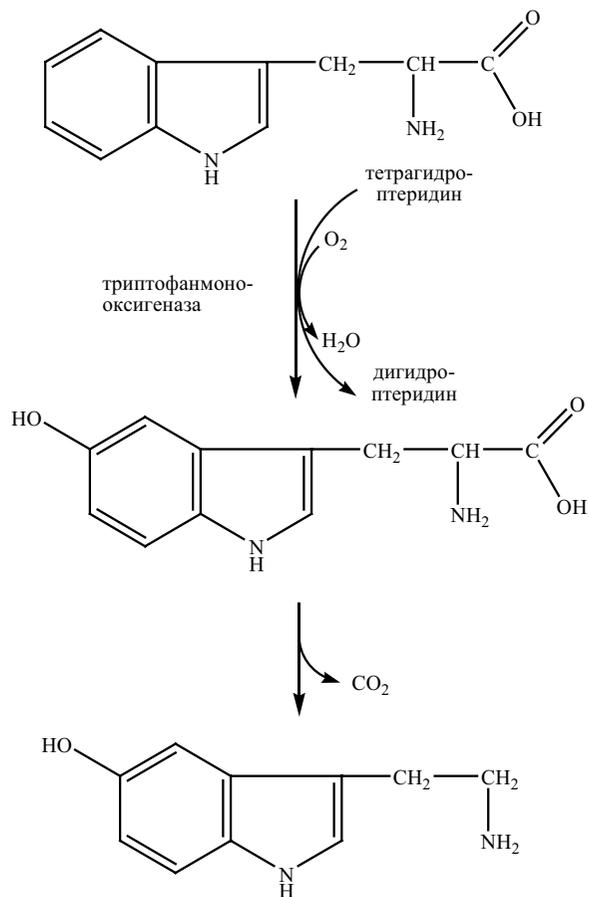


Рис. 5. Схема образования серотонина из триптофана

Образовавшийся таурин помимо нейромедиаторных функций играет важную роль в процессах эмульгирования и расщепления липидов.

Ароматические α-аминокислоты: фенилаланин и тирозин являются предшественниками целой группы важных биогенных аминов-катехоламинов (рисунок 6), выполняющих медиаторную и гормональную функции и включающих фенилэтиламин, фенилэтанолламин, диоксифенилаланин, дофамин, адреналин и норадреналин.

Декарбосилирование α-аминокислот в тканях животных и растений происходит сравнительно легко, но особенно процессы декарбосилирования протеиногенных аминокислот характерны для микроорганизмов.

Следует отметить, что образование альдимида пиридоксальфосфата дает начало не только синтезу биогенных аминов, но и является начальным этапом расщепления связи C_α — C_β в молекулах алифатических оксиаминокислот — серина и треонина.

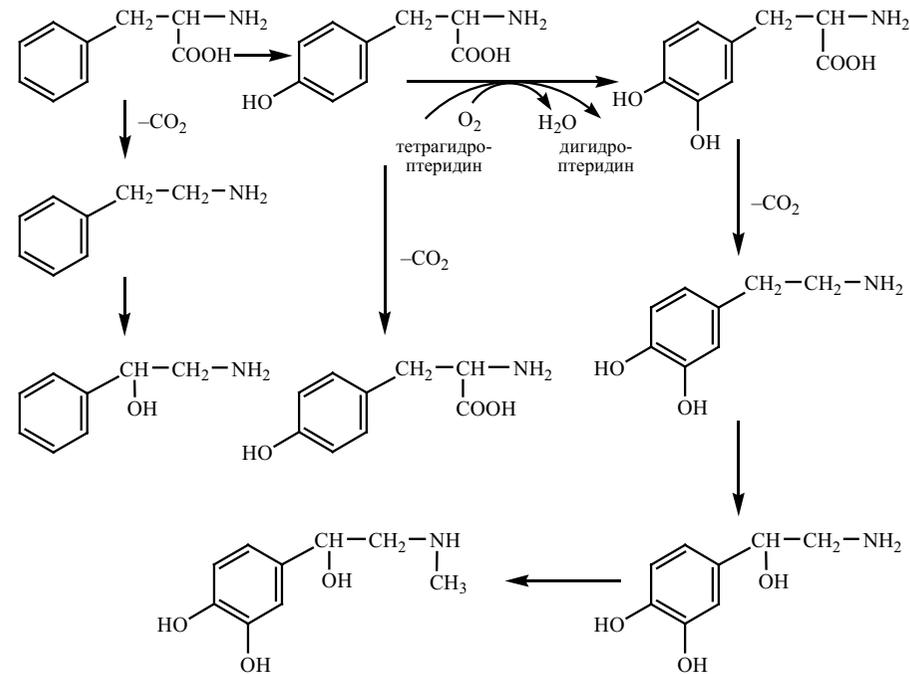
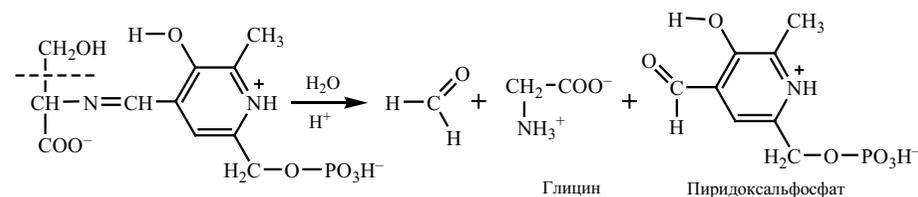
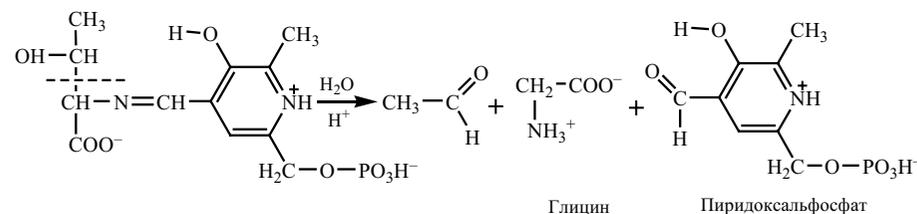


Рис. 6. Схема образования катехоламинов

В случае серина:



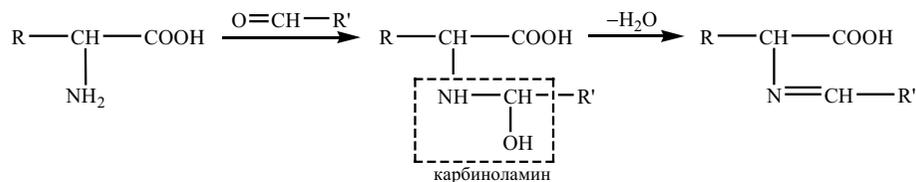
Для треонина схема процесса имеет вид:



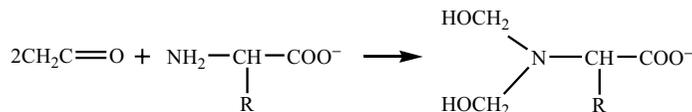
Расщепление альдимида пиридоксальфосфата в этом случае осуществляется под действием фермента альдолазы.

Образующееся динитрофенильное производное аминокислоты легко выделяется и идентифицируется хроматографически. Метод служит для определения N-концевой аминокислоты в пептидах и белках.

α-Аминокислоты образуют основания Шиффа:



Если в реакцию Шиффа с α-аминокислотой вступает формальдегид, при этом образуется N,N-диметиловое производное аминокислоты:



Большая склонность аминогрупп в аминокислотах и белках реагировать с формальдегидом приводит к необратимой денатурации белков в его присутствии. Этим объясняется высокая токсичность формальдегида и его стерилизующая способность.

Одним из биологически значимых свойств аминокислот является их способность к дезаминированию с выделением аммиака. Возможны 4 типа дезаминирования (таблица 12) с образованием соответствующих производных из α-аминокислоты

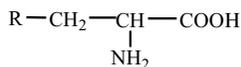
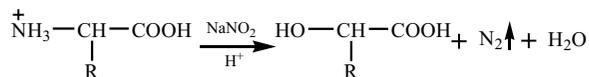


Таблица 12

Типы дезаминирования аминокислот и образующиеся продукты

Тип дезаминирования	Образующийся продукт
Восстановительное	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Гидролитическое	$\text{R}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$
Внутримолекулярное	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$
Окислительное	$\text{R}-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{\text{NH}_2^+}{\text{C}}}-\text{COOH}$

Генерация из α-аминокислот соответствующих им α-гидроксикарбоновых кислот легко протекает при действии азотистой кислоты:



Эта реакция используется для количественного определения аминогрупп в аминокислотах, а также белках и продуктах их распада.

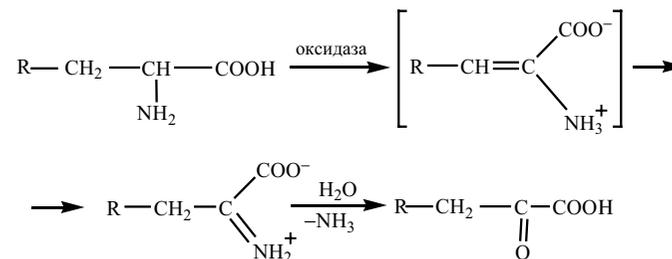
Процесс внутримолекулярного дезаминирования с образованием α,β-непредельных кислот протекает *in vivo* и является ферментативным.

В эту реакцию вовлекаются α-аминокислоты, имеющие в молекуле электроноакцепторные заместители. Так, аспарагиновая кислота легко вступает в эту реакцию, катализируемую аспарат-аммиаклиазой (аспартазой):



с образованием фумарата аммония. Процесс обратим, и в микробиологической промышленности с помощью клеток *E. coli*, содержащих аспаратаммиаклиазу, синтезируют L-аспарагиновую кислоту. Для живых систем особое значение имеет окислительное дезаминирование — ферментативный процесс, протекающий по двум схемам: прямое и непрямое окислительное дезаминирование.

Прямое окислительное дезаминирование осуществляется оксидазами L- и D-аминокислот, которые находятся в пероксиосомах. Процесс осуществляется по схеме:



Оксидаза L-аминокислот малоактивна при физиологических значениях pH. Более активна оксидаза D-аминокислот. Однако ее роль до сих пор неясна, т. к. поступающие с пищей белки содержат L-аминокислоты.

Возможно, часть L-аминокислот изомеризациями бактерий превращается в D-аминокислоты, которые всасываются и дезаминируются в тканях оксидазами D-аминокислот. Однако в целом прямое окислительное дезаминирование играет незначительную роль в превращениях групп -NH₂ аминокислот. Основной путь дезаминирования *in vivo* — это трансаминирование.

Процесс трансаминирования (переноса группы -NH₂) между α-аминокислотой и α-оксокислотой в организме происходит с участием кофермента пиридоксальфосфата и соответствующей аминотрансферазы (трансаминазы). Суть этого процесса состоит в передаче аминогруппы от α-аминокислоты, выступающей донором аминогруппы, на α-оксокислоту, являющуюся акцептором аминогруппы.



Кофермент — пиридоксальфосфат выполняет функцию переносчика аминогруппы (рисунок 7).

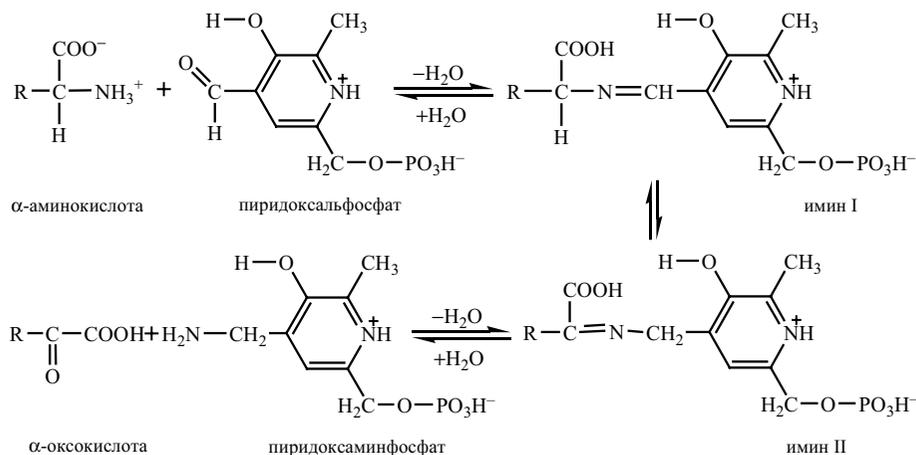
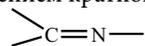


Рис. 7. Перенос аминогруппы с участием пиридоксальфосфата

Сначала пиридоксальфосфат за счет альдегидной группы образует с молекулой α -аминокислоты имин I, который в результате имин-иминной таутомерии превращается в имин II с иным расположением кратной связи

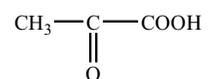


Этот имин гидролизуется, образуя α -оксокислоту и пиридоксаминфосфат. С пиридоксаминфосфатом взаимодействует другая α -оксокислота, и реакция протекает в обратном направлении, давая новую α -аминокислоту и пиридоксальфосфат.

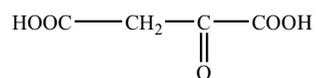
Аминотрансферазы имеются во всех животных и растительных клетках, а также в клетках микроорганизмов. Большинство из них действует только на аминокислоты L-ряда, но у микроорганизмов обнаружены аминотрансферазы, действующие только на D-аминокислоты.

Источником аминогрупп в реакции трансаминирования служат не только протеиногенные α -аминокислоты, но и многие β , γ , δ и ϵ -аминокислоты, а также амиды аминокислот — глутамин и аспарагин.

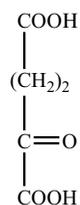
Акцептором аминогрупп в реакциях трансаминирования являются три α -кето-кислоты:



пировиноградная кислота



щавелевоуксусная кислота



2-кетоглутаровая кислота

С помощью реакции трансаминирования регулируется содержание аминокислот в клетках и устраняется избыток отдельных аминокислот.

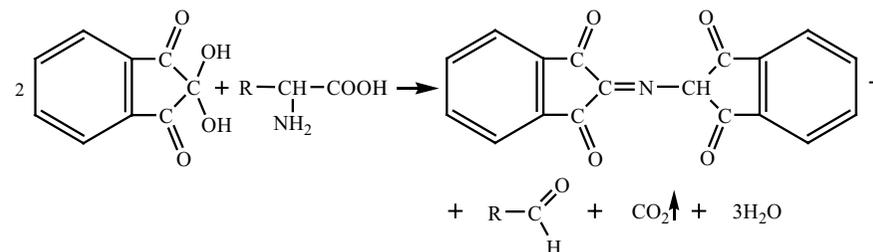
5.9. Качественные реакции на α -аминокислоты

Существуют общие, групповые и частные цветные реакции на аминокислоты.

Общая качественная реакция на α -аминокислоты

Общей качественной реакцией на α -аминокислоты является реакция с нингидрином (нингидриновая реакция). Продукт реакции имеет сине-фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 570 нм. Поэтому реакция с нингидрином (гидратом индантриона-1,2,3, образующимся в ходе реакции из 1,2,3-трикарбонильного производного) используется для визуального обнаружения α -аминокислот при хроматографировании (на бумаге, в тонком слое) и для их спектрофотометрического определения.

Нингидриновая реакция — это реакция на α -аминогруппу.

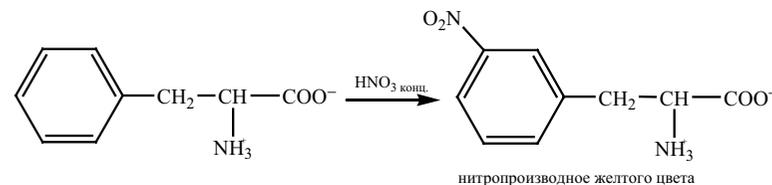


Рассмотрим нингидриновую реакцию более подробно (рисунок 8).

Специфические качественные реакции на группы протеиногенных аминокислот и отдельные α -аминокислоты

Как уже отмечалось, помимо общей реакции на α -аминокислоты — нингидриновой — имеется ряд групповых реакций.

К таким реакциям в первую очередь следует отнести ксантопротеиновую реакцию (на ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин, триптофан).



Важнейшей групповой реакцией на протеиногенные аминокислоты является реакция Фояля на серосодержащие аминокислоты — цистеин, цистин, метионин:



Т. е. проведение качественного анализа на присутствие серосодержащих аминокислот предполагает разрушение определяемых соединений.

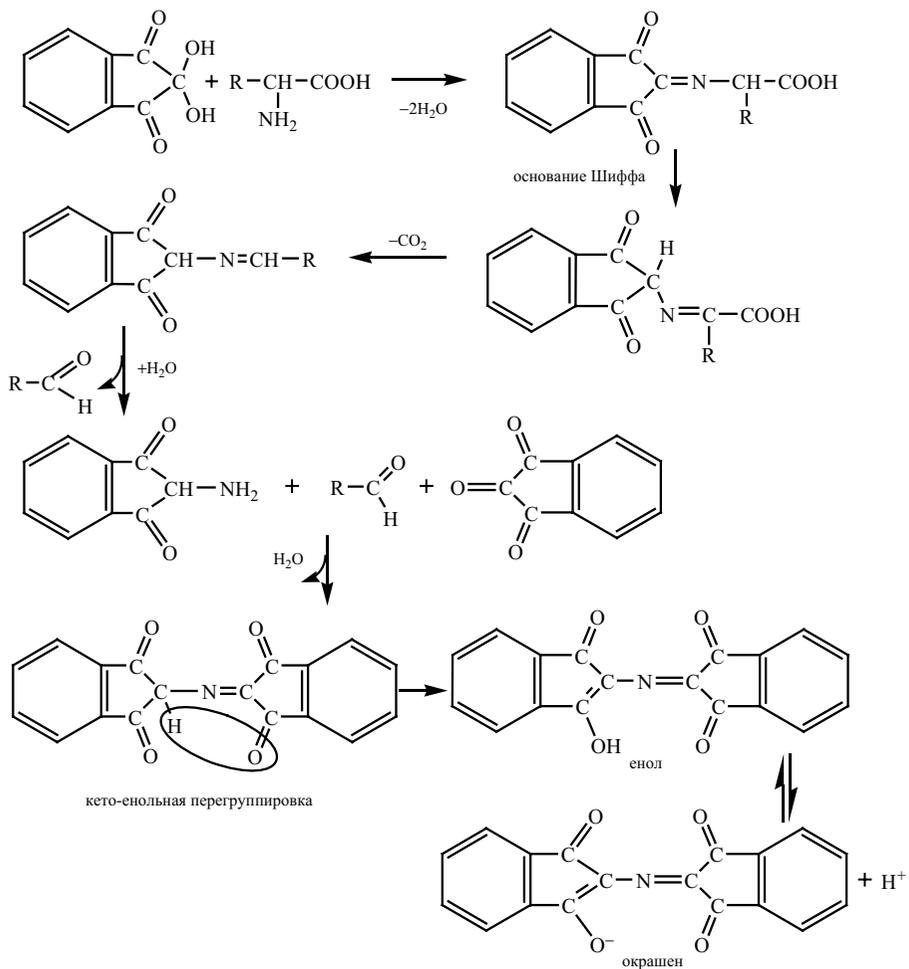
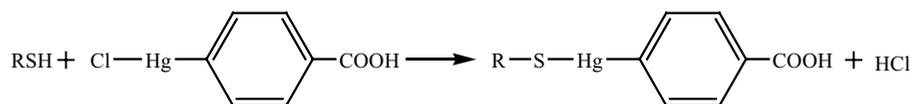


Рис. 8. Механизм нингидриновой реакции

Помимо групповой реакции на серосодержащие аминокислоты цистеин, содержащий тиольный фрагмент, может быть обнаружен реакцией с *p*-хлормеркуробензойной кислотой:



Однако следует отметить, что наличие цистина в первичной структуре белка затем приводит к образованию дисульфидных мостиков на этапах формирования высших уровней структуры белка и в этом случае при гидролизе обнаруживается преимущественно цистин.

Цистеин и цистин составляют сопряженную окислительно-восстановительную пару, для которой характерно тиол-дисульфидное равновесие ($E_0 = -0,22 \text{ В}$). Как видно из значения отрицательного потенциала, восстановительные свойства цистеина ярко выражены.

Поэтому цистеин является эффективным антиоксидантом, выполняя защитные функции при воздействии на организм сильных окислителей. Сильные восстановители, например сольватированный электрон, способны, наоборот, превратить цистин в цистеин.

Взаимопревращаемость цистеина и цистина осуществляется не только под действием химических агентов, но и с участием фермента — цистинредуктазы.

Обратимость этой реакции играет важную роль в регуляции процессов обмена в организме.

Помимо образования цистеина, возможно и более глубокое окисление цистеина сильными окислителями с образованием цистеиновой кислоты и последующим ее декарбоксилированием до таурина:

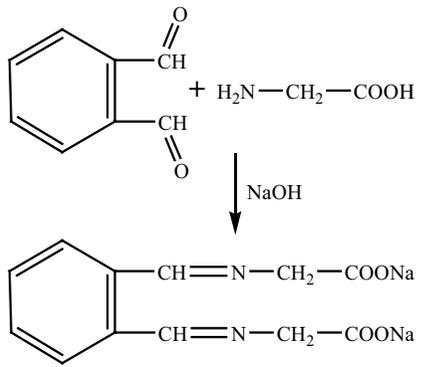
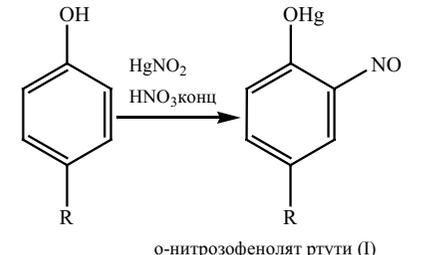
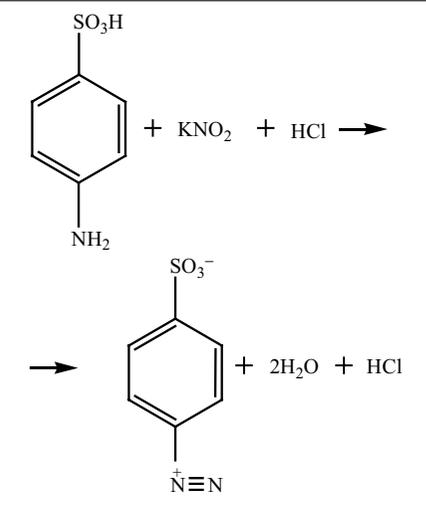


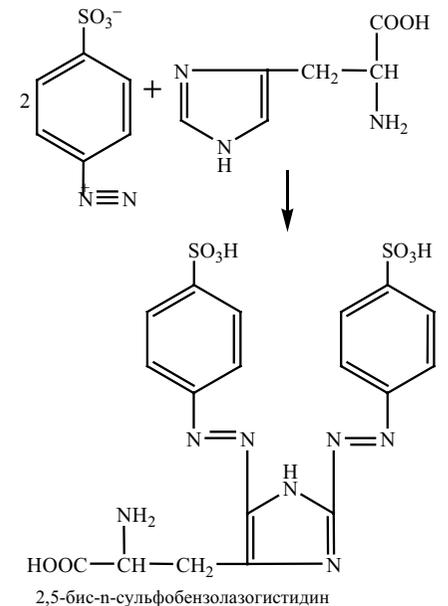
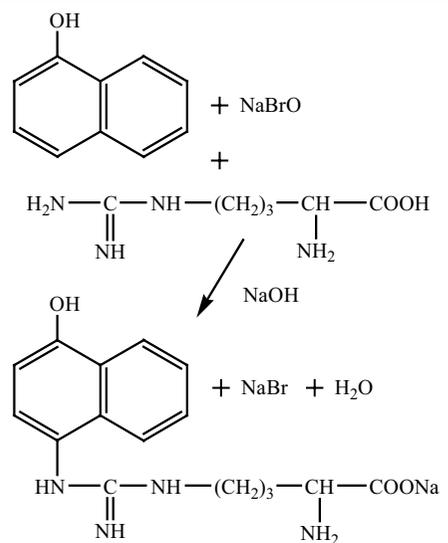
Кроме групповых реакций, существует большое количество цветных реакций на отдельные аминокислоты, некоторые из которых представлены в таблице 13.

Таблица 13

Цветные реакции на индивидуальные аминокислоты

Определяемая аминокислота и название реакции	Определяемый фрагмент	Реактив	Уравнение реакции	Цвет реакционного раствора
Пролин	Пирролидиновое кольцо	Раствор нингидрина в ацетоне		Ярко-желтый

Определяемая аминокислота и название реакции	Определяемый фрагмент	Реактив	Уравнение реакции	Цвет реакционного раствора
Глицин (Циммермана)	Аминометильный фрагмент	Раствор о-фталевого диальдегида в вод. NaOH	 <p style="text-align: center;">o-нитрозофенолят ртути (I)</p>	Зеленый осадок
Тирозин (Миллона)	Фенольный гидроксил	Р-р $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_2)_2$, HgNO_3 , HgNO_2 в HNO_3 конц.	 <p style="text-align: center;">o-нитрозофенолят ртути (I)</p>	Красное окрашивание
Гистидин (Паули)	Имидазольный фрагмент	Р-р сульфаниловой кислоты и KNO_2 в HCl с добавкой Na_2CO_3		Оранжевое окрашивание

Определяемая аминокислота и название реакции	Определяемый фрагмент	Реактив	Уравнение реакции	Цвет реакционного раствора
			 <p style="text-align: center;">2,5-бис-n-сульфобензолазогистидин</p>	
Аргинин	Гуанидиновый фрагмент	Р-р α-нафтола и NaBrO в NaOH		Красное окрашивание

Определяемая аминокислота и название реакции	Определяемый фрагмент	Реактив	Уравнение реакции	Цвет реакционного раствора
Триптофан (Гопкинса-Коле)	Индольный фрагмент	P-р глиоксиловой кислоты и CuSO ₄ в H ₂ SO ₄ конц.	$\text{HOOC}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H} \xrightarrow[\text{-CO}_2]{\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ конц.}} \text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H}$ $2 \text{ C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{H} \xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}}$ <p>бис-2-триптофанилметан</p> <p>бис-2-триптофанилкарбинол</p>	Фиолетовое окрашивание

Определяемая аминокислота и название реакции	Определяемый фрагмент	Реактив	Уравнение реакции	Цвет реакционного раствора
Триптофан (Эрлиха)	Индольный фрагмент	p-диметиламинобензальдегид в H ₂ SO ₄	$2 \text{ C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} + \text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow{-\text{H}_2\text{O}}$ 	Краснофиолетовое окрашивание

5.10. Непротеиновые аминокислоты

К настоящему времени в различных объектах живого мира найдено около 200 различных аминокислот.

В организме человека содержится около 60 различных аминокислот и их производных, но, как уже отмечалось, не все они участвуют в построении белковых молекул.

Аминокислоты, не участвующие в построении полипептидных цепей, получили название непротеиновых.

Непротеиновые аминокислоты либо находятся в клетке в свободном виде (как продукты обмена), либо входят в состав других небелковых соединений. Ниже представлены некоторые из непротеиновых аминокислот, имеющие важное биологическое значение (таблица 14).

Непротеиновые аминокислоты, в отличие от протеиновых, более разнообразны, особенно те, которые содержатся в грибах и высших растениях.

Непротеиновые аминокислоты могут быть даже токсичны для организма другого вида, т. е. ведут себя как обычные чужеродные вещества.

К токсичным для человека непротеиновым аминокислотам относятся представленные в таблице 15.

Некоторые непотеиногенные аминокислоты, имеющие важное биологическое значение

Аминокислота, строение	Название	Биологическая роль
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	орнитин	Участвует в обезвреживании аммиака в цикле мочевины
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	цитруллин	Участвует в обезвреживании аммиака в цикле мочевины
$\text{H}_2\text{NCH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	γ — Аминомасляная	Нейромедиатор, участвует в передаче нервного импульса
$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$	β — Аланин	Входит в состав витамина — пантотеновой кислоты и кофермента А

Таблица 15

Непотеиногенные аминокислоты, токсичные для человека

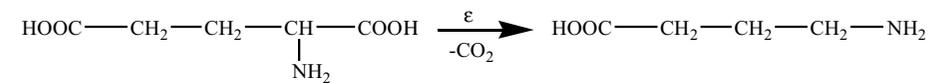
Аминокислота	Название	Источник выделения
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{O} \\ \\ (\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	канаванин	Бобы Canavalia ensiformis
$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \\ \text{S} \quad \quad \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$	Двенколевая кислота	Растительные объекты

Аминокислота	Название	Источник выделения
$\text{NC}-\text{CH}_2-\overset{\text{H}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}-\text{COOH}$	β -цианоаланин	Растительные объекты

5.10.1. Отдельные представители непотеиногенных аминокислот

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК)

γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) образуется из α -глутаминовой кислоты под действием фермента глутамат-декарбоксилазы (ϵ)



Синтез ГАМК осуществляется в тормозных синапсах нервной системы. ГАМК — важнейший нейромедиатор, функционирующий прежде всего в мозге и тормозящий передачу нервного возбуждения. Именно ГАМК принадлежит ведущая роль в процессах торможения в центральной нервной системе.

Мозг имеет свой, строго определенный пул этой непотеиногенной аминокислоты и фиксированное распределение по отделам. Наибольшие количества ГАМК содержатся в подкорковых образованиях головного мозга. В периферических органах ГАМК встречается в следовых концентрациях (таблица 16).

Таблица 16

Содержание ГАМК в мозге кошки в мкмоль/г ткани

Отдел мозга	таламус	средний мозг	мозолистое тело	кора височной доли	мозжечок
ГАМК, мкмоль/г ткани	3,65	5,81	0,961	1,39	1,49

Данные таблицы подтверждают нейротрансмиттерную роль γ -аминомасляной кислоты.

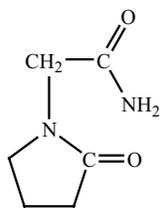
Следует отметить, что биологические функции ГАМК достаточно разнообразны. Наличие ГАМК в ЦНС необходимо для нормального течения обмена веществ: под ее влиянием усиливаются энергетические процессы, повышается дыхательная активность тканей головного мозга, улучшается утилизация мозгом глюкозы, активируются многие ферменты тканевого дыхания, улучшается кровообращение мозга, стимулируется удаление из мозга токсичных продуктов.

γ -Аминомасляная кислота — действующее начало многих медицинских препаратов, используемых при сосудистых заболеваниях головного мозга (атеросклероз, гипертоническая болезнь), которые сопровождаются нарушением памяти, внимания, речи, головными болями, а также для лечения нарушений психической и умственной деятельности на почве алкоголизма.

Структура ГАМК лежит в основе транквилизатора фенибута-гидрохлорида γ -амино- β -фенилмасляной кислоты

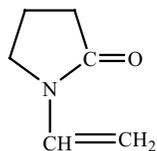


Важное значение для медицины имеют производные «циклической формы ГАМК» — ее лактама (γ -бутиролактама или пирролидона-2). Пирацетам (ноотропил) — амид (1-пирролидон-2-ил) — уксусной кислоты

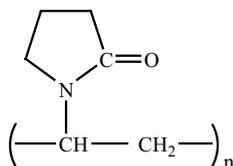


рассматривается как первый представитель «ноотропных», т. е. влияющих на мышление, веществ.

Полимер 1-винилпирролидона-2-поливинилпирролидон —



1-винилпирролидон



поливинилпирролидон

используется как эффективный заменитель плазмы крови.

β -Аланин

β -Аланин $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$ непротеиногенная аминокислота с достаточно активным метаболизмом. β -Аланин — основной продукт распада пиримидиновых оснований. Однако данная аминокислота активно вовлекается и в анаболические процессы. Так, β -аланин активно используется для синтеза дипептидов — ансерина и карнозина — участвующих в процессах мышечного сокращения.

D-аминокислоты

Ранее считалось, что D-аминокислоты не встречаются в живой природе. Однако из природного материала (капсул спорозоных бактерий палочки сибирской язвы, сенной палочки) были выделены полипептиды в виде полимеров D-глутаминовой кислоты. Как было показано позднее, D-глутаминовая кислота и D-аланин входят в состав клеточной стенки некоторых бактерий. Также D-аминокислоты обнаружены в составе некоторых антибиотиков, вырабатываемых микроорганизмами. Аминокислоты D-ряда отличаются от своих L-изомеров не только оптически, но и некоторыми другими свойствами. Так, D-глутаминовая кислота безвкусна, а L-глутаминовая имеет вкус мяса.

Ферменты, катализирующие превращения протеиногенных L-аминокислот, не способны катализировать превращения их D-изомеров. Однако, как и основные протеиногенные аминокислоты, аминокислоты D-ряда способны к дезаминированию (под действием оксидаз D-аминокислот), образуют различные функциональные производные по карбоксильной и аминогруппе, вступают в реакции декарбоксации.

6. ПЕПТИДЫ

Как уже отмечалось, к пептидам относят полиаминокислотные цепи с относительно невысокой молекулярной массой. Минимальное число остатков аминокислот, входящих в состав пептида — два. В этом случае такое соединение называют дипептид. Если число аминокислотных остатков равно трем, то мы имеем дело с трипептидом и т. д.

Например:

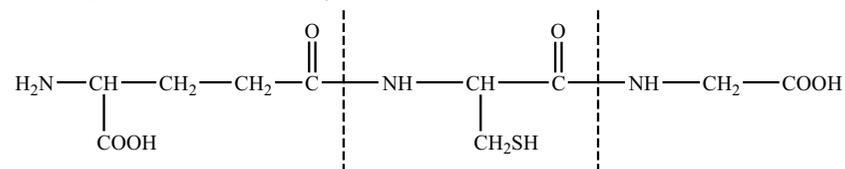


Такое построение характерно для всех пептидов и белков вне зависимости от длины их цепи.

6.1. Номенклатура пептидов и белков

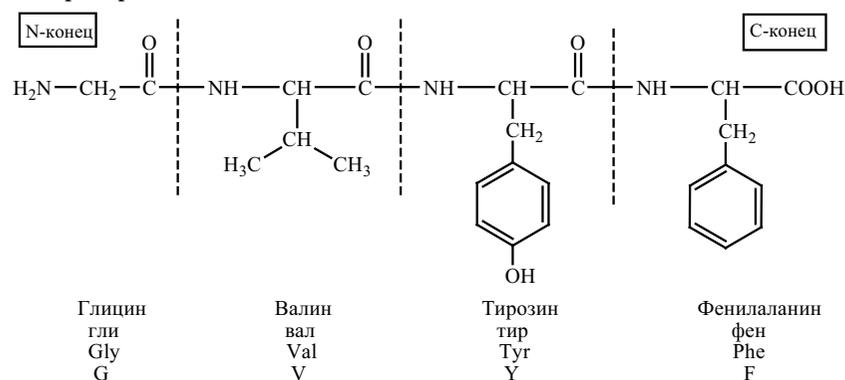
Однообразное построение полипептидной цепи предполагает единое формирование названия. Называют лишь короткие пептиды путем последовательного перечисления аминокислотных остатков начиная с N-конца, рассматривая аминокислотные остатки за исключением последнего, стоящего на C-конце, как радикалы. Тогда приведенный выше трипептид следует назвать: глицил-валил-фенилаланин.

Важнейшим природным трипептидом, содержащимся во всех клетках теплокровного организма, является глутатион,



который согласно правилам следует назвать γ -глутамил-цистеинил-глицин. Для обозначения длинных полипептидов пользуются условными сокращенными обозначениями аминокислот, входящих в состав характеризуемого пептида, записывая последовательность с N-конца.

Например:



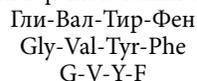
Глицин
гли
Gly
G

Валин
вал
Val
V

Тирозин
тир
Tyr
Y

Фенилаланин
фен
Phe
F

Тогда, используя сокращенные обозначения аминокислот, представленный выше тетрапептид глицил-валил-тирозил-фенилаланин можно записать:



В отличие от пептидов, систематизация в номенклатуре белков, за исключением ферментов, отсутствует. Названия белкам дают по случайным признакам, учитывая преимущественно источник выделения или какие-то особенности растворимости или формы молекул.

6.2. Биологические функции пептидов

Природные олигопептиды, содержащие 2–50 аминокислотных остатков, обнаруживаются практически во всех формах живых организмов. Их функции настолько многообразны, что в настоящее время трудно судить, в реализации каких жизненно-важных процессах они не участвуют.

В самом общем виде низкомолекулярные пептиды называют регуляторными. Они функционируют во всех регуляторных системах: нервной, эндокринной, иммунной.

Известно более 6000 олигопептидов, образующихся рибосомальным синтезом.

У бактерий и грибов значительное их количество образуется нерибосомальным синтезом. Одних только бактериальных пептидов с высоким содержанием аминокислотной кислоты (пентаболы) известно более 300.

Биологические функции пептидов чрезвычайно разнообразны. Среди биологических функций пептидов можно выделить следующие:

- 1) токсигенная;
- 2) лекарственная;
- 3) регуляторная;
- 4) антиоксидантная.

В группу пептидов, выполняющих токсигенную функцию, относятся многие нейротоксины микроорганизмов, грибов, пчел, змей, скорпионов и морских рыб. Прежде всего следует отметить ботулинический токсин, выделяемый анаэробными микроорганизмами *Clostridium botulinum*. Он является сильнейшим из ныне известных нейротропных ядов.

В кристаллическом виде ботулинический токсин был впервые выделен в 40-е годы американским химиком Леманна. Яд представляет собой смесь протеинов с $M = 90000 \div 150000$, включающую пять компонентов, и по молекулярной массе может быть отнесен к белкам. Установлено, что в основе его токсического действия лежит торможение передачи нервного импульса.

Яды змей — сложная смесь биологически активных полипептидов, состоящих их 59–62 аминокислот. Их полипептидная цепь включает три β -складчатые петли, выходящие из центрального ядра, стабилизированного четырьмя дисульфидными связями.

Одним из чрезвычайно опасных растительных токсинов полипептидной природы является рицин, выделенный из клещевины. В семенах клещевины содержится до 3 % данного токсина, относящегося к группе токсикоальбуминов. Молекула рицина состоит из двух полипептидных цепей А и В, связанных дисульфидными мостиками. Рицин вызывает гемолиз эритроцитов, является мощным ингибитором синтеза белков. За его биологическую активность ответственна субъединица А. Цепь В является проводником молекулы в клетку.

Носителями лекарственной функции являются антибиотики пептидной природы, например, различные грамицидины (грамицидины А, В, С, S). Обычно это короткие пептиды. Так, грамицидин С — циклический декапептид, вырабатываемый палочкой *Bacillus brevis*.

Группа пептидных антибиотиков, вырабатываемых микроорганизмами, чрезвычайно разнообразна. В нее следует включить актиноксантин, цефалоспорины, тироцидиновые и другие антибиотики.

Круг пептидов, выполняющих регуляторную функцию, также чрезвычайно широк.

К этой группе следует отнести нейропептиды, включающие более 150 разнообразных по строению химических соединений, рилизинг-факторы, а также множество гормонов пептидной природы. Нейропептиды — различные по структуре небольшие пептиды, обладающие свойствами физиологических передатчиков, например, играют важнейшую роль в передаче болевых ощущений. Некоторые из пептидов данной группы не присутствуют постоянно в мозговой ткани, а синтезируются лишь в связи с определенным стимулом.

Комплекс пептидов эпифиза — эпиталамин, дипептид тимуса — тимоген (Glu-Trp), а также полученные направленным химическим синтезом пептиды: вилон (Lys-Glu) и эпиталон (Ala-Glu-Asp-Gly) восстанавливают активность этих органов и обладают выраженным геропротекторным (замедляющим старение) действием.

Гормональная функция пептидов является одной из важнейших. Гормоны — химические медиаторы, вырабатываемые специальными секреторными клетками эндокринных желез.

Ниже приведены примеры некоторых гормонов пептидной природы (таблица 17).

Таблица 17

Некоторые гормоны пептидной природы и их биологические функции

Гормон	Место продукции	Биологическая роль
Инсулин (две полипептидные цепи 30 + 21 аминокислота)	β -клетки поджелудочной железы	Воздействует на рецепторы на поверхности клеток, стимулирует использование глюкозы, регулирует обмен углеводов, жиров, белков
Адренокортикотропин (39 аминокислот)	Передняя доля гипофиза	Стимулирует функционирование коры надпочечников
Окситоцин (9 аминокислот)	Задняя доля гипофиза	Стимулирует сокращение мускулатуры матки и мышечных волокон молочных желез, встречается только у женских особей
Брадикинин (9 аминокислот)		Подавляет воспалительные процессы в тканях
Тиреолиберин (3 аминокислоты)	Гипоталамус	Стимулирует синтез другого гормона — тиреотропина
Энкефалины (по структуре близки к опиатам (собственные опиаты) (5 аминокислот)	Центральная нервная система	Воздействуют на рецепторы некоторых клеток мозга, вызывают эффект анестезии (обезболивания)
Вазопрессин (9 аминокислот)	Задняя доля гипофиза	Регулирует минеральный и водный обмен, является стимулятором запоминания
Пролактин $M=23500$ (220 аминокислот)	Передняя доля гипофиза	Влияет на рост грудных желез и индуцирует секрецию молока

К настоящему времени изучено более 300 биологически активных пептидов и их аналогов.

Можно с уверенностью утверждать, что регуляторные пептиды играют ключевую роль в поддержании гомеостаза (постоянства внутренней среды), так как именно они в первую очередь определяют основные параметры формирования комплекса компенсаторно-приспособительных реакций организма на стрессорное воздействие и нарушения гомеостатического баланса.

Ключевые звенья поддержания постоянства внутренней среды организма — продукция и секреция целого ряда клеточных медиаторов: пептидных гормонов и цитокинов (интерлейкинов, хемокинов, факторов роста и др. молекул). Таким образом, гомеостаз в многоклеточном организме поддерживается особыми соединениями, объединенными общим названием: регуляторные пептиды — клеточные медиаторы.

Регуляторные пептиды в высшей степени полифункциональны, что и определяет их важную роль в организме. Согласно одной из гипотез регуляторные пептиды совместно с другими веществами образуют функционально непрерывную совокупность — континуум, обеспечивающий регуляцию процессов жизнедеятельности.

Установлено, что такое регуляторное действие достигается благодаря хорошо скоординированной реализации одной из наиболее существенных функций регуляторных пептидов — их способности к оптимальному и в высшей степени мобильному сочетанию синтеза и/или рилизинга соответствующего пептида в нужное место и в нужное время (правило «что-где-когда»).

Выявлена и достаточно интенсивно изучается защитная функция пептидов. Так, показано, что пептиды участвуют в защите от патогенных бактерий и грибов.

В настоящее время антимикробные пептиды эукариот определяются как полипептидные соединения длиной не более чем 100 аминокислотных остатков.

У растений обнаружено 9 классов защитных пептидов, размеры которых варьируются от 20 до 90 аминокислотных остатков.

Все они являются положительно заряженными, цистеин-обогащенными, стабилизированными S—S мостиками, число которых варьируется от двух до восьми.

Все растительные антимикробные пептиды, для которых известна их пространственная организация, содержат β-складки, ассоциированные с α-спиралями.

В настоящее время известно большое число природных антимикробных пептидов, выделенных из различных органов животных. Они содержат гидрофобные (лей, ала, илей) и основные аминокислоты, в основном лизин.

Природные антимикробные пептиды обнаруживаются практически во всех формах живых организмов. В специализированном банке данных ANTIMIC содержится информация примерно о 1700 природных антимикробных пептидах, различающихся химической структурой и функциями.

Несмотря на разнообразие первичной структуры, антибактериальные олигопептиды обладают одним общим свойством: все они, не будучи связанными поперечными ковалентными мостиками, обладают повышенной конформационной подвижностью.

Синтезированы искусственные пептиды из D-аминокислот. Они также обладают антимикробной активностью, но устойчивы к действию протеаз.

Антиоксидантная функция может рассматриваться как одно из проявлений защитной функции пептидов.

Важнейшим антиоксидантом пептидной природы является трипептид глутатион — низкомолекулярный компонент антиоксидантной системы аэробного организма, который взаимодействует с различными кислородсодержащими радикалами, подавляя их токсическое действие.

Некоторые пептиды обладают нейропротекторным действием, предотвращают дегенерацию нейронов, происходящую спонтанно или под воздействием различных неблагоприятных факторов.

Это открывает перспективы их использования как терапевтических средств в неврологической практике.

Все многообразие пептидов со столь обширным набором функций, среди которых обнаруживаются яды, антибиотики, гормоны, в основном построено из тех же аминокислот, что и жизненно необходимые для человека белки.

6.3. Структурная классификация пептидов

Пептиды в сравнении с белками значительно более разнообразны по своей химической структуре.

6.3.1. Канонические и неканонические пептиды

Соответственно все разнообразие пептидов можно разделить на две большие группы:

- 1) пептиды со строением, типичным для белка, построенные из канонических протеиногенных аминокислот;
- 2) пептиды, имеющие структуру, нетипичную для белка;

Группа пептидов с нетипичной для белка структурой значительно более разнообразна. В состав пептидов этой группы входят аминокислоты, не относящиеся к каноническим, например, имеющие D-конфигурацию. Выделяемые из микроорганизмов пептиды данной группы обладают выраженной биологической активностью; некоторые из них токсичны для растений и животных, другие нашли применение в качестве антибактериальных, противоопухолевых и противовирусных агентов.

Принципиальным отличием пептидов двух групп являются особенности их биосинтеза. Канонически построенные пептиды синтезируются на рибосомах при строгом генетическом контроле, а пептиды неканонической структуры синтезируются в рамках вне ribосомальных ферментативных процессов. В этом случае один и тот же вид микроорганизмов способен синтезировать смесь родственных пептидов. Именно с таким явлением часто приходится сталкиваться в процессах микробиологического синтеза антибиотиков. Значительно большее разнообразие в строении неканонических пептидов прежде всего обусловлено включением в их структуру D-аминокислот (таблица 18).

Таблица 18

Природные пептиды с включением D-аминокислот

Пептид	Включенная в его состав D-аминокислота
В составе антибиотиков	
Грамицидины, актиномицин С	D-валин
Грамицидин А	D-лейцин
Полимиксины, этамицин	
Бацитрацин	D-изолейцин
Грамицидин S, тироцидин	D-фенилаланин
Полимиксин D	D-серин
Этамицин	D-аллогидроксипролин

Пептид	Включенная в его состав D-аминокислота
Структурные пептиды микроорганизмов	
Пептиды клеточной стенки <i>Lac-tobacillus arabinosus</i>	D-аланин
Пептиды клеточной стенки <i>Lactobacillus arabinosus</i> и пептиды капсулы <i>B. Anjhracis</i> , <i>B. Subfilus</i> , <i>B. Mesentericus subfilis</i> , Клеточная стенка бактерий сибирской язвы	D-глутаминовая кислота

Все эти D-аминокислоты, найденные в составе природных пептидов, являются α-аминокислотами.

6.3.2. Неканонические пептиды

Учитывая, что группа неканонических пептидов очень обширна и разнообразна, пептиды неканонического строения также можно разбить на ряд семейств:

1. модифицированные малые пептиды (прежде всего антибиотики пептидной природы — пенициллины и цефалоспорины);
2. небольшие линейные пептиды;
3. циклические дипептиды (2,5-диоксопиперазины);
4. циклические гомодетные пептиды, в которых циклы образованы только за счет пептидных связей;
5. циклические гетеродетные пептиды, в которых образование цикла осуществляется как за счет образования пептидных, так и иных связей;
6. крупные модифицированные пептиды;

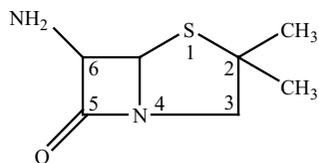
Кратко рассмотрим некоторые представители отдельных групп неканонических пептидов.

6.3.2.1. Представители модифицированных малых пептидов

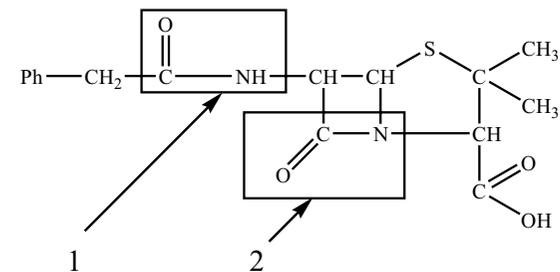
Природные пенициллины и цефалоспорины являются пептидными производными, содержащими β-лактамыный цикл, наличие которого и позволило отнести их к данной группе.

Группа природных антибиотиков — пенициллинов продуцируется различными видами плесневого гриба *Penicillium chrysogenum*, *Penicilium notatum* и другими.

В результате жизнедеятельности этих грибов образуются различные виды пенициллинов. Данные антибиотики можно рассматривать как производные 6-аминопенициллановой кислоты



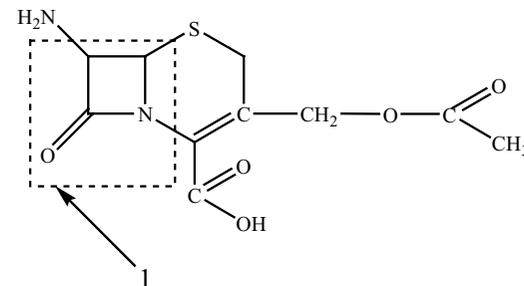
Семейство пенициллинов достаточно многочисленно и различается прежде всего строением заместителей. Одним из наиболее активных его представителей является бензилпенициллин, имеющий следующее строение



1 — амидная связь, образованная 6-аминопенициллановой и фенилуксусной кислотами и позволяющая отнести данное соединение к группе пептидоподобных веществ.

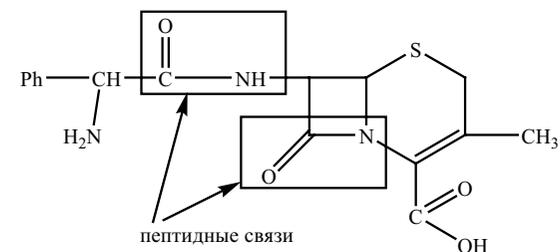
2 — амидная связь β-лактамыного цикла

К цефалоспориам относится группа природных антибиотиков и их полусинтетических аналогов, имеющих в своей основе 7-аминоцефалоспориновую кислоту



1 — β-лактамыный цикл, включающий амидную связь.

Нашедшим широкое применение антибиотиком данной группы является цефалексин,



содержащий в молекуле две пептидные связи: одну в составе β — лактамыного цикла 7-аминоцефалоспориновой кислоты и вторую, образованную аминогруппой 7-аминоцефалоспориновой кислоты и карбоксильной группой фенилаланина.

6.3.2.2. Небольшие линейные пептиды. Глутатион

Важнейшим представителем группы небольших линейных пептидов является глутатион.

Глутатион представляет собой трипептид. В его состав входят канонические аминокислоты: глутаминовая, цистеин и глицин. Однако построение данного пептида от-

лично от канонического: глутаминовая кислота участвует в образовании амидной связи своей γ -карбоксильной группой.



В организме глутатион (GSH) всегда находится в равновесии со своей окисленной формой — глутатиондисульфидом



При этом равновесие в клетке всегда сдвинуто в сторону восстановленной формы. Незначительные колебания концентраций могут оказаться критическими для регулирования некоторых физиологических процессов. Глутатион и глутатиондисульфид принимают участие во многих внутриклеточных процессах.

Важнейшая роль этих низкомолекулярных пептидов — участие в процессах, связанных с защитой клетки от патологических изменений, вызванных различными агентами, способствующими генерации радикальных интермедиатов, прежде всего радикалов кислорода и органических пероксидов.

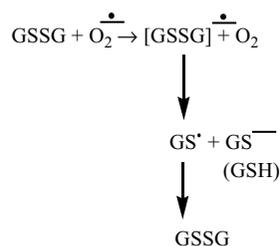
Глутатион является косубстратом важнейшего фермента антиоксидантной защиты — глутатионпероксидазы (участвует в разрушении перекисей). Однако и сам глутатион активно взаимодействует с радикалами кислорода



Образующийся при этом тиольный радикал вступает в реакцию димеризации



Окисленный глутатион, находящийся в равновесии со своей восстановленной формой, хотя и менее активно, но также взаимодействует с радикалами кислорода. Преимущественной частицей, улавливаемой GSSG, является супероксидный анион-радикал (O_2^\bullet). Процесс осуществляется по схеме



Также глутатион играет определенную роль в транспорте аминокислот через мембрану и в процессе обезвреживания ксенобиотиков, прежде всего лекарств.

Глутатион выполняет специфическую роль при восстановлении окисленной формы аскорбиновой кислоты. Помимо глутатионпероксидазы, глутатион служит коферментом глюкозидазы, малеилацетатизомеразы — ферментов, играющих важную роль в жизни микроорганизмов, а также глутатион принимает участие в под-

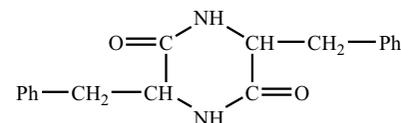
держании целостности эритроцитов, в синтезе ДНК, синтезе эйкозанов, связывании тяжелых металлов, повышении резистентности клетки к внешним воздействиям, иммунных реакциях, обеспечивает толерантность головного мозга к ишемии, имеет огромное значение для процессов терморегуляции. Одной из важнейших функций глутатиона является удержание ионов K^+ в цитоплазме через регуляцию K^+ — выходных каналов.

Глутатион играет важную роль во многих внутриклеточных процессах, включая синтез белка, регуляцию и экспрессию генов клеточного цикла. Глутатион является маркером при злокачественном росте (наблюдается резкий рост уровня глутатиона в опухолях)

6.3.2.3. Циклические дипептиды (2,5-диоксопиперазины)

2,5-Диоксопиперазины — один из самых многочисленных и широко распространенных в природе пептидных производных.

Существует множество 2,5-дикетопиперазинов природного происхождения, например дипептид, построенный из L-фенилаланина



Примеры продуцируемых микроорганизмами дипептидов, построенных из канонических L-аминокислот, приведены в таблице 19.

Таблица 19

Некоторые дипептиды, продуцируемые микроорганизмами

Дикетопиперазин	Источник
Цикло L — Pro — L — Leu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Цикло L — Pro — L — Val	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Цикло L — Pro — L — Phe	<i>Rosellinia necatrix</i>
Цикло L — Pro — L — Gly	Экстракт дрожжей
Цикло L — Ala — L — Tyr	Экстракт дрожжей
Цикло L — Phe — L — Leu	<i>Aspergillus niger</i>
Цикло L — Phe — L — Phe	<i>Streptomyces noursei</i>

Следует отметить, что среди этой группы пептидов имеется много соединений, включающих производные пролина.

Кроме природных дикетопиперазинов, непосредственно продуцируемых микроорганизмами, выделено и идентифицировано большое количество полусинтетических производных, так как они легко образуются из пептидов и белков при химическом гидролизе и термическом воздействии.

Важнейшими представителями пептидов, содержащих диоксопиперазиновый фрагмент, являются пептиды спорыньи, обладающие мощным токсическим действием.

6.3.2.4. Циклические гомодетные пептиды

Представители этой группы содержат макроциклы, образованные с помощью амидных связей.

Многие пептиды данной группы выделены из ядовитых грибов, например фаллотоксины, которые в чрезвычайно малых количествах повреждают клетки печени.

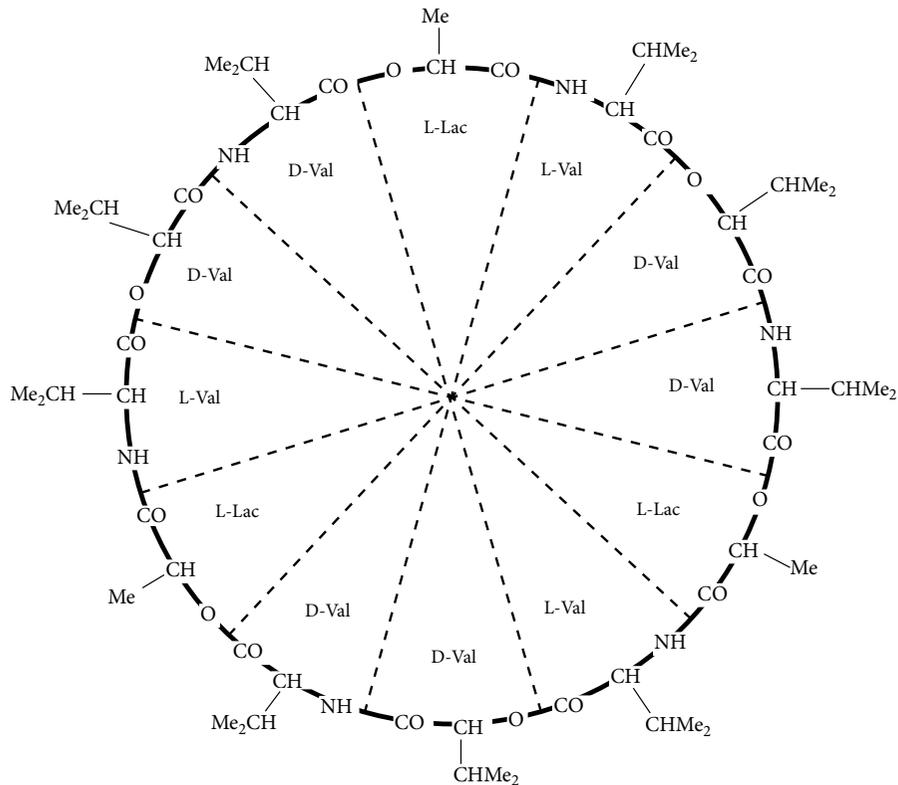


Рис. 11. Структура производных валиномицина

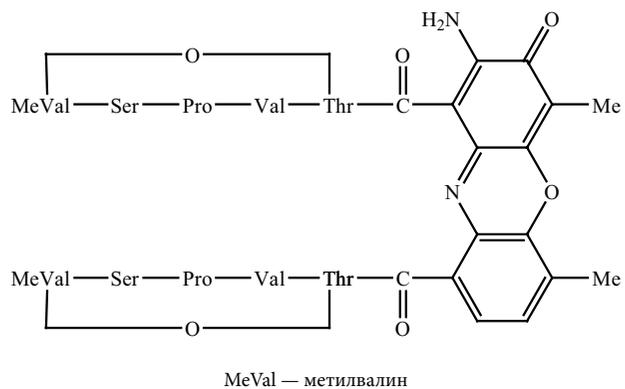


Рис. 12. Принципиальная схема строения актиномицина

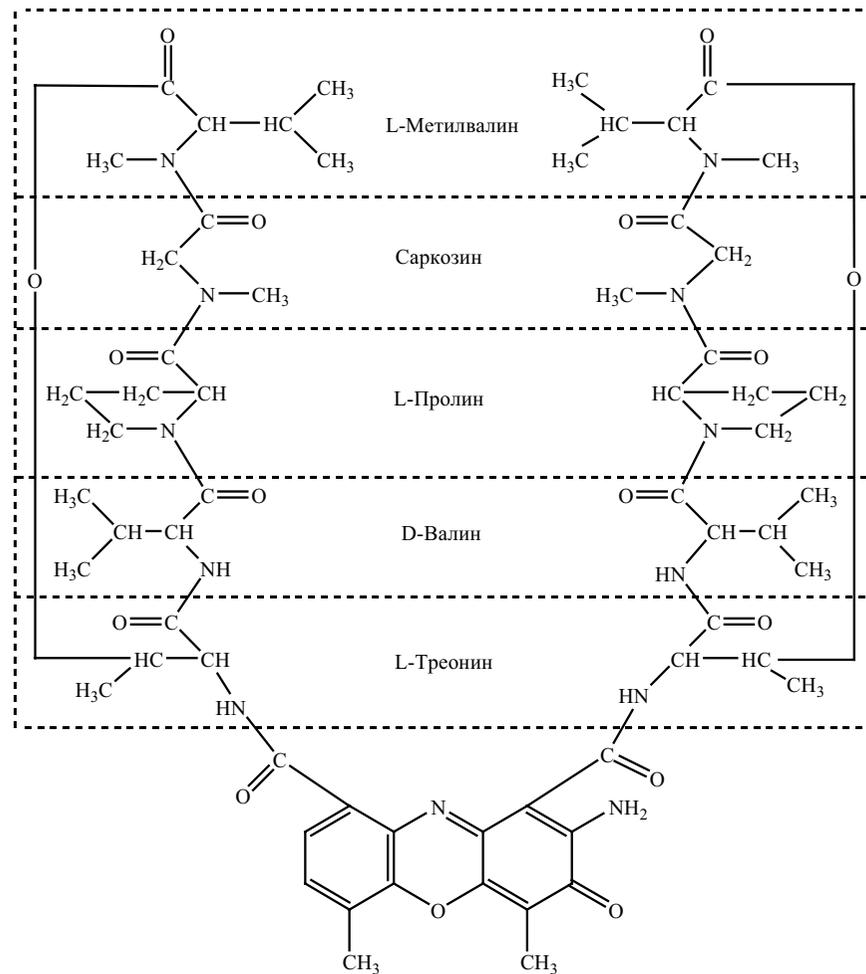


Рис. 13. Структура актиномицина D

6.3.2.6. Крупные модифицированные пептиды

К этой группе относятся крупные пептиды микробного происхождения, включающие те же модификации, что и циклические и гетеродетные пептиды, которые, однако, выделены в отдельную группу в связи со сложностью строения.

Представителем данной группы пептидов является антибиотик субтилин, продуцируемый *Bacillus subtilis*, включающий 32 аминокислотных остатка, а также ряд противоопухолевых гликопептидов семейства блеомицина.

Несмотря на рассмотренные выше отличия в строении пептидов и белков, принципиальное сходство построения полипептидных и белковых молекул и их большой размер предопределили единство принципов структурной организации этих биополимеров.

7. УРОВНИ СТРУКТУРЫ ПОЛИПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Таблица 20

7.1. Первичная структура белков

Первичная структура белка определяется составом и последовательностью аминокислотных остатков, составляющих полипептидную цепь. Таким образом, знание первичной структуры белка предполагает, какие аминокислоты и в каком количестве входят в его состав, а также последовательность их соединения между собой. При написании полных формул белков аналогично пептидам указывают порядок следования друг за другом аминокислотных остатков с помощью их трехбуквенных обозначений, начиная с N-конца полипептидной цепи.

Представление о первичной структуре миоглобина человека, содержащего в молекуле 153 аминокислотных остатка, дает следующая сокращенная запись:

1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 [140 аминокисл. остатков] –
 глй – лей – сер – асп – гли – глй – три
 – 148 – 149 – 150 – 151 – 152 – 153
 глй – лей – гли – фен – гли – гли

То есть при рассмотрении первичной структуры белка возможно выделение отдельных интересных участков (сайтов) гигантской молекулы.

В настоящее время расшифрован аминокислотный состав многих белков микробного, растительного и животного происхождения. Наиболее часто в белках находят аланин, глицин, лейцин, серин. Однако каждый белок имеет свой аминокислотный состав и определенную последовательность соединения структурных звеньев — аминокислот. Потенциально возможное число таких структур практически не ограничено; так, для 15-членного пептида, состоящего из различных аминокислот, существует 20^{15} возможностей их взаимного расположения. Для среднего по величине белка $M = 35\ 000\text{--}40\ 000$, что соответствует 350–400 аминокислотам в его составе (усредненная молекулярная масса протеиногенной аминокислоты ≈ 100) окажется, что в живой природе все эти возможности не реализуются. Общее число различных типов белков у всех живых организмов составляет величину порядка $10^{10}\text{--}10^{12}$. Если взять белок с молекулярной массой 34 000, в котором 12 аминокислот представлены в равных соотношениях, то получится 10^{300} возможных вариантов их соединений.

Двадцать аминокислот могут дать достаточное число последовательностей, чтобы их хватило не только для тысяч белков, присутствующих у каждого из ныне существующих видов организмов, но и для белков всех тех видов, которые когда-либо существовали в прошлом и появятся в будущем.

Живущие сейчас на Земле виды составляют, по имеющимся оценкам, одну тысячную всех видов, существовавших на нашей планете.

Примеры особенностей первичной структуры различных белков приведены в таблице 20.

Результаты изучения первичной структуры некоторых белков представлены в таблице 21.

Следует отметить, что знание первичной структуры белка — основа для понимания его функционирования. Связь аминокислотного состава и функции белка представлена в таблице 22.

Особенности аминокислотного состава некоторых белков

Белок	Преобладающие аминокислоты
Протамины*, простые белки, содержащиеся в молоках рыб	До 85 % аргинина
Фиброин, белок натурального шелка	До 50 % глицина
Гемоглобин	Богат гистидином (~8 % гистидина)
Коллаген — белок сухожилий	В составе редкие аминокислоты — гидроксипролин, гидроксизин

* В данных белках отсутствуют циклические, кислые, серосодержащие аминокислоты, треонин, лизин.

Таблица 21

Аминокислотный состав двух произвольно выбранных белков (указано число остатков каждой аминокислоты на одну молекулу белка)

Аминокислота	Цитохром с человека	Химотрипсиноген быка
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	15
Asp	3	8
Cys	2	10
Gln	2	10
Glu	8	5
Gly	13	23
His	3	2
Ile	8	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	3	2
Phe	3	6
Pro	4	9
Ser	2	28
Thr	7	23
Trp	1	8
Tyr	5	4
Val	3	23
всего	104	245

Таблица 22

Специфические аминокислоты, обеспечивающие выполнение белком присущей ему функции

Белок и его функция	Особенности строения
Протромбин и другие, связывающие Ca^{+2} белки	В составе найдена редкая γ -оксоглутаминовая кислота $\text{HOOC}-\underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\underset{\text{I}}{\text{CH}}}-\text{COOH}$

Наличие гомологии последовательностей предполагает, что животные, из тканей которых были выделены гомологичные белки, имеют общее происхождение. Гомология последовательностей определяет функцию белка. Таким образом, четко прослеживается связь между первичной структурой белка и его функцией.

Чем больше филогенетические различия между видами, тем сильнее различаются гомологичные белки. Например, белок-фермент цитохром *c*, участвующий в процессах тканевого дыхания, для дрожжей и утки имеет различия в 48 аминокислотах, а для курицы и утки, значительно более близких филогенетически, только в двух.

Гомологичные белки, выполняющие одну и ту же функцию, могут существенно различаться по молекулярной массе, а также иметь различные кислотно-основные свойства, что показано на примере фермента — пероксидазы, относящейся к группе сложных белков, включающей несколько простетических групп (гем и углеводный фрагмент), выполняющей функцию разложения пероксида водорода.

Пероксидаза королевской пальмы имеет $M = 51000$. Для пероксидазы африканской масличной пальмы $M = 57000$, $pI = 3.5$. Пероксидаза хрена имеет $M = 44000$ и $pI = 3.1$. Молекулярная масса пероксидазы сои — $M = 37000$

На основе сравнения гомологичных белков можно построить эволюционные карты, отражающие последовательность возникновения видов.

Антитела как гомологичные белки

Важнейшими представителями группы гомологичных белков являются антитела.

В ответ на введение в организм чужеродного вещества (антигена) в организме синтезируются специфические белки-антитела. Молекулы антител появляются в плазме и отдельных тканях. В ответ на определенное воздействие образуются антитела только одного вида. Наблюдаемое явление называется иммунной реакцией или иммунным ответом. Молекулы антител формируются в специальных клетках — лимфоцитах.

В основе многих существующих клинико-диагностических систем лежит принцип выявления специфического взаимодействия антиген-антитело.

Антитела соединяются с антигенами, обезвреживая их. Образование и функционирование антител можно исследовать с помощью реакции преципитации и представить в виде схемы (рисунок 14):

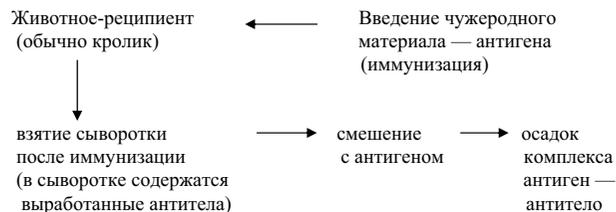


Рис. 14. Схема образования и функционирования антител

Если в качестве контроля взять сыворотку интактного (неиммунизированного) животного, то осадка при смешении с антигеном нет, так как сыворотка интактного животного не содержит антител.

Антитела имеют определенную аминокислотную последовательность на участке связывания, то есть антитела являются гомологичными белками. Поэтому антитела обладают хотя и высокой, но не абсолютной специфичностью и дают реакцию пре-

ципитации с близкими по первичной структуре белками-антигенами (следует отметить, что антигены далеко не всегда имеют белковую природу).

Так, если провести иммунизацию кролика альбумином лошади и получить антитела к данному белку, то при смешении сыворотки иммунизированного животного с гомологичными альбумину лошади белками: альбуминами сыворотки крови овцы, зебры, коровы будет наблюдаться реакция преципитации, хотя и протекающая заметно хуже.

7.2. Высшие уровни структуры белковой молекулы

Белки — высокоорганизованные молекулы, для которых характерна сложная архитектура, которая и обеспечивает выполнение данным белком характерных для него функций.

7.2.1. Вторичная структура белковой молекулы

Вторичная структура представляет собой способ укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру благодаря образованию водородных связей между пептидными группами полипептидной цепи. По конфигурации вторичная структура делится на спиральные (α -спираль) и слоисто-складчатые (β -структура) образования.

α -Спираль — одна из форм вторичной структуры

Учитывая ограничения свободного вращения вокруг пептидной связи, расчетным методом показано, что для полипептидной цепи наиболее выгодным пространственным расположением (конфигурацией) является правозакрученная спираль, названная α -спиралью.

Следует отметить, что высшие уровни структуры формируются даже в случае весьма коротких полипептидных цепей. Так, многие малые пептиды пространственно организованы. Например, нейрокинины, выделенные из мозга свиньи, состоящие из 10 аминокислот, имеют α -спиральную конфигурацию.

Пространственное расположение α -спиральной полипептидной цепи можно представить в виде линии, обвивающей некий цилиндр (рисунок 15).

На один виток спирали в среднем приходится 3,7 аминокислотных остатка. Шаг спирали составляет 0,54 нм, диаметр — 0,5 нм.

Плоскости двух соседних пептидных групп располагаются при этом под углом 108° . Боковые радикалы α -аминокислот находятся на наружной стороне спирали и направлены от поверхности цилиндра. Основную роль в закреплении такой конформации цепи играют водородные связи, которые в α -спирали образуются между атомом кислорода карбонильного фрагмента пептидной группы каждого первого аминокислотного остатка и атомом водорода — NH — фрагмента пептидной группы каждого пятого аминокислотного остатка.

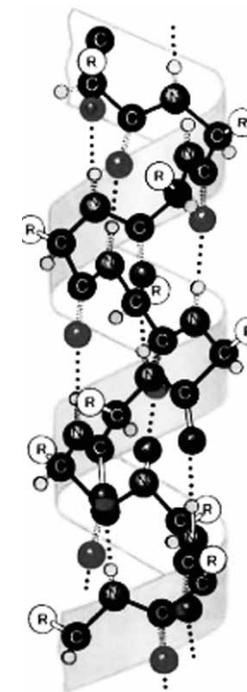
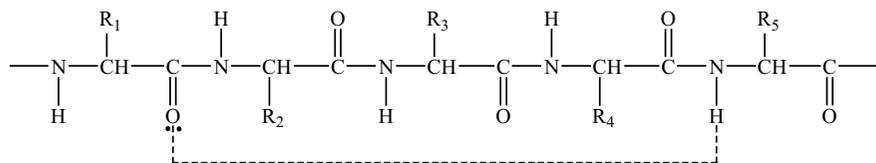


Рис. 15. Схематическое изображение α -спирали



Водородные связи направлены почти параллельно оси α -спирали, они удерживают цепь в закрученном состоянии. Помимо водородных связей, спирализации могут способствовать и некоторые ковалентные связи, так, например, дисульфидные мостики, образованные молекулами цистеина, что имеет место в α -кератинах — белках, формирующих наружные защитные покровы позвоночных: волосы, шерсть, ногти. В основе их структуры — α -спираль, форма которой, помимо водородных связей, поддерживается с помощью дисульфидных мостиков, так как эти белки богаты цистеином.

При этом для выполнения своих функций и обеспечения прочности α -спирали таких белков могут быть сшиты между собой, образуя суперспираль в виде скрученных одна вокруг другой сверхпрочных нитей, как это имеет место, например, в коллагене (рис. 16 — см. цветную вклейку).

Некоторые α -аминокислоты в силу строения бокового радикала препятствуют спирализации цепи.

Например, пролин не содержит атома водорода в составе пептидной группы и, следовательно, не может образовывать водородную связь. Поэтому в тех участках, где имеются звенья пролина, белковая цепь теряет способность к спирализации (деспирализуются) и изгибается. Спирализации полипептидной цепи также препятствует значительное число рядом расположенных остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот за счет взаимного отталкивания $-\text{COO}-$ групп, несущих отрицательный заряд при физиологических значениях pH. По той же причине спирализации препятствуют расположенные рядом остатки лизина и аргинина за счет отталкивания положительных зарядов. Рядом расположенные аминокислоты с объемными радикалами также мешают спирализации.

Таким образом, можно сформулировать следующие основные ограничения на спирализацию:

- 1) жесткость и транс-конфигурация пептидных связей;
- 2) электростатическое отталкивание аминокислотных остатков;
- 3) близкое расположение громоздких радикалов;
- 4) наличие пролина (оксипролина).

Приведенные выше ограничения на спирализацию хорошо иллюстрируют непосредственную связь вторичной структуры белков с первичной.

Следует отметить также, что спирализация полипептидной цепи возможна лишь, если цепь построена из аминокислот одного стереохимического ряда (либо L-, либо D-изомеров), что хорошо объясняет построение природных белков только из L-аминокислот. Теоретически же из любых D- или L-аминокислот можно построить как лево-, так и правозакрученную спираль.

Обычно белковые цепи бывают спирализованы не полностью, а лишь частично. В таких белках, как гемоглобин и миоглобин, содержатся довольно длинные α -спиральные участки. Например, цепь миоглобина спирализована на 75 %. Во многих же других белках доля спиральных участков в цепи может быть небольшой.

α -Спираль не является единственным способом пространственной организации полипептидной цепи.

β -Складчатая структура белковых молекул

Другим видом вторичной структуры полипептидов и белков является β -структура, называемая также складчатым листком или складчатым слоем и может быть представлена схемой (рис. 17).

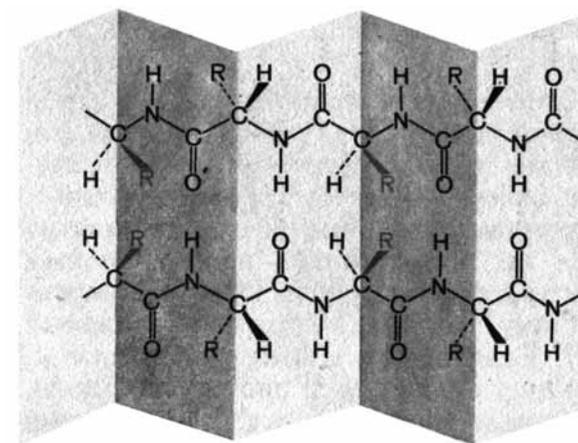
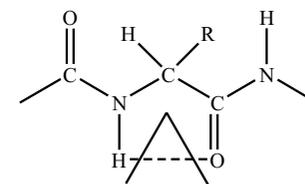


Рис. 17. Схематичное изображение β -складчатого слоя

Складчатый слой формируется путем изгибания полипептидной цепи и сближения в пространстве плоскостей отдельных пептидных связей. Такая структура поддерживается в устойчивом состоянии за счет образования множества водородных связей между $>\text{C}=\text{O}$ и $-\text{NH}-$ фрагментами соседних пептидных групп, как показано на схеме.



В такой вторичной структуре боковые радикалы — R располагаются в регулярном порядке выше и ниже некоторой плоскости, проведенной через складчатый листок.

В описанную выше β -структуру могут укладываться как индивидуальные полипептидные цепи, так и группы цепей, как это показано на рисунке 17.

В случае формирования β -складчатой структуры группой цепей их число в группе обычно не превышает шесть.

При формировании групповой β -складчатой структуры полипептидные цепи могут располагаться как параллельно (рисунок 18), так и антипараллельно (рисунок 19). При этом, если цепи параллельны, то есть имеют одинаковое направление от N- к C-концу, то образуется параллельный складчатый листок.

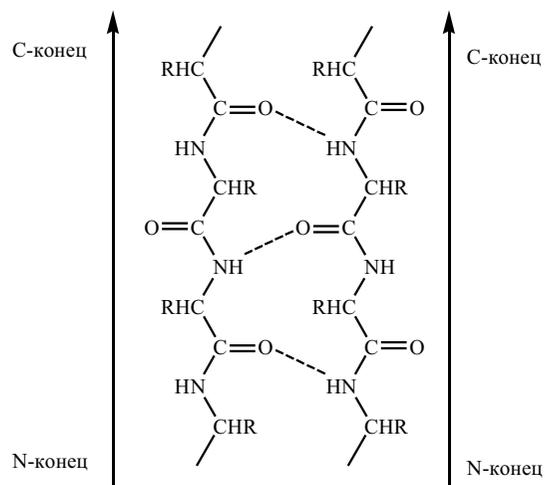


Рис. 18. Схема параллельного складчатого листа

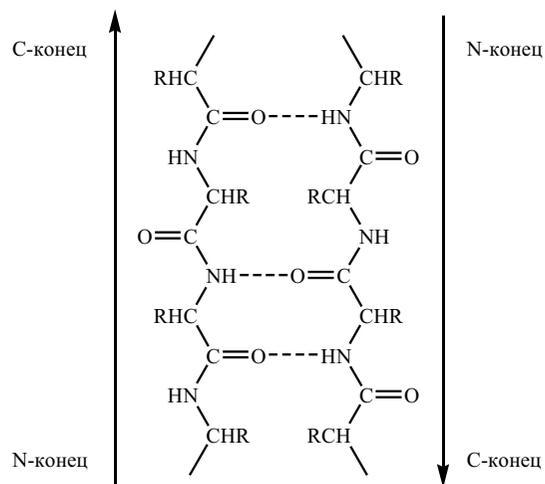


Рис. 19. Схема антипараллельного складчатого листа

Если цепи антипараллельны, то есть направления от N- к С-концу у обеих цепей противоположны, то возникает структура антипараллельного складчатого листа.

При формировании белком группового β -складчатого листа для полипептидных нитей характерно отсутствие внутрицепочечных водородных связей. Вместо них образуются межцепочечные водородные связи между пептидными группами соседних полипептидных цепей, находящихся в вытянутой конформации.

В образовании межцепочечных водородных связей участвуют, как правило, все пептидные группы белка.

Типичным представителем белков, построенных по типу складчатого листа, являются β -кератины (волосы, роговая ткань, белок паутины, β -фиброин шелка). Элементы β -структуры фиброина повторяются через каждые 0,70 нм.

Построение β -складчатой структуры фиброина определяется его аминокислотным составом. В фиброине шелка на долю глицина приходится 43,7 %, на долю аланина — 28,8 % и серина — 11,9 % всех аминокислотных остатков.

β -Кератин является представителем белков с антипараллельной β -складчатой структурой.

Для формирования складчатой структуры β -кератина имеет значение очень высокое содержание глицина и аланина — аминокислот с малыми по объему радикалами, что обеспечивает плотное прилегание друг к другу цепей, формирующих групповой складчатый листок. Так, в фиброине шелка, образующего прочные нити, каждый второй аминокислотный остаток — глицин.

Таким образом, четко просматривается связь между первичной и вторичной структурой, а также функцией белков. Вторичные структуры, в частности α -спираль и β -структура, возникают самопроизвольно вследствие того, что данный белок имеет определенный аминокислотный состав и определенную аминокислотную последовательность. Характерная вторичная структура белка — это его наиболее устойчивая форма при заданных биологических условиях, приспособленная к выполнению специфических биологических функций.

α -Спираль и β -структура стабилизируются множеством водородных связей — внутрицепочечных в случае α -спирали и межцепочечных в случае β -структуры. Хотя водородные связи, взятые в отдельности, относительно слабы ($E_{св.} \approx 10\div 40$ кДж/моль), все вместе они придают α -спирали и β -структуре значительную устойчивость. Следует отметить, что α — спираль и β -структура не являются взаимоисключающими способами пространственной организации полипептидной цепи в рамках одной белковой молекулы. Существуют белки, включающие в молекуле как α — спиральные, так и β -складчатые участки. Часть полипептидной цепи может иметь и неупорядоченный характер.

Так, полипептидная цепь α -амилазы *Aspergillus oryzae*, содержащая 478 аминокислотных остатков, включает как α -спиральные участки, так и участки, организованные в виде β -складчатой структуры. В молекуле данного фермента имеются также и хаотично расположенные участки полипептидной цепи, что представлено на рисунке 20 (см. цветную вклейку). На представленной схеме α -спирали обозначены спиральными лентами, а β -цепочки — лентами со стрелками.

7.2.2. Третичная структура белка. Форма белковых молекул

Третичной структурой белка называется способ укладки полипептидной цепи в виде α -спирали или β -структуры в пространстве. По форме третичной структуры белки делятся на фибриллярные — нити и глобулярные — шарообразные. Глобулярные белки более компактны по сравнению с фибриллярными.

Третичная структура белковой молекулы возникает автоматически в результате самоорганизации полипептидной цепи в соответствии с ее первичной и вторичной структурами, а также с параметрами (составом) окружающей среды.

Движущей силой, свертывающей полипептидную цепь белка в строго определенное трехмерное образование, является взаимодействие аминокислотных радикалов между собой и с молекулами окружающей среды.

При этом в водных растворах гидрофобные заместители вталкиваются внутрь белковой молекулы, образуя там сухие зоны, а гидрофильные — ориентируются в сторону водной среды. В некоторый момент достигается энергетически выгодная для водной среды конформация молекулы и такая конформация белковой молекулы стабилизируется межмолекулярными связями. Первым белком, третичная структура которого была установлена методом рентгеноструктурного анализа, является миоглобин кашалота. Рентгеноструктурный анализ позволяет определить конформацию и расположения полипептидной цепи в пространстве, поэтому для каждого белка может быть построена объемная модель, отражающая местоположение линейных и спирализованных участков. Ни первичная, ни вторичная структура, ни характер сочетания спиральных и линейных участков не дают представления об объеме и форме молекул белка. Такую информацию можно получить лишь после установления и исследования его третичной структуры.

То есть и третичная структура белковой молекулы, как и вторичная, формируется в строгой зависимости от его первичной структуры.

Вторичная и третичная структуры белка очень чувствительны к внешним воздействиям, как физическим, так и химическим. При изучении глобулярных белков было показано, что пространственная структура белков сильно зависит от ионной силы, pH раствора и температуры. Рассмотрим некоторые примеры белков с наиболее типичной третичной структурой.

7.2.2.1. Фибриллярные белки

Семейство фибриллярных (нитевидных) белков достаточно многочисленно. К фибриллярным белкам относятся: параамиозин — белок запирающей мышцы моллюсков, тропомиозины — белки скелетных мышц, кератины и многие другие белки.

Фибриллярные белки, то есть имеющие в основе третичной структуры нитевидные образования на уровне вторичной структуры, могут быть организованы как в виде α -спирали, так и в виде складчатой β -структуры. К фибриллярным белкам, имеющим в основе вторичной структуры α -спираль, относятся α -кератины.

α -Кератины — основной тип фибриллярных белков, формирующих наружные защитные покровы позвоночных. α -Кератины богаты цистеином, который обеспечивает образование S—S-мостиков, участвующих, наряду с водородными связями, в формировании α -спирали.

Для нитей α -кератина характерна параллельная структура (структура с односторонним расположением N-концевых аминокислот). Параллельно расположенные α -спирализованные нити могут быть закручены одна вокруг другой, формируя сверхпрочную структуру, напоминающую многожильный кабель.

Еще одним примером фибриллярного белка, имеющего в основе α -спираль, является коллаген. Фибриллярный белок коллаген составляет примерно треть всех полипептидов в организме животных и человека с максимальным содержанием в сухожилиях, коже, костях, стенках кровеносных сосудов. На коллаген приходится ~6 % массы тела взрослого человека.

Основной структурной единицей коллагена являются стержнеобразные молекулы тропоколлагена длиной приблизительно 280 нм, диаметром около 1,4 нм и массой 285000. Молекула тропоколлагена представляет собой тройную спираль трех полипептидных цепей, каждая из которых состоит из 1040 аминокислот (рисунок 16).

Было показано, что фибриллярная структура коллагена формируется путем параллельной укладки молекул тропоколлагена с продольным сдвигом примерно на четверть длины молекул.

Такая суперспираль содержит на своей поверхности большое количество гидрофобных аминокислотных остатков, что делает такие белки практически нерастворимыми в воде.

Характерным примером фибриллярных белков, имеющих в основе вторичной структуры β -складчатый слой, являются β -кератины. Как уже отмечалось, для β -кератинов характерна антипараллельная структура (с противоположным расположением C- и N-концевых аминокислотных остатков). К β -кератином относятся фиброин шелка, белок паутины. Для этих белков характерно высокое содержание глицина и аланина — аминокислот с малыми по объему радикалами.

Большое содержание аминокислот с малыми по размеру радикалами обеспечивает очень плотное прилегание нитей друг к другу (см. рисунок 21 на цветной вклейке) и высокую механическую прочность. Волокна из белков паутины обладают уникальными механическими свойствами. Например, паутина способна растягиваться на 30–300 % (искусственные волокна всего на 1–3 %). Это связано с особенностью составляющих ее белков (в фиброине каждый второй аминокислотный остаток — глицин).

Таким образом, четко просматривается связь между структурой и функцией белков.

7.2.2.2. Глобулярные белки

Другим способом пространственной организации полипептидной цепи является формирование плотного, компактного, шаровидного образования — глобулы. В составе глобулы также присутствуют как элементы α -спирали, так и β -структуры, а часть полипептидной цепи представлена хаотичной нитью. Глобулярные белки — это компактные, подвижные, хорошо растворимые белки. Одним из представителей глобулярных белков является альбумин. Растворимость этого белка столь высока, что без особого труда можно получить его 60 %-ный водный раствор.

Все ферменты — это исключительно глобулярные белки. Именно глобула обеспечивает ферментативную активность. Транспортная функция также осуществляется именно с помощью глобулярных белков.

Наиболее изученным белком с глобулярной структурой является миоглобин — белок мышц, основная функция которого — запасать кислород.

Молекула миоглобина может быть изображена в виде рыхлого клубка, внутри которого расположена небелковая часть — гем (см. рисунок 22 на цветной вклейке). Неплотное прилегание участков связано с расположением внутри глобулы неполярных R-групп. Глобула включает ряд почти прямых участков, самый длинный из которых содержит 27 аминокислотных остатков.

Каждый из этих прямолинейных участков представляет собой отрезок α -спирали. Рассмотрим особенности глобулярных белков на примере миоглобина:

- 1) молекула компактна;
- 2) все полярные R-группы расположены на поверхности глобулы;
- 3) большая часть неполярных R-групп — внутри клубка;
- 4) каждый из четырех остатков пролина, имеющих в миоглобине, находится в месте изгиба полипептидной цепи;
- 5) все пептидные группы имеют плоскую транс-конформацию; R-группы находятся по разные стороны плоскости, проведенной через атомы пептидной группы.

Множество миоглобинов, выделенных из тканей различных теплокровных животных, представляют семейство гомологичных белков, имеющих общего предшественника.

Как уже отмечалось, глобулярные белки могут быть по-разному пространственно организованы на уровне вторичной структуры. Так, миоглобин относится к крайне высоко спирализованным белкам. В нем α -спиральные участки охватывают ~80 % полипептидной цепи, а остальная часть приходится на хаотичные участки, за счет которых происходит сворачивание α -спирали в трехмерную структуру — глобулу. Необходимо отметить, что ни один из известных белков не имеет полностью спирализованной цепи. Полипептидная цепь во многих случаях складывается в пространстве в несколько доменов (глобулярных структур, образованных участками цепи, включающими несколько десятков аминокислотных остатков).

Цитохром *c* — фермент, участвующий в процессах тканевого дыхания, и фермент — лизоцим, катализирующий расщепление полисахаридов клеточных стенок бактерий, включают в своем составе только 40 % α -спиральных участков.

Фермент рибонуклеаза, гидролизующая связи между нуклеотидами РНК, содержит мало α -спиральных участков и довольно много фрагментов β -складчатой структуры в полипептидной цепи, однако на уровне третичной структуры представляет собой глобулу.

Аналогично α -амилаза, выделенная из *Aspergillus oryzae* (рисунок 20 на цветной вклейке), также включающая α -спиральные и β -складчатые участки, относится к глобулярным белкам.

Хотя как третичная, так и вторичная структура белка определяются набором и расположением аминокислот в полипептидной цепи, следует отметить, что вторичная структура есть следствие ближнего порядка, а именно взаимного расположения соседних аминокислотных остатков, а третичная — обусловлена дальним порядком и зависит от взаимного расположения аминокислот в далеко расположенных друг от друга фрагментах полипептидной цепи. Образование участков полипептидной цепи, а также направление и угол поворота цепи в этих изгибах обусловлены числом и положением определенных аминокислот, таких как пролин, оксипролин, треонин, серин, которые способствуют образованию изгибов.

Петли плотно свернутой полипептидной цепи сохраняют характерное положение в пространстве также благодаря взаимодействию между R-группами соседних петель.

Инвариантные аминокислотные остатки гомологичных белков, присутствующие в определенных положениях полипептидных цепей независимо от вида организмов, из которых выделен белок, очевидно, занимают наиболее важные в структурном отношении места в полипептидной цепи.

Одни из инвариантных остатков встречаются вблизи изгибов цепи или в самих изгибах, тогда как другие, например остатки цистеина, находятся в тех местах цепи, где между близко расположенными петлями третичной структуры возникают дисульфидные связи. Такое консервативное расположение в полипептидной цепи определенных по строению аминокислот является биологически оправданным.

Например, пролин, оксипролин, глицин получили название «антиспиральных» аминокислот. Ряд аминокислот: аланин, лейцин, глутаминовая кислота, гистидин способствуют сохранению спиральных структур в белке.

Метионин, валин, изолейцин, аспарагиновая кислота благоприятствуют образованию β -структур. Таким образом, зная первичную структуру белка, можно сделать определенные предположения о его вторичной структуре, а также о способе укладки полипептидной цепи в пространстве.

Ряд инвариантных аминокислотных остатков занимают строго определенное положение в каталитических центрах ферментов или в местах связывания простетических групп, например — гем-группы, небелкового фрагмента цитохрома *c*.

Глобулярные белки — наиболее динамичные пространственные образования по сравнению с фибриллярными. Хотя нативная (природная) третичная структура каждого глобулярного белка отвечает минимуму свободной энергии и потому является самой устойчивой конформацией, которую только может принять данная полипептидная цепь, третичную структуру глобулярных белков не следует считать абсолютно жесткой и неподвижной.

Полипептидный остов глобулярных белков характеризуется определенной степенью гибкости, вследствие чего эти белки подвержены локальным внутренним флуктуациям.

Многие глобулярные белки в норме претерпевают конформационные изменения при выполнении ими биологических функций, в частности, при связывании субстратов ферментами, это является частью их каталитического действия.

Процесс синтеза и формирования архитектуры белковой молекулы — строгий, запрограммированный и очень быстрый процесс. Пространственная структура белковой молекулы формируется уже в процессе биосинтеза. Так, в клетке *E. coli* молекула белка из 100 аминокислот синтезируется при 37 °C за 5 секунд и ее свертывание идет по заранее заложенной программе очень оперативно уже в процессе биосинтеза, а не методом проб и ошибок. Исследования последних лет показали, что в действительности пространственная структура полипептидной цепи значительно сложнее. Единый архитектурный ансамбль белковой молекулы включает пространственно организованные сегменты-домены, выполняющие определенные функции. В больших глобулярных белках иногда содержатся неодинаковые структурные домены, выполняющие разные функции. Домены формируются объединением и чередованием α -спиралей и β -слоев, между которыми открываются более рыхлые структуры. Далее домен — это компактная глобулярная структурная единица внутри полипептидной цепи. Центральная часть доменной глобулы образована в основном гидрофильными аминокислотными остатками.

Понятие домен — сравнительно новое в белковой химии. Домены — это как бы отдельные внутримолекулярные белковые структуры, выполняющие важную биологическую роль.

Домены принимают участие в образовании комплекса между ферментом и субстратом, в акте ферментативного катализа, во взаимодействии антиген — антитело, в «узнавании» регуляторного белка рецепторными зонами клетки.

Открыто много белков (например, иммуноглобулины), состоящих из разных по структуре и функциям элементов.

Например, молекула сывороточного альбумина состоит из трех доменов, каждый из которых содержит 10 спиралей.

На рисунке 10 представлена структура глобулярного белка — лизоцима куриного яйца. В рамках данной структуры четко выделяется два домена, которые разделены штриховой линией (рисунок 23 на цветной вклейке).

7.2.3. Четвертичная структура белка

Крупные молекулы белка с молекулярной массой более 60000 обычно представляют собой агрегаты, которые состоят из нескольких полипептидных цепей со сравнительно небольшой молекулярной массой.

При этом каждая цепь, сохраняя характерную для нее первичную, вторичную и третичную структуру, выступает в роли субъединицы этого агрегата, имеющего более высокий уровень пространственной организации — четвертичную структуру. Такой белок с четвертичной структурой называется олигомером и он содержит две

Почему на рисунке 10? Рис. 10 С. 61. Структура антамониды. Надо написать - «на рис. 23 на цветной вклейке представлена...»?

или более полипептидных цепи. Данная молекула — агрегат представляет собой единое целое и выполняет биологическую функцию, не свойственную отдельно взятым субъединицам.

Четвертичная структура — способ совместной укладки субъединиц с образованием нативной конформации олигомерного белка.

Молекулярная масса белков с четвертичной структурой может достигать нескольких десятков миллионов.

Число полипептидных цепей в молекуле олигомерного белка можно узнать по числу N-концевых групп в молекуле олигомера.

Примеры олигомерных белков приведены в таблице 23.

Таблица 23

Некоторые представители олигомерных белков

Белок	Функция белка	Число субъединиц
Гемоглобин	Транспорт O ₂	4
Фермент — РНК-полимераза из <i>E. coli</i>	Синтез РНК	5
Фермент — пируват дегидрогеназный комплекс	Дегидрирование пирувата — ключевая ферментная система аэробного окисления глюкозы	72
Фермент — лактат дегидрогеназа	Восстановление пировиноградной кислоты до молочной	4
Фермент — гексокиназа дрожжей	Катализ реакции фос-форилирования глюкозы: АТФ+глюкоза → АДФ+глюкозо-6-фосфат	2
Фермент — глутаминсинтетаза <i>E. coli</i>	Катализ реакции глутамат → глутамин	12
Никотиновый холинорецептор	Участие в формировании совместной зависимости от никотина и этанола	5

При четвертичном уровне организации белки сохраняют основную конформацию третичной структуры (глобулярную или фибриллярную).

Например, гемоглобин состоит из четырех субъединиц, каждая из которых представляет собой глобулярный белок, напоминающий по структуре миоглобин (рисунок 22 на цветной вклейке). Гемоглобин в целом также имеет глобулярную конфигурацию (рисунок 24 на цветной вклейке).

Белки шерсти и волос — α-кератины, относящиеся по третичной структуре к фибриллярным белкам, имеют фибриллярную конфигурацию и четвертичную структуру в виде вытянутой суперспирали.

Олигомерные белки могут включать как одинаковые, так и разные субъединицы. Многие белки существуют в живой клетке в виде олигомеров, построенных из одинаковых субъединиц.

Так, фермент NO-синтаза является гомодимером, т.е. включает две одинаковые субъединицы.

C-реактивный белок, специфический белок сыворотки крови, образующийся в острой фазе многих заболеваний: ревматоидного артрита, миокардита, включает 5 одинаковых субъединиц, каждая из которой содержит 205 аминокислот, и имеет M = 22000. Субъединицы связаны непрочно, и C-реактивный белок способен к спонтанной диссоциации. В состав фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) входят два типа субъединиц: М (мышечная) и Н (сердечная). Разное сочетание этих субъединиц обуславливает существование пяти изоформ фермента: ЛДГ₁ (H₄), ЛДГ₂ (H₃M₃),

ЛДГ₃ (H₂M₂), ЛДГ₄ (H₁M₃) и ЛДГ₅ (M₄), то есть формируются пять разных белков на уровне их четвертичной структуры.

Четвертичная структура белка чрезвычайно лабильна и может нарушаться под влиянием различных воздействий. В этом случае олигомерный белок частично или полностью утрачивает свои свойства.

Эффективность формирования белков контролируется структурно-динамическим состоянием макромолекулы: ее конформацией и внутримолекулярной динамикой.

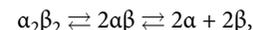
Исследование взаимосвязи между изменением структуры (конформации, внутримолекулярной динамики) и функциональной активности белков является актуальной задачей современной молекулярной биологии, учитывая ключевую роль этих макромолекул в реализации и регуляции всех процессов, протекающих в биосфере на молекулярном уровне.

Накопление и систематизация обширного материала по структуре белков позволяет высказать мнение о существовании пятого уровня структурной организации белков, под которым понимают полифункциональные макромолекулярные комплексы или ассоциаты из разных ферментов. Такие ассоциаты получили название метаболитических олигомеров или метаболонов и катализируют весь путь превращения субстрата. В качестве примеров таких метаболонов можно привести пируватдегидрогеназный комплекс, α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, ферменты дыхательной цепи митохондрий.

Гемоглобин как представитель олигомерных белков

Гемоглобин — глобулярный белок, имеющий молекулярную массу 64500 и состоящий из четырех субъединиц: 2α и 2β, каждая из которых, в свою очередь, является глобулярным белком.

Тетрамерная молекула гемоглобина может быть представлена в виде ассоциата α₂β₂. Она способна последовательно диссоциировать на субъединицы



но при этом белок утрачивает свои нативные свойства и неспособен транспортировать кислород. Субъединицы в молекуле гемоглобина расположены в шахматном порядке, что схематично представлено на рисунке 25.

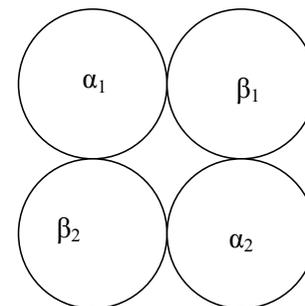


Рис. 25. Схема расположения субъединиц в молекуле гемоглобина

Транспортирование кислорода связано с последовательным переходом белка из дезокси-формы в оксигенированную, а затем вновь в дезоксигенированную форму.

Уровень организации	Тип связей и их прочность	Разновидность связей
Вторичная (α -спираль, β -структура)	Слабые	Водородные — между каждой первой и четвертой пептидными группами, или между аминокислотными остатками N ₁ и N ₅ одной полипептидной цепи (α -спираль) или между пептидными группами соседних полипептидных цепей (β -структура)
	Ковалентные (прочные)	Дисульфидные — в пределах линейного участка полипептидной цепи
Третичная (глобулярная, фибриллярная)	Ковалентные (прочные)	Дисульфидные, изопептидные, сложно-эфирные — между боковыми радикалами аминокислот разных участков полипептидной цепи
	Слабые	Водородные — между боковыми радикалами аминокислот разных участков полипептидной цепи. Ионные — между противоположно заряженными группами боковых радикалов аминокислот полипептидной цепи. Ван-дер-Ваальсовы — между неполярными боковыми радикалами аминокислот полипептидной цепи
Четвертичная (глобулярная, фибриллярная)	Слабые	Водородные — между боковыми радикалами аминокислотных остатков, расположенными на поверхности контактирующих участков субъединиц
	Ковалентные (прочные)	Ионные — между противоположно заряженными группами боковых радикалов аминокислот каждой из субъединиц. Дисульфидные — между остатками цистеина каждой из контактирующих поверхностей разных субъединиц

8. ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА

Пространственная структура белков, как уже указывалось, может нарушаться под влиянием ряда факторов: повышение температуры, изменение рН и ионной силы среды, облучение УФ, рентгеновскими, β - и γ -лучами, воздействие веществ, способных дегидратировать молекулу белка (этанол, ацетон, мочевины) или вступать во взаимодействие с белковой молекулой (окислители, восстановители, формальдегид, фенол) и даже при сильном механическом перемешивании и последовательном замораживании и оттаивании.

Денатурацией называется разрушение природной (нативной) конформации макромолекулы белка при внешнем воздействии. Денатурация — это также изменение нативной структуры (конформации) белковой молекулы, которое происходит при достаточно резком изменении внешних условий и сопровождается заметным изменением физико-химических свойств белка и полной потерей биологической активности. При денатурации разрушаются четвертичная, третичная и вторичная структуры, а первичная структура белка сохраняется.

Явление денатурации характерно только для молекул, имеющих сложную пространственную организацию. Низкомолекулярные природные и синтетические пептиды неспособны к денатурации.

Чем более низкий уровень структуры белка разрушается при воздействии, тем глубже протекает процесс денатурации.

Полипептидная цепь денатурированного белка находится в растворе в развернутом виде или в виде беспорядочного клубка.

Тепловая денатурация является наиболее изученным процессом. Большинство белков денатурирует при 50–60 °С. Особой устойчивостью к температурному воздействию отличаются белки бактерий, обитающих в горячих источниках. Очевидно, у термостабильных белков тепловое движение полипептидных цепей, вызванное нагреванием, недостаточно для разрыва внутренних связей в молекуле белка. Температура, при которой 50 % нативного белка подвергается денатурации, называется температурой перехода. Диссоциация олигомерного белка на субъединицы также рассматривается как денатурация. В некоторых случаях денатурацию вызывает весьма незначительное изменение рН.

Однако существуют диапазоны рН, в которых тот или иной белок наиболее стабилен в растворе.

Одни белки стабильны при низких значениях рН (пепсин), другие — при щелочных (щелочные протеазы). Большинство белков денатурирует при рН < 3 и рН > 9.

Но некоторые белки устойчивы к действию кислот и щелочей. Например, гистоны и протамины не денатурируют даже при рН = 2 и рН = 10.

8.1. Химические денатурирующие агенты

Очень многие химические агенты при воздействии на белок способны вызывать денатурацию. К ним относятся:

- 1) кислоты и щелочи;
- 2) органические растворители (спирт, эфир, ацетон);
- 3) детергенты (моющие средства);
- 4) некоторые амиды (мочевина, соли гуанидина);
- 5) алкалоиды;
- 6) тяжелые металлы (Ag^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cd^{+2} , Cu^{+2} и т. д.).

Механизмы денатурирующего действия химических веществ зависят от их физико-химических свойств.

Однако общий принцип денатурирующего действия — ослабление факторов, повышающих устойчивость архитектуры белка, среди которых важнейшими являются гидратная оболочка, водородные и дисульфидные связи.

Кислоты и щелочи широко используют в качестве денатурирующих агентов. Их денатурирующее действие состоит в нарушении гидратной оболочки и разрыве водородных связей, поддерживающих сложную архитектуру белка. Нарушая высшие уровни структуры белка, денатурирующие агенты снижают устойчивость белков в растворе. Так, в лабораторной практике классическим осадителем белков является трихлоруксусная кислота. Ее способность осаждать белки основана на выраженном денатурирующем действии.

Такие органические растворители как этанол и ацетон также оказывают денатурирующее действие, разрушая водородные связи.

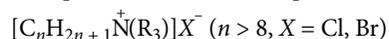
Аналогичен механизм денатурирующего действия органических оснований, таких как мочевины и гуанидин. На практике в качестве денатурирующих агентов широко применяют 8М раствор мочевины или 6М раствор гидрохлорида гуанидина.

Тяжелые металлы и алкалоиды издавна применяют как осадители белков: они образуют прочные связи с полярными группами белковой молекулы и нарушают систему водородных и ионных связей, поддерживающих высшие уровни структуры белка.

Нередко денатурацию белка проводят с помощью детергентов. Существует четыре класса детергентов. Наиболее часто используют анионные детергенты, т. е. со-

единения, содержащие высокополярную кислотную группировку. Простейшими представителями детергентов данной группы являются мыла. Из детергентов данной группы наиболее часто используют додецилсульфат натрия ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$), хлорид натрия, дезоксихлорид натрия. Анионные детергенты действуют при значении pH ниже изоэлектрической точки белка.

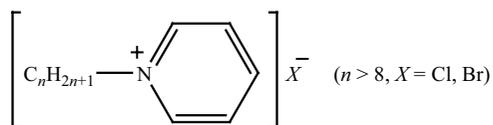
Достаточно часто применяют детергенты, где высокополярные фрагменты представляют собой органические катионы, которые в основном представлены высшими алкильными производными триметиламмоний хлоридов и бромидов.



Например,



Также широко используются соли алкилпиридиния



Детергенты данного класса вызывают осаждение белка при высоких значениях pH.

В последнее время часто используют цвиттер-ионные детергенты, содержащие как кислотный, так и основной фрагмент. Они позволяют работать в широких диапазонах pH.

Например, 3-(3-холамидопропил)-диметиламмоний-3-пропансульфонат (ЧАПС — фирменное название по первым буквам английского названия детергента) — цвиттер-ионное производное холевой кислоты.

Широко применяют неионные детергенты — полярные соединения, не содержащие ионных фрагментов, такие как: Тритон X-100, Твин-20, Твин-60, Твин-40.

Представленные детергенты близки по структуре к триацилглицеринам. Они представляют собой полигетерофункциональные соединения, в которых многоатомный спирт сорбит этерифицирован частично высшими жирными кислотами, частично полиэтиленгликолем. Получающиеся при этерификации смеси не разделяют на индивидуальные компоненты.

Поэтому твины представляют собой смеси простых и сложных эфиров сорбита, различающихся положением остатков жирных кислот и полиэтиленгликоля с примерно постоянным числом его звеньев ($n = 40 \div 80$).

Среди неионогенных детергентов широкое применение нашли эмульгоген, дигитонин, алкиловые эфиры сахарозы (например, β -октилглюкозид). Такие реагенты как β -меркаптоэтанол и дигиотренитол, восстанавливающие дисульфидные связи, обычно облегчают денатурацию белков.

В ряде случаев денатурации могут способствовать хелатирующие агенты (например, этилендиаминтетрауксусная кислота — ЭДТА), которые связывают двухвалентные катионы (Ca^{+2} , Mg^{+2} и другие), играющие роль кофакторов ферментов, а также способствующие ассоциации субъединиц белков четвертичной структуры. Напротив, добавление кофакторов или субстратов ферментов делает их более устойчивыми к денатурации.

В случае мембранных белков стабилизирующий эффект оказывает добавление липидов.

8.2. Ренатурация

Важной является проблема ренатурации, т. е. возможность вновь получить белок с исходной пространственной структурой и биологическими свойствами после снятия денатурирующего воздействия. Такой процесс называется ренатурацией.

Впервые полную ренатурацию белка удалось осуществить на примере рибонуклеазы в 1961 году.

Если полностью «развернуть» молекулу рибонуклеазы путем восстановления четырех ее дисульфидных мостиков при действии меркаптоэтанола в 8M растворе мочевины, а затем провести окисление в контролируемых условиях, то молекула вновь приобретает нативную конформацию и полностью восстанавливает ферментативную активность. Эти опыты показывают, что программа «самосборки» белка закодирована в его первичной структуре.

При ренатурации важное значение имеет образование небольших участков упорядоченной вторичной структуры. За этим сравнительно медленным процессом следует быстрое сворачивание цепи в нативную структуру. Схема денатурационно-ренатурационных превращений на примере рибонуклеазы представлена на рисунке 27.

На первых этапах ренатурации белков, в поддержании нативной конформации которых участвуют дисульфидные мостики, образуются промежуточные производные с «правильными» и «неправильными» дисульфидными связями.

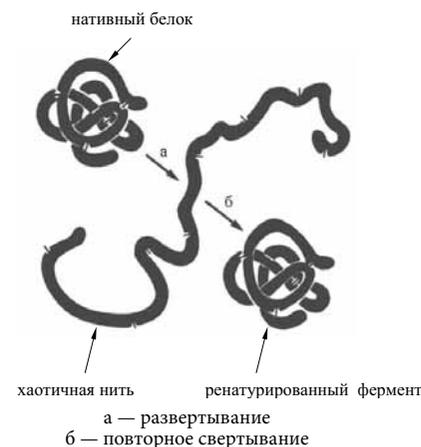


Рис. 27. Схема денатурации и ренатурации рибонуклеазы

В ряде случаев удавалось остановить процесс ренатурации на определенных стадиях и выделить такие частично свернутые формы. Поскольку в целом сборка белка является достаточно быстрым процессом, можно сделать вывод о том, что природа не перебирает все возможные комбинации в очередности замыкания дисульфидных мостиков (при четырех S-S-связях их 105 вариантов, а при пяти уже 945), а сворачивание полипептидной цепи идет по ограниченному числу направлений и приводит к конформации, характеризующейся минимальной свободной энергией.

Изучение процессов денатурации и ренатурации позволяет лучше понять конформационные особенности белков, устойчивость их пространственной структуры и природу взаимодействий, важных для стабилизации нативной конформации и проявления биологической активности.

8.3. Свойства денатурированных белков

Наиболее типичными для денатурированных белков являются следующие признаки.

- 1) Увеличение числа обнаруживаемых функциональных групп ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$) по сравнению с нативной молекулой белка, так как часть этих групп обычно находится внутри белковой молекулы и не выявляется специальными реагентами. Развертывание полипептидной цепи при денатурации позволяет обнаружить дополнительные или скрытые группы.
- 2) Уменьшение растворимости и осаждение белка (связано с потерей гидратной оболочки, развертыванием молекулы белка с «обнажением» гидрофобных радикалов и нейтрализацией зарядов полярных групп).
- 3) Изменение конфигурации молекулы белка.
- 4) Потеря биологической активности, вызванная нарушением нативной структуры белковой молекулы.
- 5) Более легкое расщепление белка протеолитическими ферментами по сравнению с нативным белком, в связи с переходом компактной нативной структуры в развернутую рыхлую форму, что облегчает доступ ферментов к внутренним пептидным связям белка.

8.4. Денатурация как предельный вариант функционально-конформационных переходов в молекуле белка

Эффективность функционирования белков контролируется структурно-динамическим состоянием макромолекулы.

Исследование взаимосвязи между изменением структуры и функциональной активностью белков является актуальной задачей современной молекулярной биологии, учитывая ключевую роль белков в реализации и регуляции всех процессов, протекающих в биосфере на молекулярном уровне.

Для функционирования белка необходимы как способность молекулы сохранять, несмотря на тепловые флуктуации, среднестатистическое трехмерное расположение атомов, так и наличие самих флуктуаций элементов структуры глобулы.

Важным свойством белковых макромолекул является их способность претерпевать конформационные перестройки при связывании лигандов, кофакторов, изменении ионного состава и диэлектрических свойств растворителя, температуры, давления, при действии других факторов.

Возможны два типа конформационных перестроек белка: денатурационный переход, связанный с глубоким разворачиванием глобулы и утратой функциональной активности, и переход, названный функциональным, между функциональными структурными формами белка.

Функциональные переходы имеют место при взаимодействии ферментов с субстратами, лежат в основе аллостерических механизмов регуляции каталитической активности, осуществляются при механикохимических, нервных, гуморальных и многих других процессах.

Функциональные конформационные переходы лежат в основе регуляции активности ферментов, проницаемости ионных каналов. При функциональных конформационных переходах степень разворачивания белковой глобулы в подавляющем большинстве случаев незначительна.

При денатурационном разворачивании глобулы, как отмечалось выше, изменения структуры белка значительны, однако денатурационное разворачивание не

всегда реализуется по принципу «все или ничего» с переходом белка между двумя дискретными состояниями: нативным (компактная глобула) и денатурированным (хаотичный клубок).

В ходе денатурации могут формироваться термодинамически стабильные частично свернутые состояния. Состояние белка со структурой, промежуточной между нативной и полностью развернутой было названо «расплавленной глобулой». Однако данный термин не отражает всей сложности процесса. В действительности степень нарушения уникальной структурной организации глобулы зависит как от природы и характера действия повреждающего агента, так и от особенностей структуры и аминокислотного состава белка: степени α -спирализации глобулы, количества складчатых β -структур, числа дисульфидных связей, баланса гидрофильных и гидрофобных аминокислот, количества ионогенных групп.

Процесс разворачивания белковой глобулы и переход в частично свернутое состояние в литературе частично связывают с полной утратой функциональной активности. Однако это не всегда так. Впервые переход белка в частично свернутое состояние с сохранением 30 % ферментативной активности зарегистрирован при действии 8М мочевины на уреазу из соевых бобов.

Структурные переходы белка, сопряженные с частичным разворачиванием глобулы и модификацией функциональной активности также можно отнести к функциональным.

Удобным объектом изучения проблем существования белков в частично свернутом состоянии является щелочная фосфатаза *E. coli*. Глобула этого фермента состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит в своем составе три остатка триптофана в положении 109, 220 и 268. Вблизи активного центра в глубине жесткого гидрофобного ядра расположены триптофан –109, два катиона цинка и два катиона магния, стабилизирующие структуру белка. Два остатка триптофана в положениях 220 и 268 локализованы в периферических областях глобулы.

При флуктуациях в области периферических зон, не затрагивающих активный центр, активность щелочной фосфатазы меняется мало, флуктуации в области аллостерического участка и активного центра приводят к значительным изменениям активности фермента.

Характер структурных и функциональных изменений, происходящих в белковой глобуле на примере щелочной фосфатазы *E. coli* приведен на рисунке 28.

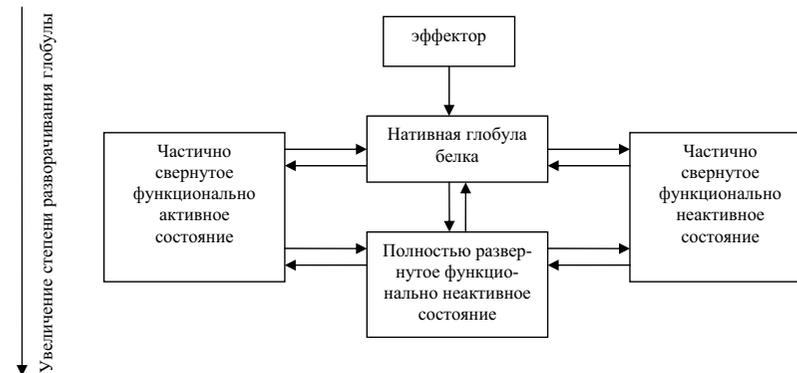
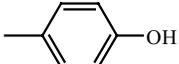
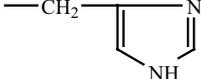


Рис. 28. Схема структурных и функциональных преобразований белка на примере щелочной фосфатазы *E. coli*

системы и по кислоте, и по основанию будет значительна. Из нейтральных протеиногенных аминокислот, несущих протоноактивные боковые радикалы, следует выделить:

тирозин  (pKa = 10,07),

цистеин —SH (pKa = 8,33),

гистидин  (pKa = 6,0).

Как видно из приведенных данных, лишь гистидин имеет pKa бокового радикала, относительно близкое к pH внутриклеточной жидкости (~7,0), однако и данная аминокислота не удовлетворяет неравенству

$$pI < pH < pKa (RH).$$

Однако близость pKa (RH) и pH внутриклеточной среды для богатых гистидином пептидов и белков обеспечивают их достаточно выраженные буферные свойства. Именно поэтому считают, что в мышцах животных и человека дипептиды карнозин и ансерин, состоящие из β-аланина и гистидина или его N-метилпроизводного соответственно, проявляют буферные свойства.

На основании вышеизложенного становятся понятными отмеченные выше уникальные буферные свойства гемоглобина, имеющего изоэлектрическую точку pI = 6,8, включающего более 8 % гистидина от всех аминокислотных остатков, входящих в молекулу, при усредненном значении pH крови 7,34.

10. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

Строгая классификация белков отсутствует.

Основные принципы их классификации основываются на различии в физико-химических свойствах, структурных особенностях и функциональном предназначении.

Классификация по выполняемым функциям

Данная классификация рассмотрена в разделе «Биологические функции белков» (таблица 2).

10.1. Физико-химическая классификация белков

Один из видов физико-химической классификации основывается на различии их электрохимических характеристик. Классификация белков по электрохимическим признакам включает следующие группы:

- 1) кислые: в их первичной структуре преобладают кислые аминокислоты. Данные белки представляют собой полианионы. Их изоэлектрическая точка pI лежит в области ниже 5,5;

- 2) нейтральные — белки, у которых число отрицательно и положительно заряженных фрагментов в молекуле, а следовательно, количество кислых и основных аминокислот в полипептидной цепи сбалансировано и их изоэлектрическая точка pI — находится в области 5,5–7,0;
- 3) основные — белки, в первичной структуре которых преобладают основные аминокислоты и которые в физиологических условиях представляют собой поликатионы и имеют значение pI > 7.

Таблица 26

Изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	pI
Кислые	
Пепсин	< 1,0
Слабокислые	
Яичный альбумин	4,6
Сывороточный альбумин	4,9
Уреаза	5,0
β-лактоглобулин	5,2
Нейтральные	
γ ₁ -глобулин	6,6
Гемоглобин	6,8
Миоглобин	7,0
Основные	
Химотрипсиноген	9,5
Цитохром с	10,7
Лизоцим	11,0

10.2. Классификация белков по полярным признакам

Близкой к уже представленной выше классификации является классификация по полярности.

В соответствии с данной классификацией белки делят на:

- 1) полярные или гидрофильные, содержащие много как заряженных, так и незаряженных высокополярных фрагментов. Это хорошо растворимые в водных средах белки;
- 2) неполярные или гидрофобные, содержащие большое количество аминокислот с неполярными углеводородными радикалами, почти не растворимые в водных средах.
- 3) амфипатические или амфифильные. У данных белков одна часть молекулы полярна, а другая — нет. Как правило, в эту группу входят мембранные белки.

Важнейшим типом классификации белков является их классификация по форме молекул, согласно которой белки делятся на фибриллярные и глобулярные в соответствии с выполняемой ими функцией.

10.3. Классификация белков по структурным признакам

Широко распространенным типом классификации белков является их классификация по структурным признакам. В соответствии с данной классификацией белки

делят на простые (протеины) и сложные (протеиды). Простые белки представлены только полипептидными цепями, а сложные включают еще и небелковый компонент самой различной структуры.

10.3.1. Простые белки

Простые белки состоят только из аминокислот и делятся на ряд групп.

Протамины и гистоны

Самыми низкомолекулярными простыми белками являются белки основного характера — протамины и гистоны.

Гистоны

Название этих белков происходит от греческого слова *histos* — ткань. Гистоны — тканевые белки многоклеточных организмов, связанные с ДНК хроматина. Значение гистонов для организма чрезвычайно велико, так как многие фундаментальные процессы в биологии определяются взаимодействиями белков с ДНК и РНК. Для гистонов характерна небольшая молекулярная масса (11000–24000). Это белки основного характера ($pI = 9,5-12,0$). Высший уровень структуры для гистонов — третичный. Выделяют 5 главных типов или фракций гистонов: H_1 , H_{2a} , H_{2b} , H_3 , H_4 . Деление на фракции основано на ряде признаков, главным из которых является соотношение лизина и аргинина во фракциях.

Таблица 27

Основные фракции гистонов

Фракция	Соотношение лизин / аргинин	$M \cdot 10^{-3}$	Молярная доля, %	
			Лизин	Аргинин
H_1	Очень богата лизином	19,5–22,0	27–29	1,5
H_{2b}	Умеренно богата лизином	14,0	14–18	7–8
H_{2a}	Умеренно богата аргинином	15,0	11	10
H_3	Очень богата аргинином	15,3	9	14
H_4	Богата аргинином и глицином	11,3	10	13

Выделен дополнительный тип гистонов H_5 , содержащийся в ядерных эритроцитах птиц, амфибий и рыб. Имеются и другие модификации гистонов, но доля их невелика.

В тканях многоклеточных организмов молярное соотношение гистоны / ДНК приближается к единице.

В естественных условиях гистоны прочно связаны с ДНК и выделяются в составе нуклеопротеида. Связь гистон — ДНК электростатическая, так как гистоны имеют большой положительный заряд, а цепь ДНК — отрицательный.

Гистоноподобные белки встречаются в составе рибосом цитоплазмы клеток. У одноклеточных организмов некоторые из фракций гистонов отсутствуют. У бактерий нет типичных гистонов, а у вирусов имеются гистоноподобные белки. Основными функциями гистонов являются структурная и регуляторная. Структурная функция состоит в том, что гистоны участвуют в стабилизации пространственной структуры ДНК, а, следовательно, хроматина и хромосом. Четыре фракции гистонов, за исключением H_1 , составляя основу нуклеосом, являющихся структурными единицами хроматина; фракция H_1 заполняет фрагменты ДНК между нуклеосомами.

Регуляторная (когенетическая) функция гистонов заключается в способности блокировать передачу генетической информации от ДНК к РНК.

В настоящее время установлено, что имеет место изменение соотношения фракций гистонов при старении клетки. В ряде клеток рост относительного содержания гистона H_1 по отношению к ДНК предшествует ее апоптозной гибели (реализация процесса запрограммированной клеточной смерти).

Протамины

Протамины — своеобразные биохимические заменители гистонов, но качественно отличающиеся от них аминокислотным составом и структурой. Это самые низкомолекулярные белки ($M = 4000-12000$). Иногда легкие фракции протаминов относят к полипептидам.

Протамины имеют выраженные основные свойства из-за большого содержания аргинина (до 80 %).

Как и гистоны, протамины — поликатионные белки. Они связываются с ДНК в хроматине спермиев. Замена гистонов на протамины в хроматине спермиев наблюдается не у всех животных.

Наиболее типично присутствие протаминов в составе нуклеопротамин в сперматозоидах рыб (в молоках). Отдельные протамины получили свое название по источникам выделения:

- сальмин-протамин из молоки лосося;
- клупеин-протамин из молоки сельди;
- труттин-протамин из молоки форели;
- скумбрин-протамин из молоки скумбрии.

Протамины делают компактной ДНК сперматозоидов, то есть выполняют, как и гистоны, структурную функцию. Однако они, по-видимому, не выполняют регуляторных функций, поэтому и присутствуют в клетках, не способных к делению. Возможно, именно этим и объясняется биологическая замена в некоторых клетках гистонов на протамины.

Растительные белки: проламины и глютелины

Проламины и глютелины — белки семян злаков. Для этих белков характерны особенности аминокислотного состава: в них много аспарагиновой и особенно глутаминовой кислоты, а также лейцина, изолейцина и пролина.

Часто общее содержание этих пяти аминокислот составляет 60–70 % всех аминокислот белка.

В растительных белках метионин, цистеин, триптофан и гистидин почти всегда присутствуют в количестве менее 3 % от общего содержания аминокислот.

Во многих белках растений нет отдельных незаменимых аминокислот. Чаще всего лимитирующими бывают четыре незаменимые аминокислоты: лизин, триптофан, метионин, треонин.

Аминокислотный состав проламинов и глютелинов семян злаков представлен в таблице 28.

Таблица 28

Аминокислотный состав проламинов и глютелинов семян злаков

Аминокислоты	Проламины, %				Глютелины, %			
	Пшеница	Рожь	Ячмень	Кукуруза	Пшеница	Рожь	Ячмень	Кукуруза
Аланин	2,0	1,8	3,0	8,8	4,3	4,0	6,6	7,5
Аргинин	2,7	2,3	2,5	1,3	6,5	5,5	4,5	4,5
Аспарагиновая	2,1	1,7	2,0	4,9	6,5	5,8	6,4	4,3

Аминокислоты	Проламины, %				Глютелины, %			
	Пшеница	Рожь	Ячмень	Кукуруза	Пшеница	Рожь	Ячмень	Кукуруза
Валин	3,8	3,7	3,7	3,6	6,1	5,8	6,0	5,0
Гистидин	1,7	1,4	1,0	1,0	2,7	4,8	2,2	3,8
Глицин	2,1	1,9	3,1	1,1	4,4	4,5	8,3	4,0
Глутаминовая	43,8	42,7	33,6	24,4	25,3	27,0	21,5	22,0
Изолейцин	4,0	3,0	3,5	3,3	4,3	3,6	4,1	3,0
Лейцин	7,3	5,9	6,7	12,6	8,2	7,3	7,9	12,3
Лизин	0,7	0,9	0,6	0,2	4,6	4,1	3,3	2,4
Метионин	0,9	1,1	0,5	0,8	1,5	1,5	0,6	3,1
Пролин	13,9	17,9	23,6	9,2	7,8	9,1	11,1	11,9
Серин	4,0	4,2	4,5	4,9	5,1	4,4	6,3	5,1
Тирозин	2,6	1,9	1,2	5,0	3,3	3,1	2,5	4,7
Треонин	1,6	2,0	1,8	2,8	3,8	3,1	4,6	3,6
Триптофан	0,4	0,4	1,0	0,2	1,1	1,1	1,3	0,1
Фенилаланин	6,8	7,7	7,4	6,9	3,4	3,5	4,5	4,9

Белки, не содержащие некоторых незаменимых аминокислот, называются неполноценными, т. е. большинство растительных белков можно отнести к неполноценным белкам.

Проламины

Проламины содержатся в клейковине семян злаковых растений. Для данных белков характерна нерастворимость в воде, солевых растворах, кислотах, щелочах. Из биологического материала их выделяют экстракцией 70 %-ным этанолом. Хорошая растворимость в спирте связана с большим содержанием в этих белках неполярных аминокислот и пролина.

Проламины получили название по источнику выделения:

- глиадины — из зерна пшеницы и ржи;
- лейкозин — из зерна пшеницы;
- гордеины — из ячменя;
- авенины — из овса;
- зеин — из кукурузы;
- эдестин — из конопли.

В семенах других культур, не относящихся к семейству мятликовых, содержание этих белков очень мало.

Проламины резко отличаются по аминокислотному составу от других белков. В них очень много глутаминовой кислоты и пролина: в проламинах пшеницы, ржи и ячменя на долю этих двух аминокислот приходится ~60 % общего содержания аминокислот, а в проламинах кукурузы ~35 %. В проламинах большинства зерновых культур, особенно кукурузы, крайне мало двух важнейших незаменимых аминокислот — лизина и триптофана. В недостаточном количестве в них также содержатся треонин, метионин и валин.

В зерне различных видов пшеницы содержание глиадина достигает 20–40 % общего количества белков, т. е. 4–8 % массы семян.

Количество авенина в зерне овса в среднем составляет 20–30 % общего количества белков. Зеина в кукурузе — до 50 %. Гордеина в ячмене — 25–40 %.

Проламины зерна довольно хорошо изучены: установлены их молекулярная масса, изоэлектрические точки, элементный и аминокислотный состав.

Проламины относят к неполноценным белкам. Например, в зерновых белках нет триптофана и почти отсутствует лизин, а глиадин содержит данную аминокислоту в следовых количествах.

Проламины относятся к слабокислым белкам. Значение изоэлектрических точек для этих белков лежит в диапазоне 4,0–5,5:

- глиадин пшеницы — $P I = 4,0$;
- лейкозин пшеницы — $P I = 4,5$;
- эдестин конопли — $P I = 5,5$.

Молекулярная масса колеблется в широких пределах:

- глиадин пшеницы — 27500;
- зеин кукурузы — 50000;
- эдестин конопли — 300000.

Глютелины

Глютелины — белки, нерастворимые в воде, солевых растворах и этаноле. В них содержится значительно больше чем в проламинах аргинина и пролина. Эти белки растворимы в слабых (0,2–2,0 %-ных) растворах щелочей.

Содержание глютелинов в зерне пшеницы, ячменя и овса обычно составляет 25–40 % от общего количества белков, а в рисе на их долю приходится большая часть белков семян (60–70 %).

Наиболее хорошо изучены глютелины зерна пшеницы и риса, получившие названия соответственно глютенин и физин.

В глютелинах также много глутаминовой кислоты и пролина, но меньше, чем во фракции проламинов.

Глютелины пшеницы, ржи и ячменя характеризуются сбалансированным аминокислотным составом, а глютелины кукурузы содержат мало лизина и триптофана.

Низкая биологическая ценность белков кукурузы объясняется тем, что ее основные белки практически не содержат лизина и крайне бедны триптофаном.

Селекционная работа на основе генномодифицированных сортов кукурузы привела к созданию новых сортов, имеющих резко повышенное содержание лизина в зерне.

Также был получен генномодифицированный высоколизинный ячмень. Данный сорт ячменя содержит значительно меньше проламинов и больше глютелинов, и соответственно с этим содержание лизина в его зерне увеличено.

Альбумины и глобулины

Альбумины и глобулины — групповое название белков, выпадающих в осадок при различной степени насыщения белковых растворов нейтральными солями (сульфатом аммония или натрия). При 50 %-ном насыщении выпадают в осадок глобулины, при полном (100 %-ном) насыщении — альбумины.

Альбумины и глобулины содержатся в плазме крови, в клетках и биологических жидкостях организма. Каждая из этих двух групп белков настолько разнообразна, что среди них имеются белки с самыми различными функциями.

При электрофорезе плазмы крови происходит разделение альбуминов и глобулинов, так как у них разная подвижность в электрическом поле. Альбумины как полианионные белки с небольшой молярной массой быстрее движутся к аноду, чем глобулины.

Альбумины

Альбумины — некрупные белки ($M = 15000-70000$). Они обладают умеренно кислыми свойствами ($pI = 4,7$) из-за большого содержания глутаминовой кислоты.

Альбумины — сильно гидратированные белки, поэтому они осаждаются только при большой концентрации водоотнимающих средств.

Характерным свойством альбуминов является их высокая адсорбирующая способность. Они адсорбируют полярные и неполярные молекулы. Благодаря высокой неспецифической адсорбции различных веществ альбумины плазмы крови играют физиологически важную транспортную роль.

Альбумин плазмы крови

Альбумин плазмы крови — один из наиболее изученных представителей в данной группе белков. Около 60 % общего белка плазмы крови приходится на долю альбумина, содержание которого в плазме составляет 35–40 г/л.

Всего в организме человека находится около 0,5 кг альбумина. Кроме плазмы крови, альбумин содержится в лимфатической системе (~15–36 г/л) и в межклеточной жидкости в количестве ~0,3 г/л.

Альбумин синтезируется в печени. Полипептидная цепь предшественника альбумина — преальбумина — синтезируется за 1,5 минуты. Затем от преальбумина отщепляется гексапептид и альбумин выходит из синтезирующей клетки. От начала синтеза до этого момента проходит ~20–30 минут. За 24 часа в организме синтезируется 10–15 г альбумина. Период 50 %-ного обновления альбумина равен 10–15 суток.

Молекула альбумина состоит из одной аминокислотной цепочки, скрепленной дисульфидными связями, включает 585 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 66400.

Около 50–67 % аминокислотных остатков молекулы альбумина уложены в α -спирали. Самая короткая α -спираль образована 5 аминокислотными остатками и имеет длину 0,75 нм. Самая длинная α -спираль состоит из 31 аминокислотного остатка, ее длина — 4,65 нм. Общее число спиральных структур в молекуле — 28. В молекуле альбумина имеется 17 дисульфидных связей между молекулами цистеина, которые формируют 9 петель. Каждая три петли образуют глобулярную структуру (домен), поддерживаемую гидрофобными взаимодействиями. Центральная область домена образована в основном гидрофобными остатками, а внешняя — гидрофильными. Молекула сывороточного альбумина человека, включающая 9 петель, состоит из трех гибко связанных доменов.

В настоящее время рассматриваются две модели расположения доменов в молекуле альбумина. По одной из них молекула альбумина состоит из трех сфер диаметром ~38 Å, которые расположены в один ряд, а по другой альбумин по форме напоминает сердце и может быть описан равнобедренным треугольником со стороной 80 и высотой 30 Å, в которой домены соединены большими спирализованными участками. То есть вопрос о форме молекулы альбумина окончательно не решен.

Молекула альбумина в целом и отдельные ее участки весьма гибки, несмотря на большое число дисульфидных связей.

Общая площадь поверхности множества мелких молекул альбумина очень велика, поэтому они особенно хорошо подходят для выполнения функции переносчиков многих транспортируемых кровью веществ.

Хорошо известна способность альбумина обратимо связывать жирные кислоты, лекарства, ионы металлов, различные метаболиты. При этом в молекуле альбумина для их связывания имеются специфические центры.

В первом домене обнаружен центр связывания двухвалентных катионов: Ni^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} . Высокоаффинный участок связывания жирных кислот находится в третьем домене.

Обнаружен специфический центр связывания геминовых производных, в частности билирубина.

Степень нагруженности белка лигандом может быть весьма значительна. Так, одна молекула альбумина может одновременно связывать от 25 до 50 молекул билирубина — достаточно крупного соединения с $M = 500$.

При связывании лигандов в молекуле альбумина происходят конформационные перестройки. Они могут быть довольно значительны, например, происходит увеличение или уменьшение содержания α -спиралей.

Вторичная и третичная структуры альбумина существенно изменяются при изменении кислотности среды. В молекуле альбумина при изменении pH происходят различные конформационные переходы в результате изменения заряда ионизированных групп белка.

Конформационные изменения, связанные с изменением pH, влияют на связывающие функции альбумина. Молекула альбумина устойчива к температурной денатурации и выдерживает нагрев до 60 °C в течение 1 часа. Изменение температуры влияет на связывающую функцию альбумина. Так, с увеличением температуры число мест связывания жирных кислот уменьшается.

Альбумин — это весьма устойчивая к разрушению молекула, которая, вместе с тем, чутко реагирует на малейшие изменения в окружающем ее пространстве, приспособляясь к новым условиям существования. Внешние воздействия приводят к сжатию и растяжению спиральных участков молекулы альбумина, частичному расплетению и дополнительному скручиванию участков полипептидной цепи.

Помимо транспортной роли, альбумин выполняет и ряд других важнейших функций: резервную, антиоксидантную, антитоксическую, связывая многие эндогенные токсичные метаболиты.

Следует отметить, что из плазмы крови человека можно выделить несколько отличающихся по строению альбуминов, т. е. можно говорить о гетерогенности альбумина плазмы крови. Электрофоретически различают до 8 типов альбумина. Обнаружено до 80 генетически детерминированных вариантов альбумина, т. е. семейство альбуминов достаточно обширно. Альбумины разных видов животных также отличаются между собой. Однако семейство альбуминов является совокупностью гомологичных белков и отличается лишь числом доменов и некоторыми аминокислотными остатками.

Глобулины

Глобулины — белки с большей, чем альбумины ($M > 100000$) молекулярной массой. В отличие от альбуминов они нерастворимы в чистой воде, но растворимы в слабых солевых растворах.

Глобулины относятся к слабокислым или нейтральным белкам. Их изоэлектрическая точка лежит в диапазоне pH 6,0–7,3.

Глобулины содержат меньше чем альбумины кислых аминокислот. Они слабо гидратированы и поэтому осаждаются в менее концентрированных растворах сульфата аммония.

Некоторые из глобулинов обладают способностью к специфическому связыванию веществ (специфические переносчики), другие, как и альбумины, к неспецифическому связыванию липидорастворимых веществ.

Фракция глобулинов неоднородна и может быть разделена электрофоретически. В порядке убывания электрофоретической подвижности различают α_1 -, α_2 -, β - и γ -глобулины. Однако даже эти субфракции неоднородны по составу белков: каждую из них можно разделить при помощи других методов.

Таблица 29

Основные электрофоретические фракции глобулинов

Электрофоретическая фракция	Отдельные белки фракции	Молекулярная масса	pI	Биологическая функция
α_1 -глобулины	Кислый α_1 -гликопротеин	44000	2,7	Транспорт фосфолипидов
	α_1 -липопротеин (кинопротеин высокой плотности)	200000	5,1	
α_2 -глобулины	Церулоплазмин	160000	4,4	Связывает медь, обладает оксидазной активностью Ингибирует протеиназы Связывает гемоглобин и препятствует его выделению с мочой
	α_2 -макроглобулин	820000	5,4	
	α_2 -гаптоглобулин	8500	4,1	
Электрофоретическая фракция	Отдельные белки фракции	Молекулярная масса	pI	Биологическая функция
β -глобулины	Трансферрин	90000	5,8	Транспорт железа
	β -липопротеин (липопротеид низкой плотности)	3000000–20000000		Транспорт липидов, прежде всего холестерина
γ -глобулины		150000–960000	5,8–7,3	антитела

Группа γ -глобулинов достаточно разнообразна.

Существуют 5 основных классов иммуноглобулинов (антител), обозначаемых IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, которые сильно различаются по молекулярной массе и значению изоэлектрической точки. Так, для IgG $M = 156000$ и $pH_1 = 5,8$. Для IgA $M = 150000$ и $pI = 7,3$. Иммуноглобулины IgM имеют молекулярную массу 950000.

Все классы иммуноглобулинов построены по общему плану: две тяжелые цепи соединены дисульфидными связями с двумя легкими цепями, то есть глобулины – олигомерные белки. Легкие и тяжелые цепи имеют инвариантные участки, которые идентичны у антител одного класса. Каждая легкая и тяжелая цепь также имеет вариабельные участки, обеспечивающие специфичность распознавания антител.

Следует отметить, что фракции α_1 -, α_2 -, и β -глобулинов нельзя отнести к истинно простым белкам, состоящим только из аминокислот, так как они, выполняя свои функции, находятся в связанном состоянии с небелковыми фрагментами, то есть представляют собой сложные белки или белок-небелковые комплексы и отдельные представители указанных фракций будут представлены в разделе «сложные белки».

Протеиноиды

Протеиноиды — это белки опорных тканей — костей, хрящей, связок, сухожилий, ногтей, волос, рогов, копыт и т. д.

Все эти белки относятся к фибриллярным белкам (фиброин, коллаген, эластин, кератин). Они не растворимы в воде и солевых растворах, обладают ограниченной растворимостью в специальных растворителях. Их строение и свойства рассмотрены ранее.

Относительность понятия «простой белок»

Все перечисленные простые белки, строго говоря, не являются простыми. Как это уже отмечалось на примере глобулинов, в составе их молекул обнаружены небелковые компоненты (углеводы, липиды, металлы). По этой причине их нельзя назвать простыми. Лишь гистоны и протамины в значительной мере отвечают определению «простой белок», однако и они в природных условиях образуют прочные комплексы с нуклеиновой кислотой. Таким образом, в чистом виде простые белки встречаются в организме крайне редко, так как многочисленные реакционноспособные группы белков способны взаимодействовать с самыми различными химическими соединениями, продуцируя довольно прочные ассоциаты.

10.3.2. Белок-небелковые комплексы или сложные белки

Сложные белки представляют собой макромолекулярный комплекс двух веществ, относящихся к разным классам, одно из которых — белок. Эти компоненты прочно соединены ковалентными или нековалентными связями, поэтому смешанные макромолекулы выделяются и функционируют как единое целое.

Если полипептид образует прочный комплекс с любым низко- или высокомолекулярным соединением небелковой природы, то образующийся ассоциат принято называть сложным белком, или протеидом. При этом белок, лишенный своей небелковой части, называется апопротеином.

Классифицируют такие комплексы по строению их небелковой части, называемой простетической группой.

Сложные белки подразделяют на:

- металлопротеиды;
- гликопротеиды;
- фосфопротеиды;
- липопротеиды;
- хромопротеиды;
- нуклеопротеиды.

10.3.2.1. Нуклеопротеиды

Это крупные белки, у которых простетическая группа представлена нуклеиновой кислотой, и по молекулярной массе значительно превосходит белковую часть, представленную протаминами или гистонами.

Связь между белковой и небелковой частью ионная и достаточно прочная, т. к. гистоны — основные белки, являющиеся в физиологических условиях поликатионами, а нуклеиновые кислоты в этих условиях представляют собой полианионы.

Примерами нуклеопротеидных комплексов являются рибосомы и вирусы. Например, рибосома *E. coli* содержит 60% РНК и 40% белка. На долю рибосомальных РНК приходится большая часть (до 80%) от всего количества клеточных РНК и они имеют наиболее высокую молекулярную массу среди всех видов нуклеиновых кислот.

Вирусы представляют собой комплексы, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты и большое число белковых молекул, образующих определенную олигомерную структуру.

Вирусы растений содержат РНК, вирусы животных могут содержать либо ДНК, либо РНК.

Огромное количество вирусов животных, растений, бактерий (бактериофагов) представляет собой обширное семейство надмолекулярных нуклеопротеидных образований. Из этого семейства вирусы бактерий изучены наиболее полно. Группы вирусов различаются строением и размерами. Среди них наиболее крупными являются вирусы животных.

Нуклеиновая кислота, содержащаяся в вирусе, влияет на его форму. Некоторые вирусы, содержащие одноцепочечную ДНК, имеют спиральную структуру.

Почти все вирусы, содержащие двухцепочечную ДНК, образуют структуры с икосаэдрической симметрией. Предполагается, что взаимодействие белок — нуклеиновая кислота в икосаэдрических вирусах слабее, чем в спиральных. К настоящему времени некоторые вирусы получены в кристаллическом состоянии.

Вирус табачной мозаики как представитель нуклеопротеидов

Хорошо изучен вирус растительного происхождения — вирус табачной мозаики, вызывающий заболевание листьев табака.

Средняя масса белков, окружающих РНК, составляет 17 500.

Молекулярная масса вируса $4 \cdot 10^7$, а молекулярная масса вирусной РНК $2,2 \cdot 10^6$.
Общий состав вируса: 5–6% РНК и 94–95% белка.

Четвертичная структура вируса представляет собой цепь РНК, окруженную расположенными в определенном порядке полипептидными цепями и включает около 2200 субъединиц, в каждой из которых содержится 158 аминокислот. Размер надмолекулярного образования вируса табачной мозаики 15×300 нм. Молекула РНК расположена в отверстии в центре состоящего из белка цилиндра.

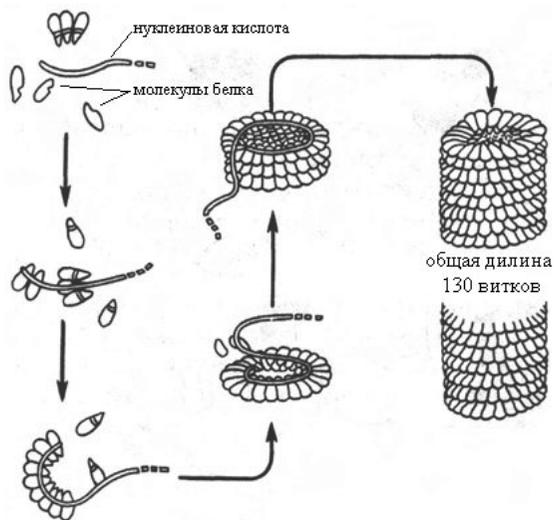


Рис. 30. Самосборка вируса табачной мозаики

Между нуклеиновой кислотой и белками оболочки существует тесная взаимосвязь. Генетическая информация для биосинтеза белков оболочки закодирована в нуклеиновой кислоте, а сам белок оболочки предохраняет нуклеиновую кислоту от действия протеаз, специфических ферментов, разрушающих полинуклеотидную цепь, которые содержатся в клетке-хозяине.

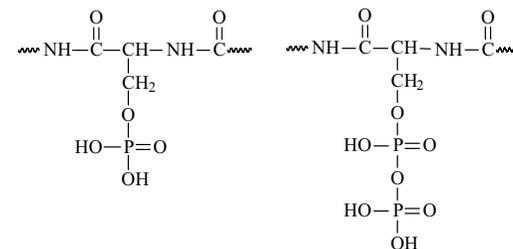
Еще более тесная связь имеет место между белковыми субъединицами. Такая связь была продемонстрирована при разрушении вируса табачной мозаики, за которым следовала спонтанная самосборка белка в отсутствие нуклеиновой кислоты. Пустая оболочка или капсида, однако, менее стабильна, чем содержащая нуклеиновую кислоту вирусные частицы.

10.4.2.2. Фосфопротеиды

Фосфопротеиды — кислые, содержащие белок молекулы сравнительно небольшой молекулярной массы.

Их небелковая часть представлена остатками фосфорной кислоты, количество которых в разных фосфопротеидах может быть различно.

Связь небелковых фрагментов с полипептидной цепью осуществляется через остатки оксиаминокислот: в основном через серин и треонин. Связь небелковой и белковой частей ковалентная, прочная. Присоединение фосфорной кислоты может осуществляться по монофосфатному или пиррофосфатному типу.



К классу фосфопротеидов относится белок молока — казеиноген. Белок образован двумя субъединицами и имеет молекулярную массу 56000.

Белки яичного желтка — вителлин, вителлинин, фосфитин также являются фосфопротеидами. Из этих белков наиболее богат фосфором фосфитин. Эти белки синтезируются в печени птиц и содержат очень много серина. Часто образование фосфопротеидов является сигналом к осуществлению определенных процессов в клетке. Через фосфорилирование осуществляется активация и дезактивация ферментов. Через фосфорилирование особых белков передается сигнал сокращения гладких мышц.

Казеиноген как представитель фосфопротеидов

Казеиноген — группа гомологичных белков молока всех млекопитающих. Казеиноген составляет ~80% всех белков коровьего молока и только ~40% всех белков молока человека. В коровьем молоке массовая доля казеиногена составляет ~3%.

Казеиноген — чрезвычайно важный питательный компонент, поставляющий не только незаменимые аминокислоты, но и некоторые углеводы, а также кальций и фосфор.

Казеиноген принадлежит к группе белков, называемых фосфопротеидами, и содержит большое число фосфатных групп, которые связывают кальций, то есть казеиноген присутствует в молоке не в свободном виде, а в соединении с кальцием (казеинат кальция).

Полипептидная цепь казеиногена включает большое число пролин-содержащих участков (пролин — антиспиральная аминокислота), которые не образуют межмолекулярные водородные связи.

Как следствие, казеиноген имеет слабовыраженную вторичную и третичную структуры. Вследствие этого он устойчив к денатурирующим воздействиям и не коагулирует при нагревании. Молекула казеиногена не содержит дисульфидных мостиков. Изоэлектрическая точка казеиногена лежит в кислой области ($pI = 4,6$).

В свежем молоке казеиноген присутствует в виде водной дисперсии.

При скисании молока в случае бактериального загрязнения казеиноген выпадает в осадок в виде творожного сгустка, что сопровождается высвобождением связанного казеиногеном кальция.

Казеинат кальция образует также нерастворимый белый творожистый сгусток при подкислении соляной или серной кислотами.

Казеиноген хорошо осаждается под действием сычужного фермента — протеолитического фермента, полученного из желудков телят.

В нейтральных растворах фермент превращает казеиноген в нерастворимый творожистый сгусток. Следует отметить, что для коагулированного белка используется термин — «казеиноген», а для коагулированного — «казеин». Фермент трипсин может гидролитически отщеплять от казеиногена фосфат-содержащий пептон. Казеиноген легко диспергируется в разбавленных растворах щелочей, растворах оксалата и ацетата натрия. В то же время он нерастворим в воде и растворах нейтральных солей. Нерастворимость в воде связана с нахождением на поверхности молекул казеина гидрофобных групп. Казеиноген находится в молоке в виде суспензии частиц, называемых мицеллами, которые агрегированы с участием ионов кальция. Мицелла казеиногена представляет собой сложное образование, состоящее из более мелких рыхлых слоистых образований — субмицелл. Точно представить структуру мицеллы достаточно трудно. В настоящее время считается, что субмицеллы казеиногена с четко очерченными границами не существует. Структура белковой частицы достаточно открыта и постоянно меняется, представляя собой «клубок спагетти». При визуализации модели мицеллы большую проблему представляло распределение фосфата кальция в мицелле. В настоящее время очевидно, что фосфат кальция в основном равномерно распределен по мицелле. Схематично структура мицеллы представлена на рисунке 31.

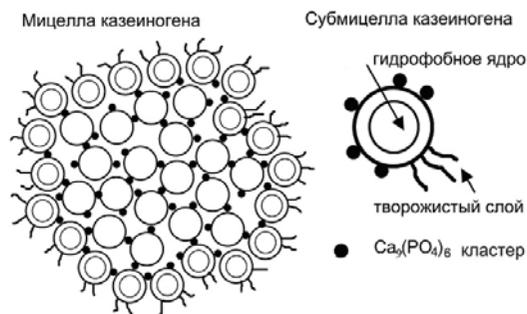


Рис. 31. Структура мицеллы казеиногена

Мицелла представляет собой близкую к сферической по форме, высоко гидратированную и довольно рыхлую частицу.

Полипептидные цепи в клубке частично связаны поперечными связями с помощью кластеров фосфата кальция нанометрового размера.

Внутренняя структура формирует внешние участки с пониженной локальной плотностью, известные как ворсистый слой, который обеспечивает стабильность природного казеина.

Казеиноген — важный пищевой продукт. Основными источниками казеиногена служат молоко и сыр.

Большая часть сырного белка представляет собой обработанный реннином казеиновый творожный сгусток.

В промышленности для получения казеиногена молоко сначала центрифугируют, чтобы удалить содержащийся в нем жир, а затем добавляют в него слабощелочной раствор, например гидрокарбоната натрия. После этого снова центрифугируют для отделения малейших следов жира и добавляют разбавленный раствор кислоты, чтобы добиться максимально полного выпадения казеиногена в осадок.

Образовавшийся творожистый сгусток промывают для удаления кислоты и высушивают при комнатной температуре.

Казеиноген используется как добавка к рациону для обогащения последнего белком. Такие добавки необходимы при различных патологических состояниях, например при ожогах, лихорадке или длительных тяжелых заболеваниях.

Казеиноген находит разнообразное применение в промышленности. Его используют как водостойкий компонент, обеспечивающий адгезию клея на склеиваемых поверхностях, как связующее в производстве клеевых красок и при проклеивании бумаги, а также в качестве стабилизатора в различных эмульсиях.

Обрабатывая казеиноген формальдегидом, можно получить полимерную массу, пригодную для изготовления различных изделий (рукояток для ножей и спиц).

Казеиновый пластик также используют как имитацию черепахового панциря, жадеита, лазурита в производстве бижутерии и швейной фурнитуры.

Гликопротеиды

Сложные белки данной группы содержат в качестве простетической группы углеводный компонент, представленный простыми сахарами, их производными а также олиго- и полисахаридами.

Ковалентное присоединение небольшого углеводного фрагмента к полипептидной цепи называют гликозилированием. Присоединение остатков сахаров является одной из наиболее часто встречающихся ковалентных модификаций вновь синтезированных белков.

Гликозилированию подвергаются все без исключения интегральные мембранные белки высших организмов, а также многие секретируемые белки.

Например, почти все белки сыворотки крови гликозилированы.

Существует два типа модификаций белка: О-гликозилирование по ОН-группе серина или треонина и N-гликозилирование аспарагиновых остатков.

Гликозилирование повышает стабильность белка, играет определенную роль в узнавании молекул гликопротеинов белковыми переносчиками, направляющими их к различным органам и тканям, защищает от протеолитической деградации, а также способствует сборке макромолекул с образованием олигомерных форм.

На примере небольшого одноцепочечного белка бромелайна ($M = 23\ 800$) из стебля *Ananas comosus*, включающего 212 аминокислотных остатков и один полиса-

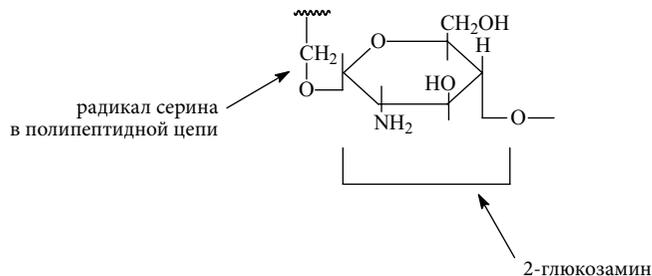
харидный фрагмент с $M = 1000$ показано, что гликозилированные белки более устойчивы к денатурирующему влиянию гуанидиний хлорида.

Гликопротеиды — обычно термостабильные белки. Углеводный компонент придает белкам термостойчивость.

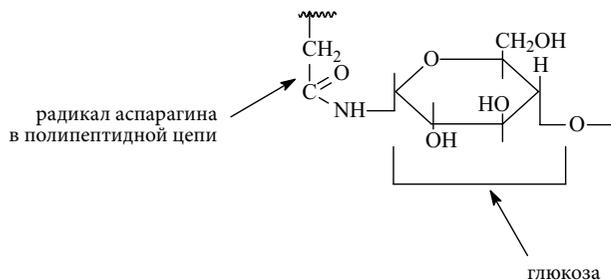
Многие ферменты микроорганизмов, обитающих в горячих источниках, являются гликопротеидами.

Гликопротеиды могут иметь как незначительный по массе, так и высокомолекулярный углеводный компонент, что позволяет разделить сложные белки данной группы на гликопротеины, имеющие в своей структуре относительно низкомолекулярный углеводный компонент, и протеогликаны, включающие гетерополисахаридный фрагмент, значительно превосходящий по массе полипептидную цепь.

Гликопротеинами называются соединения, молекулы которых состоят из белка и олигосахаридов, содержащих от 3 до 25 моносахаридных остатков, соединенных между собой гликозидными связями, с преобладанием белкового компонента (до 90%). Углеводная и полипептидная части в них связываются между собой O-гликозидными связями с участием со стороны белка гидроксильных групп остатков серина и треонина



или N-гликозидными связями, образуемыми амидной группой аспарагина.



К гликопротеинам относятся белки клеточных мембран, иммуноглобулины, гормоны, ферменты, белки плазмы, определяющие группу крови.

Установлено, что олигосахаридный компонент во многих гликопротеинах выполняет роль маркера, с помощью которого биосубстраты «узнают» нужные участки различных биополимеров, поверхностей клеток и других структур, обеспечивает взаимодействия антиген-антитело в иммунной системе, в связи с чем углеводные маркеры часто называют антигенными детерминантами.

Глобулиновая фракция белков плазмы крови включает различные гликопротеины. Так, фракция α_1 -глобулинов содержит гликопротеины, простетическая группа

которых представлена гексозами и гексозаминами. Около 2/3 всего количества глюкозы плазмы присутствует в связанной форме в составе гликопротеинов. В составе данной фракции обнаружен кислый α_1 -гликопротеин с молекулярной массой 44000 и $pI = 2,7$, который рассматривается как промежуточный продукт распада тканей.

К гликопротеинам также относятся факторы групп крови, лежащие в основе феномена несовместимости при переливании.

Так, групповая специфичность крови определяется составом антигенных детерминант (X и Y) гликопротеинов, сосредоточенных на внешней поверхности мембран эритроцитов.

Группа крови	Антигенный детерминант, Y
A	N-ацетил-галактозамин
B	D-галактоза
O	ОН

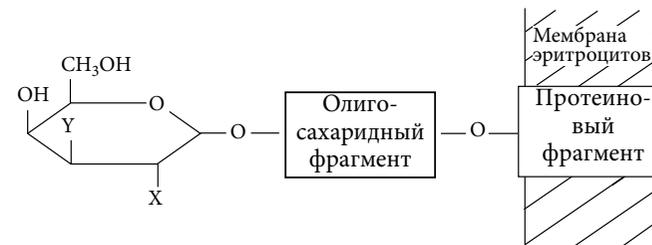


Рис. 32. Поверхность мембраны эритроцитов

Мембрана эритроцита содержит специфические гликопротеины, обладающие антигенными свойствами — агглютиногены.

С агглютиногенами реагируют специфические растворимые в плазме антитела, относящиеся к фракции γ -глобулинов — агглютинины.

При реакции антиген-антитело молекула антитела образует «мостик» между несколькими эритроцитами, и в результате они склеиваются.

Гликопротеиды плазматических мембран участвуют в контактном ингибировании клеток. Это так называемые интегральные белки, пронизывающие мембрану и имеющие на внешней стороне мембраны своеобразные олигосахаридные последовательности.

Расположение такого интегрального белка на примере гликофорина — интегрального белка эритроцитов — показано на схеме (рисунок 33 на цветной вклейке).

Такие углеводные «антенны» на поверхности клеток обеспечивают процессы их «узнавания» и регуляции клеточной активности.

Приведенные примеры свидетельствуют о важной информационной роли углеводов в составе гликопротеинов при обеспечении иммунитета и клеточной активности организма.

Антигенная специфичность бактерий определяется разнообразными по строению гликопротеидами их оболочек. Эти гликопротеиды расщепляются специфическим ферментом — лизоцимом.

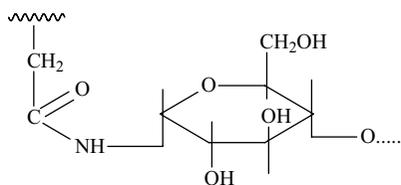
Фракция α_2 -глобулинов крови включает гаптоглобин, также относящийся по химическому строению к гликопротеинам. Одна из важнейших функций гаптоглобина — связывание гемоглобина, высвобождающегося при распаде эритроцитов, и транспорт в клетки селезенки для последующего метаболизма. После выполнения своей функции гаптоглобин отщепляется и вновь поступает в кровь. Существует несколько типов гаптоглобинов, различающихся электрофоретической подвижностью. Комплекс гаптоглобина с гемоглобином обладает пероксидазной активностью.

К группе гликопротеидов относятся и некоторые гормоны белковой природы, например эритропоэтин, контролирующий эритропоэз (формирование и созревание эритроцитов) у млекопитающих.

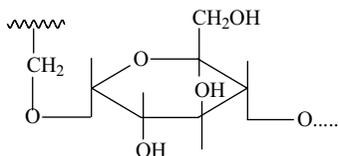
Это сравнительно небольшой белок с $M = 34000-37000$, высшие уровни структуры которого поддерживаются за счет образования дисульфидных связей.

В молекуле имеются два S-S мостика между *cys7/cys161* и *cys29/cys33*, которые чрезвычайно важны для поддержания активной конформации белка.

Эритропоэтин белка человека имеет четыре участка присоединения углеводных фрагментов, так называемых участков гликозилирования. Присоединение углеводных фрагментов осуществляется как по атому азота (N-гликозилирование) в положениях *Asn-24*, *Asn-38* и *Asn-83*, так и по атому кислорода (O-гликозилирование) в положении *Ser-126*. Углеводная часть эритропоэтина представлена олигосахаридными фрагментами, построенными из гексоз, гексозаминов и маковых кислот. N-гликозилирование через остаток аспарагина можно представить следующим образом



а O-гликозилирование по остатку серина представлено ниже.



Функции, выполняемые эритропоэтинами теплокровных чрезвычайно разнообразны. Так данные гормоны ингибируют апоптоз — процесс запрограммированной клеточной гибели. Для гликопротеидов характерны и регуляторные функции.

Гликопротеин-тромбоспондин (TSP-1) — ингибитор ангиогенеза — процесса роста и формирования сосудов.

Среди представителей гликопротеидов обнаружены белки, выполняющие токсигенную функцию.

Растительные токсины из Европейской омелы (*V. album L*) — имеют пептидную природу. Это гетеродимерные гликопротеиды, включающие две различные субъединицы ($M = 29000$ и $M = 34000$) связанные S-S связью.

Простетическая группа гликопротеинов может быть также представлена и высокомолекулярными углеводными фрагментами.

Наиболее часто в качестве простетической группы выступают кислые гетерополисахариды или мукополисахариды (от лат. *mucos* — слизь). Их комплексы с белком получили название протеогликанов, поскольку основные свойства этих макромолекул определяются углеводной, а не белковой частью.

Протеогликаны

Протеогликаны важнейшие компоненты соединительной ткани, т. е. они встречаются в коже, хрящевой ткани, суставной жидкости, роговице глаза, костях, стенках крупных сосудов.

Простетическая группа протеогликанов часто представлена хондроитинсульфатами, представляющими собой линейный полимер, мономерным звеном которого является дисахарид, построенный из D-глюкуроновой кислоты и D-галактозамина, связанных β -1,3-гликозидной связью. Мономерные звенья между собой соединены β -1,4-гликозидными связями и сульфированы по фрагменту N-ацетил-D-галактозамина либо в 4-, либо 6- положении (рисунок 34).

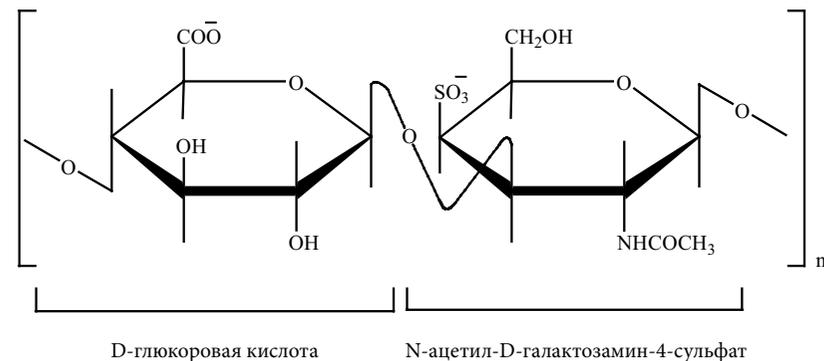


Рис. 34. Структура мономерного звена хондроитинсульфата

Углеводный фрагмент присоединен к полипептидной цепи прочной ковалентной связью через окси-группу радикала серина. Присоединение осуществляется через тетрасахаридный фрагмент, последовательно состоящий из остатка D-глюкуроновой кислоты (1), двух звеньев D-галактозы (2, 3) и D-ксилозы (4).

Схема присоединения хондроитинсульфата к полипептидной цепи показана на рисунке 35.

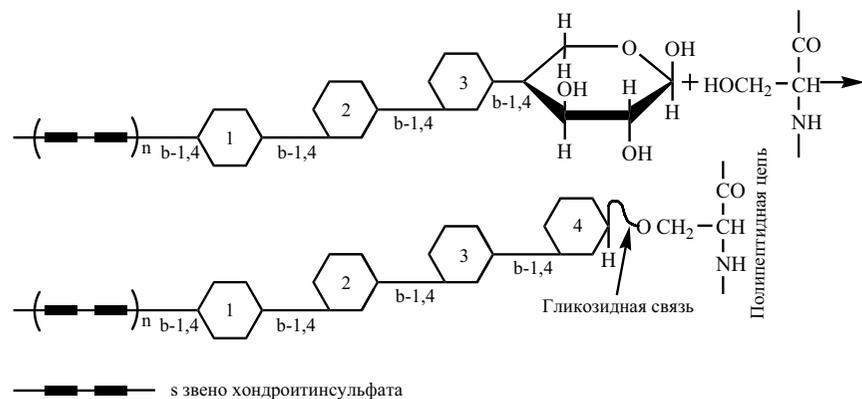


Рис. 35. Схема присоединения хондроитинсульфата к полипептидной цепи

Поскольку в полипептидной цепи остатки серина повторяются многократно, то в целом к полипептиду присоединяется большое количество хондроитинсульфатных

цепей. Молекулярная масса хондроитинсульфатов составляет 10000–60000, т. е. масса углеводного фрагмента значительно превосходит массу полипептидной цепи и составляет 83–78% от массы макромолекулы сополимера.

Хондроитинсульфаты содержатся в коже, костной ткани, тканях трахеи, аорты, артерий. Протеогликаны хрящей, пуповины, стекловидного тела глаза, суставной жидкости в качестве протестической группы содержат гиалуроновую кислоту. Гиалуроновая кислота — несulfированный линейный гетерополисахарид с самой большой молекулярной массой 200000–700000. Мономерным звеном гиалуроновой кислоты является дисахарид, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных β -1,3-гликозидной связью (рисунок 36). Мономерные звенья соединены между собой β -1,4-гликозидными связями как показано ниже.

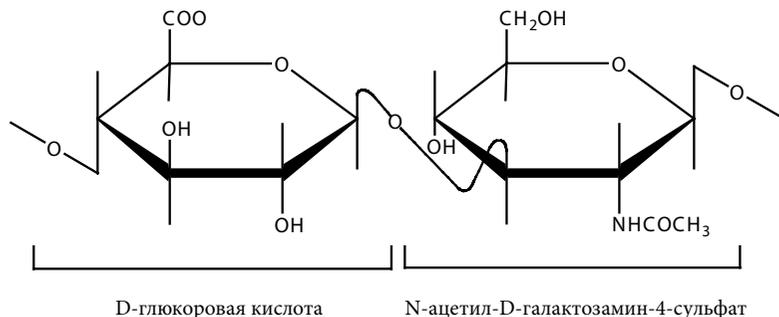


Рис. 36. Структура мономерного звена гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота и хондроитинсульфатные протеогликановые субъединицы участвуют в образовании более высокоорганизованных протеогликановых агрегатов хрящевой ткани.

Центральную вытянутую часть агрегата составляет макромолекула гиалуроновой кислоты. Равномерно вдоль всей цепи гиалуроновой кислоты через каждые 10 моносахаридных звеньев, т. е. через каждые 30–50 нм, перпендикулярно основной оси располагаются хондроитинсульфатные протеогликановые субъединицы (рисунок 37).



Единая длинная молекула гиалуроната (1) нековалентно связана со многими молекулами белка (2), каждая из которых содержит ковалентно связанные молекулы хондроитинсульфата (3).

Рис. 37. Протеогликановый агрегат

Образовавшаяся разветвленная структура является своеобразным биологическим фильтром, задерживающим микробные клетки и крупные чужеродные молекулы, попадающие в организм.

Надмолекулярные структуры с включением гиалуроновой кислоты служат биологическим цементом, заполняя пространства между клетками.

Относительная молекулярная масса такого агрегата достигает 10^8 , а длина 10^{-6} м. В целом подобный агрегат представляет собой разветвленный полианион, способный удерживать большую массу воды и катионов (K^+ , Na^+ , Ca^{+2}). За счет этого протеогликаны активно участвуют в водно-солевом обмене.

Важнейшей группой протеогликанов теплокровного организма являются сложные белки, несущие в качестве протестической группы гепарин. Данная группа протеогликанов не относится к структурным компонентами межклеточного вещества. Гепарин вырабатывается тучными клетками соединительной ткани и выделяется при их распаде (цитоллизе) в межклеточную среду и кровеносное русло. Гепарин состоит из повторяющихся дисахаридных единиц в состав которых входят остатки D-глюкозамина и урановой кислоты. В молекуле гепарина обнаружены две урановые кислоты: D-глюкуроновая и L-идурановая кислота.

Внутри дисахаридного фрагмента формируется α -1,4-гликозидная связь, а между дисахаридными фрагментами — α -1,4-гликозидная связь, когда фрагмент оканчивается L-идурановой кислотой, и β -1,4-гликозидная связь, когда фрагмент заканчивается D-глюкуроновой кислотой. Аминогруппы гепарина частично sulfированы, а частично ацилированы. Sulfированы некоторые C-2 фрагменты L-идурановых кислот и C-6 остатки глюкозамина; остатки D-глюкуроновой кислоты не sulfированы.

На одно дисахаридное звено приходится в среднем 2,5–3 — sulfатные группы. Молекулярная масса гепарина составляет 16000 — 20000.

Характерный фрагмент полисахаридной цепи гепарина имеет вид, представленный на рисунке 38.

Гепарин, подобно хондроитинсульфату, соединяется с белком через тетрасахаридный фрагмент, концевым звеном которого является D-ксилоза.

Гепарин препятствует свертыванию крови, т. е. проявляет антикоагулянтные свойства.

К протеогликанам также относятся муреин — строительный материал клеточных стенок бактерий.

10.3.2.4. Липопротеиды

Известно, что действие целого ряда природных физиологически активных соединений осуществляется в комплексе со связывающими белками, которые играют важную роль в реализации их биологических свойств.

Способность образовывать комплексы с белками выявлена для таких гидрофобных соединений, как жирные кислоты, стероидные и тиреоидные гормоны, а также жирорастворимые витамины (например A и D).

Биологическое значение связывания с белками, очевидно, заключается в переводе нерастворимых гидрофобных лигандов в растворимую в гидрофильной среде клетки форму.

Липопротеиды — это очень большие молекулы с молекулярной массой более 1 000 000. Липидная часть молекул этих соединений окружена белковым фрагментом, что обеспечивает достаточно высокую растворимость этих соединений. В форме таких липопротеидных комплексов липиды переносятся кровью. Липопротеидный комплекс непрочен, его компоненты образуют единую структуру за счет индукционных и дисперсных взаимодействий. Связь липид — белок можно разрушить путем

многократного замораживания — оттаивания, с помощью ультразвука, интенсивным механическим перемешиванием, а также воздействием органических растворителей, например этанола.

Так, при добавлении этанола к сыворотке крови последняя становится мутной за счет высвобождения липидов из липид — белковых комплексов.

Химическое строение липидного фрагмента липопротеидных комплексов очень разнообразно. Небелковая часть этих структур может быть представлена нейтральными жирами, холестерином, эфирами холестерина, фосфолипидами.

Основной спектр липидоподобных соединений крови представлен следующими соединениями (таблица 30).

Таблица 30

Основные липидоподобные соединения крови

Соединения	Содержание г/л (норма)
Нейтральные жиры	0–4,5
Жирные кислоты	2–4,5
Холестерин и его эфиры	1,6–4,2
Желчные кислоты	0,002–0,03
Соли желчных кислот	0,05–0,12
Фосфолипиды	1,5–2,5
Общее содержание эфирорастворимых веществ	3,8–6,8

Около 80% всех глицеридов, фосфолипидов, эфиров холестерина образуют липопротеиновые комплексы, связываясь с глобулинами. Неэтерифицированные жирные кислоты соединяются преимущественно с альбумином. Во всех случаях транспорта липидов небелковая липидная часть окружена гидрофильной белковой молекулой для обеспечения высокой гидрофильности всего комплекса.

Липопротеиды имеют низкую плотность (0,92–1,21 г/мл) благодаря липидному компоненту. Для них характерно явление флотации: при ультрацентрифугировании они всплывают.

Классы липопротеидов различают по скорости флотации.

Белковые компоненты липопротеидов — аполипотеины — отличаются друг от друга по структуре и аминокислотному составу. Липид — белковый комплекс может иметь структуру двух видов. Липопротеиды, содержащие менее 30% белка, имеют строение мицеллы, ядро которой образуют липиды (преимущественно триглицериды и эфиры холестерина), а наружный слой состоит из белка, фосфолипидов, холестерина, имеющих высокополярные группы.

Такое строение обеспечивает растворимость в водной среде плазмы крови, в которой циркулируют липопротеиды.

Липиды, содержащие 50% и более белка, имеют субъединичное строение: липиды каждой из субъединиц связаны с гидрофобной частью молекулы белка.

Следует отметить, что соотношение холестерин: фосфолипиды в составе липопротеидных комплексов имеет диагностическое значение. Преобладание холестерина в составе липопротеидных комплексов свидетельствует о высоком риске развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Следует отметить, что белки, составляющие аполипотеидную часть комплекса, могут иметь как α -спиральную, так и β -складчатую структуру.

В этом случае соответствующие липопротеиды называются α - и β -липопротеидами.

Одной из характеристик, зависящих от структуры аполипотеидного фрагмента, является плотность комплекса. Так, липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) представлены комплексами с α -спиральными белками, а в состав липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) входят в основном β -складчатые белки.

Таблица 31

Липопротеиды плазмы крови

Тип липопротеида	ρ , г/см ³	Размер частиц, нм	М	% состав сухой массы				
				Белки	Триглицериды	Фосфолипиды	Холестерин и его эфиры	Отношение холестерин/фосфолипид
липопротеиды высокой плотности (ЛПВП)	1,210–1,063	7–15	250000	49	7	27	17	0,6
липопротеиды низкой плотности (ЛПНП)	1,063–1,006	21–25	2500000	32	7	25	35	1,4
липопротеиды очень низкой плотности (ЛПОНП)	1,006	30–100	$2 \cdot 10^7$	2–13	64–80	6–15	8–13	1,4
хиломикроны	1,006	120	$5 \cdot 10^8$	0,5	90	4	6	1,5

Липопротеиды обладают множественными функциями: регулируют функционирование сердечно-сосудистой системы, иммунной системы, активность хроматина. С функционированием липопротеидов связана защита от инфекции. Решающее значение в большинстве эффектов имеет катионный характер их белковых компонент.

Антимикробным действием обладают липопротеиды высокой плотности (ЛПВП), большинство из которых — кислые ($pI = 4,3\div 5,7$)

Липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) активируют тромбоциты крови человека, снижают чувствительных коронарных сосудов к гистаминам. Липопротеиды низкой плотности из крови доноров содержат частицы, обладающие разной способностью к агрегации. Таким образом, липопротеиды, отнесенные по плотности к одной фракции, неоднородны. Липопротеиды высокой плотности (ЛПВП) повышают скорость гликолиза в печени. Многие ферменты, встроенные в мембрану, в своей четвертичной структуре содержат липидный фрагмент, в частности кардиолипин, для поддержания своей функциональной активности. К таким ферментам относится сукцинат дегидрогеназа из *E. coli*, цитохромоксидаза млекопитающих и другие.

Липид — белковые комплексы условно делятся на свободные (липопротеиды плазмы крови, молока), растворимые в воде, и структурные (входят в состав мембран), являющиеся жирорастворимыми. Последняя группа таких комплексов в связи с растворимостью в органических растворителях получила название протеолипидов.

В группе протеолипидов белок составляет сердцевину их молекулы, а оболочку образует липидный компонент, при этом содержание белка в протеолипиде составляет 65–85%. Протеолипиды обнаружены в сердце, почках, легких, скелетных мышцах, клетках растений, но больше всего их в миелиновых оболочках нервов. В клетках перечисленных органов они погружены в липидную фазу мембран. Состав протеолипидов из различных органов неодинаков. Предполагается, что они прежде всего обеспечивают физиологическую функцию нервных волокон.

10.3.2.5. Металлопротеиды

К металлопротеидам относятся белки, у которых простетическая группа представлена катионами металлов больших периодов. Наиболее часто в составе этих белков встречаются ионы железа и меди. Взаимодействие иона металла и белковой части осуществляется двумя типами связей: ионной и донорно-акцепторной. При этом в образовании координационных связей участвуют незаполненные d-орбитали ионов металлов и неподеленные электронные пары атомов азота и кислорода пептидных связей, неподеленные электронные пары NH₂-групп боковых радикалов аргинина и лизина, атомов азота циклов триптофана, пролина, гистидина, атомов серы серосодержащих аминокислот и атомов кислорода серина и треонина. Образующаяся связь между металлом и белком достаточно прочная.

Среди металлопротеидов следует выделить трансферрин, имеющий в своем составе два специфических центра, связывающих железо: по одному на N- и C-концах полипептидной цепи.

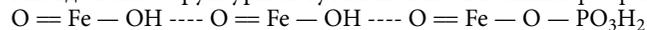
Это сравнительно небольшой белок, M = 77000. Степень окисления железа в составе трансферрина +2.

К металлопротеидам также относятся и ферритин. Ферритин — белок, депонирующий железо. В норме ферритин имеется во всех тканях. В организме теплокровных ферритин сосредоточен, главным образом, в селезенке, печени, костном мозге. Это очень крупный белок четвертичной структуры, содержащий до 24 субъединиц и имеющий молекулярную массу 500000–900000. Гомологичные ферритины выделены из организмов разных типов. Молекула ферритина млекопитающих представляет собой белковую капсулу из 24 субъединиц, формирующих полость с внутренним диаметром 8 мкм. Множественные формы, или изоферритины, формируются в различных тканях млекопитающих благодаря наличию трех видов субъединиц: L — легкая (M = 1900, 182 аминокислоты), H — тяжелая (M = 21000, 182 а/к-гты) и G — гликозилированная (M = 23000). Тканевые ферритины состоят из H и L субъединиц в различных пропорциях, в отличие от ферритина сыворотки крови, состоящего практически только из иммунологически сходных L и G-субъединиц. G-субъединица присутствует во внеклеточных ферритинах и представляет собой результат модификации L-цепи. Для ферритинов характерна тканевая специфичность.

Ферритин является буфером при поступлении свободного железа в организм, так как степень его насыщения может меняться.

Ферритин может содержать от 0 до 43000 ионов Fe⁺³ на одну молекулу белка. Железо хранится в центральной полости в форме гидроксида железа, при депонировании доставленного трансферрином железа в процессе связывания происходит его окисление. Гидроксид железа в составе ферритина формирует олигомерные структуры типа O = Fe — OH ---- O = Fe — OH ----

Иногда такие структуры могут включать связанный фосфат:



Освобождение железа из ферритина протекает с участием восстановителей: глутатиона, цистеина, цистамина. При этом железо высвобождается в форме Fe⁺². Ферритинами, которые обнаружены у микроорганизмов, растений и животных, обеспечивается эффективная концентрация клеточного железа более чем в 10¹¹ раз превышающая растворимость иона железа в клеточном соке.

Важнейшим представителем металлопротеидов является церулоплазмин. Церулоплазмин — представитель «голубых» белков плазмы крови. Он относится к группе «голубых» оксидаз. Этот белок содержит в своем составе ион меди и участвует в процессах антиоксидантной защиты, взаимодействуя с гидроксильным радикалом.

В качестве реакционного центра в этом случае выступает ион меди, окисляясь из состояния (+1) до (+2).

На каждую молекулу церулоплазмينا приходится 8 атомов меди, обуславливающих антиоксидантную активность данного белка. Церулоплазмин связывает около 90% всей меди, содержащейся в плазме, однако с током крови к клеткам медь переносится не церулоплазмином, а альбумином. При электрофоретическом разделении белков плазмы церулоплазмин попадает во фракцию α₂-глобулинов.

Семейство медь-содержащих белков достаточно обширно. Так, фермент тирозиназа содержит ионы Cu⁺². Недавно открыто семейство низкомолекулярных белков — внутриклеточных переносчиков Cu, так называемых Cu-шаперонов. Они связывают ионы меди, доставляют их во внутриклеточные компартменты и внедряют их путем прямого взаимодействия в активные центры специфических партнеров — медь-зависимых ферментов. Внутриклеточные переносчики ответственны за внедрение в белковые системы и ряда других металлов. Открыты шапероны, внедряющие ионы металлов в железо-серные и железо-молибденовые комплексы в активных центрах специфических ферментов. Среди металлопротеидов есть белки, включающие достаточно редко встречающиеся металлы. Например, формиатдегидрогеназа из *Clostridium thermoacetatum* содержит вольфрам. В состав металлопротеидов могут одновременно входить несколько разных металлов. Так, в состав белка-фермента щелочной фосфатазы *e. coli* входит два катиона Zn⁺² и два катиона Mn⁺². Цинк достаточно часто входит в состав белков. Так, фермент карбоангидраза также относится к цинк-содержащим металлопротеидам. Большинство изучаемых супероксиддисмутаза (СОД) — основного антиоксидантного фермента — олигомерны и состоят из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит один атом металла, дисульфидный мостик, одну сульфгидрильную группу и ацетилированную концевую аминогруппу. В составе супероксиддисмутаза обнаружены ионы меди, цинка, марганца, железа и других металлов. В составе металлопротеидов обнаружены не только d-металлы, но и металлы главных подгрупп. Так, кальмодулин — универсальный Ca⁺²-связывающий белок — также относится к классу металлопротеидов.

Ионы металлов могут не только непосредственно входить в состав сложных белков, но и включаться в более сложные небелковые структуры и в их составе выполнять роль простетических групп различных протеидов, что в дальнейшем может быть показано на примере гемопропротеидов — одной из групп окрашенных белков. Следует отметить, что на современном этапе изучения белков не представляется возможным четкое разделение сложных белков в рамках приведенной классификации. Многие белки в своем нативном состоянии включают несколько разнородных небелковых фрагментов. Так, лактоферрин (M = 76000–80000) — защитный фактор женского молока (1–6 мг/л), обеспечивающий устойчивость к инфекциям грудных детей, входит в семейство трансферринов-гликопротеинов. Данный белок состоит из одной полипептидной цепи (673 аминокислотных остатка) и включает два гомологичных домена. Лактоферрин содержит два сайта потенциального гликозилирования. Степень гликозилирования может быть разной, поэтому его молярная масса варьирует. Лактоферрин обычно содержит концевой остаток фруктозы. Аналогично лактоферрину, трансферрин также включает ионы металла и углеводные фрагменты. Лактоферрин и трансферрин человека — близкие гомологи, имеющие 59% идентичных остатков, однако данные белки по-разному гликозилированы, отличаются по кислотно-основным свойствам и сродству к катиону железа. Так, лактоферрин имеет pI = 8,7, а для трансферрина pI = 7,9. Сродство лактоферрина к иону железа более чем в 100 раз выше, чем у трансферрина.

10.3.2.6. Хромопротеиды

Обширная группа хромопротеидов объединяет множество разнообразных по строению и функциям окрашенных белков.

Среди хромопротеидов выделяют две большие группы белков, каждая из которых включает структуры, имеющие близкую по строению небелковую часть. Это гемопротейды и флавопротеиды.

Гемопротейды

В основе простетической группы данных белков лежит порфириновая структура. Порфирин имеет множество изомерных форм в зависимости от положения заместителей в макроцикле. Один из изомеров — протопорфирин IX — составляет структурную основу простетической группы данных белков.

Помимо порфиринового кольца, простетическая группа гемопротейда включает встроенный в кольцо ион железа в различных степенях окисления.

Комплекс протопорфирина IX с Fe^{+2} называется протогем или просто гем, а с Fe^{+3} — гемин.

Координационное число атома железа равно шести. В геме ион железа связан двумя ковалентными связями с атомами азота двух пиррольных колец. Из двух неиспользованных координационных связей одна идет на соединение с белком, а вторая — на соединение с различными лигандами.

Структура гема представлена на рисунке 39.

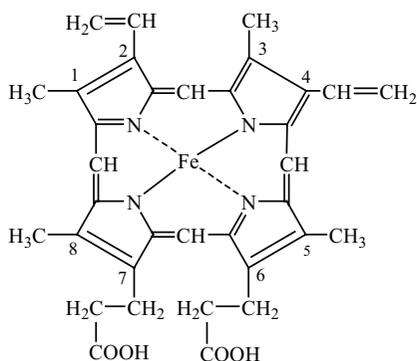


Рис. 39. Структура гема

Кроме наиболее распространенной формы гема, представленной выше, имеются и другие разновидности гемов: гем а, имеющий формильную группу в положении 8, гидроксиметильную в положении 2 и алкилвинильную в положении 4; гем с, в котором с винильными группами в положениях 2 и 4 связаны остатки цистеина; гем d, представляющий собой железодигидропорфирин.

Одна из изомерных форм гема входит в состав различных гемопротейдов, которым она придает красную окраску. Именно окраска данных белков и дала им такое название: в переводе с греческого «гем» означает кровь.

Помимо атома железа, в составе гемосодержащих белков могут обнаруживаться и другие атомы металлов. Так, в состав гемоцианина входят два атома меди.

Входящие в группу гемопротейдов белки выполняют в организме самые разнообразные функции. По биохимическим функциям гемопротейды делятся на нефер-

ментные (гемоглобин, миоглобин) и ферментные (цитохромы, каталаза, пероксидазы и др.). Разнообразие функций гемопротейдов возможно благодаря различным способам взаимодействия апобелка с гемом и потенциальными субстратами. К четырем основным функциям гемовых белков относится транспорт и депонирование кислорода (соответственно гемоглобин и миоглобин), катализ разложения перекиси водорода (каталаза), перенос электронов (цитохромы с и b), гидроксильное окисление субстратов (цитохром P-450).

Неферментные гемопротейды

К неферментным гемопротейдам относятся кислороддепонирующие и кислородтранспортные белки. Важнейшим кислороддепонирующим белком является миоглобин. Кислородпереносящие белки делятся на три группы (таблица 32).

Таблица 32

Кислородпереносящие белки и их некоторые характеристики

Кислородпереносящий белок	Атом металла в составе белка и степень его окисления	Количество атомов металла	Цвет	Источник выделения
Гемоглобин	Fe^{+2}	1	красный	Теплокровные животные
Гемоцианин	Cu^{+1}	2	голубой	моллюски, членистоногие
Гемэритрин	Fe^{+2}	2	вишневый	мелкие беспозвоночные

Миоглобин как представитель неферментных гемосодержащих белков

Миоглобины — семейство сравнительно небольших компактных глобулярных белков, $M \approx 17800$, имеющих 3 уровня структуры и включающих одну гемовую группу. Это хорошо изученные белки, многие из которых выделены в кристаллическом виде. Миоглобины свиньи, лошади, кашалота — гомологичные белки, имеющие аналогичные пространственные структуры и одинаковые редокс-потенциалы, но отличающиеся по количеству локализованных на поверхности остатков гистидина.

В основе вторичной структуры миоглобина лежит α -спираль. Степень спирализации полипептидной цепи составляет 75%. Размеры глобулы составляют $45 \times 35 \times 25 \text{ \AA}$. Внутри молекулы почти нет свободного пространства. В молекуле миоглобина выделяется 8 основных спиральных участков, между которыми находятся 5 деспирализованных зон. Два неспирализованных участка располагаются соответственно на N-конце (2 аминокислотных остатка) и на C-конце (5 аминокислотных остатков).

Расшифрована аминокислотная последовательность миоглобинов различных млекопитающих, которые являются высокомолекулярными белками.

Схематичное изображение молекулы миоглобина представлено на рисунке 40 (см. цветную вклейку).

Гем располагается в углублении глобулы, а высокополярные радикалы пропионовой кислоты расположены на ее поверхности. При физиологическом значении $pH \sim 7,34$ они находятся в ионизованном состоянии. Остальные части гема погружены внутрь молекулы миоглобина, где окружены неполярными, кроме двух гистидинов, аминокислотными остатками. Часто участок расположения гема называют гидрофобным гемовым карманом.

Два остатка гистидина вблизи гем-группы выполняют очень важную роль: к одному из них (проксимальному гистидину F-8) непосредственно присоединен атом железа и с этой стороны он выступает над плоскостью порфиринового кольца примерно на 0,3 Å. Связь между атомом железа и гистидином F-8 — координационная; т. е. гистидин F-8 занимает пятое координационное положение.

Участок связывания O₂ расположен по другую сторону плоскости в шестом координационном положении. Рядом с участком связывания O₂ располагается второй остаток гистидина (E-7), который называется дистальным. Остаток гистидина E-7 с гемом не связан. Схема расположения порфиринового фрагмента, дистального и проксимального гистидинов представлена на рисунке 41:

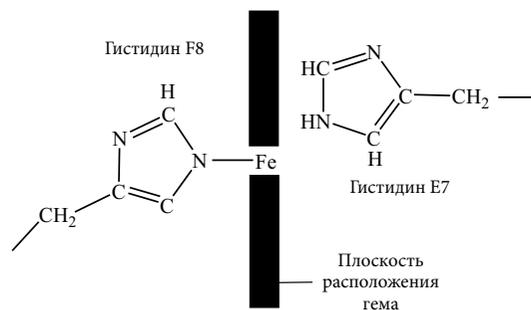


Рис. 41. Структура миоглобина в области присоединения гема к полипептидной цепи

В процессе функционирования миоглобина образуются три физиологически значимые формы миоглобина: дезоксимиоглобин, оксимиоглобин и ферримиоглобин. Сравнение этих форм, отличающихся только в области гемового фрагмента, приведено в таблице 33.

Таблица 33

Формы миоглобина

Форма миоглобина	Степень окисления железа гема	Лиганд в пятом координационном положении Fe	Лиганд в шестом координационном положении Fe
Дезоксимиоглобин	+2	His F-8	отсутствует
Оксимиоглобин	+2	His F-8	O ₂
Ферримиоглобин	+3	His F-8	H ₂ O

Указанные формы миоглобина сходны между собой, за исключением характера лиганда в шестом координационном положении.

Следует отметить, что в процессе функционирования миоглобина осуществляется постоянный взаимный переход между окси- и дезоксимиоглобинами. Биологический смысл и механизм функционирования миоглобина состоит в том, что он служит в качестве «депо» кислорода для цитохром-с-оксидазы митохондрий — конечного звена ферментативной цепи тканевого дыхания.

Функционирование миоглобина связано с пространственной перестройкой гемовой области белка. Атом железа при оксигенировании придвигается к плоскости гема на ~ 0,2 Å, т. е. гем не является жесткой структурой.

Учитывая, что функционирование миоглобина связано лишь с гемовой областью, представляло интерес выяснить роль остальной части полипептидной цепи в функционировании белка.

Установлено, что гем, отделенный от остальной части протеида, способен присоединить кислород лишь на короткое время, быстро окисляясь до ферригема и заменяя кислород как лиганд на воду. Процесс окисления атома железа сопровождается промежуточным образованием сэндвичевого соединения, включающего O₂ (рисунок 42).

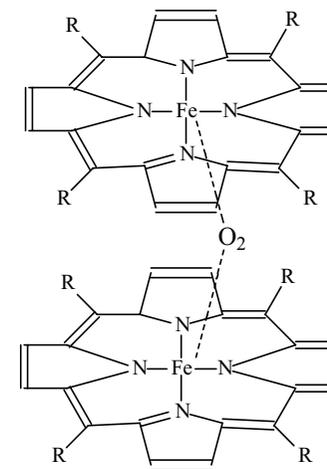


Рис. 42. Сэндвичевое соединение, промежуточно образующиеся при окислении гема

Гидрофобное окружение гема в гемовом кармане препятствует образованию такой промежуточной структуры и, следовательно, окислению атома железа.

Экспериментально это было подтверждено синтезом гемпроизводных с гидрофобными заместителями, «огороженных» железопорфиринов, имеющих нижеприведенное строение (рисунок 43).

Представленные структуры обладают таким же сродством к кислороду, как и миоглобин, и способны к обратимому его связыванию в течение длительного времени.

Кроме того, у гема, связанного с глобином, резко снижается сродство к CO — специфическому лиганду катиона Fe⁺², что влияет на функционирование белка в физиологических условиях, при которых имеет место эндогенная продукция оксида углерода.

Гемоглобин как представитель неферментных гемсодержащих белков

Гемоглобин — глобулярный белок, родственный миоглобину, имеющий четыре уровня структуры и состоящий из четырех субъединиц. Каждая субъединица состоит из простетической группы — гема и полипептидной цепи — глобина. Каждая из полипептидных цепей (субъединиц) обозначается буквами. В гемоглобине взрослого человека (HbA) эти цепи называются альфа (α) и бета (β).

Каждая молекула HbA содержит по две α- и β-цепи. Цепи различаются первичной структурой и длиной: α-цепи содержат 141 аминокислотный остаток, а β-цепи —

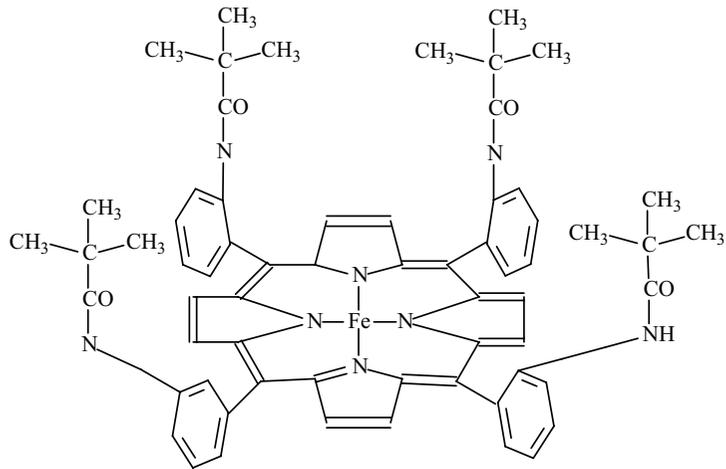


Рис. 43. Строение «огороженного» железопорфирина

146. Вторичные структуры цепей представлены α -спиральными участками различной длины, соединенными неспиральными участками.

В α -цепях семь спиральных сегментов, а в β -цепях — восемь.

Третичные структуры α - и β -цепей очень сходны и близки к структуре миоглобина. Внутри каждой субъединицы имеется гидрофобный «карман», в котором располагается гем.

Гем прочно удерживается в этом кармане благодаря 60 ван-дер-ваальсовым связям между неполярными участками гема и гидрофобными радикалами аминокислот.

Структура гема полностью аналогична простетической группе миоглобина. Присоединение гема к глобину осуществляется идентично миоглобину. Субъединицы располагаются в шахматном порядке, как было показано выше, на рисунке 25

В целом структура гемоглобина описывается формулой $\alpha_2\beta_2$.

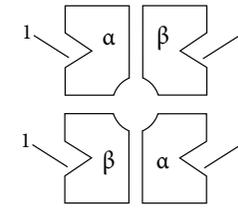
Разнородные субъединицы связаны множеством ван-дер-ваальсовых связей, а связи между субъединицами одного типа имеют ионный характер, но число их непостоянно и зависит от оксигенации белка.

Олигомерная структура из четырех субъединиц представляет собой глобулярный белок средних размеров ($M = 66000 - 68000$).

Молекула гемоглобина имеет почти правильную форму шара диаметром 55 Å. Четыре гема, каждый в своем «кармане», находятся на внешней поверхности олигомерного белка (рисунок 44).

При таком расположении субъединиц расстояние между двумя ближайшими атомами железа составляет 25 Å.

Основная функция гемоглобина состоит в переносе кислорода от легких к тканям. Гемоглобин находится внутри специализированной клетки — эритроцита. В каждом эритроците около 400 млн. молекул гемоглобина, каждая из которых способна связать четыре молекулы O_2 , т. е. по одной на субъединицу.



I — гемовый карман

Рис. 44. Расположение простетических групп в тетрамере гемоглобина

Как и в случае миоглобина, при оксигенации гемоглобина атом железа каждой субъединицы располагается в плоскости порфиринового кольца, а при потере кислорода выступает над плоскостью кольца.

В молекуле гемоглобина четыре гема работают согласованно. Такое поведение гемов называется кооперативным.

Труднее всего присоединяется первая молекула O_2 , а каждая последующая легче. Четвертая молекула кислорода присоединяется в 500 раз легче, чем первая.

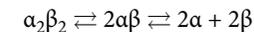
Полностью оксигенированная молекула гемоглобина изображается как $Hb(O_2)_4$.

Первая молекула O_2 соединяется с гемом α_1 -субъединицы. При этом две ионные связи между субъединицами $\alpha_1-\alpha_2$ из четырех, имеющих в дезоксигемоглобине, рвутся. Субъединицы становятся более подвижными, что облегчает присоединение второй молекулы кислорода к гему α_2 — субъединицы. Оставшиеся две $\alpha_1-\alpha_2$ ионные связи также разрываются, что дает возможность остальным гемам принять выгодное положение для присоединения кислорода. Третья молекула O_2 соединяется с β_1 — субъединицей. Одна из ионных $\beta_1-\beta_2$ -связей разрывается, облегчая доступ кислороду к последнему атому железа гема β_2 -субъединицы. При этом разрывается последняя ионная связь $\beta_1-\beta_2$.

Загруженный кислородом гемоглобин отдает его сначала с трудом, а затем все легче и легче. Такое кооперативное поведение гемов имеет физиологическое значение. Оксигемоглобин освобождается на 80% всего при четырехкратном перепаде парциального давления кислорода. Если бы гемы действовали автономно, то такая разгрузка потребовала бы 90-кратного перепада давления.

Ключевым элементом в передаче структурных изменений от гема одной субъединицы к другой служит боковая цепь проксимального гистидина, которую тянет за собой перемещающийся атом железа. Эти сдвиги передаются на области межсубъединичных контактов. Таким образом, изменение структуры внутри одной субъединицы при оксигенировании приводит к изменению структуры в области контактов субъединиц, то есть присоединение кислорода к одному гему передается на отдаленные от этого гема части молекулы.

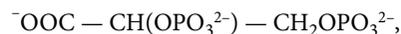
Подвижность субъединиц гемоглобина предполагает возможность диссоциации олигомерного белка, что имеет место в действительности



При диссоциации на димеры последние частично сохраняют способность связывать O_2 . Отдельные субъединицы утрачивают такую способность. Диссоциации

гемоглобина на субъединицы может рассматриваться как вариант денатурации олигомерного белка.

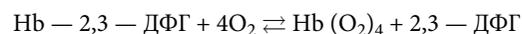
Гемоглобин, в отличие от миоглобина, является регуляторным белком. Внутри эритроцита присутствует низкомолекулярное соединение — 2,3-дифосфоглицерат (ДФГ)



ионизированное при физиологических pH. 2,3-Дифосфоглицерат имеет суммарный заряд -5 , способен проникать во внутреннюю полость олигомерного белка и соединяться с дезоксигемоглобином в эквивалентном соотношении, понижая сродство гемоглобина к кислороду.

Участок связывания 2,3-ДФГ дезоксигемоглобином образован положительно заряженными остатками, принадлежащими обоим β -цепям, а именно: протонированными остатками лизина и гистидина.

Связывание кислорода и 2,3-дифосфоглицерата — взаимоисключающие процессы. Схематично оксигенирование гемоглобина в присутствии 2,3-ДФГ можно записать



При оксигенации внутренняя полость гемоглобина сужается. При некоторых нарушениях обмена веществ в эритроцитах содержание 2, 3 -ДФГ изменяется, что сопровождается изменением сродства гемоглобина к кислороду.

Помимо транспорта O_2 , гемоглобин способен транспортировать H^+ и CO_2 . Большая часть CO_2 транспортируется в виде аниона гидрокарбоната, который присоединяется к полипептидным цепям дезоксигемоглобина.

Таким образом, присоединение CO_2 и протона к глобиновому фрагменту способствует отщеплению O_2 от гем-группы, и наоборот.

Способность гема взаимодействовать с различными лигандами приводит к существованию различных производных гемоглобина, называемых формами (таблица 34).

Таблица 34

Формы гемоглобина

Форма гемоглобина	Степень окисления железа	Лиганд в шестом координационном положении атома железа
Дезоксигемоглобин (восстановленный гемоглобин)	+2	отсутствует
Оксигемоглобин (окисленный гемоглобин)	+2	O_2
Карбоксигемоглобин	+2	CO
Метгемоглобин	+3	H_2O

Гемоглобины могут различаться и по строению белковой части. Такие разновидности гемоглобина называются типами. Различают физиологические и аномальные типы гемоглобинов.

Физиологические типы образуются на разных этапах нормального развития организма, а аномальные — вследствие нарушений последовательности аминокислот в глобине физиологических типов.

Так, у эмбриона человека на ранних стадиях развития синтезируется гемоглобин, состоящий из четырех ϵ -цепей — ϵ_4 , который последовательно заменяется на тетрамеры $\epsilon_2\alpha_2 \rightarrow \alpha_2\gamma_2$ и затем на нормальный гемоглобин взрослого человека $\alpha_2\beta_2$.

Обнаружено более ста аномальных гемоглобинов человека, и этот список постоянно пополняется. Эти гемоглобины различаются или составом полипептидных цепей, или, чаще, заменой аминокислот в отдельных цепях.

Например, существуют аномальные гемоглобины, содержащие четыре β -цепи (HbH) или четыре γ -цепи (гемоглобин Барта). Из аномальных гемоглобинов часто встречается серповидноклеточный гемоглобин (HbS). Этот тип гемоглобина обнаруживается у больных серповидноклеточной анемией и называется так потому, что эритроциты, содержащие HbS, принимают форму серпа. У этого гемоглобина в β -цепи глутаминовая кислота заменена на валин. Такие эритроциты имеют повышенную хрупкость, легко разрушаются. В крови больных серповидноклеточной анемией обнаруживается пониженное содержание гемоглобина: они страдают анемией. Серповидноклеточный гемоглобин имеет пониженную растворимость, агрегирует внутри эритроцита, в связи с чем клетка изменяет свою форму. Изменение первичной структуры гемоглобина детерминировано на генетическом уровне. У больных серповидноклеточной анемией выявлен специфический ген, названный геном серповидноклеточности.

Следует отметить, что все аномальные гемоглобины являются гомологичными белками.

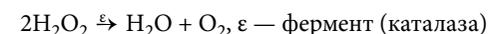
Тяжесть состояния больных — носителей мутантных гемоглобинов — определяется локализацией аминокислотных замен.

Наиболее тяжелые последствия имеют мутации в области гемового кармана, области присоединения гема к глобину, местах субъединичных контактов. Недавними исследованиями установлена полифункциональность гемоглобина. Кроме основной функции переносчика кислорода, гемоглобин обладает различными видами ферментативной активности. Гемоглобин способен окислять анилин, липиды, серо— и азотсодержащие гетероциклические соединения.

Ферментные гемопротеиды

Каталаза

Каталаза — фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, катализирует разложение пероксида водорода.



Она имеет в своем составе гем, идентичный таковому в миоглобине и гемоглобине. Именно гем является центральной частью активного центра данного фермента.

В соответствии с вышеизложенным неудивительно, что гемоглобин также обладает свойством разлагать пероксид водорода.

Каталаза широко распространена в природе, она обнаружена у животных, растений и микроорганизмов.

Железо в гем-группе фермента находится в степени окисления +3 и гем прочно связан с белковой частью молекулы.

Характер связи простетической группы с белком окончательно не установлен. Обсуждается вопрос о возможности взаимодействия карбоксильной группы остатка пропионовой кислоты боковой цепи гема с гуанидиновыми группами аргининовых остатков или азотом гистидина подобно тому, как это имеет место в миоглобине и гемоглобине.

В молекуле каталазы стабилизированным является окисленное состояние железа. Восстановление Fe^{+3} в Fe^{+2} возможно только при денатурации фермента.

Каталаза — крупный глобулярный белок ($M = 240\ 000 - 300\ 000$) с размером глобулы $70 \times 90 \times 120 \text{ \AA}$ в зависимости от источника выделения. Это белок четвертич-

ной структуры: в молекуле фермента 4 субъединицы, с каждой из которых соединена простетическая группа — гем. Помимо гем-групп, каталаза включает и другие небелковые фрагменты: 44 остатка нейтральных сахаров (манноза, галактоза), 19 остатков глюкозамина и 3 остатка галактозамина.

Углеводные фрагменты придают белку термическую устойчивость. Так, каталаза промышленного штамма *H. vitale* при десятиминутной экспозиции при 65 °С активность полностью сохраняет, при 75 °С инактивируется 50% фермента и только при 80 °С фермент полностью теряет свою активность.

Цитохромы

Цитохромы — группа гемсодержащих ферментов — оксидоредуктаз, переносящих электроны в дыхательной цепи митохондрий и микросом.

В настоящее время из различных видов живых организмов выделено большое число цитохромов.

Международная комиссия по классификации и номенклатуре ферментов разделила все известные цитохромы на четыре группы: *a*, *b*, *c*, *d*, различающиеся структурой гема.

Железо в составе гема цитохромов находится в степени окисления +3.

Одним из интереснейших цитохромов группы *c* является цитохром P-450, получивший свое название по максимуму поглощения в видимой области спектра. Строение гема данного фермента имеет вид (рисунок 45):

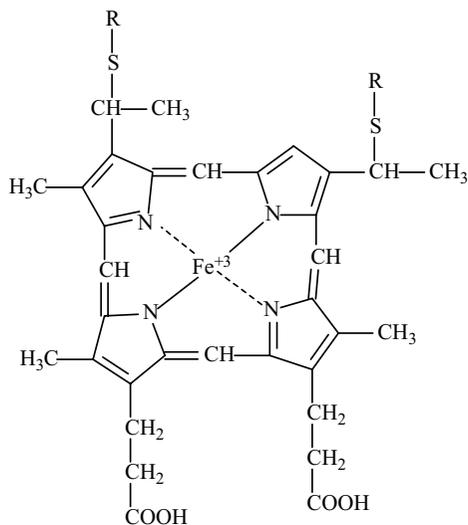


Рис. 45. Строение простетической группы цитохрома *c*

Цитохром *c* — некрупный белок. Молекулярная масса цитохрома *c*, выделенного из печени, составляет 49000, а из надпочечников — 55000.

Молекула цитохрома *c* содержит один гем. Белковые компоненты цитохромов представляют собой низкомолекулярные белки. Связь гема с белком у цитохрома P-450 осуществляется через атом серы остатка цистеина. Полипептидная цепь фермента содержит 6 цистеиновых фрагментов.

Пятым и шестым лигандами железа являются соответственно гистидин и сульфгидрильная группа.

В непосредственной близости от гема находится гидрофильный участок, участвующий в каталитическом процессе.

Цитохром P-450 — глобулярный белок, имеющий в основе вторичной структуры α-спираль с достаточно высоким уровнем спирализации.

Цитохром P-450 локализуется в мембранных структурах микросом клетки, а также прочно связан с мембранами эндоплазматического ретикулума в клетках печени, что затрудняет его выделение в чистом виде.

Важнейшая биологическая роль цитохрома P-450 состоит в окислении и обезвреживании многочисленных чужеродных для организма соединений, а также участие в синтезе стероидов.

Пероксидазы

Большая группа ферментных гемопротеидов представлена пероксидазами, которые широко распространены в царствах растений и бактерий. В тканях млекопитающих они встречаются реже. Обнаружены пероксидазы в эритроцитах, лейкоцитах и молоке.

Наиболее изученной пероксидазой, выделенной в кристаллическом виде, полностью охарактеризованной, является пероксидаза хрена.

Пероксидаза хрена — сложный белок, имеющий в своем составе гем-группу и углеводный фрагмент, аналогично каталазе. Основная масса пероксидазы хрена выделяется из корневища.

Данный гликопротеин имеет молекулярную массу 42 000. Пероксидаза, выделенная из хрена, представлена семейством из семи изоферментов. Пероксидаза хрена, как многие гликопротеины — термостабильный белок и полностью не утрачивает активности даже при кратковременном кипячении.

Активный центр фермента представлен гем-группой, которая находится в глубокой щели, выстланной гидрофобными радикалами аминокислот.

Присоединение гема к полипептидной цепи аналогично таковому для гемоглобина и осуществляется через гистидин.

Для пероксидазы хрена характерно субстратное ингибирование (скорость процесса падает при концентрациях субстрата, превышающих некоторое, критическое значение). Также фермент ингибируется под действием малых (~10⁻⁵ М) концентраций цианидов и азид-иона.

Пероксидаза хрена находит широкое применение в медицине и аналитической биохимии.

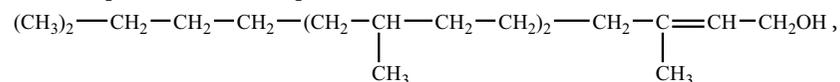
Хлорофилл

Хлорофилл представляет собой магнийсодержащую порфириновую структуру.

В растительных клетках наряду с ферментными гемпорфиринами (каталазой, цитохромами, пероксидазами) присутствует другая группа гемсодержащих надмолекулярных структур — магнийпорфириновые комплексы, включающие растительные белки и магнийпорфирины, называемые хлорофиллами, которые придают растениям зеленую окраску и участвуют в процессе фотосинтеза. У высших растений и зеленых водорослей существуют два вида хлорофилла: хлорофилл *a* и хлорофилл *b*.

Хлорофилл *a* включает порфириновое ядро, связанное двумя ковалентными и двумя координационными связями с центральным атомом магния. Молекула хлоро-

фила имеет длинный «хвост», представляющий собой остаток фитола — спирта, являющегося производным изопрена.



который содержит цепь из 20 атомов углерода. Наличие объемного углеводородного радикала придает всей структуре гидрофобные (липидоподобные) свойства.

Хлорофилл *a* найден у всех зеленых растений. Структура хлорофилла *a* представлена на рисунке 46.

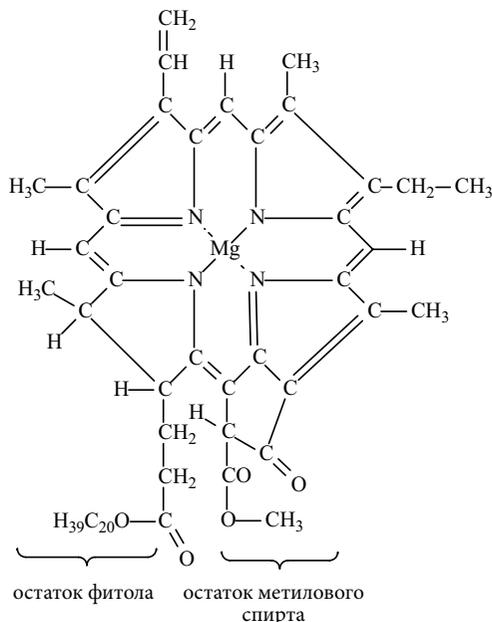


Рис. 46. Структура гема хлорофилла *a*

Другая разновидность хлорофилла — хлорофилл *b* имеет структуру, представленную на рисунке 47.

Хлорофиллы — светопоглощающие пигменты, утилизирующие кванты света с последующем использованием их энергии в биосинтезе органических веществ.

Спектры поглощения хлорофиллов *a* и *b* различны. Свет, который не поглощается в заметной степени хлорофиллом *a* (область 460 нм), улавливается хлорофиллом *b*, который обладает интенсивным поглощением именно при этой длине волны. Таким образом, два вида хлорофилла дополняют друг друга в поглощении солнечного света.

Некоторые бактерии, способные к усвоению углекислоты на свету (пурпурные бактерии), содержат не хлорофилл, а бактериохлорофилл, имеющий следующее строение (рисунок 48).

Простейшая фотосинтезирующая бактерия *Chlorobium* содержит целый набор различных хлорофиллов.

Содержание хлорофилла в растениях составляет в среднем 1% от сухого вещества. Он распределен в клетках растений неравномерно и находится лишь в особых ор-

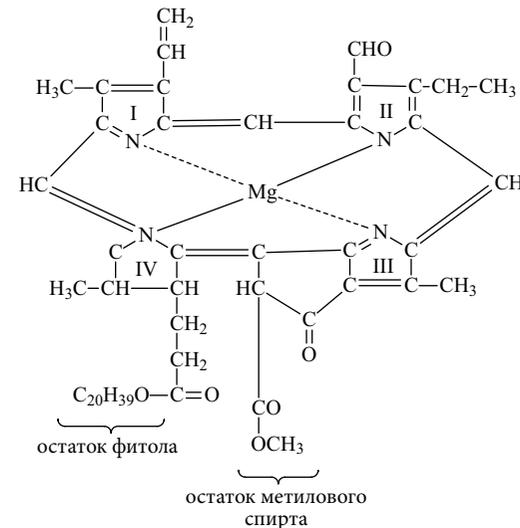


Рис. 47. Структура гема хлорофилла *b*

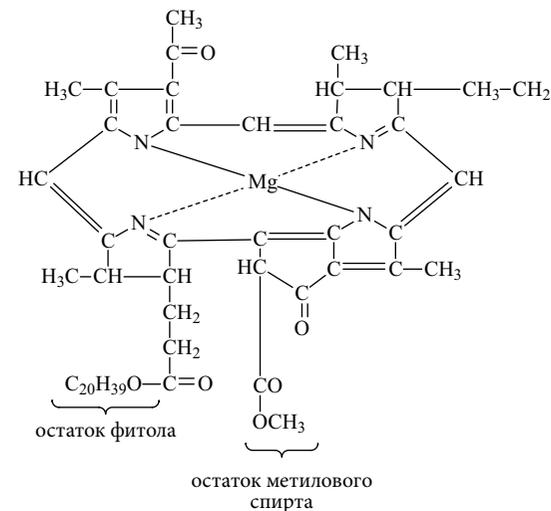


Рис. 48. Структура бактериохлорофилла

ганеллах клетки — хлоропластах, которые на 52% состоят из белка и на 48% — из липидной фракции, включающей хлорофиллы *a*, *b* и другие гидрофобные соединения.

Хлорофилл и другие фотосинтетические пигменты связаны с белками нековалентными связями.

Комплексы хлорофилла с белками составляют структурную основу осуществления фотосинтетического акта, участвуя в фотохимических окислительно-восстановительных реакциях. Хлорофилл — незаменимый пигмент, так как процесс фото-

синтеза, происходящий при участии хлорофилла, в настоящее время — главный источник органического вещества на Земле.

Как уже отмечалось, группа гемопротеидов чрезвычайно разнообразна. Белки данной группы могут содержать не только модифицированный гем, но и другие небелковые фрагменты. Так, белок четвертичной структуры — фермент миелопероксидаза — гликозилированный гемопротеид $M = 144000$. Миелопероксидаза — катионный белок, состоящий из двух ассоциированных димеров. Каждый димер имеет в своем составе легкую и тяжелую субъединицы. В миелопероксидазе имеются две гемовые группы, которые функционально идентичны. Недавно получено трехмерное рентгеноструктурное изображение кристалла миелопероксидазы человека с разрешением 1,8 Å. Оказалось, что гемы соединены с апопротеином двумя сложноэфирными связями и одной сульфоновой связью. Такой тройной тип связи гема является уникальным по сравнению с другими гемовыми белками. Связи придают порфириновому кольцу слегка изогнутую форму.

10.4.2.6.2. Флавопротеиды

Другой значительной группой хромопротеидов являются флавопротеиды, содержащие в качестве простетической группы производные рибофлавина — витамина B_2 .

Эта группа белков представлена флавинзависимыми оксидоредуктазами, у которых производные рибофлавина входят в состав активного центра. Среди наиболее интенсивно исследуемых на практике в настоящее время флавин-содержащих оксидоредуктаз следует отметить такие ферменты, как глюкозооксидаза, лактатоксидаза, ксантинооксидаза, цитохром- P_{450} -редуктаза и другие.

Флавинзависимые ферменты принимают участие в окислении жирных кислот, окислительном декарбоксилировании пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот, цикле трикарбоновых кислот. Также к флавиновым ферментам относят аминоксидазы — основные ферменты катаболизма биогенных аминов.

Простетическая группа этих белков может быть представлена как флавиномононуклеотидом (рисунок 49), так и флавинадениндинуклеотидом (рисунок 50).

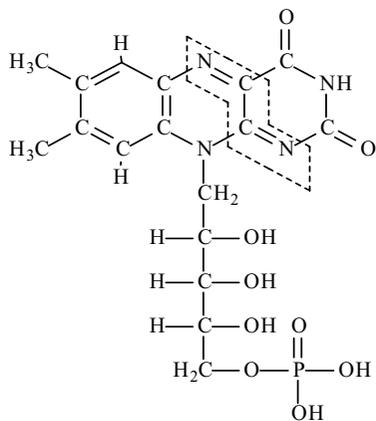


Рис. 49. Флавиномононуклеотид (ФМН)

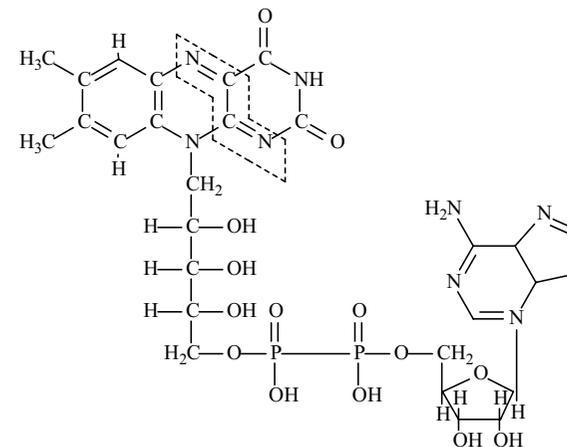


Рис. 50. Флавинадениндинуклеотид (ФАД)

При этом принцип функционирования простетической группы заключается в обратимом присоединении двух протонов и двух электронов в соответствии со следующей схемой (рисунок 51):

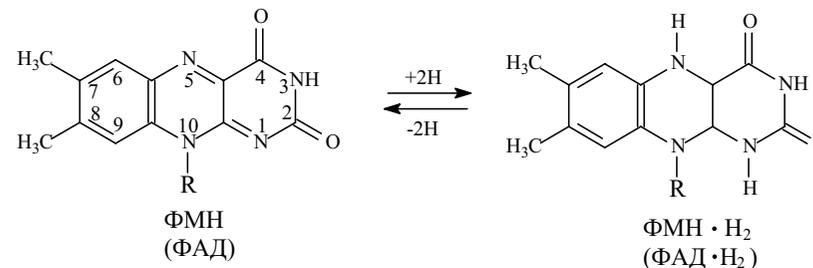


Рис. 51. Принцип функционирования простетической группы флавиновых ферментов

Таблица 35

Примеры флавинзависимых ферментов

Фермент	Катализируемая реакция
Дигидролипоилдегидрогеназа (в составе пируват ДГ и α -кетоглутарат ДГ комплексов)	<p style="text-align: center;">ФАД ФАДН₂</p> <p>(окисление дигидролипоевой кислоты)</p>

Фермент	Катализируемая реакция
Ацил-коэнзим А-дегидрогеназа (β-окисление жирных кислот)	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}\sim\text{SKoH} \xrightarrow[\text{ФАД} \rightarrow \text{ФАДН}_2]{\text{Фермент}} \text{R}-\text{CH}_2-\overset{\beta}{\text{C}}=\overset{\alpha}{\text{C}}-\text{CO}\sim\text{SKoH}$ <p>(дегидрирование ацилкоэнзима А)</p>
Оксидазы аминокислот	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \xrightarrow[\text{ФАД} \rightarrow \text{ФАДН}_2]{\text{Фермент}} \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{CH}=\text{NH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>(окисление аминогруппы в аминокислоте)</p>
Сукцинатдегидрогеназа (цикл Кребса)	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array} \xrightarrow[\text{ФАД} \rightarrow \text{ФАДН}_2]{\text{Фермент}} \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>(дегидрирование янтарной кислоты)</p>

Как уже отмечалось, одним из представителей флавопротеидов является сукцинатдегидрогеназа.

Сукцинатдегидрогеназа

Сукцинатдегидрогеназа — фермент, относящийся к группе флавопротеидов. Это белок четвертичной структуры. Сукцинатдегидрогеназа из сердца быка имеет молекулярную массу 17000 и содержит один остаток ковалентно связанного ФАД, который отщепляется только при обработке фермента трипсином. Помимо ФАД, в молекуле сукцинатдегидрогеназы имеются четыре атома негемового железа в степени окисления +2. Предполагается, что в сукцинатдегидрогеназной реакции атомы железа изменяют свою валентность



Кроме атомов железа белок включает лабильные атомы серы, функция которых не установлена.

Предполагается, что атомы железа и серы, взаимодействуя между собой и с субъединицами фермента, образуют железосеропротеид, который является промежуточным акцептором протонов и электронов, передавая их конечному акцептору — ФАД при действии фермента на субстрат.

Сукцинатдегидрогеназа прочно связана с мембраной митохондрий. Фермент как-бы «утоплен» своей гидрофобной частью в липидную часть мембраны, а активный центр фермента обращен в матрикс, где в растворенном виде находится сукцинат. Интересным фактором является сочетание как моно-, так и динуклеотидных фрагментов флавиновой группы в составе некоторых флавинзависимых ферментов, например белок четвертичной структуры — фермент NO-синтаза обнаруживает в

своем составе несколько кофакторов флавиновой группы: ФАД и ФМН. Кроме того, в составе данного фермента обнаружен гемовый фрагмент. Только их определенная, взаимная, пространственная организация обеспечивает каталитическую активность данного белка.

11. БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Весь спектр многообразных сложных функций выполняемых белками, принадлежащими к разным классам, предполагает их кооперативное функционирование. Исследование кооперативного действия белков является одним из наиболее быстро развивающихся направлений современной белковой химии.

В настоящее время неоспоримым является факт, что белок-белковые взаимодействия играют огромную роль в жизнедеятельности организмов любого уровня.

Межбелковые взаимодействия многообразны.

Каскадно-кооперативное действие белков — необходимое условие устойчивого функционирования клетки. Для обеспечения высокой эффективности обменных процессов белки, выполняющие каталитическую функцию, организованы в мультиферментные системы.

Молекулярные шапероны

Обнаружено огромное число особых низкомолекулярных белков — шаперонов, разделенных на классы по молекулярной массе: Hsp — 27, Hsp — 40, Hsp — 60, Hsp — 90, Hsp — 104, Hsp — 110, обладающих способностью оказывать влияние на конформацию различных белковых субстратов. Эти белки названы шаперонами.

Таким образом молекулярными шаперонами называют обширный класс белков, участвующих в сворачивании, сборке и внутримолекулярном транспорте различных компонентов. Молекулярные шапероны вовлечены в такие процессы как фолдинг — формирование высших уровней структуры, сборка и распад надмолекулярных белковых комплексов, транспорт белков через мембраны.

Несмотря на то, что в экспериментах *in vitro* надежно установлено, что информация о трехмерной структуре белка закодирована в его аминокислотной последовательности, сворачивание белков в клетке нельзя считать спонтанным процессом.

Для сворачивания многих белков необходимы вспомогательные факторы, в качестве которых выступают белки — помощники (молекулярные шапероны), многократно ускоряющие процесс сворачивания белка. То есть информации, закодированной в аминокислотной последовательности определенного белка может оказаться недостаточной для обеспечения его сворачивания в нативную конформацию.

В настоящее время доказана необходимость внешнего фактора для сворачивания бактериальных липаз.

Изучение механизмов действия белков-шаперонов открывает возможность влиять на заключительные стадии сворачивания, изменяя структуру шаперона.

Обращают внимание на молекулярные шапероны, которые связываются с белками до образования их третичной структуры и помогают в образовании нековалентных связей между полипептидными цепями, не являясь компонентом конечных более сложных конформационных ансамблей, обладающих биологической активностью.

Действие шаперонов основано на двух разных механизмах.

Первый механизм заключается в удержании полипептидной цепи в состоянии, способном к продуктивному сворачиванию, происходящему спонтанно после освобождения развернутых цепей в раствор после синтеза на рибосоме.

Второй механизм состоит в том, что крупные комплексы белков — помощников (шаперонов) создают физически изолированные компартменты, предназначенные для сворачивания полипептидов, инкапсулированных внутри центральной полости. Поскольку в полости может поместиться лишь одна молекула белка — субстрата, ее сворачивание происходит в условиях, имитирующих бесконечное разведение. Почти все клетки живых организмов должны контролировать процесс сворачивания белковых молекул.

Правильная третичная структура белка необходима для выполнения его функций, а неправильно свернутые или поврежденные белки могут представлять серьезную опасность для клетки.

Катепсины

Несмотря на чрезвычайно строгий молекулярный контроль формирования высших уровней структуры белковой молекулы не исключены ошибки в этом процессе.

В этом случае клетка должна избавиться от «неправильного» белка. В этом случае ошибки сворачивания исправляются с участием шаперонов и протеиназ — ферментов, гидролизующих такие белки. Процесс внутриклеточного гидролиза белка называют эндопротеолизом, а ферменты его осуществляющие — катепсинами.

Эндопротеолиз белков — универсальный механизм, вовлеченный во многие процессы жизнедеятельности клетки: клеточную смерть (некроз и апоптоз), регенеративные процессы, ответ клеток и организма на инфекции, онкологическую трансформацию и стрессовые факторы.

Процесс «исправления ошибок» осуществляется при кооперативном функционировании шаперонов и протеиназ. Молекулярные шапероны и протеиназы контролируют сворачивание, узнавая неправильно свернутые и поврежденные белки по наличию на их поверхности гидрофобных участков. Необратимо поврежденные белки расщепляются протеиназами.

Белки теплового шока

Различные воздействия (повышение температуры, введение экзогенных химических веществ), называемые стрессорными, влияют на конформацию белковых молекул и, следовательно, приводят к изменению их функций. Существуют специфические белки, выполняющие защитную функцию при таком стрессорном воздействии, получившие названия белков теплового шока.

В настоящее время изучение белков теплового шока осуществляется очень высокими темпами.

Белки теплового шока невелики: $M = 12000\text{--}43000$. Это семейство гомологичных белков. В их структуре обнаружен довольно большой гомологичный фрагмент — α -кристаллический домен, включающий 80–100 аминокислот.

Гомология белков теплового шока достаточно высока и составляет у млекопитающих до 60%, между бактериями и млекопитающими — 20%.

Установлено, что биосинтез белков теплового шока осуществляется при нарушениях функционирования других внутриклеточных белков.

Белки теплового шока (или точнее стрессовые белки) обнаруживаются в ответ на высокую температуру, пониженное содержание O_2 , действие токсических веществ, то есть при изменении условий функционирования ферментов, транспортных, сократительных и многих других белков.

Белки теплового шока необходимы для защиты клеток (прежде всего внутриклеточных белков) от температурного повреждения и нормализации функции клетки после прекращения теплового воздействия.

Цитокины

Белок-белковые взаимодействия лежат в основе клеточного взаимодействия. Выделено и охарактеризовано большое число особых белков-цитокинов, обеспечивающих взаимодействия между клетками.

Цитокины — большое и разнообразное семейство полипептидных регуляторов со сложными механизмами регуляции функций. Термин «цитокин» был введен для обозначения семьи полипептидных молекул и белков, участвующих в процессах межклеточных взаимодействий.

Цитокины влияют на взаимодействие непосредственно между клетками и регулируют процессы, имеющие место во внеклеточном окружении.

В качестве основного правила сортировки цитокинов предлагаются использовать особенности строения рецепторных систем, представленных специфическими белками, выполняющими рецепторную функцию.

Цитокины — группа белков, секретируемая лимфоцитами и моноцитами, участвующая в контроле клеточной пролиферации, дифференцировке, регуляции иммунного ответа, гемопоэзе и ответе на воспаление.

12. ФОЛДИНГ БЕЛКОВ

Как уже отмечалось, процесс формирования высших уровней структуры (сворачивание) получил название фолдинга. Это сложный, часто многостадийный процесс с участием специфических белков-помощников.

Для приобретения функциональной активности вновь синтезированная полипептидная цепь должна свернуться в уникальную пространственную структуру.

Вопрос о том как это осуществляется, представляет собой функциональную проблему биологии.

Нативные, функционально активные белки образуются посредством фолдинга новосинтезированных полипептидных цепей, в результате которого информация, содержащаяся в линейных полимерах аминокислот переходит в трехмерную структуру.

Существуют две концепции фолдинга:

- 1) котрансляционная (в процессе синтеза на рибосомах);
- 2) посттрансляционная (после синтеза на рибосомах).

Процесс активного сворачивания белка является энергозатратным и требует энергии АТФ.

Фолдинг белка — это процесс в котором происходит сближение соседних и удаленных друг от друга аминокислотных остатков полипептидной цепи, приводящее к формированию нативной структуры. Только свернутая полипептидная цепь проявляет функциональную активность.

Первые исследования фолдинга были проведены в 1920 г. Ансоном и Мирски.

Одной из моделей фолдинга является каркасная модель. Она предложена Птицыным. Фолдинг — процесс иерархический. Сначала формируются элементы вторичной структуры. Сегменты вторичной структуры объединяются и полипептидная

цепь становится компактной. Образовавшиеся элементы вторичной структуры создают каркас для формирования третичной структуры. Это означает, что белок достигает нативной структуры, избегая большого числа альтернативных состояний. Сворачивание происходит шаг за шагом, и таким образом что прохождение каждой стадии приводит к ускорению процесса. Главная идея — уровни структуры белка — вторичная, каркас свернутой формы — и третичная формируются последовательно.

Каркасную модель фолдинга дополняет идея гидрофобного коллапса, обеспечивающего фолдинг. Согласно этой идее основным типом взаимодействий, определяющих фолдинг белка, считаются гидрофобные взаимодействия в основе которых лежит сближение неполярных фрагментов, обеспечивающих уменьшение контакта с водой. То обстоятельство, что гидрофобные взаимодействия являются неспецифическими, делает возможным их более быстрое участие в фолдинге по сравнению с другими, более специфическими взаимодействиями.

Принципиальная схема фолдинга и участие белков-шаперонов в этом процессе представлено ниже. Шапероны, участвующие в процессе фолдинга, можно рассматривать как молекулярные машины, выполняющие работу по формированию архитектуры белковой молекулы. На рисунке 52 представлена схема сворачивания цитозольного белка с участием шаперонов *e. coli* GroEL и GroES.

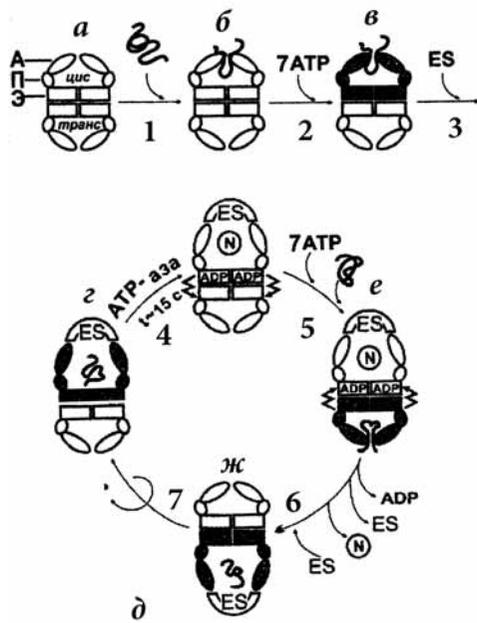


Рис. 52. Принципиальная схема фолдинга цитозольных белков *e. coli*

Первым в процесс вовлекается шаперон GroEL (а), построенный из 14 идентичных субъединиц и имеющий $M=580000$, организованный в два кольца, формирующих отдельные внутренние полости. Гидрофобные участки молекулы шаперона ориентированы внутрь колец и способны образовывать множественные контакты с ненативными структурами белка-субстрата. Вновь синтезированная полипептидная

цепь связывается с шапероном GroEL в дис-кольце за счет гидрофобных взаимодействий. К образовавшемуся комплексу (б) присоединяется 7 молекул АТФ иницируя важнейшую стадию цикла — образование закрытой полости с участием второго белка — шаперона GroES. Связывание АТФ и GroES на схеме для ясности изображено в две стадии. В действительности и АТФ и GroES присоединяются к комплексу одновременно образуя комплекс (г).

Если молекулярная масса белка не превышает 60000, то он инкапсулируется в полости дис-кольца и получает возможность начать сворачивание. Время инкапсулирования белка ограничено скоростью гидролиза АТФ (10–15 с при 25 °С). Гидролиз АТФ готовит систему к отщеплению GroES и сворачиванию белка-субстрата, который приобрел нативную конформацию (Н). Гидролиз АТФ передает сигнал на транс-кольцо подготавливая присоединение АТФ. Далее к транс-кольцу присоединяется 7 молекул АТФ с одновременным раскрытием дис-кольца и высвобождением GroES, АДФ и нативного белка. По окончании этого процесса начинается новый цикл сворачивания в транс-кольце: инкапсулируется новая молекула белка-субстрата и присоединяется GroES.

13. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРЕПАРАТИВНОЙ И АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ БЕЛКА

Так как белки присутствуют в живых системах любой сложности, то источниками белков для исследовательских целей могут служить различные ткани и биологические жидкости. Проблема выделения белка из различных объектов и вопросы его очистки достаточно сложны. Процесс получения индивидуального белка включает целый ряд этапов. Основные этапы получения индивидуального белка представлены в таблице 36.

13.1. Основные этапы выделения белка из биологического материала

В таблице 36 представлена примерная схема выделения и очистки белка

Таблица 36

Примерная схема выделения и очистки белка

Объект исследования	Признак, используемый для выделения и очистки белка	Приемы и методы	Цель операции и ее эффективность
Орган, ткань, клетка, гомогенат, органоиды клетки	Локализация белка во внутри- или внеклеточных структурах (структурный признак)	Обработка веществами, разделяющими межклеточные контакты (ферменты, комплексоны кальция). Механическое измельчение (гомогенизация), дифференциальное центрифугирование (разделение в центробежном поле)	Целевая подготовка биологического материала для извлечения нужного белка, что позволяет повысить эффективность выделения путем отбора материала с наибольшим содержанием белка (вне клетки он распределен равномерно, внутри клетки локализован преимущественно в одном из органоидов)

Объект исследования	Признак, используемый для выделения и очистки белка	Приемы и методы	Цель операции и ее эффективность
То же	Растворимость в воде, органических жидкостях, солевых растворах	Экстракция	Извлечение фракции биологического материала, содержащей интересующий белок. При этом частично происходит очистка выделяемого белка от других плохо экстрагируемых белков
Суммарные белки экстракта	Различия в размерах гидратных оболочек и зарядах белков. Различия в термостабильности белков. Различия в изоэлектрической точке белков	Высаливание Термофракционирование Кислотно-щелочная обработка (фракционирование)	Грубая очистка белка, позволяющая освободиться от основной массы сопутствующих (загрязняющих) белков
Частично очищенные белки	Неспособность проходить через полупроницаемые мембраны (высокая молекулярная масса) Неспособность проходить через поры (сетку) гранулированного геля	Диализ (электродиализ), ультрафильтрация Фильтрация через мелкопористые гранулированные гели	Освобождение от низкомолекулярных биологических примесей и веществ, использованных при грубой очистке (солей, кислот, щелочей, органических жидкостей), что необходимо для эффективной последующей очистки белка
Частично очищенные белки, освобожденные от низкомолекулярных примесей	Различия в кислотнo-основных свойствах белков. Различия в сродстве белков к неполярному адсорбенту. Различия в молекулярной массе белков. Специфичность связывания белков с лигандами.	Ионообменная хроматография Адсорбционная хроматография Гельхроматография (проникающая хроматография) Аффинная (лигандная) хроматография	Получение гомогенного белка

13.2. Некоторые методы очистки и фракционирования белков

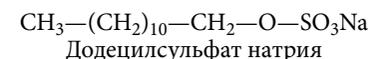
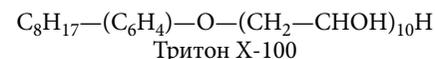
Предварительная подготовка биоматериала включает его гомогенизацию.

Гомогенизация — это процесс разрушения биологического объекта вплоть до разрушения клеточной структуры. При гомогенизации пресс-методом замороженный биоматериал пропускают через мельчайшие отверстия стального пресса под высоким давлением.

Достаточно эффективным методом, используемым на начальном этапе фракционирования белков, является экстракция. Экстракцию проводят из гомогенатов тканей. Большинство белков тканей хорошо растворимо в 8–10% растворах солей. При экстракции белков широко применяют различные буферные смеси с определенными значениями pH среды, органические растворители, а также неионные детергенты — вещества, нарушающие гидрофобные взаимодействия между белками и липидами и между белковыми молекулами.

Из органических соединений, помимо давно применяемых водных растворов глицерина, широко используют слабые растворы сахарозы. На растворимость белков при экстракции большое влияние оказывает pH среды, поэтому в белковой химии применяют фосфатные, цитратные, боратные буферные смеси со значениями pH от кислых до слабощелочных, которые способствуют как растворению, так и стабилизации белков. Особенно широкое распространение получили трис-буферные системы, представляющие собой смеси 0,2 М раствора трис-(оксиметил)-аминометана (НОСН₂)₃CNН₂ (сокращенно обозначают «трис») с 0,1 М раствором хлороводородной кислоты в разных соотношениях. Почти все органические растворители разрывают белок-липидные связи, способствуя лучшей экстракции белков.

Для извлечения белков из биологического материала применяют различные детергенты, способствующие расщеплению белок-липидных комплексов и разрыву белок-белковых связей. В частности, для освобождения белков (ферментов), прочно связанных с биомембранами митохондрий или других субклеточных структур, применяют тритон X-100, додецилсульфат натрия и дезоксихолат натрия.



Однако необходимо отметить, что детергенты, вызывая разрыв белок-белковых связей, разрушают четвертичную структуру белка.

Одна из возможных схем выделения белка из биологического материала приведена ниже (рисунки 53).

13.2.1. Диализ

Диализ — процесс первичной очистки белковых препаратов с целью удаления низкомолекулярных примесей, содержащихся в клеточном или тканевом экстракте.

Метод основан на невозможности крупных молекул белка проникать через ультрамикроскопические поры специального диализного материала (целлофан, коллоидная пленка).

Если тканевой экстракт поместить в специальный диализный мешочек, сделанный из такого материала и опустить данный мешочек в дистиллированную воду, то содержащиеся в экстракте малые молекулы, например соли, пройдут сквозь поры, а высокомолекулярные белки останутся в мешочке. Далее смесь высокомолекулярных соединений, оставшихся в диализном мешочке, можно подвергать дальнейшей обработке.

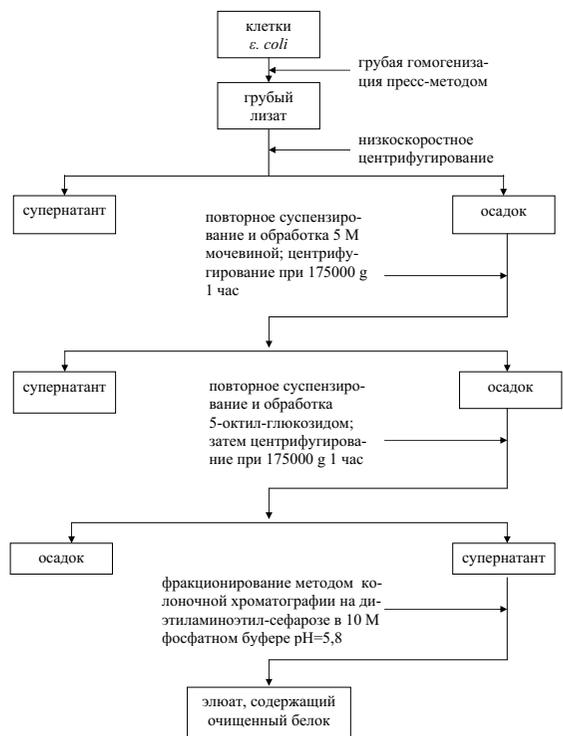


Рис. 53. Схема выделения белка из биологического материала

Высаливание

Для фракционирования белковых смесей, находящихся в растворе, широкое применение получили методы дробного осаждения, основанные на изменении растворимости белков в присутствии растворов солей.

Высаливанием называют осаждение белков с помощью нейтральных солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и др.

При фракционировании солями чаще всего используют сернокислый аммоний, позволяющий создавать высокую ионную силу раствора при низкой температуре.

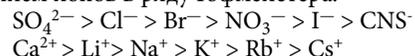
Высаливание обусловлено дегидратацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда.

Ионы растворимой соли конкурируют с гидрофильной молекулой белка за молекулы растворителя — воды, а также, ориентируясь в электрическом поле, создаваемом ионизированными фрагментами белковой молекулы, нейтрализуют поверхностный заряд белковой глобулы, что обеспечивает агрегацию молекул белка и выпадение его в осадок.

Для высаливания различных белков требуется неодинаковая концентрация одних и тех же солей.

Глобулины, имеющие большую молекулярную массу, высаливаются легче, чем альбумины. При этом глобулины осаждаются в полунасыщенном, а альбумины — в насыщенном растворе сернокислого аммония.

Хлорид натрия — более слабый высаливающий агент, чем сульфат аммония, вследствие меньшей дегидратирующей способности, которая характеризуется положением ионов в ряду Гофмейстера:



Хлористый натрий осаждает глобулины при полном насыщении раствора, а для осаждения альбуминов требуется еще и его подкисление. То есть высаливающее действие зависит не только от природы соли, но и от pH раствора а также и температуры. Высаливание белков — обратимый процесс, так как осадок белка может вновь раствориться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой.

При высаливании белки не теряют своих нативных свойств. Метод высаливания позволяет выделить белки из биологических жидкостей, экстрактов клеток и тканей для дальнейшей обработки, а также разделять белковые смеси на фракции.

Электрофоретические методы разделения белка

Метод основан на различной подвижности белков во внешнем электрическом поле. Молекулы белка обладают электрическим зарядом, величина и знак которого определяются аминокислотным составом белка, а подвижность белковой молекулы при заданном значении pH, ионной силе раствора и величине электрического тока зависит еще и от его молекулярной массы и формы молекулы.

Под влиянием внешнего электрического поля заряженные молекулы белка перемещаются в растворе к противоположно заряженному полюсу.

Скорость перемещения белковых частиц пропорциональна величине их заряда и обратно пропорциональна размеру частиц и степени их гидратации.

Широкое распространение в настоящее время получил так называемый «зональный электрофорез» — электрофорез на твердом носителе (на бумажных полосках, агаре, крахмале, акриламиде), пропитанном буферным раствором с нужным значением pH. Положение белков на бумаге или геле определяют путем фиксации и последующего окрашивания их тем или иным красителем. Количество белка в каждой фракции можно ориентировочно определять по интенсивности окраски связанного красителя. Такое определение не дает строгого количественного соотношения белковых фракций, так как количество красителя, связываемого различными белками, неодинаково. Для определения молекулярной массы белков используют электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия, который образует мицеллы с разделяемыми белками, нивелируя их заряд, в результате чего разделение происходит исключительно по молекулярной массе.

Часто в белковой химии используется электрофорез со свидетелем. В этом случае анализируемая смесь белков подвергается электрофорезу в условиях, идентичных использованным для смеси известных белков. Совпадение зон локализации белков

позволяет предположить, что в анализируемой смеси содержатся белки, идентичные тем, которые присутствуют в стандарте. В качестве электрофоретического стандарта используют плазму крови человека, а неизвестный белок характеризуют сопоставлением его положения на электрофореграмме с соответствующими зонами белков плазмы крови (альбумина, α_1 - и α_2 -глобулинов, β - и γ -глобулинов).

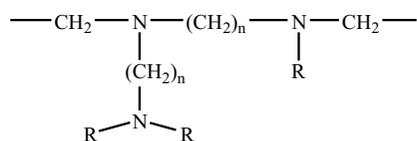
Как разновидность электрофоретического анализа белковых смесей используют метод изоэлектрического фокусирования.

Изоэлектрическое фокусирование белков

Изоэлектрическое фокусирование — один из вариантов электрофоретического разделения, принцип которого состоит в следующем: на колонку, вдоль которой сформирован градиент pH, наносят образец смеси белков и подключают ее концы к источнику тока.

Молекулы белка будут двигаться по колонке до тех пор, пока не достигнут той области, где величина pH окажется равной величине изоэлектрической точки белка.

Для создания градиента pH используются сложные смеси амфотерных соединений. Это соединения с $M = 400-800$ общей формулы:



$R = \text{---H; ---(CH}_2\text{)}_n\text{COOH; ---(CH}_2\text{)}_n\text{SO}_3\text{H; ---(CH}_2\text{)}_n\text{PO}_3\text{H}$, что обеспечивает вариацию pH в пределах $7,5 \leq \text{pH} \leq 11$ с интервалом $\leq 0,05$ единиц pH.

Смесь таких соединений помещают в колонку, один конец которой погружают в разбавленный раствор NaOH, куда опускают катод, а другой — в разбавленный раствор HCl, куда помещают анод, и подключают электроды к источнику постоянного тока.

Двигаясь по колонке, амфолиты распределяются в соответствии со своими изоэлектрическими точками, формируя буферные зоны. Таким образом создается устойчивый градиент pH.

При нанесении белка на такую колонку в процессе изоэлектрического фокусирования молекулы белка ведут себя так же, как и молекулы амфолитов. Вследствие этого после окончания процесса изоэлектрофокусирования белки концентрируются в виде очень узких зон, положение которых определяется изоэлектрической точкой белка.

Иммуноэлектрофорез

Еще более тонким способом разделения белков служит электрофорез в сочетании с иммунопреципитацией (иммуноэлектрофорез). Этот метод представляет собой комбинацию электрофоретического и иммунологического методов анализа белков. То есть электрофоретическое разделение белков сочетается со специфической серологической реакцией антиген-антитело. В буферную среду помещают анализируемую белковую смесь, например сыворотку, и соответствующую ей антисыворотку.

В этом случае с помощью серологической реакции преципитации достигается значительное повышение аналитической чувствительности электрофоретического метода.

В этом случае в электрофоретически разделенных белковых фракции появляются полосы мутности. При помощи этого метода было показано, что электрофоретически однородные белковые фракции могут состоять из нескольких белков, различающихся по иммунологическим свойствам. Так, направленное использование обычного и иммуноэлектрофореза позволило провести глубокое фракционирование белков плазмы крови человека (таблица 37).

Таблица 37

Белковые фракции плазмы крови человека

Белковая фракция		Мкмоль/л	М · 10 ⁻³	pI
Электрофоретическая	Иммуноэлектрофоретическая			
альбумины	Преальбумин	4,9	61	4,7
	альбумин	579,0	69	4,9
α_1 -глобулины	Кислый α_1 -гликопротеин	18,2	44	2,7
	α_1 -липопротеин (ЛПВП)	17,5	200	5,1
α_2 -глобулины	Церулоплазмин	1,9	160	4,4
	α_2 -макроглобулин	3,1	820	5,4
	α_2 -гаптоглобулин	11,8	8,5	4,1
β -глобулины	Трансферрин	33,3	90	5,8
	β -липопротеин (ЛПНП)	0,3–1,8	3000–20 000	—
γ -глобулины	Ig G	76,9	156	5,8
	Ig A	16,0	150	7,3
	Ig M	1,3	960	—
	Ig E	0,002	190	—

Хроматографическое разделение белков

По механизмам разделения компонентов хроматографию подразделяют на адсорбционную, осадочную, ионообменную, распределительную, гель-фильтрационную (гель-хроматографию) и биоспецифическую (аффинную).

По форме проведения хроматографию разделяют на колоночную, хроматографию на бумаге и в тонком слое. Для фракционирования белков применяют главным образом ионообменную, распределительную, аффинную и гельхроматографию на колонках.

Ионообменная хроматография используется для первичного фракционирования смесей белков и пептидов.

Для проведения процесса разделения колонка заполняется протоноактивным сорбентом, например полимером, содержащим группы — SO_3H , которые легко ионизируют, матрица колонки при этом приобретает отрицательный заряд и колонка проявляет высокое сродство к катионам (катионит). Далее на колонку наносится смесь белков, различающихся значениями pI. Катионные белки прочно связываются с гелем. Отрицательно заряженные белки и пептиды, напротив, будут свободно перемещаться между частицами сорбента, а нейтральные белки и пептиды займут нейтральное положение. Элюирование пептидов и белков осуществляется с использованием набора буферов с градиентом pH.

В качестве наполнителя колонки может использоваться не только катионит, а также и анионит, например, полимер, несущий группы — NH_2 или — NHR , которые при промывке колонки разбавленным раствором HCl преобразуются в форму — NH_3^+ или — RNH_2^+ . В этом случае при внесении смеси пептидов и белков на колонку,

наоборот, анионные белки прочно свяжутся с наполнителем, а катионные белки и пептиды будут в первую очередь удаляться с колонки.

Некоторые часто используемые материалы в ионообменной хроматографии представлены в таблице 38.

Таблица 38

Ионообменные материалы, используемые в хроматографии белков

Материал	Функциональные группы на колонке
Фосфоцеллюлоза (PC)	$-\text{PO}_3^-$
Карбоксиметилцеллюлоза (CMC)	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Диэтиламиноэтилцеллюлоза (DEAE)	$-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}^+ \begin{matrix} / \text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \backslash \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{matrix}$

При проведении ионообменной хроматографии для предотвращения агрегации белков и крупных пептидов в буферные растворы добавляют детергенты (мочевину, гуанидиний гидрохлорид, додецилсульфат натрия).

Эффективная сорбция белков происходит при значениях pH, отстоящих не менее чем на единицу от pI. В области $\text{pH} < \text{pI} - 1$ белки можно хроматографировать на катионитах, а в области $\text{pH} > \text{pI} + 1$ — на анионитах. Изменение pH в направлении pI способствует десорбции белков.

При ионообменной хроматографии смесь белков сорбируется в верхней части колонки, а затем вытесняется изменением pH элюирующего буферного раствора.

Схема проведения процедуры представлена на рисунке 54 на цветной вклейке.

Гель-хроматография (гель-фильтрация)

Гель-фильтрация — фракционирование смеси компонентов по размерам молекул путем их прохождения через гели с определенной величиной пор.

Раствор, содержащий смесь веществ, отличающихся по размеру молекул, вносят в колонку, заполненную гелем с сетчатой структурой и уравновешенную буферным раствором.

В качестве неподвижной фазы используют высокопрофильные декстраны с поперечными «сшивками» (сефадексы) или полиакриламидные гели (биогели). Они хорошо набухают в воде и после набухания действуют подобно молекулярному сити.

Существует более 20 типов сефадексов и более 30 типов биогелей, различающихся частотой поперечных швов и размером гранул.

Наибольшей скоростью продвижения по колонке обладают компоненты раствора, размеры молекул которых больше пор геля. Такие компоненты не проникают в гранулы гелевой фазы и выходят из колонки первыми. Более мелкие молекулы, способные проникать внутрь геля, непрерывно обмениваются между жидкими фазами внутри и вне геля и продвигаются по колонке значительно медленнее. Находящиеся в растворе самые маленькие частицы (например, неорганические соли) выходят из колонки последними. На этом принципе основаны методы фракционирования белков, их обессоливания, определения молекулярной массы.

Для обессоливания растворов белков и их концентрирования обычно используют сефадексы G-25 и G-50 (грубый или средний). При разделении смеси белков используют сефадексами тонкого или сверхтонкого зертнения. Чем мельче частицы геля,

тем эффективнее происходит разделение, но тем меньше скорость протекания раствора через колонку.

Схема процесса представлена на рисунке 55 на цветной вклейке.

Аффинная хроматография

Высокоспецифичным и высокоэффективным методом выделения и очистки белков является аффинная хроматография.

Аффинная хроматография представляет собой метод выделения вещества или группы веществ с использованием их сродства к какому-либо лиганду, причем это сродство отражает биологические функции исследуемого вещества.

При аффинной хроматографии выделение пептидов и белков осуществляется в результате специфического и обратимого связывания с сорбентом. Благодаря этому пептиды и белки можно концентрировать из большого объема, а также многократно использовать хроматографическую колонку.

Типичным при аффинной хроматографии является использование иммуносорбентов.

Например, для выделения пептидов, содержащих нитротирозин, с помощью аффинной хроматографии необходимо подготовить специфический сорбент.

Для этих целей получают специфические антитела путем иммунизации кроликов комплексом нитротирозин — белок с последующим выделением их сыворотки (антисыворотки).

Полученные антитела смешивают с носителем, получая иммуносорбент, который используют для выделения пептидов с остатком нитротирозина.

Примером аффинной хроматографии может также служить выделение пептидов с остатками цистеина на ртутьсодержащих адсорбентах благодаря образованию ковалентных связей с $-\text{SH}$ группами данной аминокислоты.

В современной препаративной биохимии аффинная хроматография с большим успехом используется для разделения гомологичных белков, например изоферментов. С помощью данного метода, например, были выделены изоферменты карбоангидразы.

Распределительная хроматография

В данном виде колоночной хроматографии используют пористые гели (сефадексы) и порошкообразную целлюлозу, являющиеся хорошими носителями высокополярной неподвижной фазы (как правило, воды). В отличие от адсорбционной хроматографии в данном методе твердая фаза служит только опорой (основой) для стационарной жидкой фазы.

В качестве подвижной фазы используют смеси органических растворителей, которые подбирают с помощью хроматографии на бумаге.

В качестве стационарной фазы при этом служит вода, адсорбированная целлюлозными цепями фильтровальной бумаги.

Образец помещают на одном конце бумажной полосы (на линии старта), этим же концом бумагу погружают в подходящую смесь органических растворителей (например, бутанол-уксусная кислота-вода в определенных соотношениях). При движении растворителя по бумаге, благодаря капиллярным силам, происходит разделение компонентов смеси. Хроматограмму высушивают, а местоположение каждого из разделяемых веществ (в виде пятна) определяют химическими или физическими методами.

Принцип проведения эксперимента представлен в виде схемы (рисунок 56 на цветной вклейке).

Каждое из веществ характеризуется величиной $Rf = \frac{l_1}{l_2}$,
где

l_1 — расстояние от линии старта до пятна соответствующего определяемому веществу.

l_2 — расстояние от линии старта до линии фронта растворителя.

Наиболее подходящими считают такие системы, в которых пептиды имеют разные значения Rf , но в области 0,5.

Подобранную таким образом смесь растворителей используют для проведения распределительной хроматографии на колонке. Помимо сефадексов и целлюлозы в колонках используют силикагели и влажный крахмал.

Разделяемый образец растворяют в подходящем растворителе, затем наносят на колонку.

Разделяемые вещества многократно распределяются между неподвижной (стационарной) фазой (водный слой) и движущейся органической фазой и с разной скоростью перемещаются по колонке. Собранные при помощи коллектора пробы содержат разделенные вещества.

Данный хроматографический метод оказался высокоэффективным при очистке пептидного гормона окситоцина, полученного методом химического синтеза.

Процесс выделения белка из биологического материала, его последующее фракционирование и очистка предполагают количественное определение белка в отдельных фракциях.

13.3. Методы количественного определения белка в биологическом материале

В настоящее время на практике используется несколько методов количественного определения белка

Биуретовый метод

Метод основан на образовании в щелочной среде окрашенного в фиолетовый цвет комплекса катиона Cu^{+2} с пептидными фрагментами белковой молекулы. Существуют две разновидности этого метода: при одной из них определяют от 2 до 10 мг белка в пробе, чувствительность другой (микрометод) — 0,1–2 мг.

Для определения белка биуретовым методом к 1 мл раствора, содержащего от 2 до 10 мг белка, добавляют 4 мл биуретового реактива. Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 30 минут, после чего определяют оптическую плотность ($\lambda = 540$ нм). Содержание белка в исследуемых растворах рассчитывают по калибровочному графику.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка (сывороточного альбумина) 10 мг в 1 мл.
2. Биуретовый реактив: 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (виннокислый натрий-калий, или сегнетова соль) растворяют в 50 мл H_2O , при энергичном перемешивании приливают туда 30 мл 10%-ного раствора NaOH (свободного от Na_2CO_3), добавляют 0,1 г KI и раствор доводят водой до 100 мл. Хранят в парафинированной или полиэтиленовой склянке.

Микроопределение

К 2 мл раствора, содержащего 0,1–2 мг белка, добавляют 2 мл 6%-ного раствора NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта. Раствор хорошо перемешивают и через 15 минут

определяют оптическую плотность ($\lambda = 330$ нм). Для определения концентрации белка пользуются калибровочным графиком.

Реактив Бенедикта: в 50 мл дистиллированной воды растворяют 17,2 г нитрата натрия, далее прибавляют 10 г карбоната натрия и нагревают полученную смесь на водяной бане (не доводя до кипения). Далее к полученному раствору добавляют раствор 1,73 г медного купороса в 10 мл дистиллированной воды и доводят объем смеси до 100 мл.

Метод Лоури

Метод основан на образовании окрашенных соединений ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи. Метод характеризуется высокой чувствительностью (10–100 мкг белка в пробе).

На развитие окраски влияет большое количество веществ: компоненты буферных систем (трисбуфер в концентрации 0,2 мМ, глицилглицин), восстановители (цистеин, в концентрации 0,01–0,4 мМ, аскорбиновая кислота), комплексоны (ЭДТА в концентрации 0,5 мМ), детергенты (тритон X-100 в концентрации 0,1–0,2 % вызывает выпадение осадка), сернокислый аммоний в концентрации 0,15 %, сахара в концентрации 10 % и другие.

В связи с этим при построении калибровочного графика для определения белка по Лоури в растворитель для стандартного белка необходимо включать все компоненты, содержащиеся в анализируемых пробах.

В некоторых случаях целесообразно предварительное осаждение белков из растворов, например трихлоруксусной кислотой, с последующим растворением их в щелочных растворах, или очистка белковых растворов от низкомолярных компонентов путем диализа или гель-фильтрации на сефадексе G-25.

Для определения белка по методу Лоури к 0,4 мл исследуемого раствора, содержащего 10–100 мкг белка, приливают 2,09 мл рабочего раствора (4), перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 минут. Затем добавляют 0,2 мл реактива Фолина, содержимое пробирки тщательно перемешивают и через 30 минут определяют оптическую плотность ($\lambda = 750$ нм). Для определения содержания белка пользуются калибровочным графиком.

В случае предварительного осаждения белка к исследуемому раствору добавляют Cl_3CCOON из такого расчета, чтобы ее концентрация была равна 3–4 %. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 10–20 минут. Выпавший осадок белка отделяют центрифугированием и промывают 2%-ным раствором Cl_3CCOON . К осадку добавляют 1–2 мл 1 н. раствора щелочи и осторожно подогревают до растворения осадка белка. Раствор белка количественно переносят в мерную колбу на 25–50 мл, доводят до метки, тщательно перемешивают и проводят определение белка.

Реактивы:

1. Стандартный раствор белка, содержащий 0,25 мг в 1 мл.
2. Na_2CO_3 — 2%-ный раствор в 1%-ном цитрате натрия.
3. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,5%-ный в 1%-ном цитрате натрия.
4. Рабочий раствор: 1 мл реактива 3 в день определения смешивают с 50 мл реактива 2.
5. **Реактив Фолина:** 10 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (перекристаллизованный) и 2,5 г $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ помещают в круглодонную колбу на 200–250 мл, приливают 70 мл воды и хорошо перемешивают. К полученному раствору добавляют 5 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты и 10 мл концентрированной HCl (х. ч.). Колбу присоединяют к обратному холодильнику (на шлифе), ставят на сетку и кипятят в течение 10 ч. Затем в раствор добавляют 15 г Li_2SO_4 , 5 мл

воды и одну каплю брома. Раствор перемешивают и нагревают для удаления брома. После охлаждения доводят водой до 100 мл, фильтруют и разводят водой с таким расчетом, чтобы получился 1 н. раствор кислоты (т. е. приблизительно вдвое). Кислотность определяют титрованием разведенного в 10 раз реактива 0,1 н. щелочью в присутствии фенолфталеина. Реактив может храниться в темной склянке длительное время.

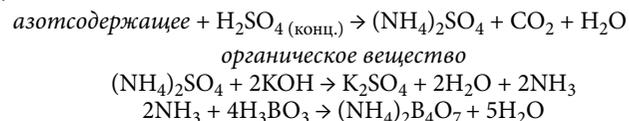
6. CCl_3COOH — 10%-ный раствор
7. NaOH — 1 н. раствор.

Определение белка по азоту. Метод Кьельдаля

Определение основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным $\approx 16\%$. По количеству экспериментально определенного азота рассчитывают количество белка в пробе.

Для определения общего азота органическое вещество подвергают минерализации под действием концентрированной серной кислоты, разлагая его до CO_2 и H_2O . Азот органического вещества при этом переходит в $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

После сжигания аммонийную соль разлагают щелочью, а выделившейся аммиак поглощают борной кислотой. Тетраборат аммония оттитровывают раствором соляной кислоты и рассчитывают количество азота в навеске, подвергаемой сжиганию, а затем и во всем препарате. Процессы, протекающие при обработке пробы, можно описать следующей схемой:

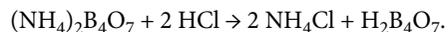


Для ускорения сжигания в пробу добавляют CuSO_4 как катализатор, а для повышения температуры сжигаемой смеси добавляют K_2SO_4 .

В случае растительного материала в опыт берут 0,3–0,5 г вещества, а животного — 0,1–0,2 г и помещают в колбу Кьельдаля, приливают 10 мл концентрированной H_2SO_4 , добавляют крупинку CuSO_4 и 5 г K_2SO_4 и проводят сжигание. Нагревание продолжают до исчезновения бурой окраски и еще 1–2 часа после просветления жидкости.

В колбу Кьельдаля, где проводилось сжигание, после полного охлаждения добавляют 20–30 мл воды и раствор количественно переносят в колбу Кьельдаля на 500 мл, ополаскивая колбу для сжигания 4–5 раз порциями воды по 20–25 мл и доводя общий объем раствора до ~ 150 мл. К полученному раствору прибавляют \sim двукратный объем 33 %-ного NaOH по отношению к взятой для сжигания кислоте и нагревают на сетке для отгонки аммиака. Выделяющийся газ пропускают через раствор борной кислоты. Конец отгонки определяют по pH отгона с помощью лакмусовой бумаги. По окончании отгона холодильник и алонж промывают дистиллированной водой, смешивая промывные воды с целевым раствором.

Аммиак, поглощенный борной кислотой, образует соль — тетраборат аммония, которая, как соль слабой кислоты, нацело оттитровывается соляной кислотой. По количеству затраченной на титрование соляной кислоты судят о количестве образовавшегося при сжигании аммиака. Для титрования пользуются 0,07 н раствором HCl :



Тогда 1 мл 0,07 М раствора HCl соответствует присутствию в анализируемом растворе (навеске исходного биоматериала) 1 мл N_2 . Таким образом, V мл HCl , по-

шедшей на титрование, соответствует \sim количеству мг N_2 в исходном биоматериале. Учитывая, что в белке $\sim 16\%$ азота, расчет количества азота в пробе проводят по формуле

$$\frac{V}{0,16} = V \cdot 6,25.$$

13.4. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ — современный высокоспецифичный метод определения отдельных фракций γ -глобулинов, имеющий важное диагностическое значение, так как он является одним из показателей функциональной полноценности В-лимфоцитов и всей системы регуляции гуморального иммунного ответа — синтеза антител.

Инструментом для определения количества иммуноглобулинов отдельных классов (IgA , IgG , IgM , IgE) являются специфические для каждого из этих классов антииммуноглобулиновые антитела.

В настоящее время предпочтительно использовать моноклональные антитела против отдельных антигенных детерминант (эпитопов) определяемых иммуноглобулинов.

Под эпитопом понимают характерный для отдельных классов иммуноглобулинов участок поверхности белковой глобулы, обеспечивающий узнавание и прочное связывание антитела.

Принципиальная схема анализа выглядит следующим образом (рисунок 57):



Рис. 57. Принципиальная схема иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ позволяет определить в любой биологической жидкости количество молекул, против которых приготовлены заранее моноклонные антитела и «проявляющая» антисыворотка, несущая в качестве метки фермент.

Схематично процесс можно изобразить следующим образом (см. рисунок 58 на цветной вклейке).

Высокая чувствительность и специфичность анализа определяются тем, что антисыворотка связывается с комплексом только в тех лунках, где со «своими» моноклональными антителами уже связались человеческие иммуноглобулины соответствующего класса.

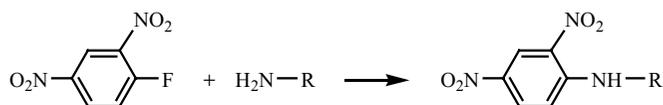
После добавления субстрата и проявителя наблюдается развитие окраски только в лунках, где произошло связывание меченой ферментом сыворотки.

13.5. Определение аминокислотной последовательности полипептидной цепи

В полных гидролизатах затем осуществляют определение отдельных аминокислот после их хроматографического разделения

Определение N-концевой аминокислоты Метод Сенгера

Для определения N-концевой аминокислоты используют реакцию с динитрофторбензолом



Далее белок подвергается полному гидролизу.

Аминокислоты, имеющие свободные $-\text{NH}_2$ -группы (аргинин и лизин), модифицируются по приведенной выше схеме. Далее методом экстракции удаляются производные аргинина и лизина, а оставшееся производное идентифицируется как N-концевая аминокислота.

Действие аминопептидазы

Для идентификации N-концевой аминокислоты производится обработка белка аминопептидазой.

При этом N-концевая аминокислота отщепляется и идентифицируется методом хроматографии на бумаге.

Ферментативная обработка должна быть непродолжительной, в противном случае фермент продолжает свое действие, отщепляя аминокислоты, следующие за N-концевой.

Определение C-концевой аминокислоты

Определение C-концевой аминокислоты довольно затруднительно. Обычно этот процесс осуществляется путем обработки белка карбоксипептидазой. Этот фермент отделяет аминокислоту с C-конца, после чего эту аминокислоту идентифицируют хроматографическими методами.

Определение аминокислотной последовательности полипептидной цепи

Это наиболее трудоемкая часть работы по установлению первичной структуры белка. Для решения данной проблемы пробу белка делят на несколько образцов, ко-

торые затем обрабатывают отдельно. Один образец, например, гидролизуют соляной кислотой на холоду, добываясь частичного гидролиза. Другой образец обрабатывают трипсином, третий — химотрипсином. Для каждого образца получают смесь пептидов различной длины. Пептиды фракционируют методами электрофореза или ионообменной хроматографии.

Для каждого из полипептидных фрагментов проводят обработку такого же характера, как для целого белка, с целью расшифровки первичной структуры каждого из них. Затем устанавливают порядок взаимного расположения пептидов в молекуле белка. Этого достигают путем сопоставления пептидов, полученных разными способами гидролиза, в которых аминокислотные последовательности частично перекрываются.

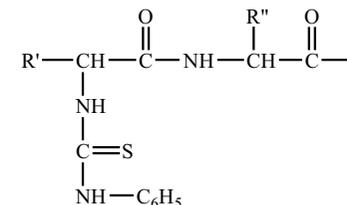
Широко распространенным методом определения аминокислотной последовательности белков является метод Эдмана.

Метод Эдмана

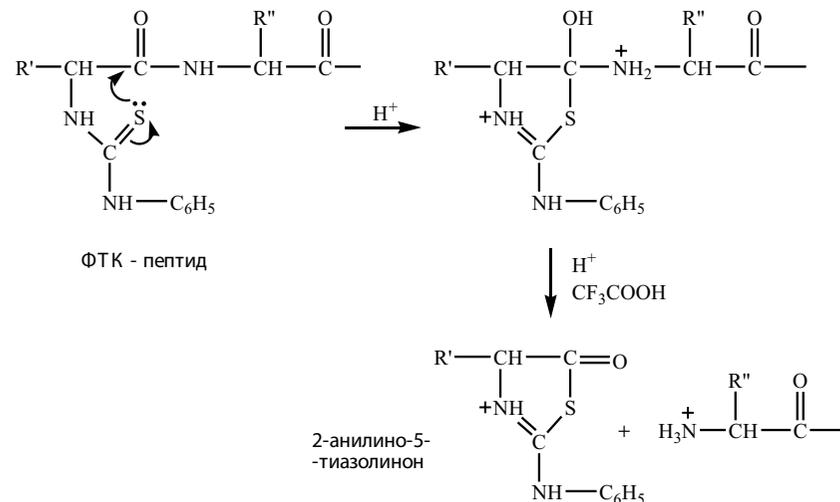
Метод Эдмана позволяет последовательно отщеплять N-концевые аминокислотные остатки в виде фенолтиогидантоинов (ФТГ).

Деградация полипептидной цепи осуществляется под действием фенилизотиоцианата (ФИТЦ) $\text{C}_6\text{H}_5-\text{N}=\text{C}=\text{S}$, который присоединяется по группе $-\text{NH}_2$ белка. Каждый цикл включает три стадии:

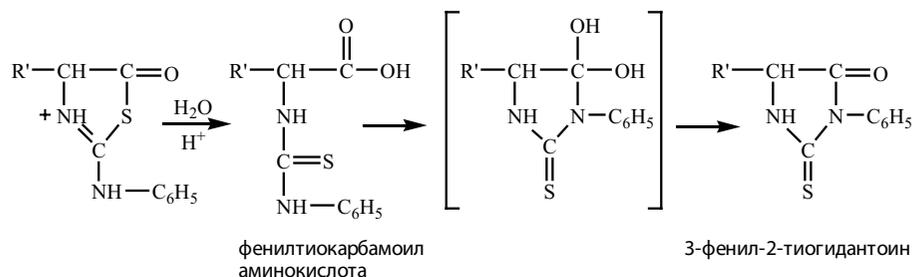
- 1) образование фенолтиокарбамоил (ФТК)-пептида



- 2) отщепление N-концевого остатка аминокислоты в форме анилинотиазолинона



3) изомеризация анилинотиазолинона в фенилтиогидантоин



с последующей идентификацией образующегося продукта.

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

Способ обнаружения ФТГ основан на сильном поглощении этих производных в УФ-области спектра ($\lambda_{\max} = 265\text{--}270$ нм, среднее значение молярного коэффициента экстинкции $\epsilon = 16000$). При использовании метода тонкослойной хроматографии для обнаружения ФТГ в состав сорбента на пластинках добавляется флуоресцентный индикатор.

Жидкостная и газожидкостная хроматография для идентификации ФТГ обычно используется в комбинации с автоматической деградацией пептидов на секвенаторе — приборе, который с высокой эффективностью осуществляет последовательное автоматическое отщепление N-концевых аминокислотных остатков по методу Эдмана.

В секвенаторе исключен контакт анализируемого образца белка с кислородом воздуха и стандартизованы условия проведения всех стадий реакции.

В секвенаторе проводятся только первые две стадии реакции Эдмана — присоединение и отщепление. Образовавшиеся в результате анилинотиазолиноны экстрагируются и собираются в коллекторе фракций.

Их превращение в ФТГ осуществляется вручную или с помощью автоматической приставки — конвектора.

Наилучшими объектами для жидкофазного секвенатора являются белки и пептиды, содержащие в своем составе от 60 до 200 аминокислотных остатков. Для них обычно удается определить последовательность 30 — 50 остатков. При исследовании более крупных белков в процессе деградации наблюдаются значительный гидролиз лабильных пептидных связей внутри полипептидных цепей.

13.6. Определение молекулярной массы белков

К наиболее распространенным физико-химическим методам определения молекулярной массы белков относятся гель-хроматография, а также электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Метод гель-хроматографии на колонках

Принцип метода основан на том, что для большого числа глобулярных белков имеется линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы и объемом элюирования с колонки, заполненной гелем с определенной величиной пор.

Для определения молекулярной массы глобулярного белка достаточно определить объем его элюции с предварительно откалиброванной колонки.

Калибровку колонки проводят, пропуская через нее белки с известной молекулярной массой и определяя объемы элюции для каждого из них. Объем элюции (V_e) — это объем элюата, собранного с момента внесения вещества на колонку до момента его элюции с колонки, включая фракцию с максимальным его содержанием.

Величиной, более стабильной, чем объем элюции (V_e), не зависящей от уровня геля в колонке, является величина K_{av}

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_e — объем элюции для данного вещества, V_0 — свободный объем колонки, V_t — общий объем колонки.

После определения свободного объема V_0 через колонку последовательно пропускают растворы соответствующих белков — «маркеров» (по 3–4 мг в объеме 0,5–1 мл). Белки удобно наносить последовательно в порядке уменьшения их молекулярной массы с интервалом, зависящим от размера колонки. Для колонки с параметрами $1,5 \times 50$ см он равен 20 мл (объем собираемого элюата между нанесением отдельных образцов составляет 20 мл). Во время нанесения белков колонку перекрывают. Элюат, вытекающий из колонки со скоростью 15–20 мл/ч, собирают небольшими порциями (1–3 мл).

Регистрацию объема элюата, прошедшего через колонку, начинают с момента нанесения образца на колонку. Содержание белка во фракциях определяют спектрофотометрически при 280 нм и строят профиль элюирования отдельных белковых фракций. Для этого вычерчивают график, на горизонтальной оси которого откладывают объем прошедшей через колонку жидкости, а на вертикальной оси — величины оптической плотности фракций.

Затем строят график зависимости отношения объема выхода белка к свободно-объему колонки V_e/V_0 или величины K_{av} от молекулярной массы белков.

После построения калибровочного графика на колонку наносят исследуемый белок и, определив объем элюции, находят по графику его молекулярную массу.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

Олигомерные белки, обработанные концентрированным раствором додецилсульфата натрия в присутствии β -меркаптоэтанола, распадаются на отдельные полипептидные цепи и приобретают отрицательный заряд, значительно превышающий собственный заряд белковой молекулы.

При последующем разделении с помощью электрофореза в полиакриламидном геле белковые зоны распределяются на электрофореграммах таким образом, что подвижность белковой зоны обратно пропорциональна логарифму молекулярной массы. Метод дает возможность определять молекулярные массы субъединиц олигомерных белков.

В качестве белков-маркеров используют следующие белки: фосфоорилазу (91000), бычий сывороточный альбумин (68000), яичный альбумин (42000), химотрипсиноген А (27000), ингибитор трипсина из сои (24000), РНК-азу (14000), цитохром *c* (12000).

В растворы опытных и стандартных белков, содержащие 2–5 мг/мл белка, добавляют 10 % додецилсульфат натрия (ДСН) до конечной концентрации 1 % и β -меркаптоэтанол (для предотвращения неспецифической агрегации полипептидных цепей) до конечной концентрации 1–5 %.

Образцы выдерживают 5 минут при 90°C. Если опытные или стандартные образцы находятся в растворах, содержащих ионы K⁺ или NH₄⁺, перед обработкой ДСН их нужно обессолить диализом или гель-фильтрацией, так как додецилсульфат калия и аммония плохо растворимы в воде.

После обработки ДСН к образцам добавляют сахарозу (до концентрации 10 %) и в качестве лидирующего красителя бромфеноловый синий (до концентрации 0,001 %).

Разделение проводят до тех пор, пока краситель не пройдет 4/5 всей длины геля. Обычно это занимает 4 — 6 часов. После этого электрофорез прекращают, вынимают гель и помещают его для фиксации в 70%-ный изопропанол на 0,5–1 час. Затем гель прокрашивают раствором кумасси К-250 в течение 2–3 часов. Избыток краски удаляют промыванием 10%-ным раствором CH₃COOH.

Определяют расстояние, пройденное каждым белком от стартовой линии. Определение можно проводить визуально или с помощью денситометра при 550–600 нм. Затем строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс длину пути, пройденного белком, а по оси ординат-логарифм его молекулярной массы. Определив длину пути, пройденного белком с неизвестной молекулярной массой, пользуясь калибровочным графиком, определяют молекулярную массу исследуемого белка.

14. ГИДРОЛИЗ БЕЛКА

Гидролиз — разрушение сложного вещества с участием воды.

Гидролиз белка — сложный поэтапный процесс расщепления белковой молекулы на α-аминокислоты. Существует несколько методов гидролиза, которые рассмотрены ниже.

В зависимости от применяемого катализатора различают щелочной, кислотный и ферментативный гидролиз.

При гидролизе простого белка конечными продуктами являются только аминокислоты.

В организме гидролиз белка постоянно протекает как в ходе пищеварения, так и в процессе жизнедеятельности клеток под действием протеолитических ферментов.

В лаборатории гидролиз — важный метод исследования белков. Анализ гидролизата позволяет установить, какие аминокислоты и в каком количестве входят в состав изучаемого белка.

Ферментативный гидролиз протекает в мягких условиях, с сохранением всех аминокислот, имеющих в составе белка, однако достаточно трудоемок, требует набора специфических протеолитических гидролаз. Помимо ферментативного используют химический гидролиз. Различают кислотный и щелочной гидролиз.

При кислотном гидролизе белка разрушаются некоторые аминокислоты: триптофан подвергается полному разрушению, а серин, треонин, цистеин, тирозин, фенилаланин — частично. Однако процент разрушения этих аминокислот невелик. Гидролиз осуществляют 6 н HCl при 110 °C в течение 24 часов в запаянной под вакуумом ампуле. Более кратковременный гидролиз может оказаться неполным, а при более длительном — высока вероятность разрушения части аминокислот. При использовании гидролиза для изучения первичной структуры белка обычно исследуемый белок подвергают как кислотному, так и щелочному гидролизу. Параллельное проведение щелочного гидролиза необходимо для обнаружения триптофана, кото-

рый при кислотном гидролизе полностью разрушается. Однако другие аминокислоты при щелочном гидролизе подвергаются более глубокой деструкции по сравнению с кислотным. Щелочной гидролиз осуществляется аналогично кислотному а для его проведения используется (2–4) М раствор NaOH.

Ферментативный гидролиз

Ферментативный гидролиз осуществляется с использованием набора протеаз через последовательное получение олигомерных фрагментов исследуемого белка.

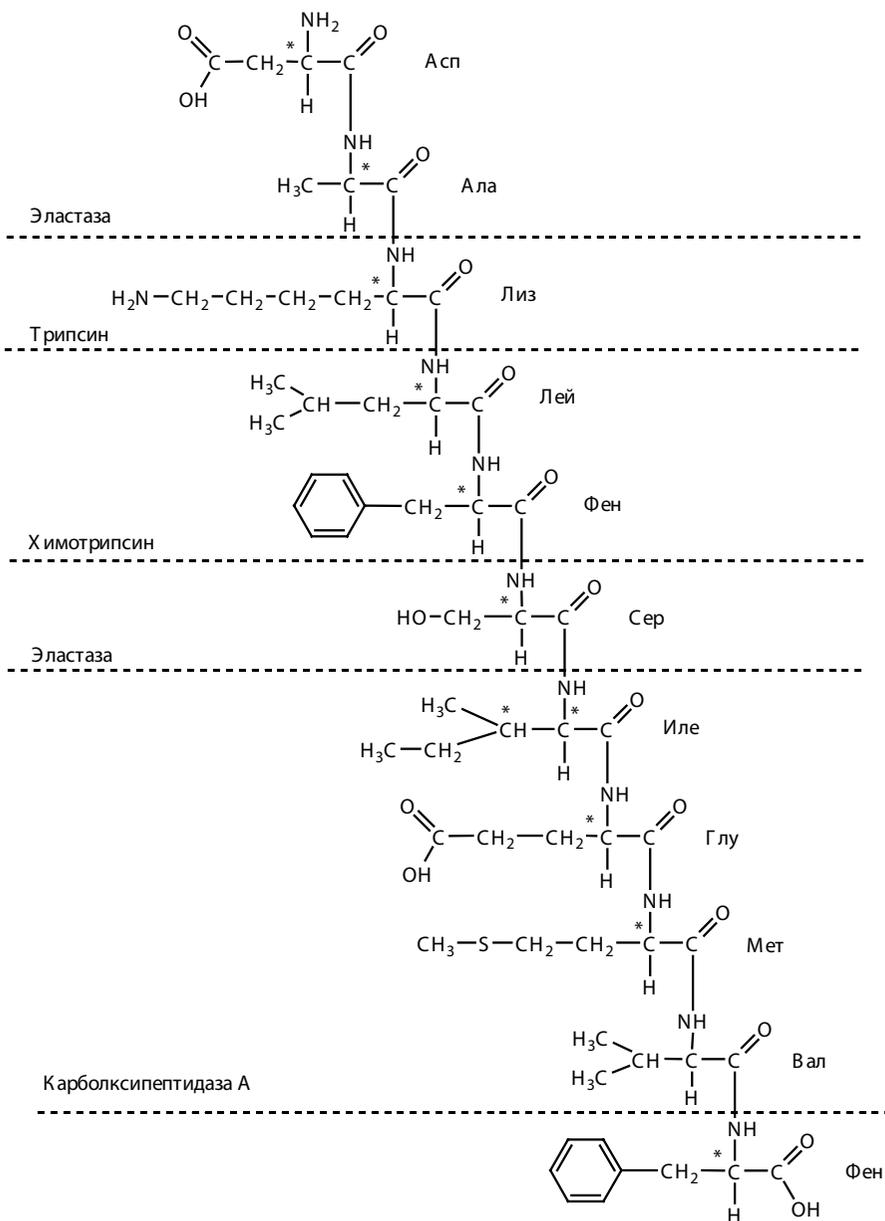
Последовательную обработку белка серией протеаз можно представить следующим образом (таблица 39).

Таблица 39

Схема последовательного гидролиза белка с использованием серии протеаз

Протеаза	Оптимальный pH	Расщепляемые связи	Примечание
Трипсин	7,0–9,0	Связи, образованные —COOH группами лизина и аргинина	Специфическая обработка ε—NH ₂ групп лизина (ацилирование) позволяет осуществить последовательное расщепление вначале только по остаткам аргинина, а затем после разделения пептидов и удаления защитных групп и по остаткам лизина
Лизин — специфичная протеаза из грибов <i>Armillaria mellea</i>		Расщепляет пептидные связи, образованные α—NH ₂ — лизина	
Клострипаин из <i>Clostridium histolyticum</i>		Расщепляет пептидные связи, образованные группами COOH аргинина	
Химотрипсин	7,8–9,0	Пептидные связи, образованные группами COOH ароматических аминокислот: тирозина, фенилаланина, триптофана	Со значительно меньшей скоростью гидролизуются связи, образованные группами COOH лейцина, метионина, гистидина
Протеаза из <i>Staphylococcus aureus</i>	Два оптимума: 4,0 и 7,8	Пептидные связи, образованные карбоксильными группами глутаминовой кислоты	Также разрушаются связи, образованные аспарагиновой кислотой
Термолизин из <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	7,0	Пептидные связи, образованные группами COOH изолейцина, лейцина, валина, фенилаланина, тирозина, триптофана	Сохраняет активность в течение 1 часа при 60 °C полностью и 50% — ную активность при 80 °C

В качестве дополнительных средств ферментативного гидролиза используется большой набор менее специфичных протеолитических ферментов (пепсин, эластаза, субтилизин, папаин, проназа и др.). Эти ферменты используются в основном при дополнительной фрагментации пептидов. Их субстратная специфичность определяется природой аминокислотных остатков, не только образующих гидролизующую связь, но и более удаленных по цепи. Специфичность действия протеаз может быть продемонстрирована следующей схемой (рисунок 59).



Ри. 59. Специфичность действия протеаз на полипептидную цепь

Для исчерпывающего ферментативного гидролиза необходимо, чтобы белковая глобула находилась в денатурированном состоянии, т. е. все пептидные связи должны быть максимально доступными для атаки ферментом. В белке же, находящемся в нативной конформации, как правило, гидролизу подвергается только ограниченное число связей, расположенных на поверхности белковой молекулы, что приводит к образованию небольшого числа фрагментов. Этот процесс известен под названием ограниченного протеолиза.

15. ПРИМЕНЕНИЕ РАСТВОРОВ АМИНОКИСЛОТ, БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ, А ТАКЖЕ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ В МЕДИЦИНЕ

Растворы аминокислот, гидролизаты белков, растворы белков и пептидов нашли широкое применение в медицинской практике.

Отдельные аминокислоты широко используются в терапии неврологических заболеваний.

Хорошо известно, что глутаминовая кислота — нейромедиатор в нервной системе. Установлены нарушения обмена глутамата при болезни Дауна, рассеянном склерозе, шизофрении, болезни Альцгеймера. На основе полученных данных глутаминовая кислота находит применение при заболеваниях ЦНС: эпилепсии, психозов, болезни Дауна, при снятии нейротоксических состояний.

γ -Аминомасляная кислота эффективна при сосудистых заболеваниях головного мозга (атеросклерозе, гипертонической болезни), хронической церебрально-сосудистой недостаточности с нарушением памяти, внимания, речи, при динамических нарушениях мозгового кровообращения.

В качестве медпрепаратов широко используются серосодержащие аминокислоты.

Метионин применяют для лечения и предупреждения заболеваний и токсических поражений печени мышьяковистыми препаратами, хлороформом, бензолом, а также при хроническом алкоголизме и диабете.

Введение метионина при атеросклерозе вызывает снижение в крови холестерина и повышение содержания фосфолипидов.

Цистеин используют для задержки развития катаракты, так как он участвует в обмене веществ хрусталика глаза.

Препараты гистидина предложены для лечения гепатитов, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Имеются также данные о благоприятном влиянии препарата на липопротеиновый обмен у больных атеросклерозом.

Белки используются для конструирования сложных многокомпонентных лекарственных средств, где они выполняют деполаризующую, транспортную роль и самостоятельную терапевтическую функцию. Создан противоопухолевый препарат на основе белка α -фетопротеина в комбинации с противоопухолевым антибиотиком доксорубицином.

Эксперименты последних лет показали, что природные пептидные препараты и синтетические регуляторные пептиды проявляют когенетическую активность, участвуя в активации хроматина и нормализуя ритм белкового синтеза в культуре тканей.

На основе выявленных свойств конструируются препараты нового поколения для коррекции иммунодефицитных состояний и лечения рака.

Не только расширяющееся непосредственное использование белковых соединений в медицине позволяет решать многие сложные вопросы лечения тяжелых заболеваний, но и изучение функций белков, особенностей их обмена при патологических состояниях позволяет конструировать новые эффективные лекарственные средства.

15.1. Короткие природные и синтетические пептиды как новые перспективные лекарственные средства

Современный период развития биомедицины ознаменован значительными достижениями в области создания лекарственных средств на основе природных эндогенных пептидов, а также в изучении их клинической эффективности и обосновании целесообразности применения в комплексной терапии различных заболеваний и патологических состояний. В связи с этим разработка новых синтетических пептидных биорегуляторов и изучение механизмов их действия представляется актуальной теоретической и практической задачей.

Активное изучение регуляторных пептидов привело к радикальному переосмыслению механизмов регуляции гомеостаза. Выяснилось, что во многих случаях воздействие на физиологические процессы оказывают не целые молекулы, а их небольшие фрагменты — олигопептиды. Это обстоятельство позволило сделать заключение о том, что регуляция и координация функций организма могут осуществляться за счет ключевых фрагментов полипептидов, отщепляющихся от достаточно длинных молекул в соответствии с потребностями организма. Эти фрагменты обладают определенной направленностью действия, специфичностью и адекватной активностью. Такой тип регуляции назвали процессинговой. Ей свойственна высокая гибкость, позволяющая путем активации соответствующих пептидаз (ферментов, гидролизующих пептидные связи) быстро формировать в нужном месте и в нужное время короткие регуляторные молекулы из их более длинных и инерционных предшественников. Это обуславливает высокую эффективность процессинговой регуляции.

Получение коротких пептидов путем направленного химического синтеза на основе аминокислотного анализа комплексных препаратов (цитомединов) тимуса и эпифиза, и разработка методов коррекции гомеостаза с помощью этих средств, представляют собой попытку моделирования процессинговой регуляции. К настоящему времени синтезировано много коротких пептидов, наиболее изученными из которых являются тимоген, вилон и эпиталон.

Тимоген — синтетический дипептид Glu-Trp, представляющий собой аналог вещества, выделенного из тимуса методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обнаружена способность тимогена ингибировать спонтанный и индуцированный радионуклидами канцерогенез, а также оказывать геропротекторный эффект.

Тимоген способствует повышению резистентности организма к микробным и грибковым инфекциям путем стимуляции функциональной активности лимфоцитов и нейтрофилов.

Выявлены противовоспалительная и антигистаминная активность тимогена. Тимоген нашел широкое применение в клинической практике при лечении острой и хронической пневмонии, абсцессе легкого, гнойном плеврите, эмфиземе легких, диффузном пневмосклерозе. Тимоген эффективен в лечении больных с врожденными и приобретенными пороками сердца, ишемической болезнью сердца. Успешно применяют тимоген для лечения больных с дегенеративными заболеваниями органов зрения, больных хроническим простатитом.

Вилон — дипептид Lys-Glu, полученный путем направленного химического синтеза на основе анализа аминокислотного состава комплексного препарата тиму-

са — тималина. Аналогично тимогену препарат стимулирует клеточные механизмы усиления иммунитета, включает активацию Т-лимфоцитов. Он усиливает экспрессию рецепторов на Т и В лимфоцитах, а также стимулирует выработку интерферонов и интерлейкинов. В экспериментах на животных вилон стимулировал репаративные процессы в органах и тканях при облучении. Обнаружено стимулирующее действие вилона на процессы регенерации поврежденной печени, а также выраженное репаративное действие при лечении животных с интенсивными инфекционными посттравматическими осложнениями. Вилон снижает частоту новообразований, повышает выносливость животных. Под действием препарата увеличивается масса тела, снижается двигательная активность и температура. Последнее связано с замедлением метаболических процессов, что увеличивает продолжительность жизни животных.

Эпиталон разработан на основе эпиталамина. Эпиталон — тетрапептид Ala-Glu-Asp-Gly. Эпиталон снижает двигательную активность, подавляет перекисные процессы в головном мозге и печени, угнетает развитие спонтанных новообразований.

В качестве перспективных лекарственных препаратов рассматриваются короткие пептиды, выделенные из спинного мозга свиньи — нейрокинины:

Нейрокинин А:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
His - Lys - Thr - Asp - Ser - Phe - Val - Gly - Leu - Met - NH₂

оказывает воздействие на гладкую мускулатуру сосудов, вызывая приток крови.

Нейрокинин В:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Asp - Met - His - Asp - Phe - Phe - Val - Gly - Leu - Met - NH₂

Нейрокины А и В контролируют перистальтику кишечника. Таким образом, быстрыми темпами расширяются как арсенал лекарственных средств пептидной природы, так и область их применения.

15.2. Препараты гидролизатов белков

Эти препараты представляют собой смеси аминокислот, полученных путем кислотного или ферментативного гидролиза белков, и используются для парентерального (внутривенного) питания.

К ним относятся гидролизин, гидролизат казеина, аминокептид, церебролизин, аминокровин, фибриносол.

Эти препараты компенсируют белковое голодание организма, обеспечивают азотистое равновесие у больных после операций на желудочно-кишечном тракте, с нарушениями переваривания белков и всасывания аминокислот, при тяжелых ожогах. Препарат церебролизин представляет собой освобожденный от белка гидролизат мозгового вещества и содержит 18 аминокислот; 1 мл водного раствора препарата соответствует по содержанию аминокислот 1 г свежей мозговой ткани.

Препарат применяют при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями функций центральной нервной системы: после травм мозга и операций на головном мозге, после перенесенных кровоизлияний или воспалительных процессов, как вспомогательное средство в наркологии.

15.3. Растворы белков

Растворы белков также активно используются в качестве лекарственных средств.

Цитохром с успешно применяется для лечения дистрофических изменений миокарда.

Активно развивается терапия с использованием иммуноглобулина человека. Новым перспективным направлением в исследованиях белковых растворов в медицинской практике является разработка препаратов для внутривенного введения, среди которых прежде всего необходимо отметить разработку препаратов иммуноглобулинов. Препараты иммуноглобулина человека для внутривенного введения являются иммуноглобулинами класса IgG, выделенными из плазмы крови человека. За рубежом выпускается свыше 30 препаратов на основе IgG, которые активно используются как в терапевтической, так и педиатрической практике.

Препараты иммуноглобулина обладают неспецифической активностью, проявляющейся в повышении резистентности организма путем усиления фагоцитарной активности лейкоцитов.

Препараты иммуноглобулина содержат различные противовирусные, антибактериальные, антитоксические антитела, обладают не только заместительным, но и иммуномодулирующим действием.

Показана высокая эффективность препаратов иммуноглобулина как у детей, так и взрослых при:

- 1) посттравматическом шоке для коррекции выраженной иммунной депрессии;
- 2) у онкогематологических больных для профилактики инфекционных осложнений;
- 3) для лечения инфекционных осложнений у больных с острыми лейкозами;
- 4) для лечения тяжелых форм острой пневмонии с выраженными признаками угнетения системы иммунитета;
- 5) при гнойных менингитах;
- 6) при тяжелых вирусных и бактериальных инфекциях: улучшает состояние больных с бактериальными инфекциями при лечении антибиотиками;

В педиатрической практике иммуноглобулин используется для профилактики и лечения септических заболеваний недоношенных детей, профилактики тяжелых бактериальных инфекций у детей, инфицированных ВИЧ.

Также в педиатрической практике применение препаратов иммуноглобулина позволяет улучшить прогноз для плода и новорожденного при внутриутробных инфекциях, снизить частоту развития раннего сепсиса и пневмонии.

В последнее время препараты иммуноглобулина для внутривенного введения находят широкое применение в арсенале детоксицирующих средств.

Помимо препаратов иммуноглобулинов с широкими иммуномодулирующими свойствами, разработаны препараты иммуноглобулинов узконаправленного действия.

Так, разработан противодифтерийный иммуноглобулин человека, представляющий собой иммунологически активную фракцию белка IgG, выделенную из плазмы крови доноров, иммунизированных в плановом порядке дифтерийным анатоксином.

При клещевом энцефалите иммуноглобулины служат почти единственным лечебным средством и являются наилучшими препаратами.

Препарат иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита для внутривенного введения является иммунологически активной фракцией человеческой сыворотки, содержащей антитела к вирусу клещевого энцефалита.

Область применения иммуноглобулинов в медицинской практике в настоящее время постепенно расширяется. Иммуноглобулины находят применение как в качестве профилактических, так и лечебных средств.

Также традиционной областью использования растворов белков и их неполных гидролизатов является их применение как препаратов для парентерального питания при тяжелых формах дистрофии, ожоговой и лучевой болезни.

16. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ МОДИФИКАЦИИ И ДЕСТРУКЦИИ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ

Разрушение сложной архитектуры белковой молекулы и, как следствие, утрата нативных свойств, характеризуется как денатурация и рассматривается в разделе 8.

Разрушение первичной структуры — расщепление на пептиды и элементарные структурные блоки — аминокислоты (гидролиз) — традиционный путь разрушения белка, который рассмотрен в разделе ???

Разрушение сложных белков может включать отщепление небелковой части, что также приводит к утрате нативных свойств белка, например разрушение липопротеидных комплексов при многократном замораживании — оттаивании белковых растворов.

Диссоциация олигомерных белков на субъединицы также может рассматриваться как вариант денатурации, и подробно рассмотрена в разделе ??? Известно множество вариантов модификации белков, которая приводит к изменению их физико-химических свойств, конфигурации, стабильности, ферментативной активности и многих других параметров.

Кроме того, сложные белки могут вовлекаться в различные процессы, в результате которых имеет место химическая модификация их простетических групп.

Такие процессы хорошо изучены на примере гемоглобина: например, окисление железа гема и превращение его в «не дышащую» форму — метгемоглобин, а также связывание железом гема угарного газа с образованием карбоксигемоглобина, также неспособного переносить кислород.

Кроме того, в условиях аэробного существования живых организмов важным направлением модификации белковых структур является пероксидное повреждение полипептидной цепи, приводящее как к агрегации, так и фрагментации белковых молекул.

16.1. Некоторые реакции модификации простетических групп сложных белков на примере гемоглобина

Атом железа в степени окисления +2, входящий в состав гема, достаточно высокореакционноспособен: может вступать в окислительно-восстановительные и координационные взаимодействия.

Ион железа Fe^{+2} в составе гема окисгенированного миоглобина хорошо окисляется ионами меди Cu^{+2} .

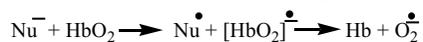
Известен многочисленный список соединений, способных окислять железо гема до степени окисления +3, переводя гемоглобин в метгемоглобин, неспособный переносить кислород.

В списке метгемоглобинообразователей можно найти соли азотистой кислоты, нитросоединения ароматического и алифатического рядов, амины, гидроксилламин и его производные, металлы переменной валентности, гидропероксидазы и другие органические и неорганические соединения.

В связи со столь широким набором метгемоглобинообразователей встал вопрос о выяснении основных путей окисления железа гема под воздействием соединений различных классов.

Было показано, что метгемоглобинообразователи можно разбить на два больших класса, осуществляющих окисление гема по двум принципиально отличным механизмам.

К первому классу относятся нуклеофильные реагенты, способные к одноэлектронному восстановлению оксигенированной формы гемоглобина с последующим распадом образовавшегося метастабильного анион-радикала:



и реализацией цепного процесса окисления гема, в который вовлечены промежуточно образующиеся активные формы кислорода (O_2^\bullet , HO_2^\bullet , OH^\bullet , H_2O_2).

Второй механизм реализуется для электронодефицитных соединений, неспособных к одноэлектронному восстановлению оксигемоглобина. В этом случае имеет место процесс отрыва электрона от железа гема деоксигенированного белка с непосредственным образованием метгемоглобина в первичном акте.

Данный процесс является обычным нецепным бимолекулярным взаимодействием. Скорость его протекания коррелирует с величиной сродства к электрону метгемоглобинообразователя.

Процесс метгемоглобинообразования под действием доноров электрона может развиваться как по цепному механизму, осложненному вырожденным разветвлением цепей, а также как неразветвленный цепной процесс.

Примером цепного процесса метгемоглобинообразования, осложненного вырожденным разветвлением цепей, является окисление железа гема под действием нитрит-иона.

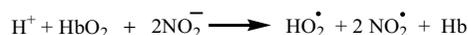
Примером неразветвленного цепного процесса метгемоглобинообразования может служить процесс аутоокисления железа гема.

Вырожденно-разветвленная реакция метгемоглобинообразования под действием нитрита натрия

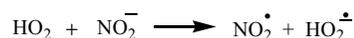
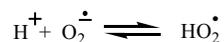
Реакция оксигемоглобина с нитрит-ионом — классический пример цепной реакции с вырожденным разветвлением и квадратичным обрывом цепей.

Стадия зарождения цепей представляет собой одноэлектронное окисление нитрит-иона молекулой оксигенированного белка.

Схема грунто-процесса генерации первичного радикала имеет вид



В действительности зарождение первичного радикала, ведущего в дальнейшем цепь, осуществляется в нескольких последовательных реакциях



При этом источником протона является либо водная реакционная среда, либо протоногенные группы глобина.

Параллельная генерация радикалов NO_2^\bullet и HO_2^\bullet при взаимодействии HbO_2 с нитрит-ионом, связана с переносом электрона от нитрит-иона на молекулу оксигени-

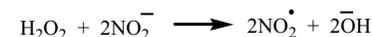
нированного белка с последующим распадом образовавшегося ион-радикала оксигемоглобина, катализируемого протоном.

Хотя в условиях эксперимента протонлитическое равновесие

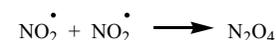


сдвинуто влево ($\text{pKa} = 4,88$), предпочтительным является взаимодействие нитрит-иона с гидропероксидным радикалом ввиду его значительно более высокой реакционной способности по сравнению с супероксидным анион-радикалом.

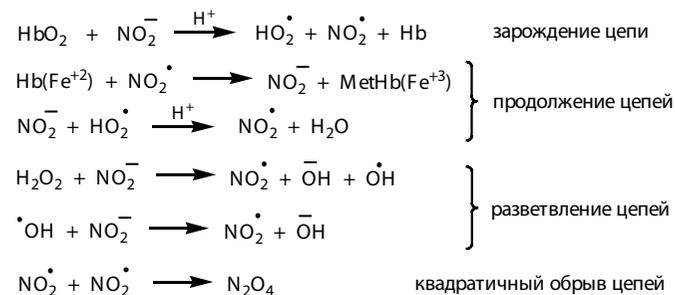
Разветвление цепей осуществляется при взаимодействии H_2O_2 , генерируемого в ходе реакции, с нитрит-ионом, и состоит в дополнительном образовании радикала NO_2^\bullet , ведущего цепь



Обрыв цепей в данном процессе преимущественно осуществляется квадратично

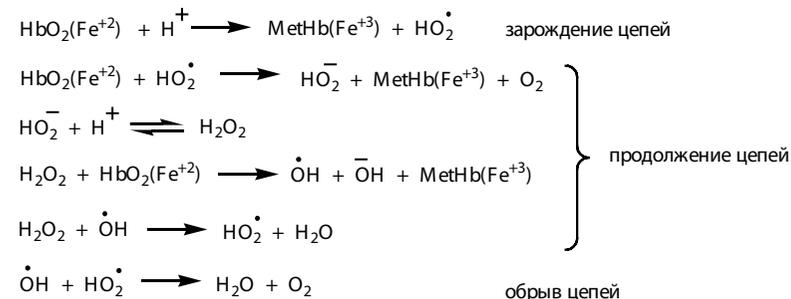


Общая схема процесса при этом имеет вид



Цепные процессы метгемоглобинообразования, не осложненные вырожденным разветвлением цепей

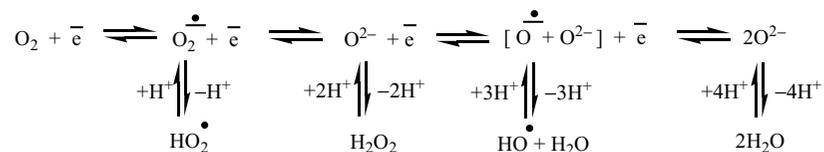
К процессам подобного типа относится процесс аутоокисления гемоглобина. Общая схема метгемоглобинообразования в этом случае имеет вид:



Аналогично (по неразветвленному цепному механизму) протекают процессы окисления гемоглобина нитроэтаном, гидроксиламином и некоторыми другими мет-гемоглобинообразователями.

16.2. Пероксидное повреждение белков

В условиях аэробного существования метаболизм кислорода предопределяет генерацию его реакционноспособных соединений $O_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} , $\dot{O}H$, H_2O_2 , называемых активными формами кислорода (АФК), так как кроме четырехэлектронного восстановления молекулы O_2 до воды в дыхательной цепи митохондрий имеет место неполное одно-трехэлектронное восстановление кислорода.



Образующиеся АФК инициируют процесс пероксидной модификации биомолекул.

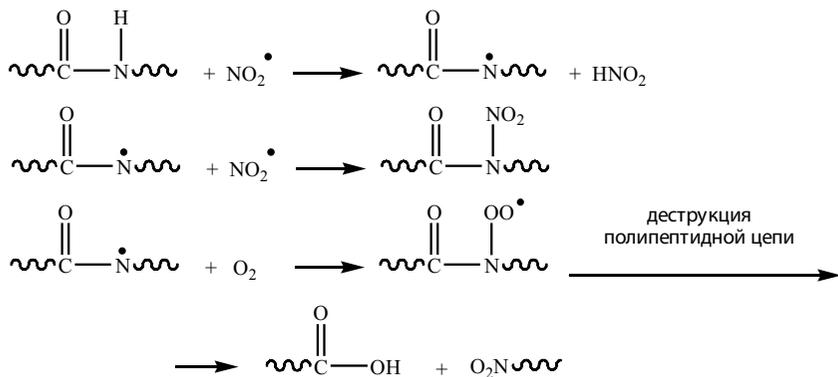
Окисление белков АФК относится к посттрансляционным модификациям и меняет свойства белков. Наиболее подвержены модификации протеин-фосфатазы, протеин-киназы, факторы транскрипции, выполняющие когенетическую функцию.

Так как белки выполняют важнейшие функции в жизнедеятельности организмов любого уровня, последние два десятилетия они привлекают пристальное внимание как субстраты процессов пероксидации.

Оксидативная модификация белков, вызванная активными формами кислорода, нарушает третичную структуру, вызывает агрегацию и денатурацию белков. При этом белки утрачивают свои нативные свойства, а некоторые из модифицированных протеинов способствуют мутациям или становятся аутоантигенами.

Характер окислительной модификации зависит от типа активных форм кислорода и строения белка.

Так, действие H_2O_2 на белки приводит к разворачиванию глобулы и поперечным сшивкам полипептидных цепей. Радикал диоксида азота непосредственно атакует пептидную связь, что приводит к образованию N-нитропроизводных белка, либо к реализации перекисного процесса.



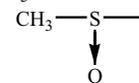
Интенсивность окислительной модификации белков определяется в первую очередь особенностями их аминокислотного состава. Окислительным превращениям подвергаются практически все аминокислоты, но особенно активно модифицируются триптофан, тирозин, гистидин, цистеин, что показано на примере бычьего сывороточного альбумина и гемоглобина.

При действии АФК на аминокислоты часто образуется смесь окисленных продуктов. Так, окисление пролина в системах, генерирующих анион-радикал $O_2^{\cdot-}$, радикал $\dot{O}H$ и молекулу H_2O_2 , сопровождается появлением различных изомеров гидроксипролина, что фактически соответствует аминокислотным заменам в полипептидной цепи.

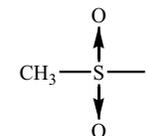
Активной модификации радикалами кислорода подвергаются серосодержащие аминокислоты, которые вовлекаются в процессе свободнорадикального окисления.

При окислении группы $-SH$ в цистеине радикалом $\dot{O}H$ и анион-радикалом $O_2^{\cdot-}$ образуются дисульфидные мостики с другими тиолами, например глутатионом.

Метилтиолатный фрагмент (CH_3S-) может быть окислен до сульфидного

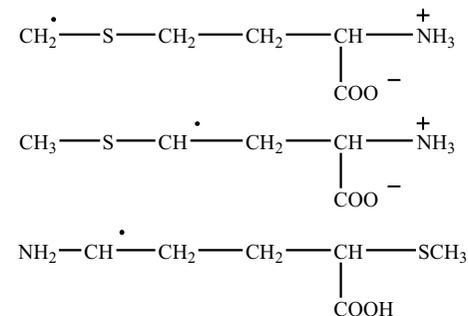


или даже до сульфона,

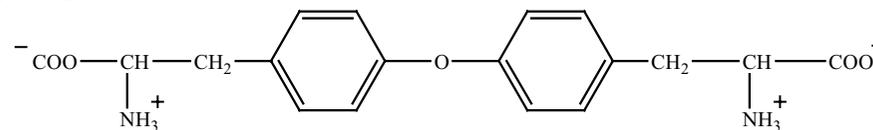


что также приводит к нарушению структуры и функции белков.

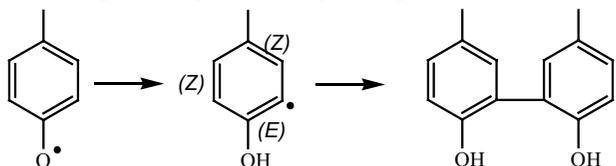
При взаимодействии радикала $\dot{O}H$ с метионином идет образование следующих радикальных продуктов:



Под действием активных форм кислорода происходит разрушение триптофана. Тирозин под действием АФК активно превращается в битирозин и различные битирозинфенолы.

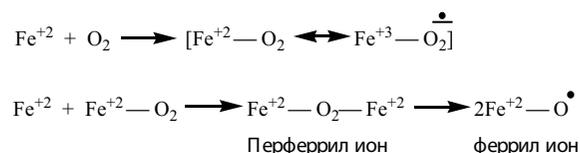


Образование битирозина протекает через миграцию свободной валентности



АФК вызывают окисление триптофана. Ведущую роль в данном процессе обычно отводят радикалу $\cdot\text{OH}$.

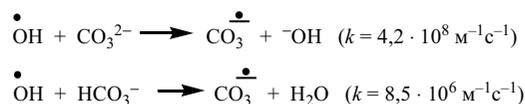
Процесс может происходить не только под действием $\cdot\text{OH}$, но и за счет образования железокислородных комплексов (феррил-перферрил-ионов), которые генерируются в аэробных условиях по схеме:



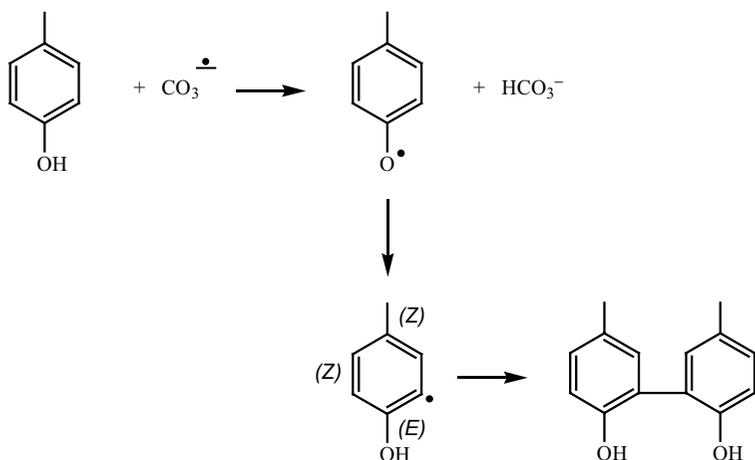
При этом образующиеся под действием Fe^{+2} АФК, а также генерируемые в тканях или поступающие извне оксиды азота влияют на высвобождение ионов Fe^{+2} из ферритина и синтез кислородных и динитрозильных комплексов железа.

Пул свободного железа играет ключевую роль в генерации АФК в зависимости от высвобождения или связывания железа с участком ферритина.

В последнее время достоверно установлено, что в процессе перекисного повреждения белков также участвует анион-радикал $\text{CO}_3^{\cdot-}$, который образуется по схеме



$\text{CO}_3^{\cdot-}$ реагирует с тирозином, триптофаном и другими соединениями ($k_2 = 10^7 - 10^8$) по схеме



Хорошо известно, что боковые радикалы тирозина в составе сывороточного альбумина человека хорошо окисляются по приведенным выше реакциям.

При введении фенольных соединений в среду, где протекает процесс перекисного окисления белков, реализуется цепной процесс, в котором совместно окисляются введенный фенол и фенольные радикалы тирозина в составе полипептидной цепи белка.

При атаке фенилаланина гидроксильным радикалом образуется ряд свободных радикалов данной аминокислоты.

При металлкаatalизируемой оксидативной модификации затрагиваются те участки полипептидной цепи, которые осуществляют связь белка с металлом. Так, при инактивации цитохрома Р-450 под действием гидроксильного радикала, генерируемого в результате реакции пероксида водорода с железом (II) гема, происходит окислительная модификация близлежащих к реакционному центру аминокислотных остатков белка.

Под влиянием радикалов $\cdot\text{OH}$, а также $\cdot\text{OH}$ в сочетании с анион-радикалом $\text{O}_2^{\cdot-}$ или молекулярным кислородом оксидативная модификация белков сопровождается либо их агрегацией с увеличением молекулярной массы, либо фрагментацией с распадом на более низкомолекулярные фрагменты. В случае агрегации образуются ковалентно-связанные белковые агрегаты в виде высокомолекулярных форм: димеров, тримеров и даже тетрамеров.

Процессу агрегации белков предшествует образование радикальных центров под влиянием активных форм кислорода (преимущественно радикалов $\cdot\text{OH}$) в различных структурных компонентах биомолекул, что повышает их склонность к агрегации. Некоторые химические соединения способны препятствовать инициированной АФК перекисной агрегации белка.

Низкие концентрации додецилсульфата натрия ингибируют аморфную агрегацию белка оболочки вируса табачной мозаики и влияют на стабильность белка.

Агрегация белков — сложный процесс, включающий несколько этапов. Механизм данного процесса в настоящее время полностью не ясен. При агрегации, имеющей место в результате перекисного повреждения, белковая глобула частично разворачивается. Наряду со стадией разворачивания белковой молекулы, агрегация включает и стадию образования ядра агрегата и стадию роста агрегата. Если допустить неуничтожимость точек роста ядер агрегатов, то можно провести аналогию между процессом агрегации белков и химическими ценными реакциями, такими как окисление молекулярным кислородом, хлорирование и т.д.

Рост агрегата может рассматриваться как неразветвленная цепная реакция, а шапероны, блокирующие агрегацию белкового субстрата, — как ингибиторы цепной агрегации белка. Имеются доказательства того, что в системе, содержащей более одного белка, агрегация происходит лишь между идентичными или очень похожими полипептидами, и в результате специфического домен-обменного взаимодействия могут формироваться когезионные (способные к слипанию) агрегаты.

В этом случае непохожие, совместно агрегирующие полипептиды не взаимодействуют и скорее ингибируют агрегацию каждого из них. В последние годы было показано, что аморфная (неукороченная) агрегация белков может играть важную роль в патогенезе целого ряда важнейших заболеваний человека и животных

Структурными участками сложных белков, подвергающимся модификации, могут быть углеводные, нуклеотидные, серосодержащие и другие фрагменты биомолекул.

При этом, чем выше скорость инициирования, тем больше образуется агрегатов, так как уменьшается длина кинетической цепи последовательных радикальных превращений.

Анализ показал, что лишь менее 10 % исследуемых белков образуют агрегаты за счет дисульфидных или нековалентных связей.

Образование 90 % агрегатов белков под действием $\cdot\text{OH}$ радикалов обусловлено межмолекулярными ковалентными связями иного характера, чем связи S—S. Прежде всего это межмолекулярные битирозиновые структуры.

Радикалы $\cdot\text{OH}$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$ не только разрушают боковые цепи аминокислот, но и вызывают окисление самого скелета полипептидной цепи в области α -углеродного атома с последующей фрагментацией молекулы.

Процесс фрагментации белка под влиянием радикалов $\cdot\text{OH}$ или $\text{O}_2^{\cdot-}$ включает образование пероксидных соединений в α -положении к карбонильному фрагменту пептидной группы с последующим их распадом.

Некоторые авторы считают, что вклад $\cdot\text{OH}$ незначителен, так как время жизни этого радикала крайне мало ($t_{1/2} = 10^{-9}\text{c}$), а его пробег составляет менее 0,001 мкм, то есть он вступает в реакции лишь в месте его генерации.

Комбинация радикалов $\cdot\text{OH}$ и $\text{O}_2^{\cdot-}$ в качестве окислителей вызывает изменения первичной, вторичной и третичной структуры белков.

Фрагментация белков сопровождается образованием фрагментов, 98 % которых имеют молекулярную массу более 5000.

Особо следует подчеркнуть воздействие активных форм кислорода на белки-ферменты.

Показано, что O_2 ингибирует каталазу, ацетилхолинэстеразу, глутатионпероксидазу. 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа чувствительна к действию не только $\text{O}_2^{\cdot-}$, но и H_2O_2 . Пероксид водорода вызывает инактивацию супероксиддисмутазы, цитохрома P-450. Под действием H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ необратимо инактивируется (K^+ , Na^+) АТФаза, которая в результате инактивации становится более чувствительной к протеолизу.

Помимо радикалов кислорода и пероксида водорода, белки-ферменты инактивируются вторичными радикалами, образующимися при участии АФК, например перекисными радикалами лигандов.

Влияние активных форм кислорода на белки различного типа приводит к сложным модификациям с последующим изменением их свойств. АФК приводит к изменению структуры плазматической супероксиддисмутазы, вызывая ее распад на отдельные субъединицы.

Воздействие малых доз H_2O_2 на миоглобин изменяет белок, придавая ему новые функции фермента оксидазы.

Наиболее активно повреждаются белки, в состав которых входит гем, железосульфидные центры, медь.

Простетические группы сложных белков участвуют в процессах их окислительного повреждения.

При пероксидном повреждении белков формируется два типа радикалов: углеродцентрированные, находящиеся в α -положении к пептидной связи, и радикалы, свободная валентность которых сосредоточена на боковых аминокислотных остатках.

Последние распределены по боковой цепи заведомо неравномерно, что обусловлено распределением аминокислотных остатков, наиболее подверженных окислительным превращениям в полипептидной цепи.

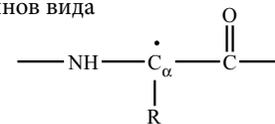
Свободные валентности, расположенные на α -углеродных атомах по отношению к пептидной связи, наоборот, равномерно распределены по полипептидной цепи.

В настоящее время не вызывает сомнений, что развитие процесса пероксидного повреждения полипептидной цепи белков под действием активных форм кислорода протекает по свободно-радикальному механизму и именно свободные валентности на α -углеродных атомах по отношению к пептидной группе образуют промежуточные

активные гидропероксиды, участвующие в стадиях продолжения цепи при пероксидной фрагментации молекулы белка.

Появление таких макрорадикалов — начальный, важнейший этап пероксидного повреждения белка.

Макрорадикалы протеинов вида



возникают также в результате радиолиза белковых растворов и облучения белков УФ светом при 77 °К.

Предельная концентрация углеродцентрированных макрорадикалов составляет 10^{19} на грамм белка, что соответствует двум радикальным центрам на частицу с молекулярной массой 120 000.

Полипептидная цепь глобулярного белка с такой массой укладывается в сфере с радиусом 3,4 нм. Таким образом, среднее расстояние между парами углеродцентрированных макрорадикалов составляет ~6,8 нм.

Дальнейшее развитие процесса пероксидного повреждения белка осуществляется именно через промежуточные макро α -углеродцентрированные радикалы, которые образуют активные гидропероксиды.

При использовании в качестве мишени бычьего сывороточного альбумина при действии трех радикалов $\cdot\text{OH}$ образуются 1,23 пероксидные группы, что соответствует 41%-ному преобразованию гидроксильных радикалов в гидропероксидные группы белка.

Это соотношение различно для белков различной структуры: для коллагена на каждые 2,8 радикала $\cdot\text{OH}$ образуется всего 0,38 пероксидные группы.

Внутри первично генерированного макрорадикала возможно перемещение свободной валентности.

Известно, что в нуклеопротеидах перенос электрона может осуществляться на большие расстояния и нуклеиновая кислота играет в этом процессе роль посредника. Этот процесс зависит от типа белка, связанного с нуклеиновой кислотой и, таким образом, специальные белки могут как активизировать, так и ингибировать радикальные процессы на значительном расстоянии.

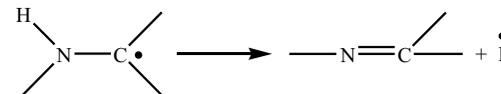
Существует достаточно оснований предполагать, что радикальная пероксидная фрагментация белка осуществляется по цепному механизму и именно активные гидропероксиды участвуют в стадиях продолжения цепи.

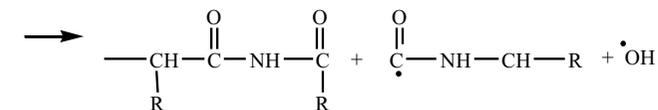
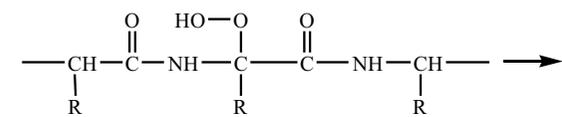
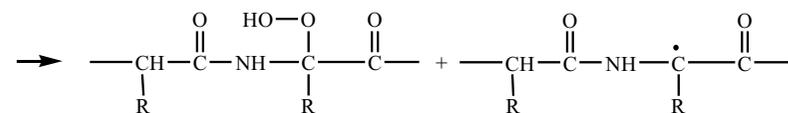
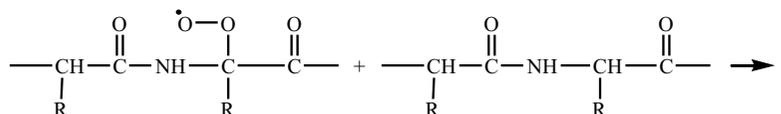
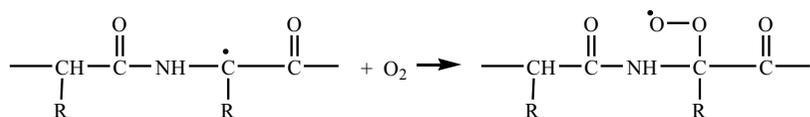
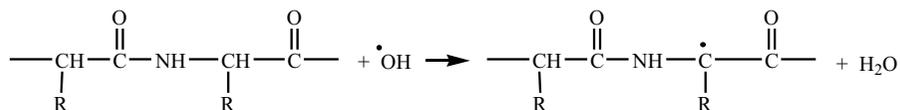
К настоящему времени сформировались следующие представления о характере цепной пероксидной фрагментации белка: перекисную деструкцию полипептидной цепи инициирует генерируемый различными путями *in vivo* радикал $\cdot\text{OH}$, отрывая атом водорода от α -углеродного атома полипептидной цепи.

Общая схема развития кинетической цепи может быть представлена ниже (рисунк 60).

Обрыв цепей осуществляется в зависимости от условий либо путем рекомбинации углеродцентрированных, либо пероксидных радикалов или при их смешанном взаимодействии.

Кроме того, макрорадикалы способны к внутренней перегруппировке типа





R — аминокислотные радикалы;

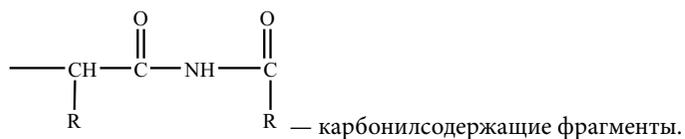
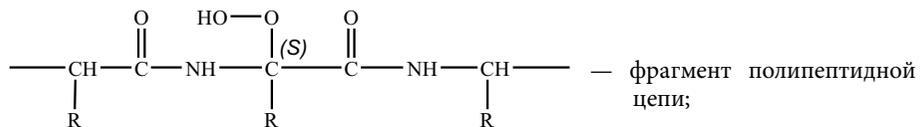
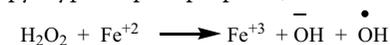


Рис. 60. Общая схема цепного процесса деструкции полпептидной цепи

сопровождается рекомбинацией атомов водорода и углеродцентрированных радикалов.

Инициирование пероксидации может осуществляться путем переноса электрона от ионизированных групп полипептидной цепи белка на молекулярный кислород или путем одноэлектронного окисления простетических групп сложных белков кислородом. Генерация активных радикалов возможна в белоксодержащих системах и без участия белковых структур, например в реакции Фентона:

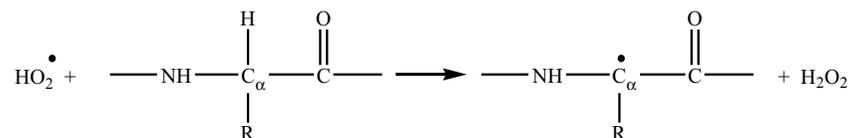


либо при одноэлектронном окислении других нуклеофилов, например, нитрит-иона по реакции:



В случае первичной генерации свободных радикалов без участия белковых структур, например, генерации радикала $\cdot\text{OH}$ в системе Фентона, при окислении нитрит-иона пероксидом водорода, эти радикалы участвуют в первичном акте генерации углеродцентрированного макрорадикала, а также могут участвовать в лимитирующей стадии звена цепи.

Особый интерес представляет пероксидное повреждение полипептидной цепи гемсодержащих белков, так как окисление железа гема также осуществляется по радикально-цепному механизму, одновременно иницируя процесс повреждения полипептидной цепи белка за счет продукции гидропероксидного радикала, способного в свою очередь генерировать углеродцентрированный макрорадикал путем отщепления атома водорода от молекулы белка



Вопрос пероксидного повреждения полипептидной цепи белков в настоящее время активно изучается, так как знание механизмов такой модификации открывает путь к целенаправленной защите белков-ферментов от окислительной деструкции. Это имеет огромное значение для практической медицины, так как в настоящее время установлено, что многие заболевания сопровождаются изменением течения свободнорадикальных реакций, что, в свою очередь, вызывает дезорганизацию клеточного метаболизма, нарушение структуры мембран, сбой в функционировании органов и систем. Это имеет драматические последствия для организма и в предельном случае приводит к его гибели. Такие нарушения в функционировании живых систем характеризуются термином «свободнорадикальная патология», так как в основе повреждения биомолекул лежит осуществление цепных радикальных реакций, инициированных АФК.

Отклонения в генерации АФК и существенные сдвиги в течении свободнорадикальных процессов сопровождают воспалительные заболевания, канцерогенез, различные виды травм, легочную патологию, тяжелые инфекции, ишемическую болезнь сердца, инфаркт миокарда, сахарный диабет, нейродегенеративные заболевания.

Болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные заболевания являются частью большого ряда наследственных заболеваний, известных как «конформационные болезни» и возникающих тогда, когда те или иные белки подвергаются структурной перестройке, способствующей их агрегации.

Характерным признаком этих заболеваний является изменение конформации белков, приводящее к образованию белковых агрегатов с различной надмолекулярной организацией, что является следствием перекисной модификации белков.

16.3. Пероксидное повреждение липопротеидов

Липопротеиды составляют группу сложных белков, наиболее подверженных процессам перекисной модификации. В составе сложных белков данной группы в цепные реакции с участием АФК вовлекаются как простетические группы данных белков, так и полипептидные цепи. Модификация полипептидной цепи осуществляется по схемам, представленным в предшествующих разделах, а на процессах модификации простетических групп — липидов различных классов — необходимо остановиться подробнее. Из всех биомолекул процесс перекисного окисления липидов изучен наиболее подробно. Для липидов установлен цепной радикальный механизм перекисного окисления, во многом схожий с процессами жидкофазного окисления органических соединений.

Применение цепной теории для описания кинетики окисления липидов (LH) было впервые осуществлено Ю. А. Владимировым и А. И. Арчаковым.

Был предложен механизм перекисного окисления липидов (ПОЛ), инициированного различными химическими агентами, в том числе и железосодержащими системами. ПОЛ играет исключительную роль в клеточной патологии, так как приводит к повреждению мембран и гибели клеток. Авторы рассматривают ПОЛ как цепной вырожденно-разветвленный процесс с квадратичным обрывом цепей (рисунок 61).

В качестве источника иона железа обычно рассматривают белки, имеющие в своем составе железо-серные центры, а также свободные ионы Fe^{+2} , присутствующие в биологических жидкостях в следовых количествах, а протонирование супероксидно-ион-радикала осуществляется за счет участия буферных систем организма.

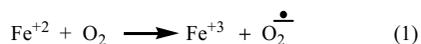
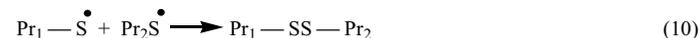


Рис. 61. Схема цепного вырожденно-разветвленного окисления липидов

Здесь стадия (1) представляет собой зарождение цепей, (2–5) — продолжение, (6) и (7) — разветвление, (8) — квадратичный обрыв цепей. Вышеприведенный механизм описывает классический способ инициирования цепных реакций. При этом следует отметить, что, помимо Fe^{+2} — зависимого перекисного окисления липидов, реализуется и железонезависимый процесс. В этом случае распад промежуточного гидропероксида должен осуществляться либо гомолитически, либо с участием иных доноров электрона.

Данная фундаментальная разработка получила широкое развитие в исследованиях отечественной научной школы. Был изучен процесс окисления липидов в составе сложных белков — липопротеинов. Было показано, что пероксидное окисление липидов в составе сложных белков сопровождается окислением тиоловых (сульфгидрильных) групп мембранных белков (Pr), что приводит к неферментативной реакции групп $-SH$ со свободными радикалами липидов. При этом образуются сульфгидрильные радикалы, которые затем взаимодействуют с образованием дисульфидов либо окисляются кислородом с образованием различных кислородсодержащих соединений (сульфокислотных радикалов ($PrSO$) и производных сульфоновой кислоты ($PrSO_3H$)), в том числе и производных сульфоновой кислоты (реакции 9–11):



Следует отметить, что агрегация липопротеинов может быть результатом не только ПОЛ, но и радикальной модификации полипептидной цепи данных сложных белков.

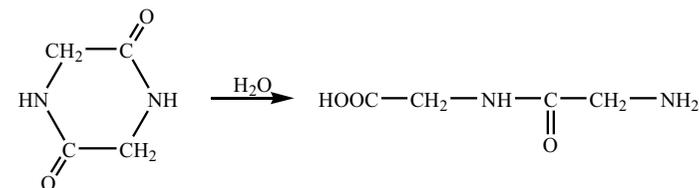
17. СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

За немногим более чем 100-летний период биологическая химия прошла путь от синтеза L-стереоизомеров аминокислот до синтеза искусственных пептидов и белков.

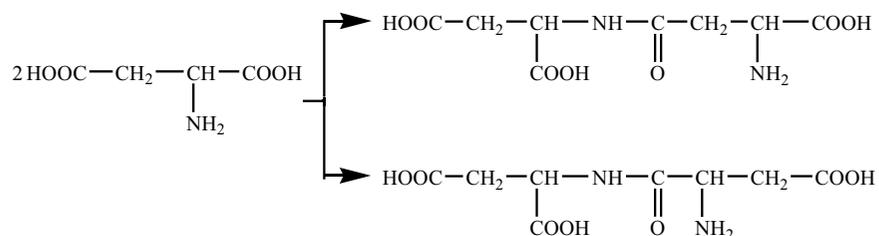
Синтез аминокислот — по существу первый шаг к синтезу природных белков.

Попытки получить белковоподобные вещества прямым синтезом предпринимались с 70-х годов XIX века.

Пептидный синтез — это построение пептидной цепи путем соединения аминокислот с помощью химических методов. Однако один из первых линейных пептидов был получен не прямым связыванием свободных аминокислот или их производных, а реакцией частичного гидролиза дикетопиперазина, содержащего в своей структуре две пептидные связи. Таким способом был получен глицилглицин:



В 1871 году Шааль при нагревании аспарагиновой кислоты до 200°C и пропускании CO₂ получил ее димер, включавший, очевидно, соединения 2-х типов

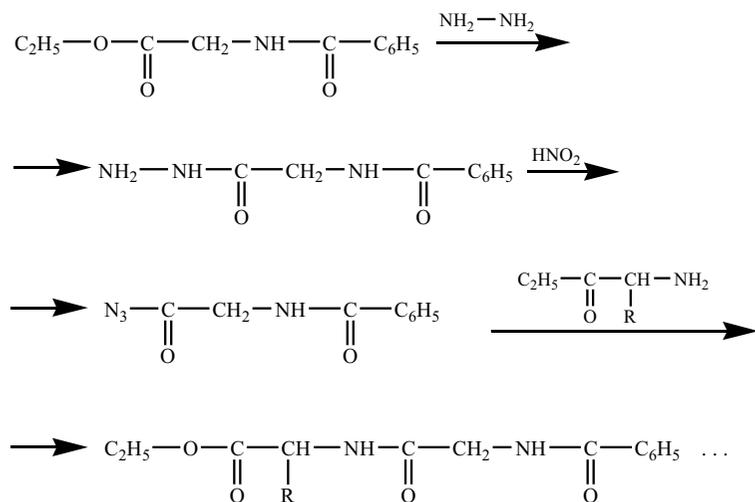


В 1882 году Курциус получил пептидоподобное соединение при взаимодействии серебряной соли глицина с хлорангидридом бензойной кислоты:



Основные методы наращивания полипептидной цепи

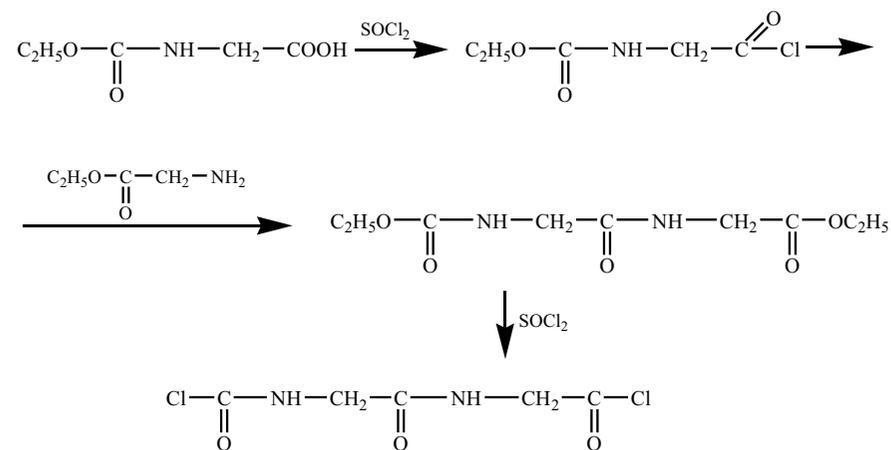
Дальнейшие работы Курциуса привели к разработке азидного метода синтеза пептидов, разработанного на основе глицина и включающего последовательный переход от этилового эфира бензоилглицина к гидразиду бензоилглицина, его азиду с последующим замещением азидной группы на остаток этилового эфира новой аминокислоты.



Этот предложенный более 100 лет назад метод достаточно актуален и в настоящее время.

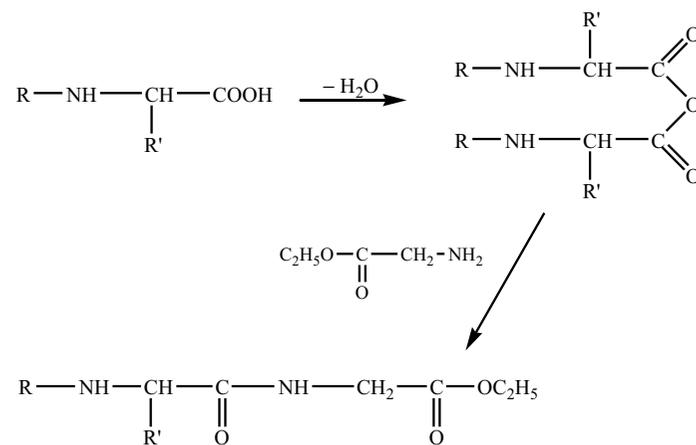
В 1903 году Фишер предложил хлорангидридный метод синтеза пептидов, который впоследствии был усовершенствован его учеником Варбургом.

Указанный метод включал синтез хлорангидрида этоксикарбонилглицина с последующим его взаимодействием с эфиром другой кислоты с образованием пептидной связи. Образовавшееся соединение при обработке хлористым тионилем превращали в хлорангидрид, способный вступать в конденсацию с новым производным аминокислоты.

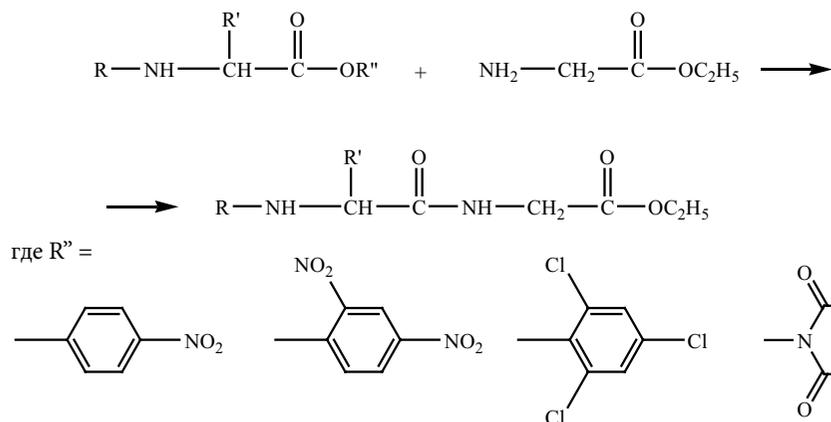


Достаточно широкое распространение получил так называемый ангидридный метод получения пептидов.

В данном методе ангидрид алкиламино кислоты конденсировали с этиловым эфиром другой аминокислоты с последующим образованием дипептида:

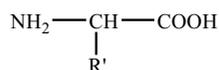


Значительный интерес представляет метод активированных эфиров, в котором в реакцию вводились этиловый эфир алкиламино кислоты и эфир аминокислоты, карбоксильная группа которой этерифицирована оксисоединением, содержащим электроотрицательный фрагмент. Это обеспечивало его легкое замещение на остаток производной аминокислоты, вводимого в реакцию.

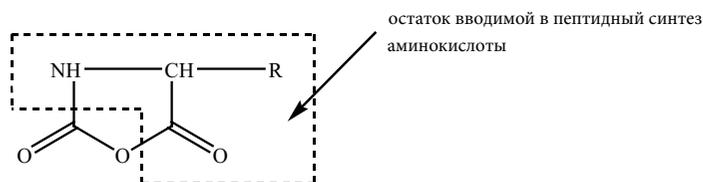


Карбоксиангидридный метод был предложен Хиршманом в 1966 году. При этом вводимая в полипептидную цепь аминокислота берется в карбоксиангидридной форме и построение цепи начинается с С-конца.

Например, в реакцию с глицином $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ нужно ввести аминокислоту



Для этого осуществляют реакцию глицина с карбоксиангидридом аминокислоты (смешанным ангидридом угольной и вводимой в синтез аминокислот):



Общая схема наращивания полипептидной цепи представлена на рисунке 62.

Этим методом были получены достаточно крупные фрагменты фермента рибонуклеазы.

Однако получение значительных по числу мономерных звеньев полипептидных фрагментов было достаточно сложной задачей, и первыми такими полипептидами были гомополимеры аминокислот.

Была синтезирована поли-D-глутаминовая кислота с молекулярной массой $M=15000$, которая имела значительное сходство с природным веществом капсул бактерий *B. Antracis*, основу которого составляет поли-D-глутаминовая кислота, в которой аминокислотные единицы соединялись как α -, так и γ -амидными связями.

Такой подход к синтезу искусственных пептидов сформировался на основе изучения структуры коллагена.

Было обнаружено, что полипептидная цепь коллагена содержит пептиды трех типов

- Gly - Pro - R -
- Gly - Pro - I -
- Gly - Ala - I -

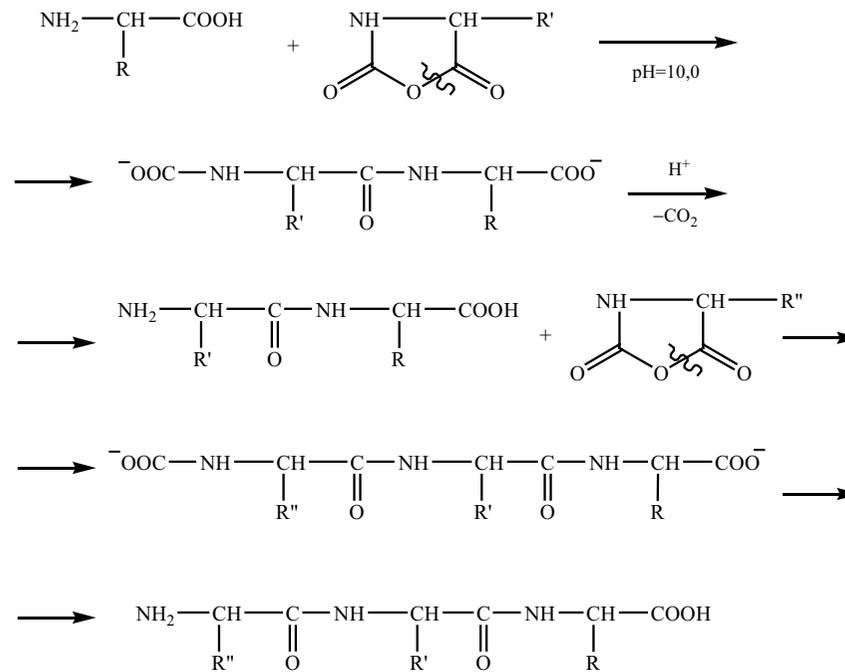


Рис. 62. Общая схема карбоксиангидридного метода наращивания полипептидной цепи

где R — остаток любой аминокислоты, I — остаток пролина или оксипролина. Остаток оксипролина в дальнейшем обозначим Нур.

При синтезе регулярных пептидов с повторяющимися звеньями

- Gly - Pro - Нур -
- Gly - Pro - Pro -
- Gly - Нур - Нур -
- Gly - Pro - Ala -
- Gly - Нур - Pro -

было показано, что при достижении определенной длины цепи такие пептиды способны спонтанно скручиваться в тройную спираль.

Достаточно было соединить приблизительно 10 трипептидов указанного выше строения, как три образовавшихся полипептида, каждый из которых содержал 30 аминокислотных остатков, формировали суперспиральную структуру коллагенового типа. Молекулярная масса таких линейных полипептидов составляла приблизительно 3000. Таким образом был открыт путь к синтезу пептидов, являющихся аналогами природных. Пептидный синтез осуществляется по классическому пути: от простого к сложному.

В 50-е годы XX века Де Виньо синтезировал пептидные гормоны окситоцин и вазопрессин, состоящие из 9 аминокислот, которые обладали всеми биологическими свойствами природных аналогов, за что был удостоен Нобелевской премии. В 1950-е — 1960-е годы велись работы по синтезу пептидных антибиотиков: грамицидина S, актиномицина, валиномицина.

В 1963 году был синтезирован инсулин, включающий 2 полипептидные цепи и 51 аминокислотный остаток. Затем были получены синтетические полипептиды, родственные природным гистонам, которые активно используются для изучения взаимодействия гистонов и ДНК и уточнения их когенетического действия.

В 1969 году был осуществлен синтез фермента рибонуклеазы, включающего 124 аминокислотных остатка.

Полученный белок давал ~30% энзиматической активности природного фермента, но его количество было столь мало (доли миллиграмма), что дальнейшая его очистка и характеристика не представлялись возможными.

Все описанные синтезы осуществлялись в растворе и были чрезвычайно длительными.

При этом необходимо было добиться полного растворения образующихся промежуточных пептидов, что вызывало серьезные затруднения в работе, так как по ходу наращивания полипептидной цепи существенно менялась растворимость продуктов.

С целью повышения эффективности пептидного синтеза в 1963 году Меррифилдом был предложен твердофазный метод синтеза пептидов. Идея состоит в закреплении растущей полипептидной цепи на нерастворимом носителе.

При этом значительно упрощается операция выделения промежуточных продуктов, полностью снимается проблема нерастворимости пептида и создаются предпосылки для автоматизации процесса.

Например, синтез полипептидов, иммобилизованных на твердой матрице, активно проводится по ангидриднему методу.

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

Нагрузка полимера растущими пептидными цепями, как правило, невелика и составляет 0,1–0,3 ммоль пептида на 1 г полимерного носителя.

Однако невозможность достичь 100 % выхода полипептида на каждой стадии в процессе синтеза приводит к крайне сложным смесям полипептидов по окончании процесса и даже в случае обнаружения ферментативной активности у синтезированного продукта часто приходится констатировать что мы имеем дело не с индивидуальным белком, а со смесью гомологичных пептидов, разделить которые практически невозможно.

Дальнейшей модификацией полипептидного синтеза с использованием иммобилизующей матрицы была замена нерастворимой полистирольной матрицы на растворимую: более низкомолекулярный растворимый полистирол или полиэтиленгликоль, что позволило соединить преимущества синтеза в растворе (высокие скорости реакций, широкий выбор реактивов и защитных групп) и преимущества синтеза на твердом носителе (легкость отделения избытка реагентов и низкомолекулярных продуктов реакции, что облегчает автоматизацию).

Искусственный пептидный синтез, несмотря на его чрезвычайно высокую трудоемкость, активно развивается и совершенствуется.

Естественно, что этот процесс крайне несовершенен по сравнению с природным механизмом биосинтеза белка. Однако, несмотря на успехи генной инженерии, позволяющей целенаправленно изменить биосинтетический аппарат клетки, пептидный синтез имеет значительно более широкие возможности, так как с его помощью можно включать в молекулу белка любые аминокислотные остатки, не встречающиеся в природе, получать циклические и полициклические структуры.

Пептидный синтез открывает путь к синтезу искусственных аналогов природных ферментов, устойчивых к действию протеаз, может привести к созданию ферментов, способных разрушать опасные ксенобиотики и таким образом способствовать улучшению качества окружающей среды.

18. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНАЛОГИ БЕЛКОВ

В настоящее время одним из важнейших направлений белковой химии является дизайн белков с новыми биологическими функциями. В рамках поиска новых лекарственных препаратов сформировалось новое магистральное направление по синтезу химически модифицированных пептидов и белков.

Синтетически модифицированные пептиды входят в группу биологически активных соединений, объединенных термином — пептидомиметики.

Такие соединения способны подражать (частично выполнять) биологическим функциям природных пептидов и белков.

Так как белки и белковоподобные соединения осуществляют свою биологическую функцию только при сохранении высшей архитектуры, то пептидомиметик должен иметь архитектурные особенности, аналогичные природным пептидам.

При этом первичная структура такого соединения может быть очень далека от первичной структуры природного пептида.

Способность соединения, далекого по своей первичной структуре от природного пептида, сохранять физиологическую активность, была, например, продемонстрирована при синтезе пептидомиметика, способного замещать тиролиберин — гормон, высвобождающий тиротропин, который вырабатывается в гипоталамусе и способствует выделению тиротропина из передней доли гипофиза. Тиролиберин представляет собой трипептид, состоящий из пироглутаминовой кислоты, гистидина и пролиламида.

Методом рентгеноструктурного анализа было подробно изучено строение данного гормона и синтезирован его изоэстерический аналог (структура, близкая по пространственному строению), сохраняющий основные функциональные группы трипептида, предположительно ответственные за взаимодействие с рецептором.

Фармакоактивными группами тиролиберина являются отмеченные на схеме (рисунки 63) фрагменты (группы 1).

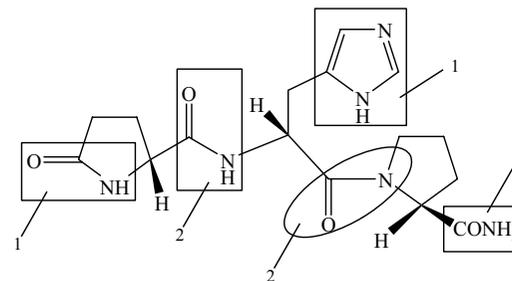


Рис. 63. Схема строения тиролиберина

Пептидные связи в тиротропине отмечены как фрагменты (2).

Синтез соединения, содержащего в центральной части молекулы циклогексанный фрагмент, и являющегося изостерическим аналогом тиролиберина, с последующим его испытанием на биологическую активность показал, что соединение, имеющее структуру (рисунок 64) и сохраняющее фармакоактивные фрагменты тиролиберина, действительно обладает выраженной способностью стимулировать высвобождение тиротропина. При этом необходимо отметить, что в синтезированном соединении полностью отсутствуют пептидные связи.

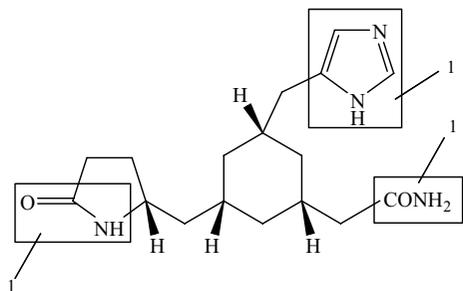


Рис. 64. Схема строения стимулятора высвобождения тиротропина

Перспективность синтеза и использования таких соединений трудно переоценить, так как они являются основой для разработки высокоэффективных лекарственных средств нового поколения, устойчивых к действию протеаз, обладают высоким сродством к рецепторам, эффективно связываются транспортными белками.

Пептидомиметики служат важным инструментом при изучении тонких механизмов работы ферментов, позволяя понять характер связывания субстрата, функционирования аллостерических активаторов и ингибиторов ферментативных процессов.

18.1. Пептидомиметики как ингибиторы ферментов

Фермент — субстратный комплекс, организующийся в процессе ферментативного катализа, имеет очень сложную пространственную конфигурацию, в которую фермент и субстрат включаются в своей нативной форме.

В случае воздействия на фермент ингибиторов или активаторов процесс изменения активности также связан с построением аддукта фермента с эффектором, имеющего определенную конфигурацию.

Многие ингибиторы ферментов, встречающиеся в природе, являются пептидами.

Огромное число заболеваний сопровождается нарушением ферментативной активности тех или иных белков, участвующих в определенных звеньях основных и minorных метаболических процессов.

В связи с вышеизложенным многие эффективные терапевтические средства представляют собой эффекторы, изменяющие активность тех или иных ферментов. Однако важным условием эффективного действия таких средств является их протейолитическая устойчивость и решение этой задачи осуществляется через синтез пептидомиметиков, функционально замещающих природные биорегуляторы.

Описанные подходы по созданию терапевтических средств на основе пептидомиметиков были воплощены в создании синтетических ингибиторов протеазы ВИЧ.

Протеаза ВИЧ — важный фермент, обеспечивающий эффективный процесс размножения вируса. Ее функция заключается в синтезе зрелых оболочечных белков путем частичного гидролиза получаемых в результате трансляции белковых предшественников. Этот фрагмент проявляет абсолютную групповую специфичность и активно катализирует гидролиз пептидных связей тирозин — пролин и фенилаланин — пролин (рисунок 65).

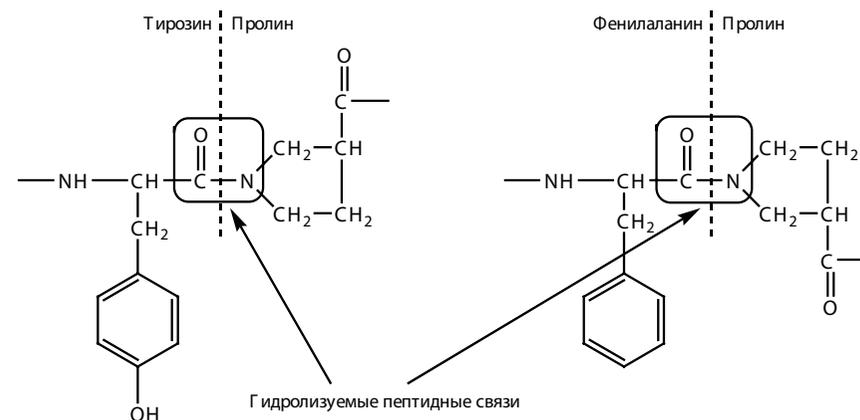


Рис. 65. Структура реакционных центров в субстратах, атакуемых протеазой ВИЧ

Для поиска ингибиторов протеазы ВИЧ был выбран путь создания эффектора, способного ингибировать фермент по конкурентному механизму, то есть необходимо было создать изостерический негидролизуемый аналог.

Таковыми эффективными ингибиторами протеазы ВИЧ оказались соединения, имеющие в непосредственной близости к фенилаланину гидроксизетиленовый фрагмент.

Структура одного из таких ингибиторов представлена на рисунке 66.

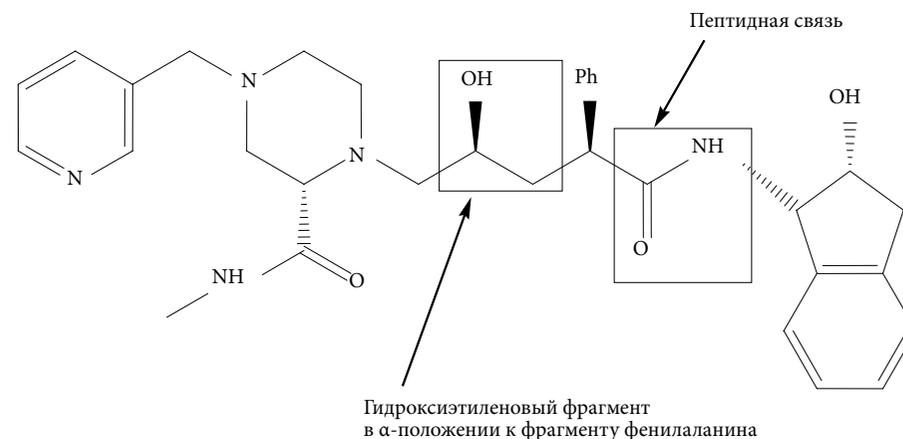


Рис. 66. Структура ингибитора протеазы ВИЧ

Данное соединение хорошо узнается ферментом вследствие наличия в молекуле фенилаланинового фрагмента и пептидной связи, является изостерическим по отношению к традиционно гидролизуемым пептидам, однако ввиду отсутствия пролина в α -положении к фенилаланину не подвергается гидролизу. Связывание этого соединения в активном центре протеазы ВИЧ приводит к ингибированию фермента по конкурентному механизму. Вирусная протеаза захватывает ингибитор в свой активный центр, образуя комплекс с высокой устойчивостью. В результате этого она не выполняет свою роль в гидролизе вирусных полипротеинов и жизненный цикл вируса прерывается.

18.2. Пептидо-нуклеиновые кислоты

Еще одним направлением в синтезе функциональных аналогов белков является синтез принципиально нового класса биологически активных соединений — пептидо-нуклеиновых кислот (ПНК). Пептидо-нуклеиновые кислоты — аналоги нуклеиновых кислот, но в отличие от них ПНК не содержат ни фосфатных, ни углеводных остатков и обладают незаряженным псевдопептидным остовом.

Мономерные звенья в классических пептидо-нуклеиновых кислотах состоят из остатков N-(2-аминоэтил)глицина и гетероциклического (пуринового или пиримидинового) основания, связанного с остовом ацетатным линкером, как показано на рисунке 67.

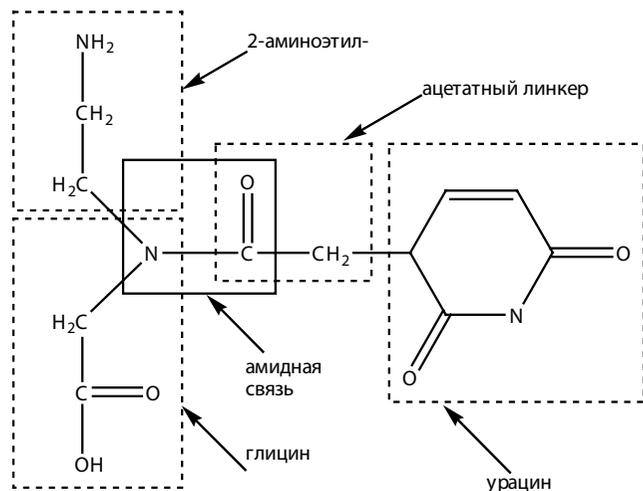


Рис. 67. Структура мономерные звена пептидо-нуклеиновых кислот

Эти мономеры соединяются между собой амидными связями, образуя полимерные цепи. Важной особенностью образовавшихся полимеров является отсутствие в остове полимера хиральных центров. Кроме того, образовавшиеся полимеры не имеют группировок с выраженными кислотными свойствами и в физиологических условиях неспособны к ионизации.

Геометрия остова ПНК и его относительная гибкость позволяют удивительно точно имитировать пространственную структуру углеводно-фосфатного остова нуклеиновых кислот (НК).

Сравнительная структура пептидо-нуклеиновых кислот и истинных нуклеиновых кислот приведена на рисунке 68.

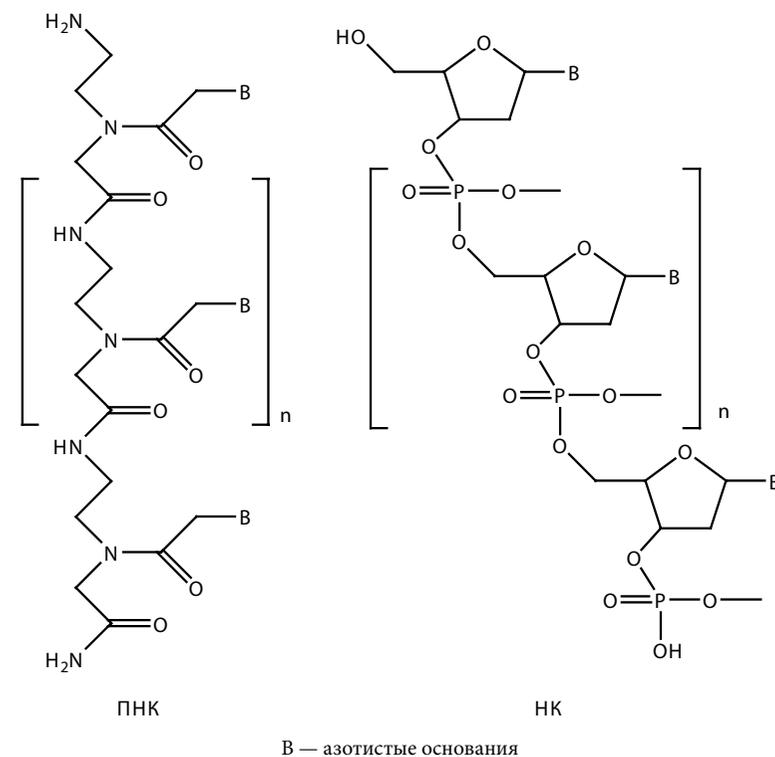


Рис. 68. Сравнительная структура пептидо-нуклеиновых кислот и истинных нуклеиновых кислот

С химической точки зрения ПНК являются гибридом олигонуклеотида (из структуры которого заимствованы гетероциклические азотистые основания) и пептида (из структуры которого заимствован принцип построения остова молекул пептидо-нуклеиновых кислот). Следует отметить, что название пептидо-нуклеиновые кислоты было выбрано с целью подчеркнуть структурную аналогию этих соединений с нуклеиновыми кислотами, а также отразить сходство остова олигомеров ПНК с остовом пептидов, хотя ни термин «кислота», ни термин «пептид» не применимы к ПНК. Как уже отмечалось, ПНК не являются поликислотами, а также в отличие от пептидов не состоят только из аминокислот. Тем не менее, аббревиатура ПНК стала общепотребительной, хотя правильнее было бы называть эти соединения полиамидными аналогами олигонуклеотидов.

Структурная двойственность ПНК определяет их уникальные свойства. Действительно, в этих молекулах удивительным образом сочетается способность к узнаванию, присущая структуре нуклеиновых кислот, с гибкостью и прочностью белков.

Благодаря своим уникальным свойствам пептидо-нуклеиновые кислоты находят широкое применение в молекулярно-биологических, биохимических, генно-инженерных и медицинских исследованиях.

ПНК — привлекательные кандидаты на роль генетических терапевтических средств нового поколения, способных избирательно влиять на экспрессию генов. Пептидно-нуклеиновые кислоты способны избирательно ингибировать биосинтез белков мозга.

Многообещающим выглядит создание противораковых и противовирусных препаратов на основе пептидо-нуклеиновых кислот. Показано, что некоторые производные ПНК проявляют антибактериальную активность.

Заключение

К началу третьего тысячелетия научно-технический прогресс достиг колоссальных масштабов и рассмотрение сложнейших жизненных процессов на молекулярном и субмолекулярном уровне является неотъемлемой частью общеобразовательных учебных программ. Биохимия — основная биологическая наука, рассматривающая молекулярные механизмы жизнедеятельности, быстрое развитие которой создало основу для глубокого понимания всех процессов, протекающих в живых системах. Химия белка как исторически первого молекулярного объекта, изучаемого биохимией, в определенной степени отражает историю развития биологической химии как науки. Множество функций, выполняемых белками в живом организме, позволило показать тесную связь структуры с их свойствами и в дальнейшем наметить основные направления развития химии белков и пептидов, ключевым из которых является «инвентаризация» белков современных живых систем и построение видовых белковых карт. Активно осуществляется целенаправленная модификация белков и синтез искусственных протеинов с целью создания эффективных лекарственных средств. В настоящее время объем продаж лекарственных средств на основе пептидов и белков, используемых для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, патологии нервной системы, в качестве иммуномодуляторов, средств адресной доставки лекарственных препаратов составляет десятки миллионов долларов в год.

Освоение азот химии протеинов — первый шаг, который необходимо сделать для успешного решения задач, поставленных современной наукой о белках — протеомикой.

Материалы, изложенные в настоящем пособии можно рассматривать как введение в мир белковой химии. Ознакомление с содержанием пособия позволит начинающим исследователям, студентам и аспирантам обобщить базовые знания по структуре и свойствам белков. В настоящем издании также представлена новая информация по применению белков и пептидов, реакционной способности белков различных типов, производным белков, проявляющим новые физиологические свойства. Особый интерес представляют вопросы фолдинга белков, перекисного окисления протеинов, структуре и свойствам пептидо-нуклеиновых кислот и проблемам синтеза и медицинского применения пептидомиметиков. Таким образом, сочетание в настоящем издании необходимого набора традиционной учебной информации в области химии белка с обзором наиболее быстро развивающихся и перспективных направлений химии протеинов позволит молодому начинающему исследователю активно включиться в творческую работу в области изучения химии белка.

В настоящее время активно изучаются проблемы тонкой многоуровневой структуры белковых молекул, осуществляется поиск новых синтетических пептидов с заданными полезными свойствами на основе корреляции структура—активность

(QSAR). Вопросы реакционной способности белков, проблемы диагностики молекулярных болезней, в основе которых лежит изменение структуры белка, выполняющего ту или иную функцию, надолго останутся ключевыми вопросами, требующими систематического изучения. Расширение инструментальных возможностей биологических наук, применение методов молекулярного дизайна, математического моделирования, современных квантово-химических методов позволит решить поставленные многочисленные задачи современной белковой химии. Для успешной реализации методов клеточной терапии, ранней диагностики тяжелых заболеваний необходимо детальное изучение механизмов биологического структурирования, исследование взаимодействий белок-белок и белок-растворитель во всех аспектах метаболической регуляции и установления клеточной структуры, а также анализ нарушения кооперативных взаимодействий между молекулами белков. Таким образом, углубленное изучение проблем организации белков, белковых кластеров, химической активности белковых молекул, чему посвящено настоящее пособие, относится к числу приоритетных задач биоорганической химии, молекулярной биологии и медицины.

Литература

1. Х. Жанг, З. Чанг. Протеиназа человека // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 6. С. 843–850.
2. И. С. Бокша. Глутамат-возбуждающий нейромедиатор в нервной ткани // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 7. С. 869–886.
3. Д. Фенг, З. Х. Зенг. Упаковка белков в кристаллы // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 7. С. 912–918.
4. А. Л. Брюханов, А. И. Нетрусов. Каталаза и супероксиддисмутаза: распространение, свойства и физиологическая роль в клетках строгих анаэробов // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 9. С. 1170–1186.
5. К. М. Маркосян, Б. И. Курганов. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегатов // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 9. С. 1196–1212.
6. К. А. Маркосян, А. А. Замятин, Б. И. Курганов. Антибактериальные богатые пролином природные олигопептиды и их белки-мишени // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 10. С. 1332–1344.
7. О. Н. Кулаева. Цитокины. Их структура и функции. М.: Наука, 1973, 264 с.
8. С. Ли, В. Лю, Г. Ф. Ли, Я. Д. Гонг, Н. М. Жао, Р. К. Жанг, Х. М. Жоу. Взаимодействие пероксида водорода с рибулозо-1, 5-дифосфаткарбоксилазой из риса // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 10. С. 1369–1402.
9. А. В. Феофанов, Г. В. Шаронов, М. А. Дубинина, М. В. Астахова, И. В. Куделина, П. В. Дубовский, Д. И. Родионов, Ю. Н. Уткин, А. С. Арсеньев. Сравнительное исследование структуры и активности цитокинов из яда кобр // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 10. С. 1410–1421.
10. Б. Ф. Поглазов. Структура и функции сократительных белков. М.: Наука, 1965. 223 с.
11. Б. Ф. Поглазов, Д. И. Левицкий. Миозин и биологическая подвижность. М.: Наука, 1982. 161 с.
12. С. Марко, Т. Будье, Ц. Мессоди, Ж. Л. Риго. Электронная томография биологических образцов // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 11. С. 1497–1505.
13. Д. Н. Ермоленко, А. В. Жардев, Б. В. Дзантиев. Антитела как специфические шапероны // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 11. С. 1515–1521.
14. А. А. Замятин. Биохимические проблемы олигопептидной регуляции // Биохимия. 2004. Т. 69, вып. 11. С. 1565–1573.
15. А. А. Замятин. Нейрохимия. М.: Наука, 1990. 215 с.