

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра биохимии

**О.Н. Макурина**

# **ХИМИЯ БЕЛКА И ФЕРМЕНТОВ**

Часть I

## **ХИМИЯ БЕЛКА**

Самара

Издательство «Универс групп»

2007

Печатается по решению Редакционно-издательского совета  
Самарского государственного университета

УДК 577.11  
ББК 22.0  
М 15

**Рецензент**

доктор биологических наук, профессор В.Г. Подковкин

**Макурина, О. Н.**

М 15 Химия белка и ферментов. Часть I. Химия белка [Текст]: учебное пособие / О.Н. Макурина. – Самара : Изд-во «Универс групп», 2007 – 100 с.

ISBN 978-5-467-00133-3

Учебное пособие содержит современные представления об особенностях структурно-функциональной организации аминокислот, пептидов, белков. Включает информацию о некоторых физико-химических свойствах белков и особенностях их пространственной укладки.

Предназначено для студентов 3 курса дневного отделения и 4 курса очно-заочного отделения университета специальности «Биология», а также может быть использовано студентами педагогических, медицинских и сельскохозяйственных вузов.

УДК 577.1  
ББК 22.0

ISBN 978-5-467-00133-3 © Макурина О.Н., 2007  
© Самарский государственный университет,  
2007

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Белки представляют собой продукт длительного эволюционного процесса, насчитывающего более 2 миллиардов лет. Вещества белковой природы, скорее всего, возникли в процессе химической эволюции и получили свое дальнейшее развитие (приобретая и совершенствуя необходимые для жизнедеятельности свойства и функции) в ходе биологической эволюции. Аминокислотная последовательность белковых молекул, составляющих основу всех ныне живущих на Земле организмов, является результатом длительного естественного отбора между малыми молекулами, макромолекулами, различными механизмами реакций, то есть – результатом биологической эволюции.

Вещества белковой природы (белки и пептиды) являются важнейшим классом органических соединений, играющих основополагающую роль в жизнедеятельности любой живой клетки, а также вирусов. На долю этих соединений приходится не менее 50% сухой массы органических веществ клетки. В природе существует несколько миллиардов химически индивидуальных белков, разнообразных не только по структуре, но и по функциям.

В принципе, белки могут выполнять все известные в природе функции, кроме одной – синтезировать сами себя. Так, почти монополярной функцией белков является катализ химических реакций в живых системах; регуляторную функцию выполняют белки, контролирующие биосинтез белков и нуклеиновых кислот, а также гормоны; защитная функция характерна для иммуноглобулинов, белков комплемента и цитокинов иммунной системы, антибиотиков и токсинов; механическую работу способны выполнять такие белки, как актин и миозин, белки жгутиков бактерий и ресничек простейших, белки цитоскелета (обеспечивающих расхождение хромосом к полюсам клетки при ее делении и изменение формы клеток); белки биомембран способны выполнять ряд уникальных функций – рецепторную (например, рецепторы гормонов и других лигандов), сигнальную (белки-эффекторы, G-белки), транспортную (разнообразные АТФазы, пере-

носчики сахаров, липидов и аминокислот); структурную функцию выполняют белки, составляющие основу костной и соединительной ткани, шерсти, копыт, чешуи, рогов, когтей, шелка, а также белки микрофиламентов и микротрубочек цитоскелета любой клетки; белки, для которых свойственна запасающая функция, широко распространены в природе – это казеин молока и альбумин яиц, белки семян и плодов растений; многие белки являются необходимой составной частью пищи человека и животных, поскольку содержат незаменимые для живых организмов компоненты (например, незаменимые аминокислоты).

Функции белков всегда индивидуальны и универсальны, однако, в основе их функционирования лежат некоторые общие принципы молекулярной организации этих соединений. Это можно объяснить тем, что белки работают в большинстве случаев по принципу комплементарности, то есть соответствия их пространственной структуры строению и химической природе других молекул. По такому принципу работают ферменты, рецепторы, многие транспортные системы, иммуноглобулины и т.д. Для такого уникального взаимодействия необходима достаточно прочная пространственная конформация молекул белков. Именно поэтому биологическая функция белков однозначно определяется их трехмерной организацией. Даже незначительные изменения подобной структуры ведут к резкому изменению или полной потери активности белков.

Изучение белков во многом определяется уровнем развития методического обеспечения, совершенствованием существующих технологий, разработкой новых методов (например, методов генной инженерии). Можно выделить пять основных задач, позволяющих на разных уровнях решить проблему белка: 1) исследования химического строения белковых молекул; 2) исследования пространственного строения белков; 3) изучение структурной организации белков (изучение взаимосвязи между аминокислотной последовательностью, с одной стороны, и пространственной формой и динамическими, конформационными свойствами белковой молекулы – с другой); 4) ис-

следование структурно-функциональной организации белков (установление закономерностей между строением и биологическими и физиологическими свойствами белков); 5) исследование структурно-функционально-эволюционной организации белков (изучение белков с эволюционной точки зрения, как исторические объекты, некогда возникшие на Земле и постоянно развивающиеся).

Любая открытая биологическая система и любая часть этой системы – это производство белков. Поэтому без глубокого знания их структурной, функциональной и эволюционной организации и развития нельзя понять общих закономерностей строения, свойств и развития сложных организмов.

# ГЛАВА 1

## АМИНОКИСЛОТЫ

Вещества белковой природы представляют собой полимеры, мономерами которых являются  $\alpha$ -аминокислоты. Только 20 *L*-аминокислот (так называемые – основные, белковые, стандартные, кодируемые) могут формировать полипептидную цепь в процессе трансляции, то есть их положение в цепи кодируется генами. Это один из примеров биохимического единства биосферы. Однако в природе значительно больше аминокислот, в том числе и тех, которые встречаются в белках и пептидах. Аминокислоты, отличающиеся от кодируемых, называют *нестандартными* (например, орнитин, цитруллин,  $\gamma$ -аминомасляная кислота и др.), некоторые из них образуются в процессе посттрансляционной модификации стандартных аминокислот. Так, например, в природных антибиотиках и токсинах часто встречаются *D*-аминокислоты, цистин, гидроксипролин, тироксин и др. Присутствие производных аминокислот часто приводит к появлению уникальных свойств белков – устойчивости к нагреванию и обработке детергентами, усилению биологической функции, изменению вкусовых качеств и пр.

Для понимания свойств аминокислот как свободных метаболитов и как компонентов веществ белковой природы следует знать, что: 1) аминокислоты существуют преимущественно в форме биполярных ионов (цвиттерионов); 2) аминокислоты асимметричны и образуют два семейства – *D* и *L*; 3) аминокислоты отличаются друг от друга структурой боковых групп (боковых цепей, радикалов). Эти группы имеют разную химическую структуру. Они выступают из основной цепи и формируют в значительной степени поверхность полимера, определяя многие химические и физические свойства пептидов и белков [10].

Ниже приведены структурные формулы радикалов аминокислот, обычно встречающихся в белках (структурная формула пролина – аминокислоты – приведена полностью):

## Алифатические

Глицин	Гли	—Н	$\alpha$ -Аминоуксусная кислота. Неполарная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 57. Выступает в роли простейшего связующего звена в цепи белка, обеспечивая минимальные стерические препятствия при вращении и размещении соседних групп.
Аланин	Ала	—СН <sub>3</sub> СН <sub>3</sub> 	$\alpha$ -Аминопропионовая кислота. Неполарная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 71.
Валин	Вал	—СН   СН <sub>3</sub>	
Лейцин	Лей	СН <sub>3</sub>   —СН <sub>2</sub> —СН   СН <sub>3</sub>	$\alpha$ -Аминоизокапроновая кислота. Неполарная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 113.
Изолейцин	Иле	СН <sub>3</sub>   —С—Н   СН <sub>2</sub> —СН <sub>3</sub>	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -метилвалериановая кислота. Неполарная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Имеет еще один хиральный центр. Молекулярная масса – 113.

## Гидроксиаминокислоты

Серин	Сер	—СН <sub>2</sub>   ОН	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -оксипропионовая кислота. Полярная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 87. —ОН-группа имеет очень слабые кислотные свойства. Способна к образованию эфиров фосфорной и органических кислот и служит местом присоединения сахарных колец в гликопротеидах. Гидроксильные группы серина обнаружены в активных центрах ряда ферментов.
Треонин	Тре	—СН—ОН   СН <sub>3</sub>	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -окси- <i>n</i> -масляная кислота. Полярная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 101. Имеет еще один хиральный центр. Здесь показана конфигурация боковой цепи <i>L</i> -треонина. <i>D</i> -треонину соответствует противоположная конфигурация. <i>L</i> -аминокислота с противоположной конфигурацией боковой цепи называется <i>L</i> -алло-треонином.

## Дикарбоксильные

Аспарагиновая кислота	Асп	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—C=O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\alpha$ -Аминоянтарная кислота. Полярная, кислая, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 114.
-----------------------	-----	--	--

Глутаминовая кислота	Глу	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C=O} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	$\alpha$ -Аминоглутаровая кислота. Полярная, кислая, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 128. Карбоксильные группы боковых цепей аспарагиновой и глутаминовой кислот при нейтральных рН находятся в диссоциированном состоянии. Обуславливают присутствие отрицательного заряда на поверхности белка.
----------------------	-----	--	--

## Амиды дикарбоксильных аминокислот

Аспарагин	Асп	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—C=O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\beta$ -Амид- <i>L</i> -аспарагиновой кислоты. Полярная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 114.
-----------	-----	--	--

Глутамин	Глу	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—C=O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\gamma$ -Амид- <i>L</i> -глутаминовой кислоты. Полярная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 128. Амидные группы аспарагина и глутамина не обладают кислотными свойствами, но полярны и могут участвовать в образовании водородных связей
----------	-----	--	--

## Аминокислоты с катионообразующими группами в боковых цепях

Гистидин	Гис	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—C—N} \\    \quad    \\ \text{HC} \quad \text{CH} \\ \quad \backslash \quad / \\ \quad \text{NH} \end{array}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -имидазолилпропионовая кислота. Полярная, слабоосновная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 137. Основная группа несет на себе положительный заряд и может служить акцептором протона. Имидазольные группы боковых цепей гистидина составляют часть активного центра многих ферментов. Как и другие основные группы белков, они могут также связывать ионы металлов.
----------	-----	---	--

Лизин	Лиз	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha, \epsilon$ -Диаминокапроновая кислота. Полярная, основная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 129. Гибкая боковая цепь с реакционноспособной аминогруппой на конце. В нейтральных растворах всегда протонирована.
-------	-----	---	--

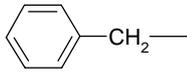
Аргинин	Арг	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2$   $\text{NH}_2$	$\alpha$ -Амино- $\gamma$ -гуанидиновалериановая кислота. Полярная, основная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 157. Гуанидиниевая группа в большинстве случаев остается протонированной. Эта группа имеет важное значение как центр связывания фосфатных групп.
---------	-----	---	--

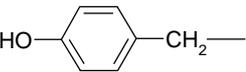
### Серосодержащие аминокислоты

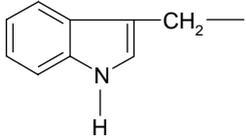
Цистеин	Цис	$-\text{CH}_2-\text{SH}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -меркаптопропионовая кислота. Полярная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 103.
---------	-----	--------------------------	--

Метионин	Мет	$-(\text{CH}_2)_2-\text{SH}-\text{CH}_3$	$\alpha$ -Амино- $\gamma$ -метилтио- $n$ -масляная кислота. Полярная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 131.
----------	-----	--	---

### Ароматические аминокислоты

Фенилаланин	Фен		$\alpha$ -Амино- $\beta$ -фенилпропионовая кислота. Неполярная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 147.
-------------	-----	---	---

Тирозин	Тир		$\alpha$ -Амино- $\beta$ -( $p$ -оксифенил)-пропионовая кислота. Полярная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 163. Имеет легко диссоциирующий протон, благодаря которому служит донором протона в водородных связях и функциональной группой в ферментативном катализе.
---------	-----	--	---

Триптофан	Три		$\alpha$ -Амино- $\beta$ -индолилпропионовая кислота. Неполярная, нейтральная, <b>незаменимая</b> аминокислота. Молекулярная масса – 186. Способна образовывать гидрофобные связи и особенно эффективно связывается с другими плоскими молекулами.
-----------	-----	---	--

### Иминокислота

Пролин	Про	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_2 \quad \text{CH}-\text{COOH} \\ \backslash \quad / \\ \text{NH} \end{array}$	Пирролидин-2-карбоновая кислота. Неполярная, нейтральная, заменимая аминокислота. Молекулярная масса – 97. Заслуживает внимания вторичный характер аминогруппы (пролин называют также иминокислотой) и жесткая конформация аминокислоты. Присутствие остатков пролина оказывает существенное влияние на характер укладки полипептидной цепи.
--------	-----	---	--

И хотя не так уж много разнообразных функциональных групп содержат аминокислотные остатки, но и их вполне достаточно для то-

го, чтобы обеспечить нативную конформацию белковых молекул благодаря таким связям, как ионные, водородные, дисульфидные, гидрофобные.

Приведенная выше классификация аминокислот основана на химической природе их радикалов. Однако существуют и другие типы классификаций аминокислот:

1. На основе полярности радикалов: а) *полярные* (в радикале есть полярные связи С—О, С—N и О—Н) – Гли, Сер, Тре, Цис, Тир, Асп, Глу, Асн, Глн, Арг, Лиз, Гис; б) *неполярные* (в радикале есть неполярные связи С—С и С—Н) – Ала, Вал, Лей, Иле, Мет, Фен, Три, Про.

2. На основе ионных свойств радикалов: а) *кислые* (радикал может нести отрицательный заряд) – Асп, Глу, Цис, Тир; б) *основные* (радикал может нести положительный заряд) – Арг, Лиз, Гис; в) *нейтральные* (радикалы незаряжены) – Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Мет, Фен, Сер, Тре, Асн, Глн, Про, Три.

3. На основе питательной ценности (для человека): а) *незаменимые* (не могут синтезироваться в организме человека) – Тре, Мет, Вал, Лей, Иле, Фен, Три, Лиз, Арг, Гис (две последних аминокислоты незаменимы только для детского организма); б) *заменимые* (могут синтезироваться в организме человека) – Гли, Ала, Сер, Цис, Про, Асп, Глу, Асн, Глн, Тир.

Частота, с какой разные аминокислоты встречаются в белках, неодинакова. Например, глицин обнаруживается в 10 раз чаще, чем триптофан. Из каждой тысячи аминокислотных остатков в белках на долю глицина приходится около 70, а на долю триптофана – около 7. Остальные аминокислоты по частоте нахождения в белках занимают промежуточное положение, образуя такой ряд: (Ала~Вал~Лей~Сер) > (Глу~Глн~Лиз~Арг~Про) > (Асп~Асн~Иле~Тре~Фен) > (Три~Цис~Мет~Гис). В таблице 1.1 приведен аминокислотный состав некоторых белков.

Большинство белков по аминокислотному составу различаются не очень резко. Но есть некоторые специализированные белки с особым аминокислотным составом. Например, основной белок со-

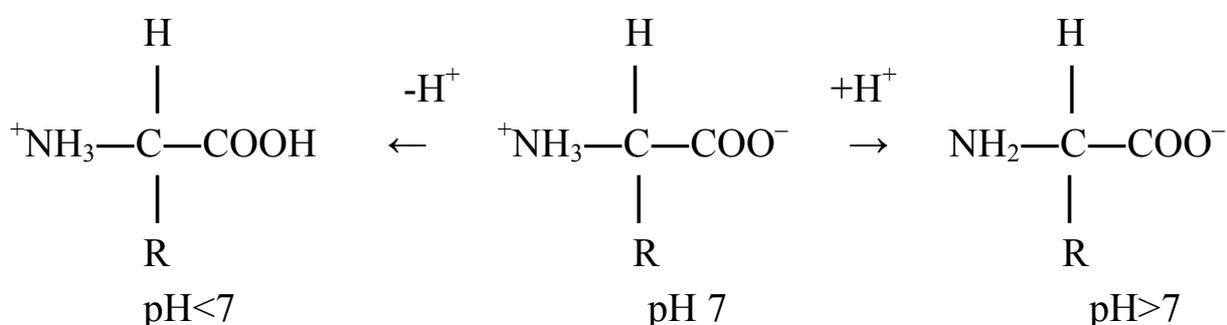
единительной ткани коллаген на 1/3 построен из остатков глицина, около 1/5 приходится на остатки пролина и оксипролина. Компактную укладку ДНК в хромосомах обеспечивают белки гистоны, на 1/3 построенные из остатков лизина и аргинина.

Таблица 1.1

Аминокислотный состав некоторых белков (число аминокислотных остатков на молекулу белка) [13]

Аминокислота	Кортикотропин	Цитохром с	Миоглобин	Лютеинизирующий гормон	Тромбин	Фосфоорилаза гликогена
Глицин	3	13	15	10	24	48
Аланин	3	6	12	11	12	63
Валин	3	3	7	18	19	62
Лейцин	1	6	17	12	20	79
Серин	3	2	7	14	15	29
Глутаминовая кислота	4	8	14	8	12	64
Глутамин	1	3	7	8	8	31
Лизин	4	18	20	9	19	48
Аргинин	3	2	2	13	18	63
Пролин	4	4	5	23	13	36
Аспарагиновая кислота						
Аспарагин	0	4	8	5	14	45
Изолейцин	0	8	8	6	15	49
Треонин	0	7	4	15	11	35
Фенилаланин	3	3	7	5	9	38
Тирозин	2	5	2	6	11	36
Цистеин	0	2	0	22	6	9
Метионин	1	3	3	4	7	21
Гистидин	1	3	9	6	5	22
Триптофан	1	1	2	1	7	12
<b>В с е г о</b>	<b>39</b>	<b>104</b>	<b>152</b>	<b>205</b>	<b>259</b>	<b>841</b>

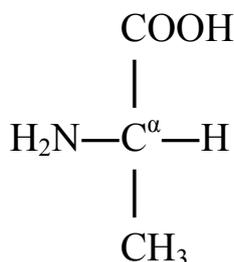
Свободные аминокислоты, имеющие в своем составе карбоксильную и аминогруппу, обладают рядом общих физико-химических свойств. Во-первых, поскольку все аминокислоты являются биполярными ионами (*цвиттерионами*), то они способны проявлять амфотерные свойства, то есть в зависимости от условий среды могут выступать в роли или кислот, или оснований. Так, в кислой среде суммарный заряд аминокислоты (являющийся скомпенсированным при рН 7) будет положительным и она сможет выступать в роли донора протонов водорода, то есть будет проявлять кислотные свойства. В щелочной среде аминокислота будет иметь суммарный отрицательный заряд и сможет проявлять свойства основания:



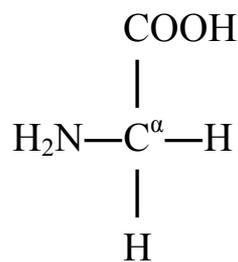
Значение рН, при котором заряды аминокислоты скомпенсированы, то есть аминокислота имеет вид биполярного иона, называется *изоэлектрической точкой*. В таком состоянии аминокислота не будет перемещаться в электрическом поле ни к катоду, ни к аноду. Если аминокислота имеет дополнительные ионогенные группы (глутаминовая кислота, лизин и др.), то при расчете изоэлектрической точки следует учитывать их вклад. Когда аминокислота приобретает суммарный положительный заряд (при рН < 7), в электрическом поле она будет перемещаться к катоду, а при рН > 7 суммарный заряд аминокислоты будет отрицательным и, следовательно, она будет передвигаться к аноду.

Во-вторых, во всех аминокислотах (кроме глицина) α-углеродный атом имеет четыре различных заместителя (*хиральный* атом углерода). Благодаря этой структурной особенности аминокислоты могут существовать в различных стереоизомерных формах, отличающихся

друг от друга различной пространственной ориентацией групп, присоединенных к  $\alpha$ -углеродному атому:

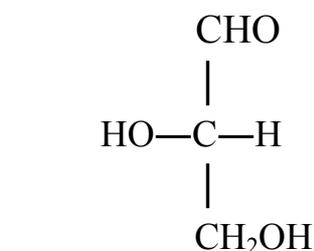


$\alpha$ -углеродный атом аланина  
хирален

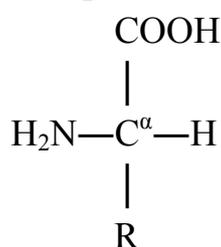


$\alpha$ -углеродный атом глицина нехирален

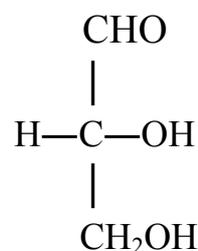
Для каждого хирального атома углерода, входящего в состав молекулы, реализуется две различные конфигурации (из 20 стандартных аминокислот только треонин и изолейцин имеют больше одного хирального атома углерода), соответствующие *L*- и *D*-стереоизомерам. Эти две структуры можно рассматривать как два несовместимых при наложении зеркальных отображения. Они называются *энантиомерами*. Обозначения *L* и *D* связывают конфигурации при  $\alpha$ -углеродном атоме с известными конфигурациями двух энантиомеров глицеральдегида:



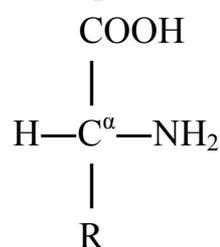
L-глицеральдегид



L-аминокислота



D-глицеральдегид



D-аминокислота

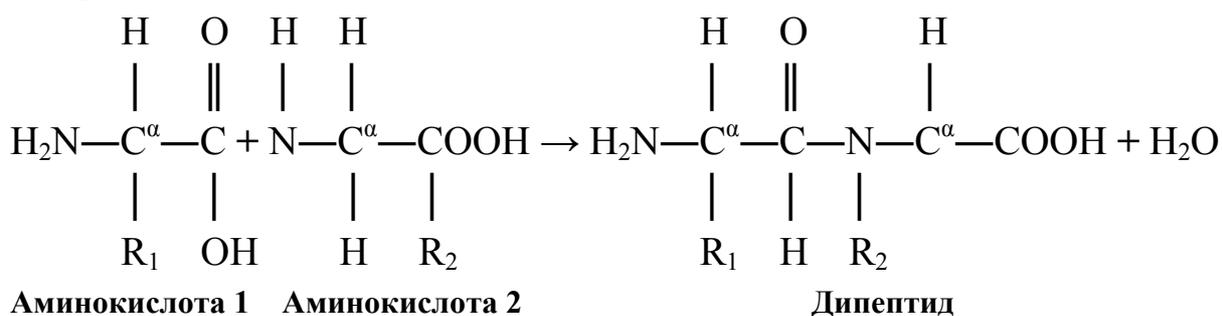
Подобная классификация аминокислот имеет биологическое значение. Первоначально в процессе биосинтеза в составе белков обнаруживаются только *L*-аминокислоты. Обнаруженные в белках *D*-

аминокислоты возникают после завершения синтеза белка в результате реакции *рацемизации*. Превращение *L*-формы аминокислот в *D*-форму и обратно является одним из метаболических процессов в живых организмах, причем равновесие этого метаболического процесса сильно смещено в сторону образования *L*-формы.

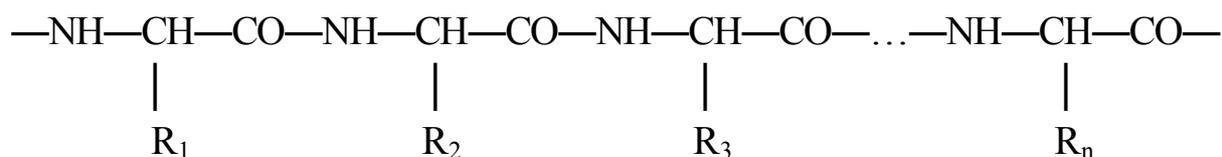
Когда метаболические процессы после смерти организма прекращаются, процесс превращения  $D \leftrightarrow L$  продолжается самопроизвольно с очень малой скоростью, приводя для каждой аминокислоты к соотношению *D/L*-энантиомеров, характерному для неметаболического равновесия. Для достижения такого равновесия могут потребоваться десятки тысяч лет. Метод определения геологического возраста образца основан на измерении соотношения *D/L*-энантиомеров аспарагиновой кислоты в образцах окаменелых костей. Результаты, полученные методом *D/L*-датирования, хорошо дополняют данные, полученные радиоуглеродным методом.

Показано, что повышение *D/L*-отношения для аспарагиновой кислоты в зубах живущих в настоящее время животных также коррелирует с биологическим возрастом. Зубы выбраны для исследования потому, что белки, присутствующие в зубных тканях (эмаль и дентин), не регенерируют в течение жизни. После синтеза на раннем этапе онтогенеза животного эти белки остаются совершенно неизменными в течение жизни организма и отражают, таким образом, неметаболический процесс взаимопревращения *D*- и *L*-форм. Пока остается неясным – связан ли процесс рацемизации аминокислот прямо с процессом старения живой материи, или же это вторичный эффект старения.

В-третьих, аминокислоты могут вступать в реакцию конденсации с образованием пептидов:



При синтезе белков аминокислоты теряют определенные группировки (ОН-группу и водород) и превращаются в *аминокислотные остатки*. Белковая цепь (последовательность аминокислотных остатков) имеет химически регулярный остов, в основе образования которого лежит пептидная (амидная) связь. От него отходят боковые группы аминокислотных остатков (радикалы – R), число которых кодируется геном и составляет от десятка (олигопептиды) до сотен тысяч (белки):



Поскольку химическая структура радикалов аминокислотных остатков разнообразна, то белок может приобретать определенные свойства и пространственную конформацию.

Набор аминокислот в белках различен, также как и отличается набор свободных аминокислот в клетках живых организмов. Такой набор имеет тканевую, органную и эволюционную специфичность. Так, аминокислотный состав тканей мозга значительно отличается от состава других тканей тем, что в мозге присутствует избыточное количество дикарбоновых аминокислот и их амидов (они составляют 2/3 от общего количества аминокислот в мозге). Причем, следует сказать, что молодые клетки характеризуются большей степенью амидированности аминокислот, чем старые клетки.

Некоторые аминокислоты выполняют важные функции благодаря наличию особых по химическому строению боковых групп (радикалов).

Гистидин, тирозин, триптофан и фенилаланин являются ароматическими аминокислотами и в связи с этим проявляют высокую химическую активность. Эта активность определяется системой сопряженных связей и делокализованных электронов и способностью этих группировок участвовать в реакциях нуклеофильных и электрофильных замещений. Ароматические аминокислоты входят в состав таких биологически активных соединений, как гормоны, медиаторы, коферменты. Например, происходит последовательное превращение:

Триптофан→Серотонин→Мелатонин→Мексамин  
Гистидин→Гистамин

Триптофан обладает очень широким спектром действия, в частности, влияет на липидный обмен и на синтез белков в печени; в малых дозах он обнаруживает гипогликемический эффект, а при больших дозах оказывает противоположный эффект, так как в сверхвысоких дозах триптофан выступает в роли конкурента гормонов желудочно-кишечного тракта и ингибирует специфические рецепторы этих гормонов на поверхности клеток, секретирующих инсулин. Недостаток триптофана переносится тяжелее, чем голод [19].

Гистидин, также как и триптофан, является незаменимой аминокислотой и тоже проявляет ряд регуляторных функций (за счет свойств боковой группы – имидазола). Эта группа принимает участие в окислительно-восстановительных реакциях и способна устанавливать координационные связи с переходными метаболитами. Он входит в активные центры многих ферментов (химотрипсин, рибонуклеаза, конвертаза), а также регуляторных пептидов (нейрокинины, карнозин, гистатин). Производное гистидина – гистамин – является медиатором, регулирующим сосудистое давление, проницаемость капилляров и аллергические реакции. Гистамин имеет клеточные рецепторы даже в головном мозге.

Гистидин, входящий в состав такого трипептида, как глутамил-гистидил-лизин, по-видимому, придает данному трипептиду такие свойства, как способность регулировать скорость роста и дифференциацию клеток. Кроме того, благодаря именно гистидину указанный выше трипептид обладает высокой селективностью в связывании ионов меди и других переходных металлов за счет их взаимодействия с имидазольным кольцом гистидина (благодаря имидазольному кольцу пептид приобретает способность участвовать в окислительно-восстановительных реакциях).

Гистидин и цистеин очень часто участвуют как кофакторы или активные центры ферментных систем в каталитических реакциях и обеспечивают многие антиоксидантные системы организма. Находясь

в составе мембранных белков, они ответственны за формирование электрического потенциала клетки и передачу электрохимического сигнала во внешнюю среду.

Цистеин встречается в составе пептидных регуляторов. При окислении их сульфгидрильные группы образуют внутримолекулярные S—S-связи, формирующие петли основной полипептидной цепи и фиксируют определенную конфигурацию всей молекулы. Так, глутатион, представляющий собой трипептид ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин), действует как антиоксидант, защищая сульфгидрильные группы ферментов и других белков. Глутатион играет также важную роль в восстановлении окисленного аскорбата.

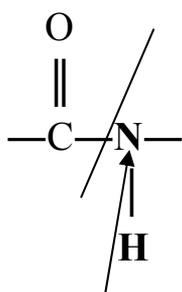
## ГЛАВА 2 ПЕПТИДЫ

### 2.1. Химическая природа и свойства пептидов

Согласно современным представлениям о классификации веществ пептидной и белковой природы, их принято делить на: 1) *олигопептиды* (короткие пептидные цепочки, содержащие от 2 до 10 аминокислотных остатков); 2) *пептиды* (цепочки из 10-20 аминокислотных остатков); 3) *полипептиды* (пептидные цепи, содержащие более 20 аминокислотных остатков, но не превышающих 50); 4) *белки* (полипептидные цепи, состоящие более, чем из 50 аминокислотных остатков). В отличие от белков пептиды и полипептиды, как правило, не имеют в растворе третичной структуры и не претерпевают необратимой денатурации [19]. Однако чаще всего в литературе используются термины пептиды (до 50 аминокислотных остатков в цепи) и белки (более 50 аминокислотных остатков).

В пептидах последовательно соединенные аминокислотные остатки ковалентно присоединены друг к другу путем образования связи между  $\alpha$ -карбоксильной группой одной аминокислоты и  $\alpha$ -аминогруппой другой аминокислоты. Образующаяся в результате этого амидная связь называется *пептидной*:

Из одной  
аминокислоты



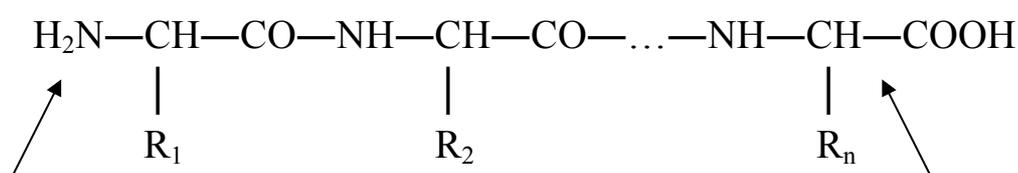
Из другой  
аминокислоты

Пептидная связь

Химические реакции, в результате которых образуется пептидная связь между двумя аминокислотами (см. главу 1), по сути представляют собой типичные реакции пептидного синтеза, происходящие в

живых клетках (биосинтез), а также в лабораторных условиях (химический синтез).

Если пептид содержит от двух до десяти остатков, такое соединение называют *олигопептидом*. Если число аминокислотных остатков в олигопептиде невелико, то можно дать ему название с помощью приставок, например – *дипептид*, *тетрапептид*, *гексапептид* и т.д. Пептиды, с более чем десятью аминокислотными остатками, называют *полипептидами*. Большинство пептидов имеют линейную цепочечную структуру с двумя концевыми остатками:



N-конец

C-конец

Поскольку изображение полной структурной формулы пептида слишком громоздко, обычно используют сокращенные условные обозначения или применяют тривиальные названия. При написании формулы линейных пептидов начинают с N-конца и указывают каждый остаток аминокислоты как ацильный заместитель  $\alpha$ -аминогруппы следующего остатка. Названия аминокислотных остатков внутри (кроме последнего) пептидной цепи образуются от названия соответствующей аминокислоты путем замены ее окончания на окончание *ил*:

1            2            3            4            5            6            7            8  
Аргинил-Глицил-Валил-Метионил-Серил-Тирозил-Аланил-Пролин

или просто: Арг-Гли-Вал-Мет-Сер-Тир-Ала-Про

Указывая мономерный состав пептида, следует обязательно привести три главных элемента его структуры: 1) какие аминокислоты входят в состав пептида; 2) каково относительное количество каждой аминокислоты; 3) каким образом они соединяются, то есть порядок соединения аминокислот в пептиде. Конечно, очень важно знать аминокислотный состав пептида, однако, именно последовательность

аминокислот определяет уникальность пептида. Именно последовательность аминокислотных остатков определяет общую трехмерную форму молекулы, которая в свою очередь является важнейшей характеристикой структуры, определяющей, каким образом молекула будет функционировать.

Поскольку пептиды содержат свободные амино- и карбоксильную группы, то они также как и аминокислоты, являются биполярными ионами, имеют изоэлектрическую точку и проявляют амфотерные свойства ( $\alpha$ -аминогруппа в пептидах становится менее основной, а  $\alpha$ -карбоксильная группа – менее кислотной). Растворимость пептидов зависит от размера молекулы и от химической природы входящих в неё аминокислотных остатков. Но в остальном химические свойства  $\alpha$ -аминной и  $\alpha$ -карбоксильной групп пептидов близки к таковым аминокислот. Так, пептиды могут вступать в реакции ацилирования, этерификации, арилирования, с альдегидами, с нингидрином и др.

Интересным являются свойства дипептидов. В частности, изменение заряда одной ионогенной группы дипептида оказывает влияние и на ее взаимодействие с неорганическими ионами ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  и др.), и на поляризуемость, и на суммарный дипольный момент пептида, а также изменяет ориентацию молекул окружающей воды, приводя к смещению баланса между гидратной и клатратной гидратацией всей молекулы дипептида. *Клатраты* – это клеточные гидраты, представляющие собой рыхлые гидратные структуры со средней плотностью  $0,79 \text{ г/см}^3$  (плотность льда составляет  $0,92 \text{ г/см}^3$ ). Клатраты устойчивы только при наличии в их полостях каких-либо молекул или атомов, не способных участвовать в водородных связях. Количество клатратной воды оказывается максимальным для гидратов гидрофобных веществ. Для каждого типа клатратных соединений имеется критическая температура, выше которой они разрушаются (плавятся).

Известно, что пептиды, боковые группы которых способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях (процессы присоединения и передачи электрона), обладают высокой биологической активностью. Дыхательные цепи и реакции фосфорилирования в

значительной степени определяются ходом окислительно-восстановительных реакций.

В связи с этим диапазон свойств и биологической активности дипептидов расширяется за счет более высокой чувствительности к изменению ионной силы и кислотности окружающей среды. Их активность в организме (по сравнению с отдельными аминокислотами) проявляется при меньших молярных концентрациях, но с большей селективностью. Примерами таких дипептидов могут служить регуляторные молекулы: карнозин ( $\beta$ -аланил-гистидин), тимоген (*L*-глутамил-*L*-триптофан) и вилон (*L*-лизил-*L*-глутаминовая кислота). Биологическая активность этих дипептидов напрямую связана со свойствами пептидов, описанными выше.

Карнозин обнаруживается во всех иннервированных тканях в концентрации до 20 мМ. В результате изменения степени диссоциации одного из атомов азота боковой группы гистидина, происходит перемещение электронной плотности по кольцу и обеспечивается участие гистидина в лигандных и окислительно-восстановительных взаимодействиях, в то время, когда его  $\alpha$ -аминогруппа включается в пептидную связь. Именно этими свойствами можно объяснить весьма благоприятное влияние карнозина на гликолиз и окислительное фосфорилирование, приводящее к увеличению количества образующегося АТФ.

Карнозин увеличивает эффективность процесса активного транспорта  $K^+$  и  $Na^+$  через плазматические мембраны различных клеток. Карнозин препятствует перекисному окислению липидов, активирует восстановление поврежденных тканей, обладает эффективным действием при лечении старческой катаракты. Карнозин защищает ткань мозга от образования амилоидных отложений белка (амилоидоз – системное заболевание – характеризуется отложением белково-углеводных комплексов в межклеточном пространстве нервной ткани). Защитный эффект карнозина при данной патологии обеспечивается электрон-акцепторной активностью имидазольного кольца гистидина (только в составе карнозина), препятствующего перекисному

окислению. Немаловажную роль в дестабилизации амилоидных отложений играет и  $\beta$ -структура аланина в составе карнозина [22].

Тимоген сочетает в своей структуре гидрофильную и гидрофобную части, которые в водном окружении располагаются с разных сторон от плоскости пептидной связи. Гидрофильная группа тимогена имеет отрицательный заряд. При условии, что остаток глутаминовой кислоты тимогена не находится в пирроформе, то его молекула имеет два локальных противоположно ориентированных дипольных момента (между С- и N-концами дипептида), а также между  $\alpha$ -амино- и карбоксильной группами остатка глутаминовой кислоты. Очень важной особенностью тимогена, как дипептида, является то, что он содержит и самую гидрофильную аминокислоту (глутаминовую), и самую гидрофобную (триптофан). Присутствие триптофана делает его сходным с нейропептидами класса нейромединов и пептидов-либеринов. В то же время тимоген обладает всеми иммуномодулирующими свойствами тималина, но значительно превосходит тималин по удельной активности [8, 11]. Большая гидрофобная группа триптофана облегчает взаимодействие тимогена с гидрофобными участками мембран.

Вилон, представляющий собой также дипептид, является структурным элементом многих тимических гормонов. Отличительной особенностью этого дипептида является резкое разделение электростатических зарядов между двумя его концами (положительно заряженный остаток лизина и отрицательно заряженный остаток глутаминовой кислоты). Благодаря такой своей особенности вилон активно участвует в электростатических (ион-ионных и ион-дипольных) взаимодействиях.

Введение вилонна мышам значительно увеличивает продолжительность их жизни и угнетает развитие злокачественных опухолей и новообразований. Этот дипептид оказывает влияние на экспрессию генов, имеющих отношение к регуляции клеточного цикла и мембранного транспорта, а также генов, имеющих отношение к обмену кальция [1].

Установлено, что регуляторное и иммуномодулирующее действие виллона на механизмы регенерации и канцерогенеза опосредовано стромальными клетками его микроокружения (тучные клетки, макрофаги, эндотелиальные и ретикулярные клетки, макрофаги) и реализуется через микроциркуляторное русло.

## **2.2. Строение и функции некоторых пептидов**

Исследованные к настоящему времени пептиды, как правило, имеют более, чем два, аминокислотных остатка и по этой причине диапазон их биологических функций более широк.

Природные пептиды очень часто отличаются по своей структуре от белков. Такие пептиды имеются во всех типах организмов. В структурном отношении пептиды весьма разнообразны: отличаются по размерам, наличию циклических структур, разветвленностью, наличию *D*-аминокислот, присутствием производных аминокислот (например, алло-гидроксипролина и др.), по уникальному строению пептидной связи или наличию других типов амидных связей (например, между  $\gamma$ -карбоксильной группой остатка глутаминовой кислоты и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина). Естественно, что и функции таких пептидов будут разнообразны.

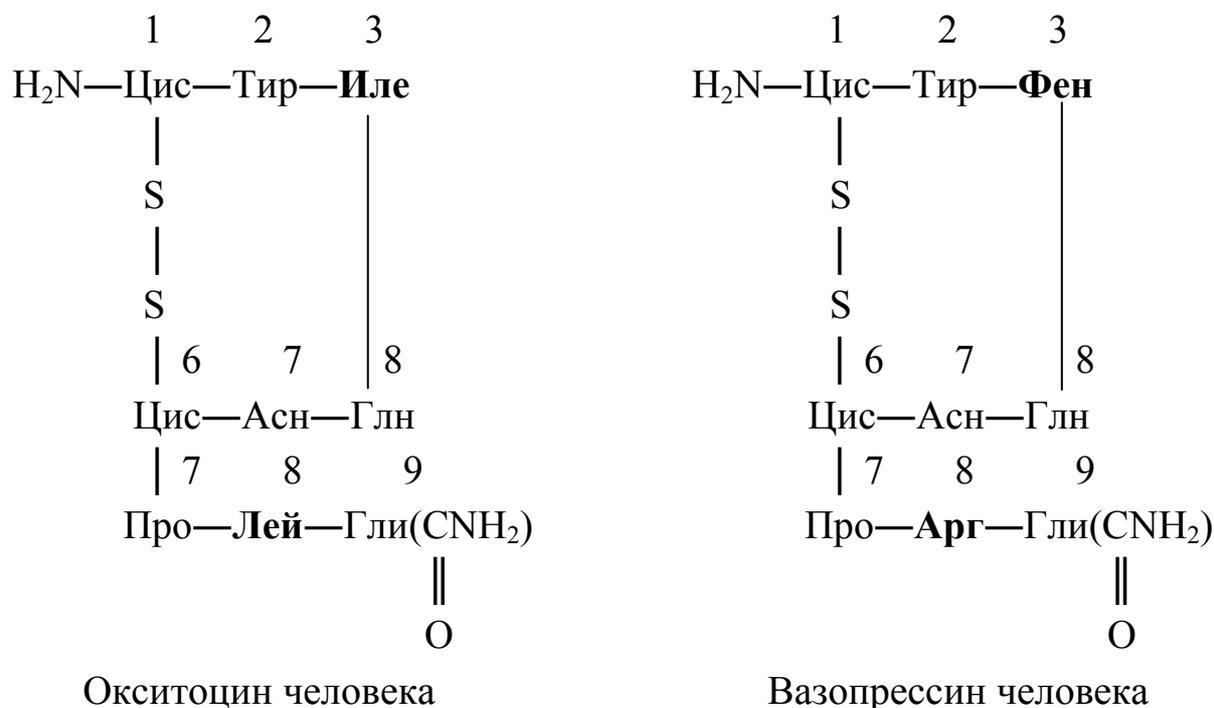
Природные пептиды могут представлять собой как промежуточные продукты деградации белков, так и самостоятельные молекулы, выполняющие специфическую физиологическую роль.

### ***2.2.1. Пептидные гормоны***

Одним из уникальных свойств живых организмов является их способность к саморегуляции всех метаболических процессов. У многоклеточных организмов, имеющих эндокринную систему, регуляция химических реакций осуществляется с помощью гормонов. У млекопитающих (в том числе и у человека) гормоны вырабатываются специализированными органами – различными железами внутренней и

смешанной секреции. Большинство гормонов представляют собой пептиды (небольшого и среднего размера) и белки.

Наиболее хорошо изучены такие гормоны, как *окситоцин* и *вазопрессин*, являющиеся циклическими нонапептидами (9 аминокислотных остатков, 1 дисульфидная связь):



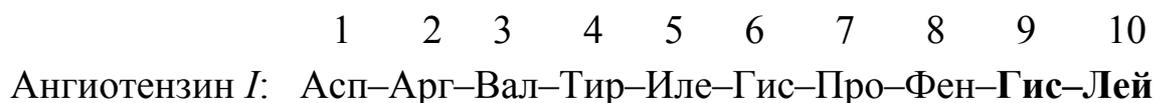
Эти пептиды состоят только из *L*-аминокислот, на С-конце имеют амидную группу, а не свободную карбоксильную группу COOH и отличаются друг от друга только двумя аминокислотными остатками в положениях 3 и 8. Окситоцин стимулирует сокращение матки у беременных самок и выделение молока из молочных желёз кормящих самок. Вазопрессин обладает сильным антидиуретическим действием (регулирует водный обмен), стимулируя реабсорбцию воды почками. Он также способствует распаду гликогена в печени, стимулирует сокращение гладких мышц, особенно стенок периферических артериол и капилляров, участвуя, таким образом, в повышении кровяного давления [3].

Некоторое функциональное подобие и в то же время индивидуальность этих гормонов согласуются с их химическими структурами. Сравнивая структуры и функции этих гормонов, становится очевид-

ным, что именно остатки 3 и 8 имеют определяющее значение при выполнении гормонами их физиологической роли. Так, важную роль для свойств окситоцина имеет неполярный алифатический остаток изолейцина в положении 3, а обладающий основными свойствами остаток аргинина в положении 8 особенно важен для свойств вазопрессина.

Оба гормона синтезируются в гипоталамусе и с помощью специальных белков-переносчиков (нейрофизинов *I* и *II*) поступают в нейрогипофиз. Эти гормоны были первыми биологически активными пептидами, выделенными из нервной ткани и именно поэтому их часто рассматривают как представителей нейропептидов.

*Ангиотензин II* является представителем так называемых *тканевых (кининовых) гормонов*, имеющих линейную структуру (октапептид), повышающим кровяное давление в результате стимулирования сокращения кровеносных сосудов. Кроме того, этот гормон оказывает действие и на центральную нервную систему, вызывая жажду и стимулируя секрецию вазопрессина гипофизом. Он также стимулирует секрецию клетками коры надпочечников стероидного гормона *альдостерона*, влияющего на солевой обмен в организме. Образуется ангиотензин *II* в результате отщепления дипептидного фрагмента (Гис—Лей) от его предшественника – *ангиотензина I* при прохождении последнего с кровью через легкие под действием фермента *ангиотензин-конвертазы*:



В свою очередь ангиотензин *I* (декапептид) образуется в результате расщепления *ренином* полипептида плазмы крови – *ангиотензи-*

*ногена* – между 10 и 11 аминокислотными остатками его полипептидной цепи, в результате чего и появляется декапептид.

Другими представителями тканевых гормонов, образующихся из предшественников и оказывающих регулирующее действие на кровяное давление и сокращение гладкой мускулатуры, являются *каллидин* (линейный декапептид) и *брадикинин* (нонапептид, возможны линейная и циклическая формы). Отличаются они лишь одним аминокислотным остатком – лизином:

Каллидин Лиз—Арг—Про—Про—Гли—Фен—Сер—Про—Фен—Арг

Брадикинин Арг—Про—Про—Гли—Фен—Сер—Про—Фен—Арг

Каллидин и брадикинин обладают во многом сходным действием – снижают кровяное давление (оказывают гипотензивный эффект), увеличивают проницаемость капилляров. Брадикинин в небольших концентрациях стимулирует сокращение гладкой мускулатуры кишечника, а в более высоких – сокращение мышц матки [14]. Брадикинин участвует в функционировании центральной нервной системы, является одним из медиаторов боли. Каллидин и брадикинин образуются из белка плазмы крови *кининогена*.

Процесс пищеварения в организме животных контролируется такими пептидными гормонами желудочно-кишечного тракта, как *гастрин* (17 аминокислотных остатков), *секретин* (27 аминокислотных остатков) и *холецистокинин-панкреозимин* (33 аминокислотных остатка).

Гастрин секретируется клетками многих отделов желудочно-кишечного тракта и его секреция стимулируется приемом пищи. Он оказывает стимулирующее действие на секрецию желудком соляной кислоты, влияет на сократимость желудка, ингибирует адсорбцию воды и электролитов подвздошной кишкой, стимулирует выделение ферментов. С-концевой пентапептид гастрина (Гли-Три-Мет-Асп-Фен) обладает практически полным биологическим действием гормона. Гастрин образуется из предшественника (молекулярная масса

7кДа), обнаруженного в плазме крови, и названным «большим гастрином».

Секретин стимулирует секрецию панкреатического сока и секрецию желчи.

Холецистокинин-панкреозимин получил двойное название, так как вызывает два физиологических эффекта: 1) сокращение желчного пузыря; 2) стимуляцию секреции пищеварительных ферментов поджелудочной железой. С-концевой октапептид этого гормона (Асп-Тир-Мет-Гли-Три-Мет-Асп-Фен) значительно активнее, чем нативная молекула.

К настоящему времени установлено, что гормоны желудочно-кишечного тракта (гастрин, холецистокинин и др.) образуются и в нервной ткани и, следовательно, обладают более широким спектром биологического действия [14].

Поджелудочная железа продуцирует такой пептидный гормон, как *глюкагон* (29 аминокислотных остатка). Этот гормон вызывает повышение уровня глюкозы в крови за счет стимуляции расщепления гликогена в печени, а также увеличивает содержание глюкозо-6-фосфата в мышцах и обладает липолитическим действием. Молекула глюкагона преимущественно находится в  $\alpha$ -спиральной конформации и склонна к образованию олигомеров.

*Кальцитонин* (32 аминокислотных остатка) способствует снижению концентрации ионов кальция ( $\text{Ca}^{2+}$ ) в крови, то есть он регулирует кальциевый обмен. Кроме того, кальцитонин стимулирует аденилатциклазу в костных клетках. Этот гормон синтезируется в парафолликулярных клетках щитовидной железы в форме прогормона.

### **2.2.2. Нейропептиды**

*Нейропептидами* называются вещества, обнаруженные в мозге (позвоночных и беспозвоночных животных) и способные влиять на функции центральной нервной системы. К этой же группе относят пептиды гипоталамуса и гипофиза, обладающие широким спектром действия [14]. В 1975 г. была открыта группа пептидов, которые ока-

зывали влияние на передачу нервного импульса. Поскольку эти пептиды впервые обнаружены в экстрактах тканей мозга, они получили название *энкефалинов* (от греч. «в голове»). Их также называют *опиатными пептидами*, поскольку механизм их действия сходен с механизмом действия морфина и других опиоидов. Они способны, аналогично морфину, подавлять боль и вызывать состояние эйфории.

Первые два энкефалина были выделены из мозга свиньи. Они были пентапептидами, различающимися только одним С-концевым аминокислотным остатком:

Мет-энкефалин	Тир—Гли—Гли—Фен— <b>Мет</b>
Лей-энкефалин	Тир—Гли—Гли—Фен— <b>Лей</b>

Это небольшое различие по составу определяет важные различия в их способности выступать в роли нейромедиаторов – при лабораторных испытаниях Мет-энкефалин показал примерно в 20 раз более сильный обезболивающий эффект, чем Лей-энкефалин. Считают, что обезболивающее действие – это одна из нормальных функций опиатных пептидов *in vivo*.

В 1975-1976 гг. были выделены и охарактеризованы другие пептиды, являющиеся эндогенными лигандами к морфиновым рецепторам – *α-эндорфин* (16 аминокислотных остатков), *β-эндорфин* (31 аминокислотный остаток), *γ-эндорфин* (17 аминокислотных остатков) и *δ-эндорфин* (19 аминокислотных остатков). Несколько позже был идентифицирован ряд опиоидных пептидов: *динорфин* (17 аминокислотных остатков), *α-неоэндорфин* (10 аминокислотных остатков) и *β-неоэндорфин* (9 аминокислотных остатков).

Из гидролизатов казеина был выделен *β-казоморфин*, а из кожи южноамериканской лягушки – *дерморфины А и В*:

β-Казоморфин	Тир—Про—Фен—Про—Гли—Про—Иле
Дерморфин А	Тир—D-Ала—Фен—Гли—Тир—Про—Сер—NH <sub>2</sub>
Дерморфин В	Тир—D-Ала—Фен—Гли—Тир—Гидрокси-Про—Сер—NH <sub>2</sub>

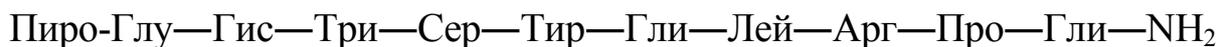
Биологическое действие опиоидных пептидов связано с регуляцией болевых ощущений, эмоционального поведения, памяти, обучаемости. Как и свои растительные аналоги, эти пептиды способны вызывать такие явления, как привыкание, физическую зависимость, угнетение дыхания и сердечной деятельности, то есть такие явления, которые характерны и для наркотиков. Считают, что механизм действия опиоидов основан на их участии в секреции таких нейромедиаторов, как дофамин, ацетилхолин, норадреналин и др. Большинство нейромедиаторов данной группы имеют в растворах очень подвижные конформации и их взаимодействие с рецептором можно объяснить на основе концепции «динамического фармакофора» (взаимного индуцированного соответствия лиганда и рецептора).

Английский физиолог Г.У. Харрис в начале 50-х годов высказал гипотезу о том, что гипоталамус координирует выработку аденогипофизом тропных гормонов. В конце 60-х годов американские исследователи Р. Гиллемин и Э. Шелли выделили особые факторы, вырабатываемые гипоталамусом, которые они назвали «релизинг-факторами». Позже эти вещества получили название *либертинов* и *статинов*. Поскольку релизинг-факторы выполняют регуляторную функцию, их часто рассматривают в группе регуляторных пептидов, а не нейропептидов.

Самым маленьким природным нейропептидом является *тиреолиберин* (трипептид), стимулирующий секрецию тиреотропина и пролактина:

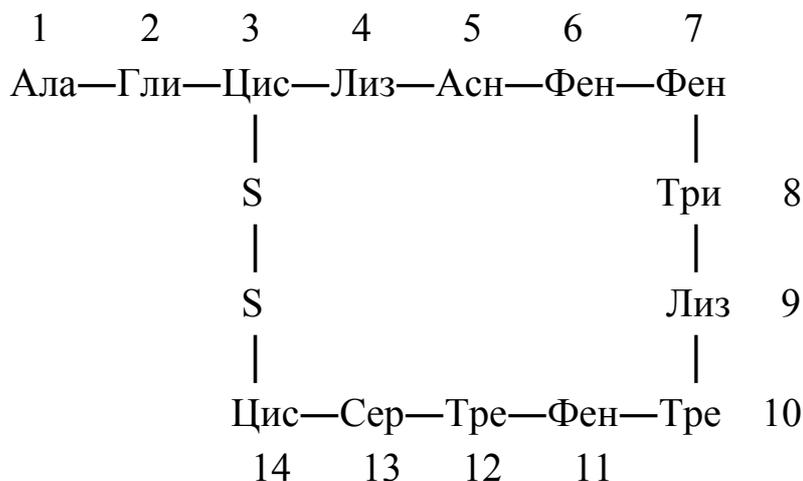


*Люлиберин* (нонапептид) обладает активностью, аналогичной тиреолиберина, а также он стимулирует секрецию аденогипофизом лютеинизирующего гормона, или лютропина:



В 1973 г. Р. Гиллемин выяснил структуру и функцию еще одного гипоталамического фактора – *соматостатина*, который ингибировал синтез гормона роста (соматотропина). Соматостатин является цик-

лическим пептидом, содержащим 14 аминокислотных остатков и имеющим одну дисульфидную связь:

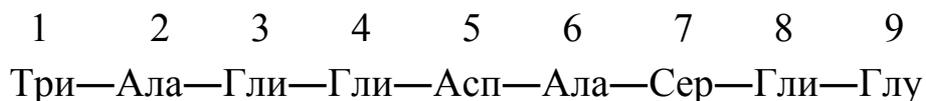


Соматостатин ингибирует секрецию не только соматотропина, но и тиротропина, инсулина, глюкагона, гастрина и секретина. Было обнаружено, что соматотропин синтезируется не только в гипоталамусе, но и в поджелудочной железе, в спинном мозге, в секреторных клетках вдоль всего желудочно-кишечного тракта. Этот нейропептид был первым гормоном животных, биосинтез которого был осуществлен с помощью методов генной инженерии (1977 г.).

К настоящему времени выделены и охарактеризованы и другие пептиды, относящиеся к группе либеринов и статинов (соматолиберин, пролактолиберин, пролактостатин, гонадолиберин, кортиколиберин и др.), которые проявляют тропную активность, а также действуют на кору больших полушарий, мозжечок, влияют на поведение и двигательные функции.

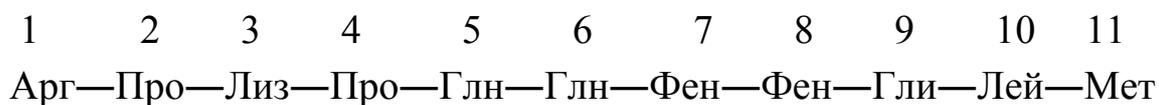
В последнее время большое внимание уделяется изучению природы сна и механизмов его регуляции. Считается, что основополагающую роль в процессе сна играют особые нейропептиды. В 1977 г. Швейцарские ученые М. Моннье и Г. Шененбергер установили строение пептида (9 аминокислотных остатков), который был выделен из церебральной венозной крови кроликов, подвергнутых электрической стимуляции сна [14]. Ученые назвали обнаруженный пептид *DSIP* (*δ-sleep inducing peptide*). При введении этого пептида контрольной группе животных (не подвергавшихся электростимуля-

ции), у них появлялись поведенческие и электроэнцефалографические изменения, характерные для медленно-волнового сна:



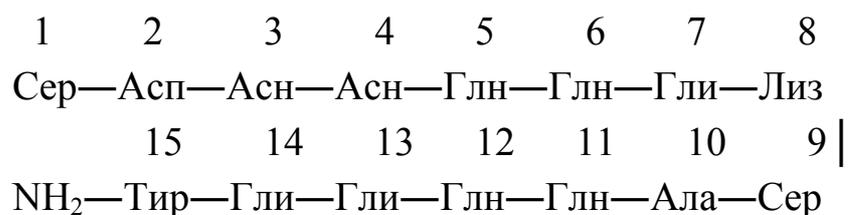
Было установлено, что DSIP приводит в норму и улучшает характеристики возмущенного, нарушенного сна, а также повышает устойчивость к стрессу и помогает при бессоннице. Отечественным ученым В.Т. Ивановым было выявлено существование этого пептида в двух формах: свернутой (квазициклической) и развернутой, находящихся в организме в равновесии. Вероятно, квазициклическая структура ответственна за биологическую функцию, поскольку именно она обладает значительной гипногенной и антистрессорной активностью.

В 1971 г. установлена структура нейропептида, обладающего способностью стимулировать сокращение гладкой мускулатуры, расширять сосуды и регулирующего слюноотделение. Его назвали *вещество Р*:



Вещество *Р* регулирует двигательную активность и болевые ощущения, оказывает влияние на эмоции и поведение (подавляет агрессию). Считают, что этот нейропептид выполняет нейромодуляторные и нейромедиаторные функции. Вещество *Р* в достаточном количестве содержится в гипоталамусе, субстанции *nigra* и других отделах головного мозга, а также в спинном мозге.

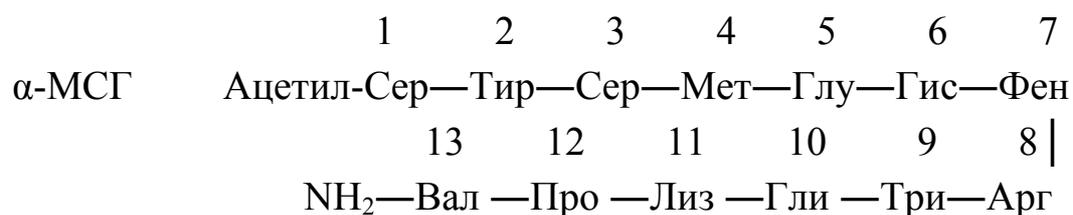
Очень интересной группой нейропептидов являются *пептиды-коннекторы*. В 1972 г. Г. Унгар (США) установил, что если крысу приучить избегать темноты, то в ответ на этот условный рефлекс в мозге животного синтезируется особое вещество, названное *скотофобином*:

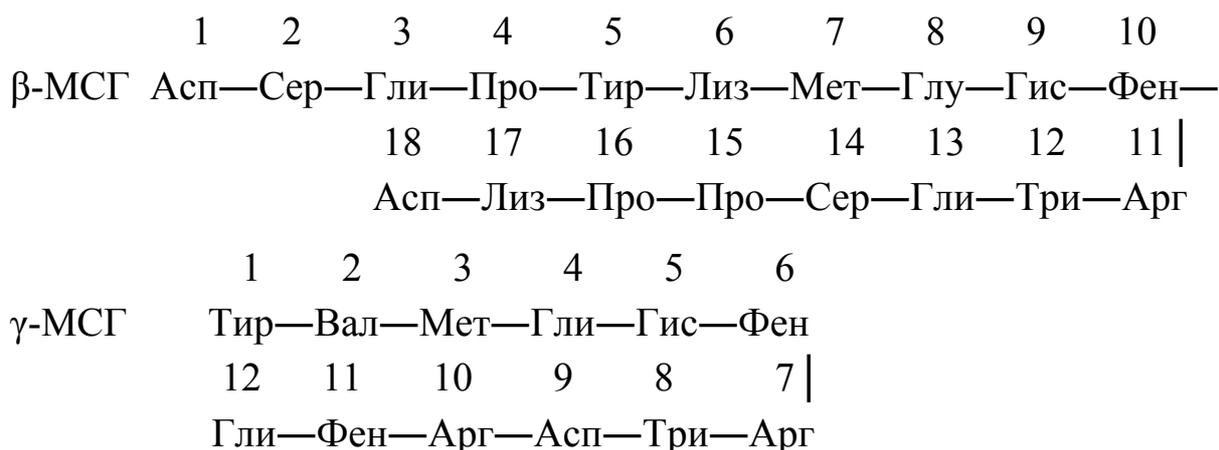


При введении этого пептида контрольным животным рефлекс воспроизводился полностью. Аналогичные пептиды-коннекторы позднее были выделены из мозга белых крыс и золотых рыбок (*амелитин*, *хромодиопсин*, *катабатмофобин* и др.).

Клетки передней доли гипофиза вырабатывают 39-членный полипептид, называемый *адренотропным гормоном* (*кортикотропином*, *АКТГ*). Он обладает широким спектром биологического действия. Так, он стимулирует кору надпочечников (вырабатывающую кортикостероиды), проявляет липотропную активность (стимулируя синтез жирных кислот в жировых клетках), снижает уровень глюкозы в крови, влияет на белковый обмен, нервную систему, поведение животных. Анализ биологического действия данного гормона и его синтетических аналогов позволяет предположить, что фрагмент (1-24) обладает практически полной активностью АКТГ. Другой участок (25-33) служит «антигенной детерминантой» при определении видовой специфичности и несуществен для проявления гормональной активности. Два других участка (4-10 и 11-20) очень важны для генерации биологического стимула и связывания гормона с клеточными рецепторами. Небольшой фрагмент (4-10), получивший название «актон», входит в структуру некоторых других гормонов гипофиза (*меланотропина* и др.). Еще более короткий участок АКТГ (4-7) влияет на формирование такого условного рефлекса у крыс, как обучаемость.

Из промежуточной доли гипофиза выделены нейропептиды, получившие название *меланостимулирующих гормонов* (*меланотропины*, *МСГ*):





Эта группа пептидов стимулирует пигментные клетки (меланоциты), что приводит к усилению биосинтеза пигмента меланина.

Сравнение аминокислотных последовательностей АКТГ и МСГ показало, что  $\alpha$ -меланотропин представляет собой небольшой фрагмент АКТГ (с 1 по 13 аминокислотные остатки). Но в  $\alpha$ -МСГ были выявлены некоторые отличия: N-концевая группа серина ацетилирована, а C-концевой валин – амидирован.  $\alpha$ - и  $\beta$ -МСГ являются частью препроопиомеланокортина. Сравнительно недавно установлено, что  $\beta$ -меланотропин не является истинным гормоном, а возникает в результате расщепления белкового гормона  $\beta$ -липотропина.

Поскольку меланотропины были обнаружены и в гипоталамусе, считают, что одной из основных функций этих гормонов является регуляция деятельности центральной нервной системы [14].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что многие нейропептиды мозга синтезируются из более крупных предшественников. В 1979 г. Ш. Нума с соавторами установили нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок-предшественник – *препроопиомеланокортин* (около 400 аминокислотных остатков). Этот белок содержит в своем составе сигнальный пептид,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -МСГ, АКТГ,  $\alpha$ - и  $\beta$ -липотропин,  $\beta$ -эндорфин. Процессинг белка происходит под действием преимущественно трипсиноподобных ферментов группы катепсинов *B* или катепсинов *D* и приводит к расщеплению молекулы исключительно по остаткам основных аминокислот: лизина и аргинина. Однако было также установлено, что процессинг в разных клетках протекает по-разному.

Кроме препроопиомеланокортина, известны еще два белка-предшественника опиоидных пептидов: *проэнкефалин* (для нескольких молекул Мет-энкефалина и одной молекулы Лей-энкефалинов) и *продинарфин* (для  $\alpha$ -неоэндорфина, динарфинов,  $\beta$ -эндорфина).

Преобразование большой неактивной молекулы белка-предшественника в активные молекулы меньшего размера можно назвать *молекулярной стратегией*, характерной для многих белков живых организмов. Так, инсулин образуется из особого белка-предшественника и только после его химической модификации возникает биологически активная молекула гормона, вырабатываемого поджелудочной железой. Если из одного предшественника образуется несколько активных продуктов, то такую молекулу можно назвать *мультифункциональной*.

### 2.2.3. Пептидные токсины

Токсины, выделяемые из биологических объектов, издавна интересовали человека и использовались им. Так, в истории описаны случаи отравления сильнейшими токсинами растительной природы (рицин из клещевины) и ядами грибов (токсины бледной поганки). Самыми мощными токсинами микробного происхождения являются столбнячный, дифтерийный, холерный и ботулинический. Укусы многих животных также могут быть смертельны для человека, так как в их организме вырабатываются специфические токсины – зоотоксины змей, пауков, скорпионов, морских беспозвоночных. Яд пчел и некоторых змей используется человеком для приготовления лекарств. Некоторые токсины используются в качестве высокоспецифичных инструментов в молекулярной биологии (при изучении механизмов синтеза белков), а также при исследовании механизмов нервной проводимости и гормональной регуляции.

В 60-70-е годы прошлого столетия Т. Виланд установил строение двух главных токсинов бледной поганки (*Amanita phalloides*) – *фаллоидина* и  *$\alpha$ -аманитина*. Выделенные микотоксины являются бициклическими пептидами, содержащими большое количество производных стандартных аминокислот и уникальные ковалентные связи (рис. 2.1).

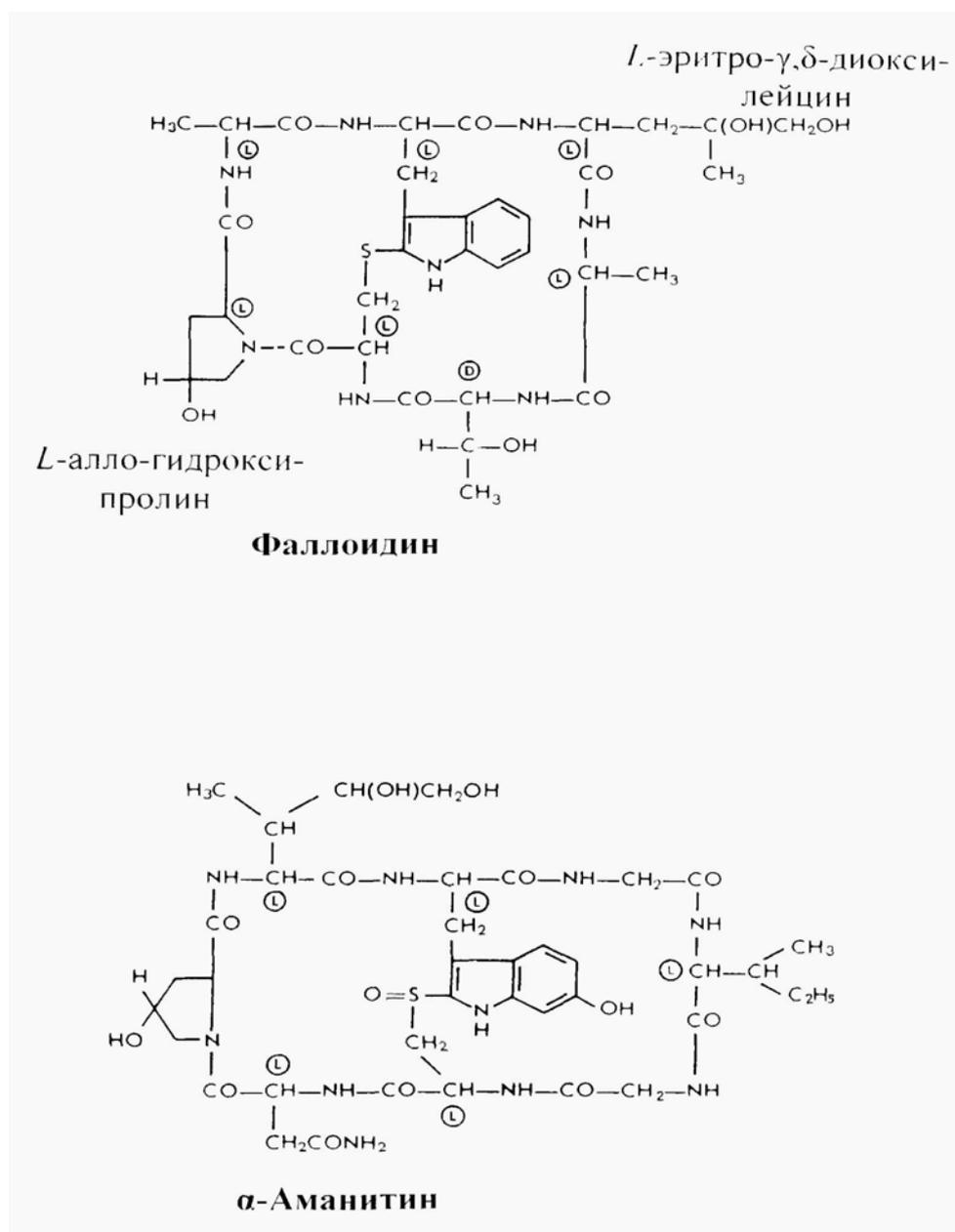


Рис. 2.1. Структурные формулы токсинов бледной поганки: фаллоидина и α-аманитина [14]

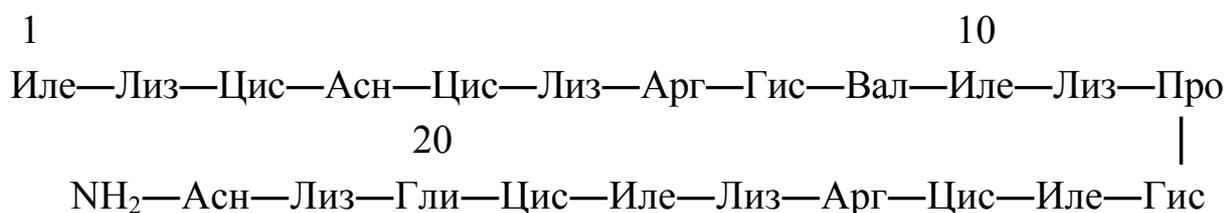
Мостиком в бициклических системах этих микотоксинов служит бифункциональная аминокислота *триптофин* (продукт окислительной конденсации *L*-треонина и *L*-цистеина). Кроме того, в состав этих соединений входят *L*-аллогидроксипролин, *D*-треонин, *L*-эритро-γ,δ-гидрокси-лейцин. Позднее были выделены и другие токсины группы аматоксинов (рис. 2.2)





Мишенью действия апамина являются  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые  $\text{K}^+$ -каналы. Он специфично и с высоким сродством связывается с соответствующими рецепторами ( $Kd \approx 2 \cdot 10^{-14}$  М).

Еще один токсин, выделенный из яда пчел, получил название *penmid 401* (или *MCD*-пептид – *Must Cell Degranulating peptide*). Он приводит к выделению гистамина из тучных клеток, что вызывает воспалительные явления. Этот пептид (22 аминокислотных остатка) не оказывает действия на нервную систему, хотя и имеет некоторое сходство с апамином:



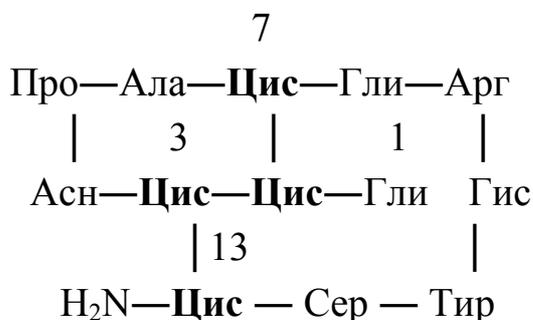
Из ядов змей семейства элапидов (кобры, мамбы, крайты) выделены нейротоксины постсинаптического действия, блокирующие рецепторы ацетилхолина. Эти токсины можно разделить на два класса: 1) «короткие» токсины (60-62 аминокислотных остатка, 4 дисульфидных связей); 2) «длинные» токсины (71-74 аминокислотных остатка, 5 дисульфидных связей). Эти нейротоксины обладают высокой устойчивостью: они выдерживают кипячение в кислой среде в течение 30 минут или обработку 8 М раствором мочевины в течение 24 часов.

Из яда южноамериканской гремучей змеи (*Crotalus d. terrificus*) выделен нейротоксин, названный *кротамином* (42 аминокислотных остатка, 3 дисульфидных связи). Этот токсин действует на натриевые каналы электровозбудимых мембран оксонов.

Нейротоксины из яда скорпионов представляют собой гомологичные полипептиды молекулярной массой 6000-8000 Да с четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями. Они менее устойчивы, чем яды змей. Яд скорпионов содержит токсины, действующие избирательно на один из классов животных: насекомых, ракообразных или млекопитающих. Нейротоксины скорпионов замедляют скорость инактивации быстрых натриевых каналов.

Из стрекательных клеток морских анемонов и актиний были выделены токсичные полипептиды молекулярной массы около 5000 Да, действующие на быстрые натриевые каналы электровозбудимых мембран и влияющие на процесс их инактивации. Так, из клеток средиземноморской анемоны *Anemonia sulcata* выделен *токсин II*, состоящий из 47 аминокислотных остатков (среди которых много гидрофобных остатков) с тремя дисульфидными связями.

Из морского моллюска *Conus geographus* была выделена группа нейротоксинов – *конотоксинов*. По механизму действия они подобны постсинаптическим нейротоксинам из ядов змей, но почти на порядок превосходят их по токсичности. Конотоксины состоят из 13-15 аминокислотных остатков с двумя дисульфидными связями:



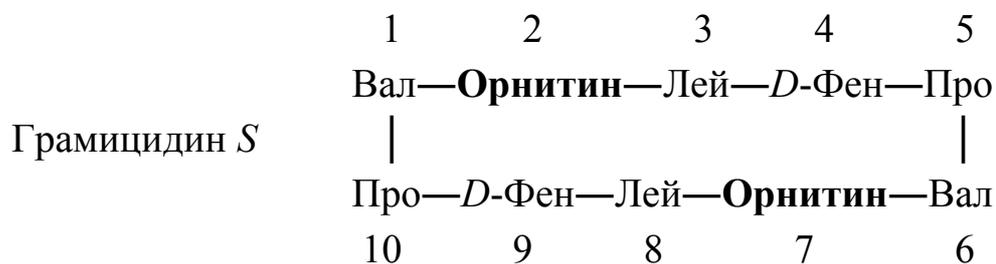
#### 2.2.4. Пептидные антибиотики

Природная биологическая роль антибиотиков, вероятно, сводится к самозащите микроорганизмов, которые их производят, и для осуществления химического узнавания в биоценозе.

Антибиотики очень широко применяются в качестве химиотерапевтических средств при лечении многих заболеваний человека и животных. Некоторые из них оказывают бактерицидное действие, другие – бактериостатическое. Есть антибиотики, которые являются регуляторами иммунитета. Ряд антибиотиков используется в качестве инструментов при изучении механизма действия биомембран.

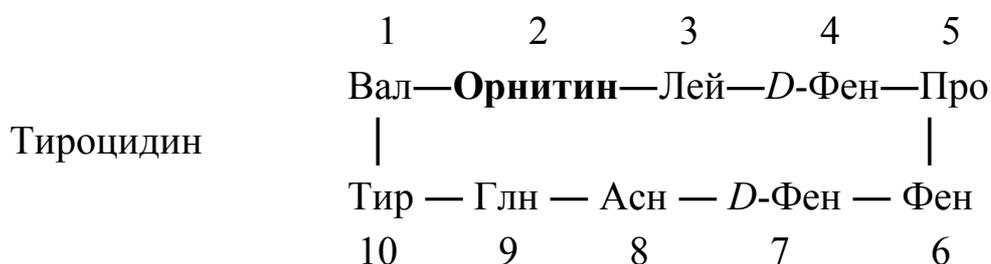
В 1942 г. Г.Ф. Гаузе и М.Г. Бражниковой из культуральной среды *Bacillus brevis* был выделен антибиотик *гармицидин S* («S» означает «советский»). С помощью рентгеноструктурного анализа установле-

но, что этот антибиотик имеет циклическую структуру (10 аминокислотных остатков, четыре внутримолекулярных водородных связи), содержит *D*-фенилаланин и 2 остатка орнитина:



Грамицидин *S* подавляет грамположительные и слабые грамотрицательные бактерии и в связи с этим широко применяется в медицинской практике (в частности, для полоскания горла при ангине). Предполагают, что механизме действия этого антибиотика связан, во-первых, с взаимодействием с фосфолипидами мембран бактерий, приводящим к их разрушению и, во-вторых, с его участием в трансмембранном транспорте нуклеотидов. Биосинтез грамицидина *S* идет без участия рибосомного аппарата, но осуществляется с помощью ферментных систем (комплексом, названным *грамицидин-S-синтетазой*), в которых осуществляется активация аминокислот и их последовательное соединение друг с другом с помощью пептидных связей.

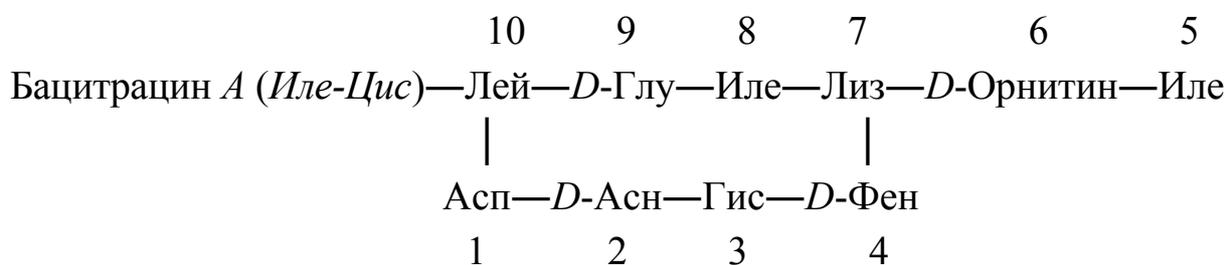
Группа *тироцидина* – это антибиотики, которые по строению и характеру действия очень близки к грамицидину *S* (содержат орнитин и *D*-фенилаланин):



Эти антибиотики могут также образовывать комплексы с ДНК, участвуя, таким образом, в регуляции активности генов.

*Бацитрацин А* – это основной представитель группы антибиотиков, называемых *бацитрацинами*, которые были открыты в 1945 г.

Молекула бацитрацина *A* представляет собой циклолинейный пептид (10 аминокислотных остатков), содержащий необычные элементы – тиазолиновое кольцо, образовавшееся из С-концевого дипептида *Иле-Цис*, остатки *D*-аминокислот и орнитина:



Этот антибиотик очень активен против грамположительных бактерий и по спектру действия напоминает пенициллин. Бацитрацин *A* нарушает регенерацию липидного переносчика, участвующего в биосинтезе клеточной стенки бактерий, что приводит к гибели микроорганизма.

Группу мембрано-активных пептидных антибиотиков составляют *полимиксины*. Они имеют циклолинейную структуру и сильноосновные свойства за счет наличия нескольких остатков  $\alpha,\gamma$ -диаминомасляной кислоты (*ДМК*): в 1, 5, 8 и 9 положениях – *L*-*ДМК*, а в 3 – *D*-*ДМК* (Рис. 2.3).

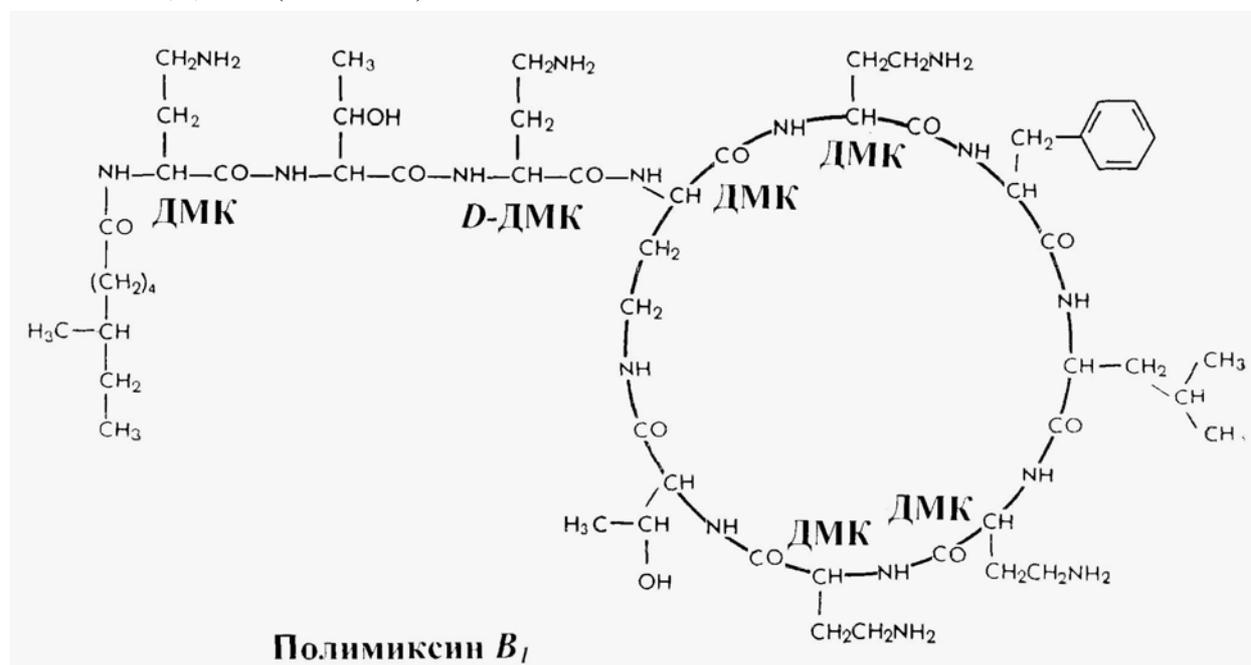


Рис. 2.3. Структура полимиксина В<sub>1</sub> [14]

Полимиксины обладают столь ярко выраженным бактерицидным действием против большинства грамотрицательных бактерий, что превосходят в этом отношении многие другие антибиотики.

Эти антибиотики, связываясь с фосфатными группами кардиолипина, фосфатидилэтаноламина или других кислых липидов, нарушают барьерные функции мембран бактерий, вызывая их гибель. Разрушение мембран микроорганизмов полимиксины могут вызвать в результате активации фосфолипазы этих организмов.

Группа антибиотиков, называемых *актиномицинами*, была выделена в 1940 г., но только через 20 лет была установлена их структура. Одним из типичных представителей этой группы антибиотиков является *актиномицин D* (рис. 2.4).

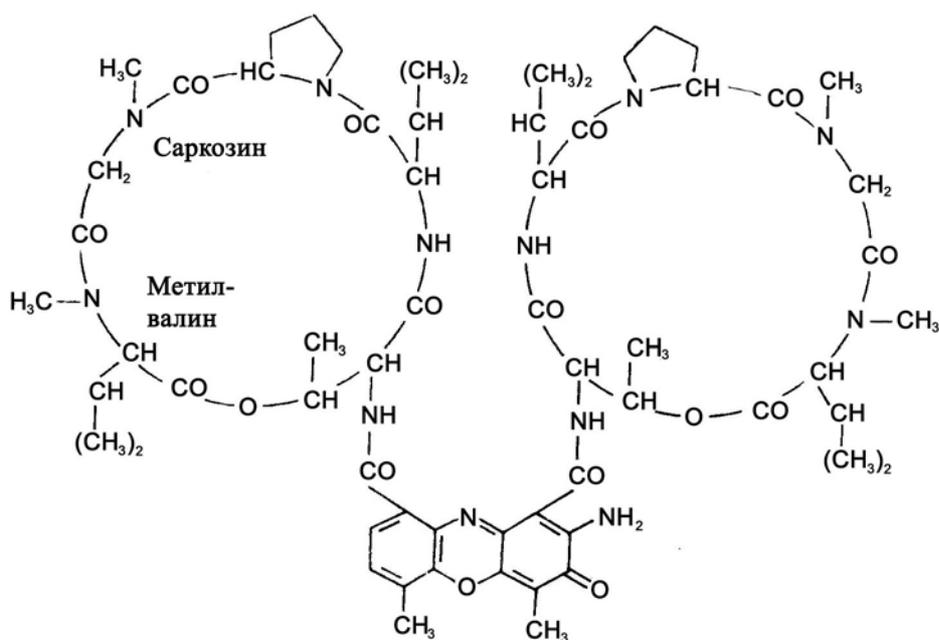


Рис. 2.4. Структура актиномицина D [14]

Актиномицины способны образовывать устойчивые комплексы с ДНК бактерий за счет многочисленных гидрофобных контактов и водородных связей. В результате такого взаимодействия нарушаются процессы репликации и транскрипции ДНК.

Антибиотик *эхиномицин*, выделенный впервые из культуры актиномицетов (*Streptomyces echinatus*), относится к антибиотикам хиномициновой (хиноксалиновой) группы (рис. 2.5).

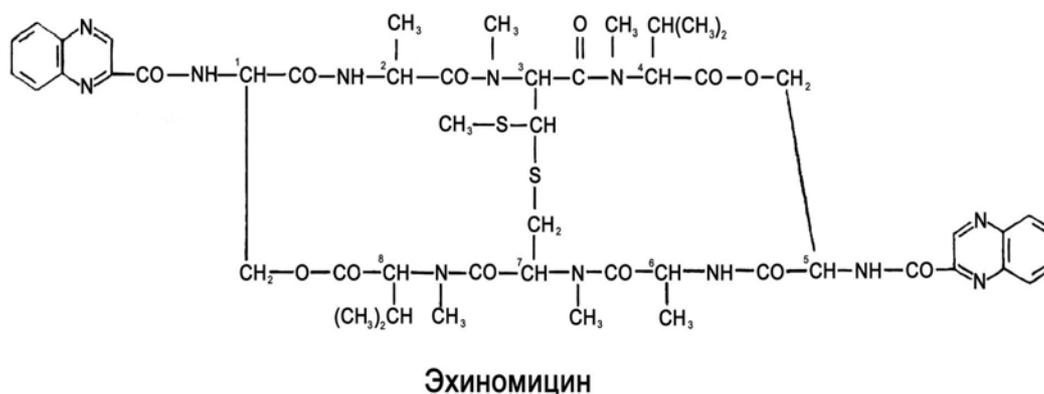
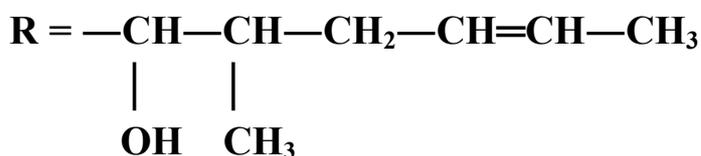
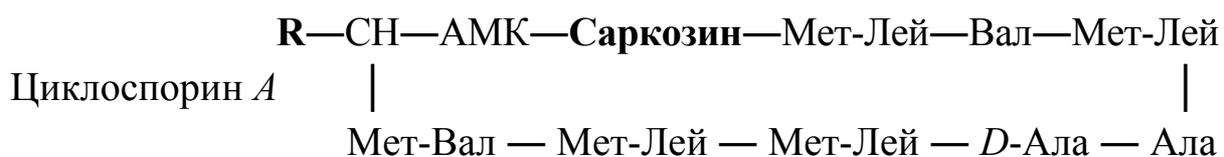


Рис. 2.5. Структура эхиномицина [14]

Биологическое действие этого антибиотика связано с их способностью связываться с двунитевой ДНК бактерий за счет гидрофобных взаимодействий и водородных связей.

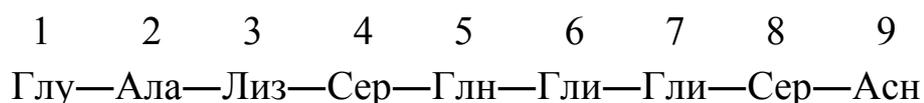
Микроорганизм *Trichoderma polysporum* синтезирует антибиотик, получивший название *циклоспорин А*. Он имеет циклическую структуру, содержащую *N*-метилглицин (саркозин), метилвалин, метиллейцин, *D*-аланин и аминокислоту (АМК), а также особый фрагмент (R):



Так как циклоспорин ингибирует отторжение пересаженных тканей и органов, то его активно применяют в клинике в качестве иммунодепрессивного препарата. Мишенью действия циклоспорина *А* является *T*-хелперная популяция лимфоцитов.

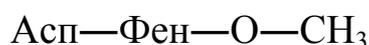
Другим важным регулятором иммунитета является антибиотик *тафцин*, выделенный в 1970 г. Он является тетрапептидным фрагментом C<sub>H</sub>2-домена иммуноглобулина G, повышающим цитотоксическую и цитостатическую активность против чужеродных клеток. Кроме этого, тафцин обладает противоопухолевым и антибактериальным действием.

Выделенная из тимуса группа иммуноактивных пептидов, получила название *тимических гормонов* или *тимических факторов*. Наиболее известным из этой групп веществ является *тимозин*. По своей структуре он представляет смесь высокомолекулярных пептидов, среди которых известны *тимозин α<sub>1</sub>* (28 аминокислотных остатков), *тимозин β<sub>4</sub>* (43 аминокислотных остатка) и др. Все эти вещества регулируют активность Т-лимфоцитов. Такое же физиологическое действие оказывают соединения *timoпоэтины* и *тимулин* (9 аминокислотных остатков) [14]:



### 2.2.5. Пептиды, обладающие вкусом

В 1981 г. в США разрешено использование низкокалорийной добавки для придания продуктам сладкого вкуса – *аспартама*. Он представляет собой метиловый эфир дипептида, состоящего из остатков аспарагиновой кислоты и фенилаланина:

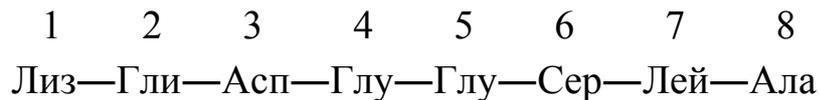


Этот дипептид почти в 200 раз слаще сахарозы, нетоксичен, а также легко и быстро синтезируется.

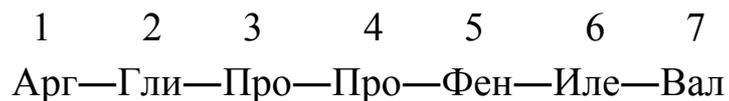
*Тауматины* и *монеллин*, выделенные из плодов южноамериканских растений *Thaumatococcus danieli* и *Discoreophullum cumminsii*, имеют интенсивно сладкий вкус (в 100 000 превосходят сахар по сладости). Тауматины имеют молекулярную массу 22 кДа и доменную структуру, содержат высокий процент β-структур и β-изгибов, проявляют основные свойства. Известно, что тауматины I и II содержат по

207 аминокислотных остатка, их молекулы построены из двух доменов, соединенных гибким 28-членным пептидным фрагментом. Молекула монеллина имеет две нековалентно связанные пептидные цепи, содержащие в целом 94 аминокислотных остатка.

При обработке папаином мяса крупного рогатого скота в 1980 г. был выделен октапептид, имеющий название «*вкусный*» пептид и обладающий сладковатым вкусом:



Однако, кроме сладких и вкусных пептидов, в природе еще встречаются диаметрально противоположные по вкусу пептиды. Так, при протеолизе казеина получен *горький* гептапептид, не уступающий по вкусу хинину:



## ГЛАВА 3

### БЕЛКИ

Белки характеризуются высокой молекулярной массой, сложной пространственной структурой и многообразными функциями. Типичный белок содержит от 100 до нескольких сотен аминокислот, представляющих собой линейный полимер. Различают несколько уровней структурной организации белков: *первичную, вторичную, третичную*, а для белков, состоящих из нескольких полипептидных цепей (олигомерных) – *четвертичную* структуру [4,5].

Так как молекулы белков очень крупные и в их состав входит большое число аминокислотных остатков, имеющих разнообразные функциональные группы, то достаточно трудно установить, какие химические связи встречаются внутри молекулы нативного белка. Особенно трудно определить наличие и характер более лабильных связей, так как, являясь весьма подвижными молекулами, белки теряют свои первоначальные свойства под влиянием даже незначительных воздействий окружающей среды. Белок, обладающий хорошо определенными биологическими, физическими и химическими свойствами, называется *нативным* белком в отличие от *денатурированного*, потерявшего свои первоначальные свойства. Конечно, наибольший интерес представляют нативные белки, которые имеют строго определенный для каждого белка набор химических связей, обеспечивающих уникальную пространственную структуру и функцию белков.

Установлено, что в нативных белках встречаются следующие виды связей: 1) *пептидные связи*, в которых участвуют только  $\alpha$ -аминогруппы и  $\alpha$ -карбоксильные группы; 2) *S—S-связи* (дисульфидные мостики), образующиеся при окислении HS-групп двух цистеинов, находящихся в разных местах одной полипептидной цепи или в двух соседних цепях, при достаточно близком расположении этих групп; 3) *водородные связи*, возникающие между электроотрицательными атомами N и O; 4) *ионные* (солеподобные) *связи*, появляющиеся вследствие электростатического притяжения между кислотными и

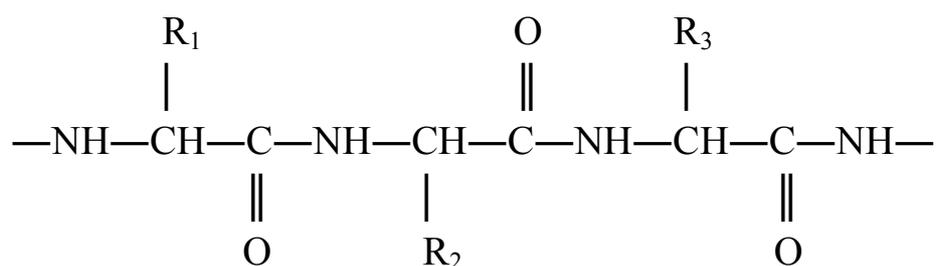
основными группами; 5) *гидрофобные взаимодействия*, которые наступают между неполярными боковыми цепями аминокислот.

### 3.1. Пептидная связь и первичная структура белков

Установлено, что в белках основной, сильной ковалентной связью, соединяющей аминокислоты, является пептидная. Щелочные аминокислоты участвуют в пептидных связях лишь своей  $\alpha$ -аминогруппой, а  $\epsilon$ -аминогруппа лизина, гуанидиновая группа аргинина и имидазольная группа гистидина находятся в свободном виде и не принимают участия в образовании пептидных связей. Моноаминодикарбоновые кислоты (аспарагиновая и глутаминовая) участвуют в пептидной связи только одной своей ( $\alpha$ -) карбоксильной группой.

Благодаря вышеописанным особенностям белки никогда не имеют разветвлений. В каждой полипептидной цепи имеется «стержень» (остов), который во всех белках один и тот же [2]. Полипептидные цепи различных белков отличаются друг от друга только лишь по характеру R-радикалов, присоединенных к стержню полипептидной цепи, а характер этих радикалов в свою очередь зависит от того, какая аминокислота находится в этом месте полипептидной цепи.

Пространственное расположение валентностей таково, что боковая цепь поочередно выходит то в одну, то в другую сторону:



Методом рентгеноструктурного анализа было установлено, что, например, у белка шелка (аминокислотный состав которого является сравнительно простым) по остову полипептидной цепи на расстоянии 3,5 Å имеются повторяющиеся структуры. На основании данных о расстоянии между атомами и их пространственного расположения вырисовывается такая картина, что в основной цепочке (стержне, ос-

тове) полипептидной молекулы повторяются С—N—С-единицы. В 1948-1951 гг. Л. Полинг и Р. Кори (на основе исследования структуры методом рентгенодифракции) пришли к выводу, что стержень полипептидной цепи имеет спиральную структуру. Если на один виток (оборот) спирали приходится 3,7 аминокислотных остатков, то такую спираль называют  $\alpha$ -спиралью.

Пептидная связь в белках является практически плоской. В физиологических условиях наблюдаются лишь незначительные отклонения от плоской системы (до  $5-10^\circ$ ). Пептидная связь обычно имеет *транс*-конфигурацию (является транспланарной), но встречаются молекулы белков с *цис*-конфигурацией (например, при больших размерах радикалов соседних аминокислотных остатков или в напряженных циклических структурах – циклопептиды) (рис.3.1).

*Цис*- и *транс*-пептидные связи можно различить с помощью таких физических методов, как ИК- и ЯМР-спектроскопии. В белках пептидная связь в большинстве случаев практически всегда имеет *транс*-конфигурацию, так как *цис*-конфигурация энергетически довольно невыгодная (она примерно на  $8 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$  менее устойчива, чем *транс*). Исключение составляет пептидная связь, предшествующая пролину, для которой *транс*-конформация лишь ненамного лучше, чем *цис*.

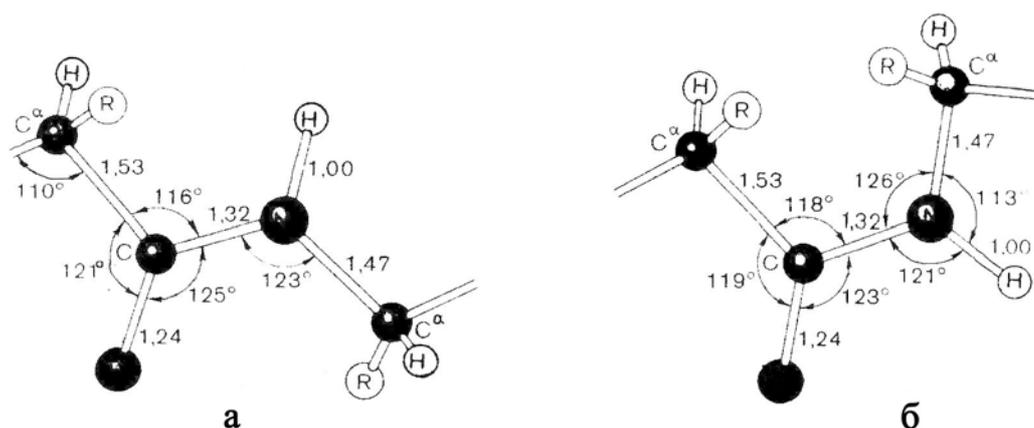
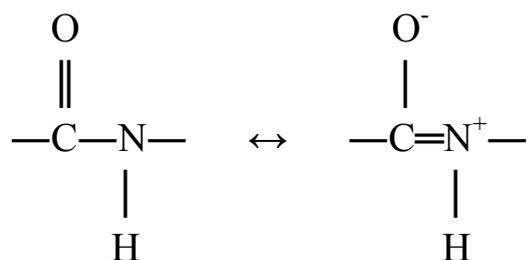


Рис. 3.1. Валентные углы и длины связей (в нм) в *транс*- и *цис*-пептидных связях (а и б соответственно) [14]

И в глобулярных белках, и в развернутых пептидах (то есть флуктуирующих, не имеющих фиксированной структуры) наблюда-

ется около 90% *транс*- и 10% *цис*-пролинов. Таким образом проявляется уникальная закономерность – что выгодно само по себе, то чаще встречается и в глобулярных белках.

В обычных условиях наблюдаются лишь небольшие отклонения от плоской системы. Пептидная связь примерно на 10 % короче обычной, простой C—N и имеет характер «частично двойной» связи —C=N—:



В белках связь C—N является частично кратной из-за неподеленной пары электронов атома азота с  $\pi$ -электронной системой карбонильной группы, что приводит к затрудненному вращению вокруг пептидной связи C—N (барьер вращения составляет 63-84 кДж/моль) [14].

Белковую молекулу можно рассматривать как цепочку из связанных друг с другом плоских пептидных звеньев (рис. 3.2).

Каждое пептидное звено присоединяется к другому через  $\alpha$ -углеродный атом аминокислоты. Именно этот атом углерода обуславливает присутствие в цепи двух одинарных связей, вокруг которых возможно вращение (исключением служит циклический остаток пролина). Конформация аминокислотного звена в цепи белка определяется торсионными углами относительно каждой из упомянутых одинарных связей. Эти углы обозначаются через  $\varphi$  (вращение вокруг N—C $^\alpha$  связи) и  $\psi$  (вращение вокруг C $^\alpha$ —C связи).

При вращении по каждому из них возникает шестикратный потенциал с низкими барьерами, высота которых равна примерно 1 ккал/моль, что соответствует уровню энергии тепловых колебаний (0,6 ккал/моль при комнатной температуре). Именно почти свободное вращение по углам  $\varphi$  и  $\psi$  вокруг указанных выше связей (между N и C $^\alpha$  и между C $^\alpha$  и C) в главной цепи белка и обеспечивает основную гибкость полипептидной цепи.

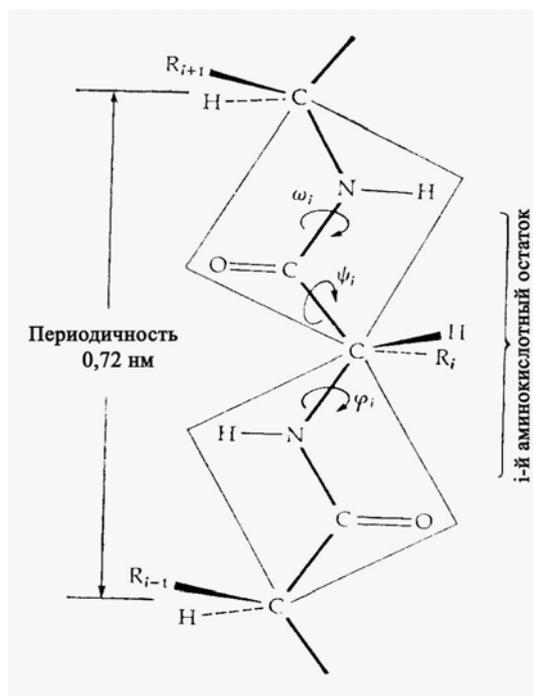


Рис. 3.2. Две пептидные группы в полностью вытянутой  $\beta$ -конформации. Торсионные углы  $\varphi_i$ ,  $\psi_i$  и  $\omega_i$  считаются равными  $0^\circ$ , если атомы главной цепи находятся в цис-конформации. В полностью вытянутой цепи все эти углы равны  $180^\circ$  [10]

Расчеты конформации пептидной группы выполнил в 1963 г. Г.Н. Рамачандран. Результаты такого анализа часто представляют в виде графиков зависимости  $\varphi$  от  $\psi$  (графиков Рамачандрана, или *конформационных карт*). В силу взаимодействия между заместителями в пептидной цепи углы  $\varphi$  и  $\psi$  не могут принимать любые значения – для них разрешенными оказываются лишь некоторые дискретные области, которые соответствуют энергетически выгодным конформациям пептидной цепи, то есть, по существу, являются областями минимума энергии. Их достаточно компактная локализация свидетельствует о том, что углы  $\varphi$  и  $\psi$  взаимосвязаны (табл. 3.1), изменение одного из них влечет изменение второго.

Структура белковой молекулы, определяемая пептидными связями, называется *первичной структурой*. Именно она кодируется последовательностью триплетов мРНК и реализуется при трансляции. Однако, как правило, первичная структура зрелой молекулы белка не полностью совпадает с непосредственным продуктом трансляции.

Первоначально синтезированные молекулы белков подвергаются более или менее значительным ко- и посттрансляционным модификациям (*процессингу*), в результате которых изменяются аминокислотные остатки, длина полипептидной цепи, происходит химическая модификация молекулы и пр.

Таблица 3.1

Примерные значения торсионных углов для некоторых регулярных пептидных структур [10]

Структура	$\varphi$	$\psi$
Гипотетическая полностью вытянутая цепь полиглицина	$-180^\circ$	$+180^\circ$ <sup>1</sup>
$\beta$ -Поли ( <i>L</i> -аланин) в антипараллельном складчатом слое	$-139^\circ$	$+135^\circ$
Параллельный складчатый слой	$-119^\circ$	$+113^\circ$
Полиглицин II (смещение вдоль оси составляет 0,31 нм на остаток, периодичность – 0,93 нм)	$-80^\circ$	$+150^\circ$
Поли ( <i>L</i> -пролин) II (предпочтительна левая спираль)	$-78^\circ$	$+149^\circ$
Коллаген <sup>2</sup>	$-51^\circ, -76^\circ, -45^\circ$	$+153^\circ, +127^\circ, +148^\circ$
Правая $\alpha$ -спираль	$-57^\circ$	$-47^\circ$

<sup>1</sup> Торсионные углы для полностью вытянутой цепи могут быть равным образом обозначены как  $+180^\circ$  или  $-180^\circ$ , что полностью эквивалентно одно другому. Для более удобного сравнения с другими структурами здесь принято, что  $\varphi=-180^\circ$ ,  $\psi=+180^\circ$ .

<sup>2</sup> Набор из трех углов соответствует трем остаткам, образующим преобладающую в коллагене повторяющуюся последовательность (Про-Гли-Про)<sub>n</sub>.

Первичная структура белка определяет все его последующие возможные конформации, свойства и функции. Важным является не только качественный и количественный аминокислотный состав, но и то, в какой последовательности соединены аминокислоты в полипептидной цепи. Нередко замена лишь одной из аминокислот приводит к серьезным нарушениям структуры и функции белка. Примером может

служить замена одной аминокислоты в молекуле гемоглобина (глутаминовой кислоты в 6-ом положении  $\alpha$ -цепи на валин) приводит к заболеванию серповидноклеточной анемией. Такой гемоглобин существенно отличается по физико-химическим и биологическим свойствам от нормального гемоглобина. Дети, родившиеся с этой аномалией, в раннем возрасте погибают.

Кроме первичной структуры, для всех белков характерны и более сложные пространственные организации молекул. Согласно концепции датского биохимика К. Линдерштрем-Ланга, кроме первичной структуры, существуют еще три уровня организации полипептидов: вторичная, третичная и четвертичная структуры. Эта классификация основана на реальных последовательных этапах формирования пространственного строения первичной структуры белковых молекул, исходя из их возможных свойств.

### **3.2. Водородные связи и вторичная структура белков**

Достаточно регулярная структура полипептидной цепи предполагает возможность формирования стандартных (так называемых канонических) конформаций, обнаруживаемых в нативной молекуле. Такого рода пространственно упорядоченные участки стабилизированы водородными связями между пептидными СО- и NH-группами и называются элементами *вторичной структуры*. Ее можно назвать низшим уровнем пространственной организации молекулы белка, основанной на ближних взаимодействиях атомов в полипептидной цепи.

Известны четыре основных типа вторичной структуры полипептидных цепей:  $\alpha$ -спираль,  $\beta$ -структура (складчатый листок, складчатый слой),  $\beta$ -изгиб и *беспорядочный клубок* (бесструктурный участок).  $\alpha$ -Спираль также, как и  $\beta$ -структура, являются так называемыми каноническими конформациями, которые чаще всего встречаются в природных белках. Спиральные участки полипептидной молекулы можно представить в виде своеобразных стержней, внутреннее пространство которых полностью заполнено радикалами аминокислот-

ных остатков (гидрофобных в большей своей части). Полярные радикалы обращены наружу белковой молекулы (рис. 3.3).

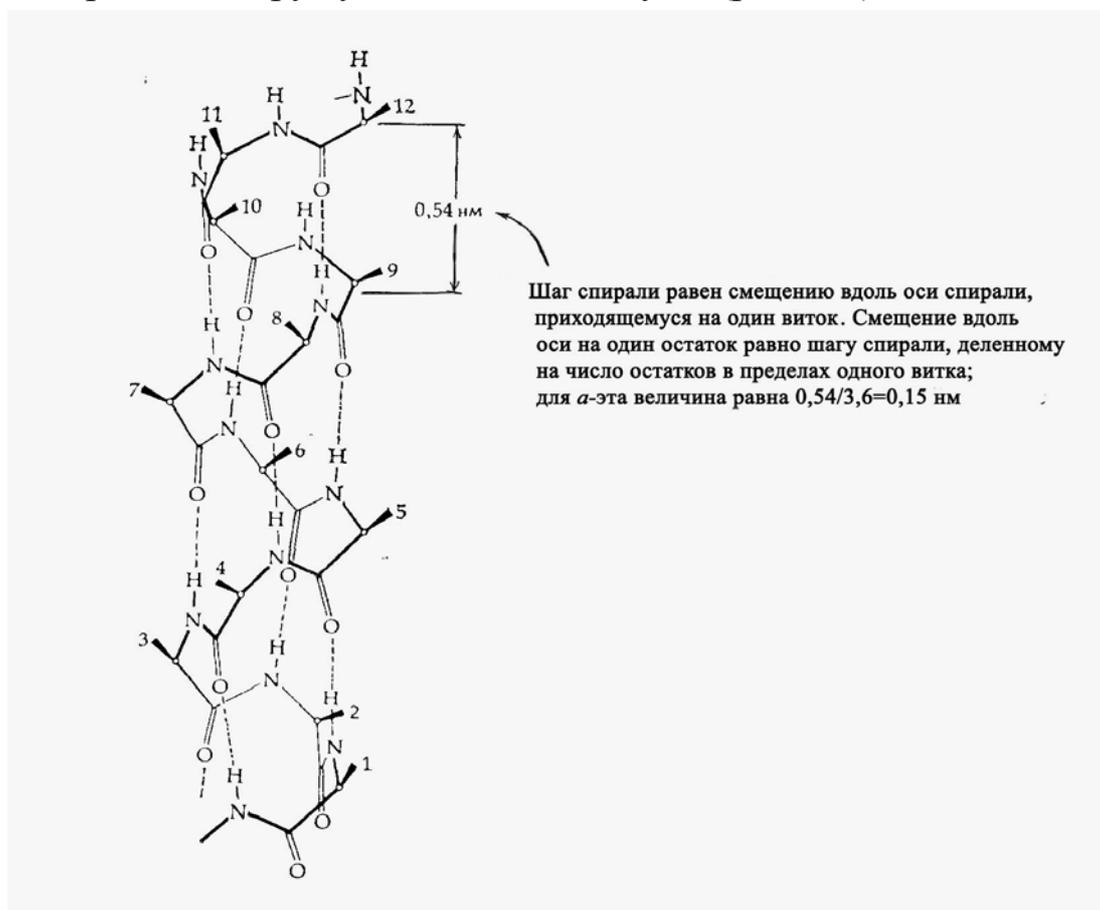


Рис. 3.3. Правая  $\alpha$ -спираль с вертикально расположенными водородными связями, изображенными в виде пунктирных линий. Положения радикалов аминокислотных остатков указаны цифрами в порядке возрастания от N-конца к C-концу полипептидной цепи [10]

$\alpha$ -Спиральные структуры могут иметь различные геометрические характеристики в зависимости от природы составляющих ее аминокислотных остатков (табл. 3.2).

Одним из важных принципов формирования пространственной (вторичной) структуры белков является образование как можно большего количества водородных связей между группами C=O и N—H основной цепи (пептидных групп). Примером такой организации служит  $\beta$ -складчатый слой (рис. 3.4).

Таблица 3.2

## Параметры спиральных структур [14]

Параметр спирали	Спираль $3_{10}$	$\alpha$ -Спираль	$\pi$ -Спираль	Полипролин I	Полипролин II
Число аминокислотных остатков на виток (n)	3,0	3,6	4,4	3,3	3 (лево-варшающая спираль)
Высота спирали на один аминокислотный остаток $d$ (нм)	0,2	0,15	0,11	0,19	0,31
Высота спирали на один виток (шаг спирали) $P$ (нм)	0,6	0,54	0,5	0,57	0,93
Углы (в градусах):					
$\varphi$	-49	-47	-57	-83	-76
$\psi$	-26	-57	-70	+158	+146
$\omega$	+180	+180	+180	0	+180

Периодичность  $\beta$ -складчатый структуры составляет 0,7 нм, то есть чуть меньше, чем в полностью вытянутой цепи. Пары водородных связей между цепями придают структуре большую прочность. Цепь может повернуться назад (в этом случае имеет место  $\beta$ -изгиб) и идти вдоль самой себя. В средней точке  $\beta$ -изгиба пептидная группа ориентирована почти перпендикулярно плоскости складчатого слоя.

Одна и та же молекула белка может состоять из участков, имеющих разные виды вторичной структуры (табл. 3.3).  $\alpha$ -Спиральные и  $\beta$ -структурные фрагменты полипептидной цепи обычно представлены достаточно короткими отрезками. Основная часть молекулы белка приходится на долю различных петель, позволяющих изменить направление полимера. В  $\beta$ -изгиб входят всего три пептидные группировки, которые позволяют развернуть цепь на  $180^\circ$ , и одна водородная связь. Поскольку объемные аминокислотные остатки мешают форми-

рованию изгиба, то в его составе чаще всего встречаются остатки глицина. Участок молекулы белка, имеющий  $\beta$ -изгиб, практически всегда находится на поверхности белковой глобулы и может играть значительную роль во взаимодействии данной молекулы с другими белками.

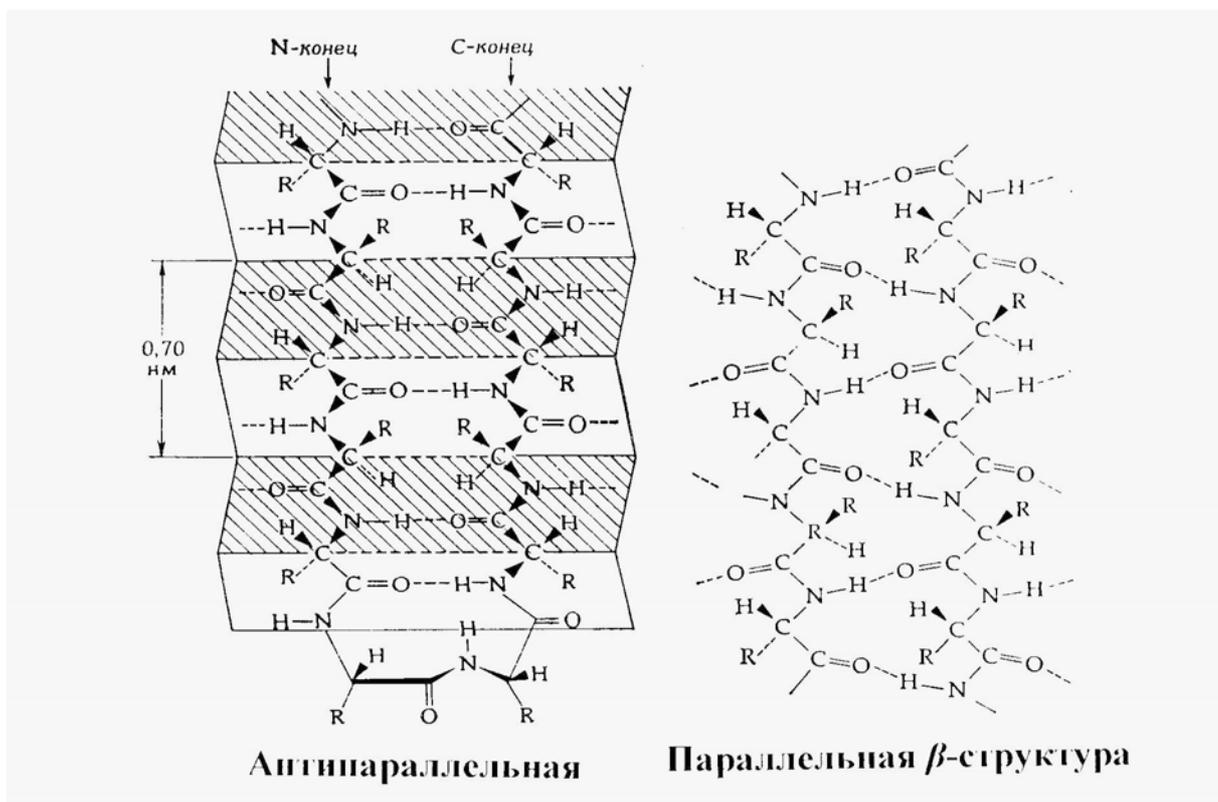


Рис. 3.4. Структура складчатого  $\beta$ -слоя, образованного вытянутыми цепями. Слева – антипараллельная структура в фиброине шелка. Боковые цепи аминокислот ( $R$ ) располагаются поочередно то выше, то ниже складок, изображенных на рисунке. Справа изображена аналогичная структура, сформированная параллельными цепями (водородные связи располагаются чуть менее выгодно, чем в первом случае) [10]

Элементы вторичной структуры приобретают устойчивость только после их объединения в компактную белковую глобулу, поскольку в ней резко повышается кооперативность системы нековалентных взаимодействий. Значительная часть структуры при этом оказывается погруженной в среду с полярностью гораздо меньшей, чем у воды. Кроме того, следует учесть, что в компактной структуре значительная

часть внутримолекулярных водородных связей скрыта от воздействия воды и вероятность их разрыва гораздо меньше.

Таблица 3.3

Распределение аминокислотных остатков между четырьмя вариантами вторичной структуры, % [15]

Белок	$\alpha$ -Спираль	$\beta$ -Структура	$\beta$ -Изгиб	Бесструктурные участки
Аденилаткиназа	54	12	19	15
Ингибитор трипсина	28	33	3	36
Инсулин	51	24	12	13
Карбоксипептидаза А	37	15	26	22
Конканавалин	2	51	9	38
Лактатдегидрогеназа	45	24	6	25
Лизоцим	41	16	23	20
Миоглобин	79	0	5	16
Нуклеаза	24	15	18	43
Папаин	28	14	17	41
Парвальбумин	62	5	17	16
Рибонуклеаза А	23	40	13	24
Субтилизин ВРН	31	10	22	37
Термолизин	36	22	18	24
$\alpha$ -Химитрипсин	9	34	34	23
Цитохром <i>c</i>	39	0	24	37
Эластаза	7	52	26	15

Рентгеновский кристаллографический анализ структуры известных белков и синтетических полипептидов показали, что некоторые аминокислоты (глу, ала, лей) способствуют образованию  $\alpha$ -спирали, другие аминокислоты (мет, вал, иле) чаще встречаются в составе  $\beta$ -структуры, а пролин и аспарагин обычно расположены в местах изгиба полипептидной цепи. Способ укладки полипептида определяется последовательностью аминокислот, их качественным и количественным составом. Так, например, если в каком-то участке цепи сосредоточено несколько остатков, способствующих образованию спирали, то образуется спираль. Эта спираль будет расти в обоих направлениях до тех пор, пока не встретит на своем пути остатки аминокислот (например, пролин), которые препятствуют ее образованию. Если сгруп-

пированы соответствующие остатки, идет формирование и  $\beta$ -структуры.

Следует отметить, что стабильная вторичная структура формируется не мгновенно, а проходит ряд промежуточных стадий (так называемые мерцающие элементы вторичной структуры) [15]. Эти структуры могут возникать на достаточно коротких участках и обеспечивают благоприятные предпосылки формирования пространственной структуры белковой молекулы, выступая в роли единиц ее свертывания. Так, например, если из шести сгруппированных остатков четыре способствуют образованию спирали, данную группу можно рассматривать как *центр спирализации*. От этого центра спираль может разрастаться в обоих направлениях, пока ей не встретится тетрапептид из остатков, препятствующих образованию спирали. Подобным же образом три остатка из пяти, способствующие образованию  $\beta$ -структуры, играют роль затравки для формирования  $\beta$ -слоя. В этом случае большое значение имеет возможность образования связей с другими участками цепи, отделенными от растущего  $\beta$ -слоя  $\beta$ -изгибами или участками с нерегулярной конформацией (статистический клубок) [10].

Большинство белков с известной пространственной структурой можно так или иначе распределить между четырьмя структурными группами: 1)  $\alpha$ -белки, в которых преобладают  $\alpha$ -спирали (гемоглобин, миоглобин); 2) белки, построенные из  $\beta$ -слоев, расположенных один над другим и образующих многослойную структуру (рубредоксин, конканавалин А); 3)  $(\alpha+\beta)$ -белки, у которых в состав одной и той же полипептидной цепи входят участки, целиком построенные из  $\alpha$ -спиралей, и участки, целиком состоящие из  $\beta$ -слоев (папаин, термолизин); 4)  $\alpha/\beta$ -белки, в которых  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -цепи чередуются по ходу полипептидной цепи. Обычно здесь имеется один центральный  $\beta$ -слой, по обе стороны которого располагаются спиральные участки (фосфоглицераткиназа, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, гексокиназа, карбоксипептидаза) [10].

Боковые радикалы аминокислот, хотя непосредственно и не участвуют в стабилизирующих эту структуру связях, тем не менее, определяют, каким образом пептидная цепь может свернуться для образования таких связей и может ли свернуться вообще. Например, остатки пролина и гидроксипролина полностью исключают образование в своем локусе как  $\alpha$ -спирали, так и  $\beta$ -структуры. Одноименно заряженные радикалы аминокислот, если они находятся близко друг от друга, не могут сблизиться из-за взаимного отталкивания. Отсюда и получается типичное для каждого белка распределение между разными типами вторичной структуры.

Кроме пептидной связи, в формировании вторичной структуры белков принимают участие и водородные связи. И пептидные группы главной цепи, и полярные боковые группы выступают донорами и акцепторами водородных связей. Они могут формировать связи друг с другом или с молекулами воды. Практически все такие связи формируются, так как энергия водородных связей (5 ккал/моль) примерно в 10 раз превосходит энергию теплового движения, то есть тепловое движение не может разрушить эти связи.

В водном окружении образовавшаяся внутри белковой цепи водородная связь (Н-связь) замещает собой связь цепи с водой. По этой же причине водородные связи, стабилизирующие структуру белка в воде, носят энтропийную, а не энергетическую природу: энергии двух состояний цепи (с внутрицепочечной связью и без нее) примерно равны. Из этих двух состояний с примерно равной энергией стабильнее та, где выше энтропия, то есть где больше число микросостояний. А их больше у оторванной воды, чем у связанной.

Водородные связи в белковой цепи (в водном окружении) носят энтропийную, а не энергетическую природу именно потому, что энергия Н-связей очень высока. Раз так, то «свободные» от связей в белке доноры и акцепторы водородных связей в цепи всегда на деле не свободны от всех связей вообще, а связаны с водой. Оторвавшиеся же от белка при образовании внутривеликовой Н-связи молекулы воды тут же связываются друг с другом, так что энергия компенсируется, и

свободно-энергетический выигрыш Н-связей в белке идет только от множественности возможных микросостояний оторвавшихся молекул воды. Однако, чтобы связаться друг с другом, молекулы воды жертвуют частью своей обретенной свободы, частью энтропии. Но лучше потерять небольшую энтропию, чем большую энергию [17].

Вторичная структура характерна для так называемых *структурных белков*, в которых регулярная  $\alpha$ -спиральная структура распространяется на достаточно большой фрагмент молекулы полипептида. В результате такой организации образуются механически прочные нити или волокна, которые придают экстрацеллюлярным структурам особую прочность и принимают участие в построении цитоскелета.

К структурным белкам относятся:  *$\alpha$ -кератин, коллаген и фиброин шелка*.  $\alpha$ -Кератин является основным структурным компонентом волос, шерсти, перьев, игл, когтей, копыт животных. Кератин (цитокератин) является структурной основой промежуточных филаментов – одной из важных частей цитоскелета большинства клеток. Две цепи кератина образуют единую левую *суперспираль*. Димеры кератина объединяются в тетрамеры, агрегирующие с образованием *протофибрилл* (диаметром примерно 3 нм). Восемь протофибрилл образуют *микрофибриллу* (диаметром около 10 нм). Волосы человека построены из таких же фибрилл – в отдельном волосе диаметром 20 мкм переплетены миллионы фибрилл.

Коллаген – это белок, который в организме человека преобладает в количественном отношении (составляет 25 % общего белка). Он присутствует в соединительной ткани и имеет уникальную аминокислотную последовательность – 1/3 аминокислотных остатков составляет глицин, около 10 % приходится на пролин, а также гидроксипролин и гидроксизин. Коллаген присутствует в организмах животных в виде правой тройной спирали, скрученной из трех первичных левых спиралей. Вся молекула коллагена имеет длину около 300 нм [6, 10].

Фиброин шелка имеет структуру антипараллельного складчатого листа, а сами листы располагаются параллельно друг другу, формируя многочисленные пласты. Фиброин на 80 % состоит из глицина, ала-

нина и серина, то есть из таких аминокислот, которые имеют минимальные размеры радикалов. Молекула фиброина построена из повторяющихся фрагментов (гли-ала-гли-ала-гли-сер)<sub>n</sub>.

### 3.3. Третичная структура белков

Большинство белков живых клеток имеют значительно более сложную пространственную конформацию, чем традиционные вторичные структуры в виде  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -конформации. При дальнейшем усложнении укладки полипептидной цепи возникают дополнительные типы взаимодействий и связей: дисульфидные связи, ионные и гидрофобные взаимодействия (то есть дальние взаимодействия). Они формируются за счет пространственного сближения аминокислотных остатков, которые линейно удалены друг от друга. Таким образом формируется *третичная структура белков*.

Говоря о третичной структуре, не учитывают взаимодействия данной полипептидной цепи с другими глобулами белков. И поэтому третичную структуру можно определить, как расположение в пространстве всех, входящих в белковую молекулу, атомов. Причем, такая конформация белка будет свойственна только данной молекуле, поскольку она обладает определенным набором атомов, способных формировать именно данные виды взаимодействий. Впрочем, многие эволюционно родственные белки, имеющие неодинаковые аминокислотные последовательности, обладают сходными способами укладки молекул в пространстве. Данный факт свидетельствует о наличии общих принципов формирования белковых молекул в пространстве.

Третичную структуру обычно рассматривают в отношении глобулярных белков, имеющих более разнообразную пространственную организацию и соответственно более разнообразные функциональные возможности. Здесь следует отметить, что именно порядок расположения аминокислотных остатков (первичная структура белка) определяет специфику укладки в пространстве всех элементов белковой молекулы (то есть определяет вторичную и третичную структуры белков).

Третичная структура лежит в основе биологической активности белков, которая может реализоваться только при условии строго определенной (нативной) пространственной организации полипептидных молекул с учетом особенностей химической природы радикалов аминокислотных остатков в белках [16]. Именно в основном благодаря специфичности строения боковых групп аминокислотных остатков возможно формирование таких биологически активных фрагментов белковой молекулы, как участки связывания рецептора с лигандом, активные центры ферментов и пр.

Молекулы белков формируют наиболее прочную третичную структуру только в том случае, если внутри глобулы действует система нековалентных взаимодействий и связей (ионные и водородные связи, гидрофобные взаимодействия), а также дополнительные ковалентные связи (дисульфидные).

Денатурация белка, приводящая к нарушению его третичной структуры, приводит к потере биологической активности данной молекулы.

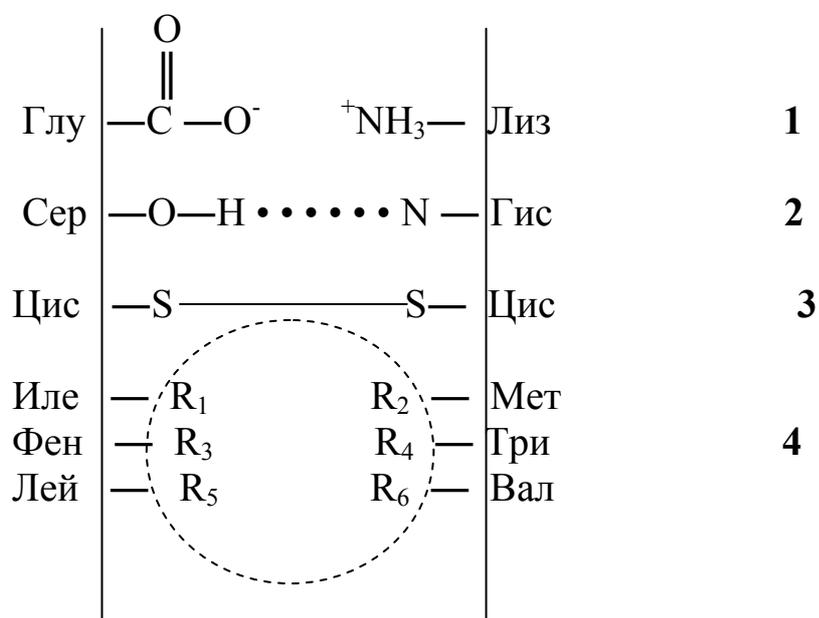


Рис. 3.5. Химические связи и взаимодействия, поддерживающие и стабилизирующие третичную структуру (1- ионная связь, 2- водородная связь, 3 – дисульфидная связь, 4 – гидрофобные взаимодействия)

В живой клетке на третичную структуру белка огромное влияние оказывает взаимодействие полипептидной цепи с природным растворителем (водой), а также с растворенными в нем макро- и микромолекулами (другими белками, солями металлов и т.д.). При взаимодействии с водным окружением полярные и неполярные радикалы аминокислотных остатков ведут себя по-разному. Полярные радикалы аминокислот (сер, тре, тир, асп, лиз, глу и др.) гидрофильны и поэтому обычно располагаются на поверхности белковой глобулы, взаимодействуя с диполями воды. Неполярные радикалы гидрофобных аминокислот (ала, лей, иле, фен и др.), как правило, оказываются внутри молекулы белка, образуя ядро неполярной природы [7].

Большинство глобулярных белков формируют и сохраняют свою нативную конформацию благодаря гидрофобным взаимодействиям, возникающим между соответствующими аминокислотными остатками (например, валином, фенилаланином, изолейцином и др.), локализованными, как правило, внутри белковой молекулы. Внутри белка боковые группы аминокислот уложены весьма компактно, но если где-либо в структуре остается свободное пространство, оно обычно заполняется водой. Как правило, гидрофобные боковые цепи аминокислот формируют одно или несколько гидрофобных центров (ядер) [15]. В каждое такое ядро может входить 20-30 % общего числа аминокислотных остатков (как правило, аминокислоты, имеющие весьма объемистые радикалы – лейцин, изолейцин, фенилаланин, валин).

Гидрофобное ядро окружено, как правило, гидрофильной наружной оболочкой, контактирующей с водой. Но иногда гидрофильные участки на поверхности белковой глобулы чередуются с гидрофобными, что формирует мозаичный характер поверхности белка. Такие гидрофобные кластеры имеют функциональное значение, обеспечивая, например, белок-белковые взаимодействия и контакты белка с соответствующими «водобязанными» лигандами.

Формирование гидрофобных контактов между неполярными аминокислотными радикалами влечет за собой установление слабых ван-дер-ваальсовых взаимодействий между ними, которые также вно-

сят определенный вклад в энергетику процесса свертывания белковой молекулы.

Гидрофобный эффект берет на себя примерно 90 % черновой работы по формированию белковой глобулы, но он не может создать нативный «твердый» белок. «Отвердевает» белок под действием водородных, ионных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которые являются более специфичными и чувствительными к особенностям структуры молекул аминокислотных остатков, и которые доводят строение белковой глобулы до абсолютно точной, прочной нативной конформации.

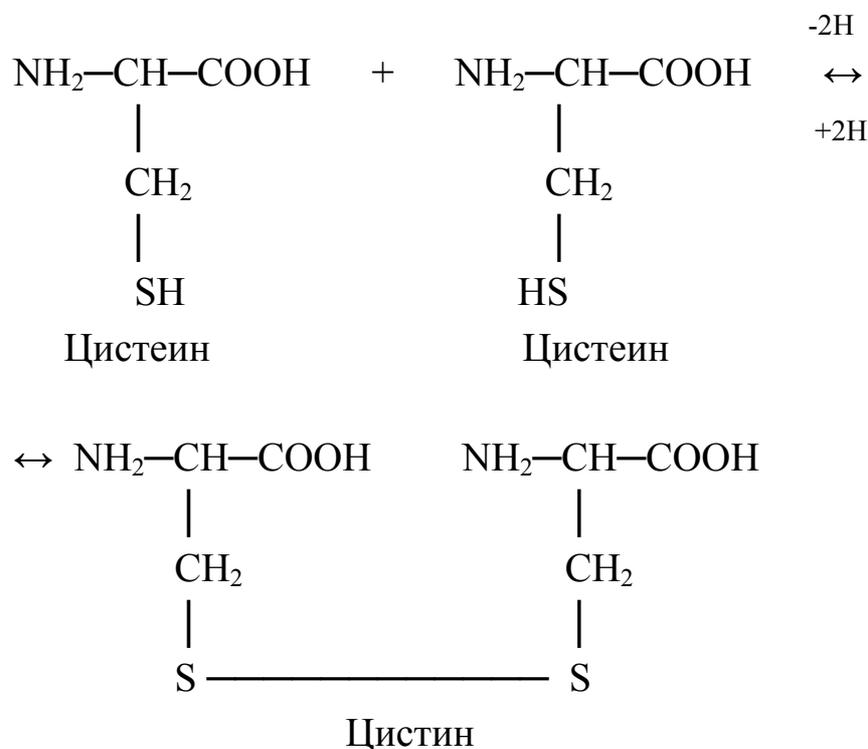
Еще одним видом взаимодействий, поддерживающих третичную структуру большинства белков, являются электростатические взаимодействия. Так, например, отрицательно заряженная карбоксильная группа ( $-\text{COO}^-$ ) остатка глутаминовой (или аспарагиновой) кислоты может притягиваться положительно заряженной  $\epsilon$ -аминогруппой ( $-\text{NH}_3^+$ ) остатка лизина, расположенного в соседней петле. Кроме лизина, приносить положительные заряды в формирующиеся ионные взаимодействия могут остатки аргинина и гистидина.

Полярные группы, как правило, располагаются на поверхности белка, но иногда бывают погруженными внутрь. При этом между такими внутренними группировками могут образовываться водородные связи – еще один вид нековалентных связей, формирующих третичную структуру белков. Чаще всего водородные связи возникают между гидроксильной группой остатка серина в одном участке полипептидной цепи и атомом азота в кольце остатка гистидина, находящегося в соседней петле той же белковой цепи.

Дополнительную прочность белковой глобуле придают ковалентные дисульфидные связи ( $-\text{S}-\text{S}-$ ), а также достаточно редко встречающиеся эфирные связи ( $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-$ ).

Соседние петли полипептидной цепи в некоторых белках (например, в рибонуклеазе) содержат остатки цистина, которые образуют внутрицепочечные ковалентные поперечные связи между соседними петлями в результате окисления остатков цистеина. Эти мости-

ки возникают самопроизвольно. Ниже приведена обратимая окислительно-восстановительная реакция, в результате которой из двух молекул цистеина образуется одна молекула цистина. Аналогичная реакция идет и между остатками молекул цистеина в различных участках молекулы белка:



Такие связи намного прочнее перечисленных выше нековалентных взаимодействий, но дисульфидные мостики встречаются не во всех белках, то есть не являются непременным условием его стабильности. Впрочем, есть белки достаточно стабильные и в отсутствие дисульфидных связей.

Образование S—S-связей в белках может происходить при помощи тиол-дисульфидного обмена. Возможно, в клетке это происходит при участии глутатиона, существующего и в мономерной тиольной (Г-SH), и в димерной дисульфидной (Г-S—S-Г) формах. Как разрыв, так и образование S—S-связей в клетках катализируется специальным ферментом – дисульфидизомеразой. S—S-связи образуются в клетке обратимо, т.к. энергетический баланс этой реакции (тиол-дисульфидного обмена) близок к нулю (было две ковалентные S-H-связи и одна S-S-связь, и столько же осталось).

Следует отметить, что участие дисульфидной связи в конформационную стабильность белка значительно зависит от ее расположения в пространственной структуре. Вклад дисульфидных связей в стабильность белков (например, панкреатической рибонуклеазы, лизоцима, легкой цепи иммуноглобулинов) можно оценить в 2,3-5 ккал/моль (для сравнения – энергия стабилизации белковой глобулы составляет примерно 10 ккал/моль). Немаловажное значение имеет геометрия дисульфидных мостиков. Торсионный угол при S—S-связи равен, как правило,  $90^\circ$ , но бывают и отклонения от этой величины.

Стабилизацию белковой структуры дисульфидными связями можно объяснить тем, что они, сохраняясь в денатурированном белке, существенно сокращают число возможных конфигураций развернутой полипептидной цепи, понижая тем самым ее энтропию [15]. Переход такой денатурированной молекулы белка в нативную конформацию сопряжен с меньшей убылью конформационной энтропии и, следовательно, является более выгодным, чем при отсутствии дисульфидных связей.

Сохраняющиеся в денатурированной молекуле белка дисульфидные связи облегчают поиск правильного пути образования нативной структуры белка, то есть они благоприятно сказываются на кинетике ренатурации полипептида.

Не следует думать, что образование дисульфидных связей предшествует формированию нативной структуры белка. Они идут параллельно с процессом укладки в пространстве полипептидной цепи и способствуют формированию природной конформации белковой глобулы.

Считается, что при формировании нативного белка, могут возникать промежуточные состояния, в которых некоторые дисульфидные связи оказываются образованными не теми остатками цистеина, между которыми они устанавливаются в нативной белковой глобуле. И лишь на конечном этапе пространственной укладки полипептидной молекулы происходит «корректировка» их сборки.

Дисульфидные связи довольно часто встречаются в белках, секретируемых клетками, и значительно реже возникают во внутриклеточных ферментах. Полагают, объяснение данного факта заключается в том, что внутри клеток молекулы белков (в частности, ферментов) защищены от многих внешних воздействий и не нуждаются в дополнительной стабилизации за счет ковалентных S—S-связей.

Принято считать, что дисульфидные связи особенно важны для «кинетической» стабилизации (устойчивости к внешним факторам) таких секреторных белков, которые функционируют вне постоянной внутриклеточной среды. С одной стороны, там нет дисульфидизомераз и глутатиона, так что возникшие (внутри клетки или на выходе из нее) связи как бы замораживаются, они уже не порвутся и не перестроятся. С другой стороны, белок вне клетки попадает в разные условия и дополнительный запас прочности, обеспечиваемый стабильными «замороженными» S—S-связями, для него не будут лишними. Поэтому S—S-связи более типичны для белков, производимых «на экспорт», чем для внутриклеточных белков. В секретируемых белках, обычно, все имеющиеся цистеины задействованы в образование S—S-связей [17].

Для маленьких белков наличие дисульфидных ковалентных связей тоже актуально для поддержания их стабильности, поскольку в них ощущается недостаток количества нековалентных взаимодействий. Примером может служить панкреатический ингибитор трипсина. Его молекула состоит всего из 54 аминокислотных остатков, но содержит 4 дисульфидных мостика, благодаря которым этот белок сохраняет свою грушевидную форму даже при нагревании до +95°C.

Дисульфидные связи присутствуют не только в глобулярных белках. Так, например, один из белков, обладающих наибольшей концентрацией поперечных связей, присутствует в так называемой кератиновой «матрице». Разрушение дисульфидных связей в этом белке лежит в основе химической завивки волос (перманент). Для этого применяется одно из тиоловых соединений, под действием которого осуществляется восстановительный разрыв поперечных дисульфид-

ных связей. После укладки волос окисление на воздухе приводит к образованию новых поперечных связей, при этом структура и форма волос изменяются [10].

Такие авторы, как Н.Н. Мушкамбаров и С.Л. Кузнецов [12], предлагают разделять все аминокислоты на три основных группы в зависимости от их физико-химических свойств их радикалов, а образуемые между ними связи – на 4-5 видов (табл. 3.4).

Таблица 3.4

Типы радикалов аминокислот и образуемые ими связи [12]

Типы радикалов	Соответствующие аминокислоты	Примерное содержание в белках	Связи, образуемые радикалами
Неполярные радикалы	Гли, Ала, Вал, Лей, Иле, Мет, Фен, Три, Про	50 %	Гидрофобные и ван-дер-ваальсовы (индукционные и дисперсионные взаимодействия)
Полярные радикалы, не способные к ионизации	Сер, Тре, Цис, Тир, Асн, Глн, Гип (гидроксипролин)	20 %	Водородные связи. Для Цис – еще и дисульфидные
Полярные радикалы, способные к ионизации при физиологическом рН	Асп, Глу, Арг, Лиз, Гил (гидроксилизин), Гис	30 %	Ионные и водородные

Третичная структура белка обуславливает форму и размеры индивидуальной белковой молекулы. Белковые молекулы могут быть и шаровидными, и удлинёнными – от эллипса до нити. Чаще всего отношение длинной оси к короткой оси молекулы белка варьирует от 3 до 6. Длина белковых молекул в среднем находится в пределах нескольких десятком нанометров [18].

Большинство белков, имеющих третичную структуру, весьма компактны. Плотность упаковки (отношение объема, ограниченного

вандерваальсовой оболочкой, к полному объему) белковых глобул имеет принципиально важное значение для таких белков, как ферменты, гормоны и другие биологически активные вещества пептидной природы. Молекулы лизоцима и рибонуклеазы имеют плотность упаковки около 0,75 (для плотно упакованных сфер теоретическое значение плотности упаковки равно 0,74) [10].

Белки, имеющие третичную структуру, могут иметь различные пространственные конформации с более или менее упорядоченными структурами. Так, миоглобин имеет достаточное количество  $\alpha$ -спиральных фрагментов, лизоцим (129 аминокислотных остатков, молекулярная масса 14 600) содержит лишь несколько коротких спиралей, а вся цепь уложена сложным и нерегулярным образом. В молекулах более крупных размеров часто встречаются области с четко выраженной  $\beta$ -структурой. Примером такого белка является карбокси-пептидаза *A* (307 аминокислотных остатков). В молекуле глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (334 остатка) имеются участки как параллельных  $\beta$ -структур, так и антипараллельных  $\beta$ -структур, которые формируют четко различимые домены, соединенные бесструктурными «шарнирными» участками.

Считается, что третичная структура глобулярных белков отвечает минимуму свободной энергии и, следовательно, представляет собой наиболее устойчивую конформацию. Однако не следует считать, что третичная структура – это абсолютно жесткая и неподвижная структура. Многие глобулярные белки (особенно ферменты и гормоны) претерпевают конформационные изменения при выполнении ими биологических функций. Так, ферменты могут существенно изменять свою пространственную структуру при связывании с субстратом или ингибитором. Не менее значительные изменения происходят и при связывании белковых гормонов с мембранными рецепторами клеток. Поскольку полипептидный остов глобулярных белков характеризуется определенной степенью гибкости, то молекулы этих белков подвержены локальным внутренним флуктуациям (молекулы «дышат»).

Предполагают, что на формирование глобулы белка могут оказывать влияние следующие факторы: 1) тепловые флуктуации и колебания отдельных групп, когда связи между ними то разрываются, то вновь замыкаются; 2) специальные вещества-регуляторы; 3) химическая модификация белка (например, фосфорилирование, гликозилирование и пр.); 4) само выполнение белком его функций [12].

Формирование третичной структуры играет определяющую роль в приобретении белком присущей ему функциональной активности. Именно на уровне этой структуры в белке появляются так называемые *активные центры* (один или несколько) – группы из нескольких радикалов (чаще всего от 3 до 8), способные специфично взаимодействовать с определенными лигандами. На уровне первичной структуры они могут быть значительно удалены друг от друга, но сближаются в процессе *фолдинга* (процесса формирования или «созревания» нативного белка).

Большинство белков, имеющих третичную структуру, обладают высокой молекулярной массой. И можно было бы предполагать, что сворачивание такой глобулы – дело случайное, хаотическое и длительное. Однако установлено, что даже в очень маленьких клетках, таких как клетках *E. coli*, полная биологически активная молекула белка, состоящая из 100 аминокислотных остатков, при +37°C строится за 5 секунд. Если предположить, что аналогичная молекула беспорядочно «перебирала» бы все возможные варианты (углы вращения вокруг каждой одинарной связи белкового остова) пока не нашла бы свойственную именно только ей, единственную нативную конформацию, то на это потребовалось бы не менее  $10^{50}$  лет [9].

Отсюда следует вывод, что белки сворачиваются не случайным путем (по пути «проб и ошибок»), а происходит компактная укладка высококооперативным способом. То есть, если какой-то минимальный отрезок цепи свернулся надлежащим образом, то значительно увеличивается вероятность правильной укладки всех остальных участков цепи.

Кроме того установлено, что для фолдинга крупных белков требуются специальные белки – шапероны (вспомогательные белки) и ферменты фолдазы. Эти вещества не определяют то, какой должна быть пространственная конформация белковой глобулы (решающую роль в этом играет только первичная структура белка!), но создают возможность для быстрого ее формирования.

Изменение конформации белков – это важнейший способ изменения их биологической активности, который постоянно используется в клетке для регуляции процессов метаболизма.

Модификации пространственной структуры белков могут осуществляться под действием ряда факторов, среди которых особое значение имеют другие молекулы (лиганды). Существует несколько групп белок-лигандных взаимодействий: 1) после связывания с белком лиганд не изменяет, а стабилизирует его конформацию (ионы  $Ca^{2+}$ , образуя дополнительные связи с радикалами аминокислот лизоцима, придают этому белку дополнительную устойчивость к воздействию таких агентов, как мочевины или гуанидингидрохлорид); 2) связывание лиганда с белком приводит к таким значительным изменениям третичной структуры белка, которые и позволяют белку выполнять присущие ему функции (кальмодулин, связав два иона  $Ca^{2+}$ , приобретает способность влиять на активность многих белков в клетке); 3) белок, после связывания с лигандом, из состояния так называемой расплавленной глобулы (компактная молекула, но без упорядоченной структуры), переходит в определенную нативную функциональную молекулу (в отсутствие иона  $Ca^{2+}$  лактальбумин утрачивает нативную третичную структуру, но глобулярность формы не теряет, поскольку в молекуле этого белка имеется 4 дисульфидных связи); 4) в отсутствие лиганда цепь белка частично развернута, то есть не полностью формируется вторичная структура и, естественно, полностью отсутствует третичная структура (белок остеокальцин без 5 ионов  $Ca^{2+}$  представляет собой достаточно рыхлую структуру, а после связывания с катионами кальция он существенно уменьшается в объеме, происходит формирование третичной структуры, а отдель-

ные глобулы молекул остеокальцинов объединяются в димеры, что приводит к формированию и четвертичной структуры белков); 5) в отсутствие лиганда белок почти полностью развернут, то есть представляет собой случайный клубок, а взаимодействие с лигандом обеспечивает формирование нативной пространственной структуры белка (отсутствие гема в цитохроме *c* приводит к полному разворачиванию белковой глобулы); 6) лиганд вызывает очень серьезные конформационные изменения доменов или субъединиц белка (взаимодействие гемоглобина – Hb – с кислородом приводит к многочисленным и сложным конформационным превращениям – соседние субъединицы поворачиваются друг относительно друга на 10-15°. Кроме того, связывание молекулы кислорода с гемом одной субъединицы повышает сродство к кислороду соседних субъединиц, то есть имеет место так называемый кооперативный эффект, имеющие огромное физиологическое значение) [12].

Третичная структура белков формируется постепенно, проходя определенные стадии и принимая разнообразные формы в процессе образования нативной конформации.

Так, исходным состоянием белковой молекулы можно считать форму случайного клубка (белок не имеет ни вторичной, ни третичной структуры и пептидная цепь полностью развернута, но не растянута). Белок может приобретать форму случайного или рыхлого клубка, сохраняющего такие свойства белка, как эластичность. Затем следует состояние, предшествующее расплавленной глобулы (когда вторичная структура сформирована, но не до конца, то есть цепь частично развернута, третичная структура отсутствует). Далее белок приобретает форму расплавленной глобулы (вторичная структура полностью сформирована, цепь свернута в компактную глобулу, но жесткая третичная структура отсутствует). Белок, переходящий в состояние расплавленной глобулы, коллапсирует, то есть происходит сжатие клубка. Движущими силами этого процесса является взаимодействия радикалов аминокислот друг с другом. Причем, с помощью радикалов фактически взаимодействуют отдельные элементы

вторичной структуры. И, наконец, процесс завершается формированием нативного белка (цепь свернута в компактную глобулу, имеющую определенную третичную структуру). В случае большого белка сначала идет формирование третичной структуры доменов, а затем эти домены занимают правильное положение друг относительно друга. Самым последним этапом является связывание мономеров в олигомерные структуры (если белок состоит из нескольких субъединиц).

Изучение третичной структуры белков имеет очень важное практическое и теоретическое значение.

### 3.4. Четвертичная структура белков

Если в состав белка входят несколько полипептидных молекул (субъединиц, или протомеров), то такой белок называют *олигомерным*, и говорят о следующем уровне организации белков – *четвертичной структуре*. Можно определить четвертичную структуру, как расположение полипептидных цепей, входящих в состав отдельных субъединиц, относительно друг друга, то есть способ их совместной укладки и упаковки с образованием нативной конформации олигомерного белка.

Количество субъединиц в составе белков может быть различной. Из примерно 200 белков (при случайной выборке) с молекулярной массой не более 300 кДа оказалось: димеров – 102, тетрамеров – 58, гексамеров – 23, тримеров – только 9, пентамеров – ни одного, октамеров – 3. Поскольку количество полипептидных цепей в таком белке достаточно велико (от 2 до нескольких десятков, но, как правило – четное число субъединиц), то и молекулярная масса его будет выше таковой одноцепочечных белков, да и функции олигомерного белка будут тоже более сложными. Четное число субъединиц, очевидно, отражает общий *принцип симметрии*, свойственный живой природе [7].

Белки с нечетным числом субъединиц встречаются в природе редко, но многие из них выполняют весьма важные функции. Например, тримерами являются некоторые ГТФ-связывающие белки,

функции которых заключаются в передаче сигналов внутрь клетки или в различные ее компартменты, в участии в биосинтезе белка. ГТФ-азная активность ГТФ-связывающих белков приводит к высвобождению энергии макроэргических связей ГТФ, которая используется, например, для передачи сигнала. К ГТФ-связывающим белкам относится, в частности, трансдуцин, который участвует в передаче и усилении светового сигнала, выступая в качестве компонента комплекса белков (трансдуцин-родопсин-фосфодиэстераза циклических нуклеотидов), обеспечивающих восприятие и многократное ( $5 \cdot 10^5$  раз) усиление светового сигнала в сетчатке глаза.

Наиболее известными белками, имеющими олигомерную структуру, являются гемоглобин, РНК-полимераза, пируватдегидрогеназный комплекс и ряд других белков (табл. 3.5).

Таблица 3.5

Некоторые олигомерные белки [9]

Название белка	Молекулярная масса, Да	Число цепей в олигомерном белке
Гемоглобин (из крови млекопитающих)	64500	4
Аденилаткиназа (из печени крысы)	18 000	3
Гексокиназа (из дрожжей)	102 000	2
Лактатдегидрогеназа (из сердца быка)	140 000	4
Цитохромоксидаза	200 000	7
Глутаматдегидрогеназа (из печени быка)	320 000	6
F <sub>1</sub> -АТФаза	380 000	9 или 10
РНК-полимераза (из <i>E.coli</i> )	400 000	5
Аспартат-карбамоилтрансфераза (из <i>E.coli</i> )	310 000	12
Изоцитратдегидрогеназа (из сердца быка)	1 000 000	10
Глутаминсинтетаза (из <i>E.coli</i> )	600 000	12
Пируватдегидрогеназный комплекс	4 600 000	72

В формировании четвертичной структуры участвуют не пептидные цепи сами по себе, а глобулы, образованные каждой из этих цепей в отдельности. Понятие четвертичной структуры, таким образом, относится к ансамблю глобул. Весь ансамбль выступает как единая макромолекула, но, в тоже время, каждая из субъединиц сохраняет значительную автономию (более выраженную, чем автономия доменов в третичной структуре белков).

Субъединицы связываются в макромолекулярный комплекс за счет взаимодействий (ионных, гидрофобных, водородных) аминокислотных радикалов, расположенных на контактирующих поверхностях субъединиц. Такие поверхности называются *взаимно комплементарными*. Субъединицы могут связываться в единую глобулу только после того, как каждая из них приобретет характерную для нее третичную структуру. Но функциональная активность отдельных полипептидных молекул проявляется только после того, как произойдет взаимодействие всех субъединиц в единый комплекс.

Одним из наиболее ярких примеров может служить группа иммуноглобулинов, построенных из различных полипептидных цепей, комплементарных друг другу [21].

Четвертичная структура поддерживается силами слабых взаимодействий. Поэтому такая структура белков представляет собой достаточно лабильное образование, менее прочное, чем третичная структура. Однако в природе существуют белки четвертичной структуры, которые образуют замкнутые структуры (кольцевые, сферические эпимолекулы, молекулы в форме трубок), называемые *тороидальными*. Подобные замкнутые конструкции дополнительно стабилизируют четвертичную структуру за счет увеличения общего числа контактирующих группировок и поверхностей между субъединицами. К таким белкам, например, относятся белки-гексамеры, называемые *хеликазами*, которые расплетают двойную спираль ДНК в ходе репликации. Вообще, количество субъединиц в тороидальных белках колеблется от 6-7 до 12-15.

Межсубъединичные контакты в белках четвертичной структуры представляют собой в основном систему нековалентных контактов (водородными связями, гидрофобными взаимодействиями и пр.). Дисульфидные связи крайне редко принимают участие в стабилизации четвертичной структуры (соединение легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов).

Наиболее важная роль отводится водородным связям. Система таких связей объединяет в одну вытянутую структуру  $\beta$ -складчатые листы взаимодействующих субъединиц (в ферменте алкогольдегидрогеназе лошади две субъединицы, взаимодействуя, образуют протяженный  $\beta$ -складчатый слой, состоящий из 12 пептидных отрезков). Еще один существенный вклад в формирование и поддержание четвертичной структуры вносят гидрофобные взаимодействия (контакты между гидрофобными группами и целыми гидрофобными участками на поверхности взаимодействующих субъединиц). У того же фермента – алкогольдегидрогеназы – кроме водородных связей четвертичную структуру стабилизируют гидрофобные взаимодействия (в общей сложности 18 остатков гидрофобных аминокислот на площади  $600 \text{ \AA}^2$ ). Наличие водородных связей и гидрофобных взаимодействий делают объединение субъединиц в алкогольдегидрогеназе настолько прочным, что диссоциация четвертичной структуры этого белка достигается только 8 М мочевиной [15].

Четвертичная структура – это последний уровень организации белковых молекул (но не обязательный). Некоторые белки, имеющие четвертичную структуру, легко диссоциируют на отдельные субъединицы даже в обычных условиях. Но есть и такие, которые сохраняют свою стабильность (в виде субъединичной организации макромолекулы) даже в жестких условиях среды (например, при повышении температуры).

Субъединицы в олигомерных белках могут быть одинаковыми (по пространственной организации, по функциям), а могут быть разными. Если субъединицы, образующие четвертичную структуру белка, совершенно различны (и по строению, и по функциям), то говорят

о *гетеромерном* белке. Такая молекула белка является полифункциональной (например, протеинкиназа, в которой одна из субъединиц каталитическая, а другая – регуляторная). Если субъединицы одинаковые, то белок называют *гомомерным* [15].

Геометрия симметричных димеров и тримеров очевидна. Симметричные тримеры часто играют определяющую роль при образовании трансмембранных каналов, поскольку (в соответствии с геометрией) пучок из трех субъединиц сам по себе образует внутренний канал.

В белках, состоящих из 4 субъединиц, протомеры могут размещаться в вершинах квадрата (встречается достаточно редко), или могут занимать вершины тетраэдра (встречается значительно чаще). Четвертичная структура, в которой каждая субъединица взаимодействует с тремя остальными с различной силой, а молекула в целом оказывается весьма компактной, встречается особенно часто. Для гексамерных белков характерна октаэдрическая упаковка, но встречаются и гексагональные плоские структуры (гораздо реже).

Субъединицы белка, формирующие четвертичную структуру, бывают идентичными, но могут и отличаться (будучи в то же время однотипными, эволюционно родственными белками, обладающие одинаковым способом свертывания пептидной цепи в пространстве). В таких случаях образование четвертичной структуры имеет интересные особенности. Так, например, тетрамерный белок образован структурно гомологичными однотипными субъединицами  $\alpha$  и  $\beta$ , то в зависимости от степени их отличия возможны два варианта: 1) когда контакты  $\alpha$ - $\alpha$ ,  $\beta$ - $\alpha$  и  $\beta$ - $\beta$  отличаются значительно, образуется четвертичная структура типа  $\alpha_2\beta_2$ , другие наборы субъединиц будут нестабильны; 2) если межсубъединичные контакты практически равноценны, то появляется возможность существования всех разнообразных вариантов четвертичных структур –  $\alpha_4$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_1\beta_3$  и  $\beta_4$ , причем, доля каждой из этих *множественных форм* определяется относительным содержанием субъединиц  $\alpha$  и  $\beta$ .

Примером такого белка является лактатдегидрогеназа человека. Она построена из 4 субъединиц двух типов: М-субъединицы (от англ. muscle – мышечная) и Н-субъединица (от англ. heart – сердечная). Для этого фермента возможны следующие варианты множественных форм:  $M_4$ ,  $M_3N_1$ ,  $M_2N_2$ ,  $M_1N_3$  и  $N_4$ . Множественные формы лактатдегидрогеназы обусловлены генетически и поэтому их называют *изоформами*.

Примером очень крупных белков, имеющих четвертичную структуру, являются *ферритины*, которые служат для связывания и депонирования ионов железа у различных видов растений и животных. Молекулы ферритина животных состоит из 24 субъединиц, между которыми располагаются каналы (полости) для проникновения оксидов железа. Так, например в одной эпимолекуле ферритина насекомых (в центральной полости белка) может находиться 3500 атомов железа.

По мнению некоторых авторов [7] к четвертичной структуре не следует относить надмолекулярные (полиферментные) комплексы, метаболонны и протеасомы. Возникновение таких комплексов (адсорбционных и интегральных ансамблей ферментов и т.д.) необходимо: 1) для обеспечения высоких скоростей метаболизма в клетке; 2) для упрощения и ускорения протекания серии химических реакций за счет адресной передачи метаболитов от одного фермента к другому; 3) для осуществления быстрой деградации прежде всего аномальных белков, возникающих вследствие мутаций или в результате ошибок белоксинтезирующей системы (с помощью протеасом – крупных комплексов протеолитических ферментов).

## ГЛАВА 4

### ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ

Белки, представляющие собой высокомолекулярные биополимеры, формируют нативные конформации с помощью различного рода связей и взаимодействий. Некоторые из них являются достаточно прочными (пептидная, дисульфидная связи), другие – менее прочными (водородная связь, ионные и гидрофобные взаимодействия). Оптимальная активность белков отмечается при определенной пространственной организации белков, которая зависит от факторов внешней среды.

Большинство нативных белков в клетке имеют достаточно стабильно фиксированные пространственные структуры. При физиологических условиях окружающей их среды изменения конформаций таких белков бывают незначительными. Однако в живой клетке постоянно наблюдаются процессы нарушения некой упорядоченной структуры белков и их последующей самоорганизации. Такие явления играют весьма важную роль, например, при переносе белков через мембраны, при связывании рецепторов с лигандами, при взаимодействии с другими макромолекулами (белками, нуклеиновыми кислотами) и т.д.

Как известно, стабильность пространственной структуры белка требует: во-первых, образования не менее 90 % возможных водородных связей внутри белковой глобулы; во-вторых, строго определенных расположений гидрофобных радикалов аминокислот, принимающих участие в формировании гидрофобного «ядра» белковой макромолекулы; в-третьих, комплементарного расположения заряженных радикалов аминокислотных остатков, формирующих ионные взаимодействия [15]. Разрыв значительной части внутрибелковых связей и взаимодействий вызывает кооперативный переход нативной структуры белка в денатурированное состояние.

Нарушение нативной структуры белков *in vitro* имеет место, например, при воздействии детергентов, высоких и низких температур, давления, в случае резкого изменения рН среды и т.д.

В описанных выше случаях имеет место принципиально серьезное нарушение нативной структуры белковых молекул. Причем, нарушаются в первую очередь менее прочные связи и взаимодействия. Так вот, если при воздействии различного рода факторов внешней среды, происходит существенное изменение нативной вторичной и третичной структуры белковых молекул, возрастанием энтропии системы, то говорят о *денатурации белков*. Денатурация, как правило, сопровождается потерей белком его функциональных свойств.

Денатурация может происходить либо очень резко, приводя к весьма значительным нарушениям и пространственной структуры, и функций белка, либо достаточно плавно (это может иметь место, например, при денатурации не всей белковой молекулы, а отдельного ее домена). Установлено, что высокое содержание глицина приводит к чрезмерной лабильности основной цепи белка, что делает этот белок наименее устойчивым к денатурирующим факторам [20].

Денатурация белков может быть вызвана некоторыми физическими факторами: температурой, давлением, различного рода излучениями. Так, например, повышение температуры приводит к возрастанию вклада энтропийного фактора. Тепловая денатурация, как правило, происходит скачкообразно. Температура денатурации для различных белков различна. Есть белки, которые обладают выраженной термостабильностью (например, фермент термолизин, продуцируемый термофильными микроорганизмами, выдерживает температуру до +80°C).

Процесс денатурации белков возникает под действием таких веществ (мочевины, солянокислого гуанидина, минеральных и органических кислот, ионных детергентов и др.), которые нарушают, прежде всего, нековалентные взаимодействия (например, водородные связи, ионные и гидрофобные взаимодействия). Денатурирующее действие перечисленных выше реагентов весьма индивидуально, разнообразно и зависит от природы вещества, физико-химических свойств и пространственной организации белка, от температуры, от pH и от прочих факторов.

Очень трудно оценить степень денатурации, то есть полноту исчезновения системы нековалентных взаимодействий, свойственных нативной структуре. Иногда для этого используют методы, оценивающие какой-либо физический параметр пространственной структуры белка, например, дисперсии оптического вращения или спектра флуоресценции, которые могут изменяться в процессе денатурации.

Применив целый букет физико-химических методов, удалось установить, что при денатурации резко меняются такие характеристики белка, как: активность, упорядоченность окружения боковых групп белка и фиксированность глобулярной структуры.

В ходе многочисленных исследований с помощью различных методов был обнаружен весьма универсальный интермедиат разворачивания (и сворачивания) белков, названный *«расплавленной глобулой»*. Свойства этого интермедиата следующие: нет уникальной упаковки боковых групп; наблюдается флуктуация молекулы белка; отмечается подвижность алифатических боковых групп; часть остатков триптофана выходит в воду; обнаруживается распад большинства дальних по цепи контактов; не происходит (как правило) дальнейшего плавления белковой молекулы [17]. Некоторые нативные белки (особенно небольшие) разворачиваются, минуя стадию расплавленной глобулы.

Процесс денатурации белков сродни плавлению кристалла: небольшой рост его объема приводит к разрыву части Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий в нем и раскрепощает движения молекулы. Процессы, происходящие при денатурации белков, похожи на плавление или испарение твердого тела [17].

Расплавленная глобула получается из нативного состояния путем кооперативного температурного плавления, то есть такое состояние обладает значительно большей энтальпией и энтропией, чем нативное состояние. Внутримолекулярные взаимодействия в расплавленной глобуле резко ослаблены, а подвижность белковой цепи резко возрастает. Поскольку большая часть внутренних степеней свободы в белке определяется мелкомасштабными флуктуациями структуры (прежде всего – с движением боковых групп), именно раскрепощение таких

флуктуаций может сделать состояние расплавленной глобулы термодинамически выгодным. Однако раскрепощение мелкомасштабных флуктуаций не требует полного разворачивания белковой цепи – достаточно лишь ее небольшого набухания. При этом в белке резко ослабляется Ван-дер-Ваальсово притяжение. Поскольку оно сильно зависит от расстояния, то даже небольшое увеличение размеров молекулы оказывается достаточным для его значительного ослабления.

Обычные полимерные глобулы, состоящие из одинаковых мономеров (или почти одинаковых – например, молекулы ДНК или РНК), разрушаются путем постепенного набухания. Для белковой глобулы такой процесс денатурации не характерен. Это можно объяснить такими факторами, как: во-первых, белок имеет единственную наиболее стабильную укладку цепи; во-вторых, в белковой цепи радикалы аминокислотных остатков подвижны, но крепятся на достаточно жесткой главной цепи; в-третьих, нативный белок упакован плотно, как кристалл.

Белок, благодаря описанным выше свойствам, не меняясь, терпит изменение внешних условий до некоторого предела, а потом плавится, как микроскопическое твердое тело, весь сразу. Такая устойчивость и твердость белка обеспечивает надежность его работы в клетке. То есть можно сказать, что фазовый переход между нативным и денатурированным состояниями белка объясняется скачкообразным ростом энтропии (и в основном – энтропией боковых групп радикалов) при расширении глобулы, а его фазовый, кооперативный характер связан с тем, что боковые группы прикреплены к главной жесткой цепи и не могут раскрепощаться поодиночке.

Ранее считалось, что денатурация белка сопряжена с полным разрушением структуры и переходом глобулы в клубок. После того, как было открыто состояние белка – расплавленной глобулы – стало ясно, что денатурированный белок может быть и достаточно плотным, и достаточно рыхлым. Эти состояния будут определяться двумя факторами: силой растворителя и гидрофобностью полипептидной цепи. Компактность расплавленной глобулы обеспечивается остаточными

гидрофобными взаимодействиями. Если остаточные гидрофобные взаимодействия слабы, то глобула начнет разбухать, и тем сильнее, чем сильнее притяжение растворителя к белковой цепи. При увеличении притяжения растворителя к белковой цепи она разбухает до неупорядоченного клубка.

Переход расплавленной глобулы в клубок начинается (в некоторых белках) с ее фазового перехода в «пред-расплавленную» глобулу, а затем эта глобула разворачивается до клубка уже постепенно. Конечно, разные белки ведут себя по-разному. Но, не смотря на разнообразие белков, можно констатировать, что: 1) нативное состояние любого белка отделено от всех других его состояний переходом типа «все-или-ничего»; 2) денатурированное состояние обязательно отличается от нативного подвижными боковыми группами (но может быть и весьма компактным); 3) переход из температурно-денатурированного состояния в клубок может быть как фазовым переходом типа «все-или-ничего» для одних белков, так и не-фазовым переходом – для других.

Установлено, что денатурация белка может осложняться нарушением его ковалентной структуры. Такое явление возможно, например, при длительном воздействии мочевины в условиях высокой температуры (происходит карбамилрование аминогрупп лизина). Довольно часто наблюдается гидролиз амидных групп аспарагина и глутамина (дезаминирование), расщепление остатков цистина с образованием дегидроаланина. Подобные нарушения нативной структуры белков препятствует ренатурации белков.

*Ренатурацией* белка называется процесс, в результате которого развернутая полипептидная цепь возвращается в исходное компактно сложенное состояние.

В условиях живой клетки или организма процессы денатурации и ренатурации могут происходить достаточно часто и легко (процессы связывания фермента с субстратом, рецептора с гормоном и пр.). Если белок не слишком велик и не подвергался сильной химической модификации после сворачивания, то ренатурация проходит «мягко»,

то есть архитектура белка спонтанно восстанавливается при нормализации среды. Обратимость денатурации белка очень важна, поскольку свидетельствует о том, что вся необходимая для создания уникальной нативной структуры белка информация находится в его аминокислотной последовательности, а сама нативная структура белка равновесна и стабильна [17].

Реальное свертывание белка, скорее всего, происходит по одному или по немногим путям. Это значительно сокращает время формирования нативной структуры белка. Зачастую свертывание полипептидной цепи *in vivo* синхронизировано с ее биосинтезом, что уже во многом предопределяет выбор пути пространственной укладки. Такой процесс называется *котрансляционный процессинг* белка. Кроме того, в физиологических условиях при свертывании белка значимыми могут быть такие события, как скорость синтеза полипептидной цепи, начало формирования нативной структуры белка уже в тот момент, когда полипептидная цепь покидает пептидилтрансферазный центр рибосомы.

Не исключено, что аналогичные процессы имеют место и при ренатурации белков, а не просто во время их синтеза, поскольку определяющим фактором в свертывании полипептидной молекулы является первичная структура белка.

Исследование кинетики ренатурации некоторых белков позволяет предположить следующий механизм этого процесса. Так, сначала быстро образуются короткие фрагменты вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складчатой конформации или  $\beta$ -изгибы). Возникшие элементы вторичной структуры достаточно нестабильны и могут то возникать, то распадаться («мерцающие» фрагменты) [15]. Когда появятся несколько участков такой организованной структуры длиной по 50-150 аминокислотных остатков (будущие домены), происходит их соединение за счет нековалентных взаимодействий. Результатом этого «склеивания» преддоменных участков образуется так называемая *расплавленная глобула*, которая еще не есть нативный белок (поскольку ее пространственная структура достаточно рыхлая), но уже близка к таковому. Далее происходит уплот-

нение структуры и на уровне доменов, и на уровне так называемых бесструктурных фрагментов, устанавливается контакт между ними и завершается формирование нативной белковой глобулы. После этого белок приобретает характерную для него биологическую активность.

Следует учесть, что *in vivo* пространственная структура в норме формируется каждой вновь синтезируемой молекулой в отдельности, без накопления денатурированных, развернутых структур. Замедленное формирование пространственной структуры белка в физиологических условиях можно объяснить задержкой образования дисульфидных связей. Фермент протеиндисульфидизомераза (встречается в эндоплазматическом ретикулуме и ускоряет перебор возможных дисульфидных связей в нативной клетке) способствует ускорению поиска правильно образованных S—S-связей. В присутствии этого фермента ренатурация протекает значительно быстрее. Так, например, ренатурация панкреатической рибонуклеазы при действии протеиндисульфидизомеразы происходит примерно за 30 мин, а спонтанно протекающая ренатурация (без фермента) практически не фиксируется за указанное время. Аналогичную функцию может выполнять и тиоредоксин [15].

Замедление ренатурации и *in vivo* может объясняться *цис-транс*-изомеризацией некоторых пептидных связей (например, образованных иминогруппой пролина). Для ускорения процесса ренатурации (или самосборки молекулы белка в процессе трансляции, или сразу после трансляции), в клетке существует такой фермент, как пролил-*цис-транс*-изомераза (циклофилин). Этот фермент ускоряет процесс свертывания полипептидной цепи в компактную глобулу, поскольку катализирует *цис-транс*-изомеризацию пептидных связей пролина.

Однако названные выше ферменты не способны очень эффективно и быстро свертывать полипептидную цепь в процессе трансляции. Скорость трансляции оказывается намного выше. Поэтому для успешной и практически моментальной пространственной укладки белка в клетке существуют специализированные белки, называемые *шаперонами*. Основная функция этих белков – быстрое нахождение правильной нативной пространственной структуры вновь синтезированного белка.

## ГЛАВА 5

# СВОРАЧИВАНИЕ БЕЛКОВ

Белковые молекулы способны обретать свои нативные пространственно-функциональные структуры по-разному (с разной скоростью, посредством вспомогательных белков, через интермедиаты и пр.). Характер и последовательность самоорганизации белков зависят от целого ряда обстоятельств: от молекулярной массы и размеров белков, от растворимости белков (гидрофобные или гидрофильные), от формы белковых молекул (глобулярные, фибриллярные), от локализации системы синтеза белков (на свободных рибосомах или на связанных с эндоплазматическим ретикулумом), от условий окружающей среды (температура, рН среды и т.д.). Наиболее успешно сворачивание и пространственная кладка полипептидных молекул осуществляется в физиологических условиях. Изучение закономерностей свертывания вновь синтезированных белковых цепей является одной из важнейших задач биохимии.

Биохимический синтез белковой молекулы, происходящий на рибосомах, занимает около минуты. Образование нативной структуры белка происходит произвольно примерно за такое же время. Предполагают, что белки начинают процесс сворачивания уже на рибосомах, не успев сойти с них. Однако достоверные данные об образовании белковой структуры *in vivo* весьма ограничены. Это объясняется тем, что очень трудно увидеть структурные превращения растущего белка на фоне всего внутриклеточного содержимого (клеточного «супа»). При выделении какого-либо белка из клетки во время его синтеза занимает несколько минут, а то и больше, а за это время белок успевает кардинально изменить свою конформацию десятки раз.

Исследования показывают, что (в случае высокомолекулярного белка) существуют так называемые «единицы самоорганизации», которыми являются отдельные домены, а не весь белок в целом. Доказательством этого факта являются следующие обстоятельства: во-первых, отдельно взятые домены часто способны к правильной сомо-

организации; во-вторых, однодоменный белок, лишенный примерно десятка аминокислотных остатков на своем С-конце, к самоорганизации не способен.

Вообще, самоорганизация пространственных структур белков (а также РНК) представляет собой уникальное физическое явление, не имеющее аналогов в неживой природе. Самоорганизация белков напоминает образование кристаллов, но таких, которые не имеют периодической пространственной структуры, чрезвычайно сложно устроенных и очень маленьких. Самоорганизация трехмерной структуры белков возникает из стремления молекул к термодинамическому равновесию. В каждом конкретном случае конформация полипептидных молекул будут устойчивы лишь тогда, когда они обладают минимумом свободной энергии. Вместе с тем, свертывание полипептидных цепей повышает степень их упорядоченности. Рост упорядоченности означает уменьшение энтропии системы. При свертывании полипептидной цепи снижается степень упорядоченности воды и образуется максимально возможное количество водородных связей. При этом возрастает энтропия водной среды. Таким образом, уменьшение энтропии полипептидной цепи перекрывается ростом энтропии окружающей среды и энтропия системы в целом возрастает. Следовательно, полипептидная цепь самопроизвольно принимает нативную конформацию, характеризующуюся минимумом свободной энергии суммарной системы [6].

Белковая цепь выходит с рибосомы постепенно и не вполне равномерно – имеются паузы, приостановки биосинтеза цепи (на «редких» кодонах). Соответствие пауз границам структурных доменов способствует их спокойному созреванию. Далее белковая цепь в клетке сворачивается с помощью специальных белков – *шаперонов*, которые препятствуют агрегации с другими белками и, тем самым, создают условия для нормального сворачивания растущего пептида. С агрегацией борются «малые» шапероны, например, Hsp 60 (heat shock protein, 60 килodalton), Hsp 70, Hsp 90. Эти белки получили свое название потому, что их синтез возрастает при повышении тем-

пературы и других формах стресса. При этом они выполняют функцию защиты белков клетки от денатурации. «Большие» шапероны типа GroEL/GroES или TriC работают с многодоменными белками. Взаимодействие с шаперонами – это энергозависимый процесс (при освобождении шаперонов гидролизуется АТФ). Термин «шапероны» был введен в научную литературу в 1987 г.

Поскольку в живой клетке «созревание» белка, в частности, его сворачивание происходит в окружении, насыщенном макромолекулами, то за время эволюции возник ряд механизмов, которые позволяют разрешить проблему, создаваемую этим окружением. Эти механизмы включают следующие составляющие: действие различных семейств молекулярных шаперонов, преимущественно ко-трансляционное сворачивание (по сравнению с пост-трансляционным). Но первостепенным, определяющим фактором, конечно же, является аминокислотная последовательность белка, которая и предопределяет ту или иную конформацию белка в клеточном окружении.

В настоящее время всё многообразие шаперонов можно разделить на три группы белков: 1) нуклеоплазмины (ядерные белки, принимающие участие в сборке нуклеосом); 2) белки, которые называются Hsp 70 – Vir и др. (группа белков теплового шока и их гомологи); 3) собственно белки-шапероны, или *шаперонины* (имеют непосредственное отношение к сворачиванию полипептидной цепи в нативный белок) [7].

Шаперонины – это белковые комплексы, обнаруженные в бактериях, цитоплазме эукариотических клеток, матриксе митохондрий и хлоропластов (табл. 5.1). В целом можно сказать, что шапероны способствуют корректному сворачиванию вновь синтезируемых белков, а также они защищают свернутые в расплавленные глобулы цепи от агрегации.

Наиболее хорошо изучены шаперонины *E. coli* (GroEL и GroES). GroEL построен из 14 идентичных субъединиц, или протомеров, с молекулярной массой 57 кДа каждый. Он представляет собой цилиндр, сформированный из двух колец, каждое из которых состоит, в

свою очередь, из семи протомеров. Отдельный протомер шаперонина состоит из трех доменов: экваториального, апикального и промежуточного (рис. 5.1).

Таблица 5.1

Функции шаперонов [7]

Источник	Белки, подвергающиеся фолдингу	Шаперон	Функция
<i>E. coli</i>	Предшественники секреторных белков. ДНК-репликационный комплекс	GroEL GroES SecB DnaK/DnaJ	Задержка свертывания перед транспортом; реорганизация белкового комплекса
Фотосинтезирующие бактерии	Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза	GroEL/ GroES	Сборка олигомера
Хлоропласты	Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза	RuSBR	Сборка олигомера
Митохондрии	Митохондриальные белки-предшественники.  Белки-предшественники в матриксе	Hsp70  Hsp60	Завершение транслокации; стабилизация не полностью свернутых структур в матриксе Стабилизация не полностью свернутых структур и свертывание; реэкспорт предшественников в межмембранное пространство
Эндоплазматический ретикулум	Секреторные белки  Субъединицы Т-клеточного рецептора Запасные белки растений	Вip  TRAP, или p28 b70 (Вip)	Завершение транслокации; стабилизация не полностью свернутых структур в канальцах Сборка рецептора  Стабилизация вновь синтезируемых белков

Цитозоль	Синтезируемые полипептиды	Hsc70	Стабилизация не полностью свернутых структур
	Митохондриальные и секреторные белки-предшественники	Hsc70	Разворачивание перед транслокацией
	Белки-рецепторы стероидных гормонов	Hsp90	Стабилизация неактивной формы рецептора
	Белки, трансформирующие ретровирусы	Hsp90	Стабилизация неактивной формы белка при прохождении через плазматическую мембрану
Ядро	Гистоны	Нуклеоплазмин	Сборка нуклеосом

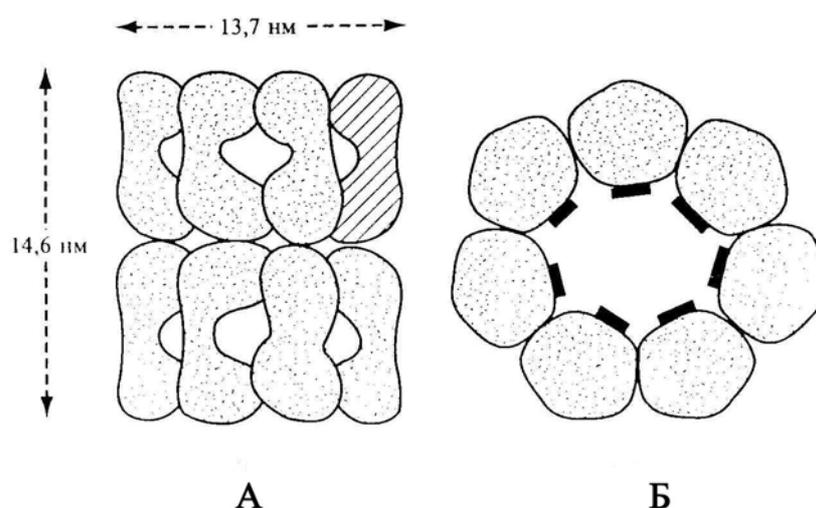


Рис. 5.1. Структура шаперонинового комплекса GroEL: А – вид сбоку цилиндра GroEL, состоящего из двух колец; Б – вид сверху. Темные прямоугольники – участки связывания полипептида [7]

Вершинные (апикальные) домены каждого кольца образуют входные отверстия в центральную полость цилиндра GroEL. Шаперонин GroES (кошаперонин) состоит из 7 одинаковых протомеров (молекулярная масса каждого протомера по 10 кДа). Протомеры GroES образуют куполообразную структуру. Крышу купола формируют короткие подвижные петли протомеров GroES, образованные коротким фрагментом полипептидной цепи – Гли 45-Про 56. В центре купола

имеется отверстие диаметром около 0,8 нм. GroEL и GroES способны связывать АТФ (14 и 7 молекул соответственно). Места связывания АТФ располагаются на внутренней поверхности экваториальных доменов GroEL. Вновь синтезированная полипептидная цепь, подлежащая сворачиванию, связывается с определенным участком внутренней боковой поверхности апикальных доменов. Взаимодействие GroEL и GroES происходит при гидролизе АТФ, в результате чего образуется комплекс GroEL/GroES (рис. 5.2).

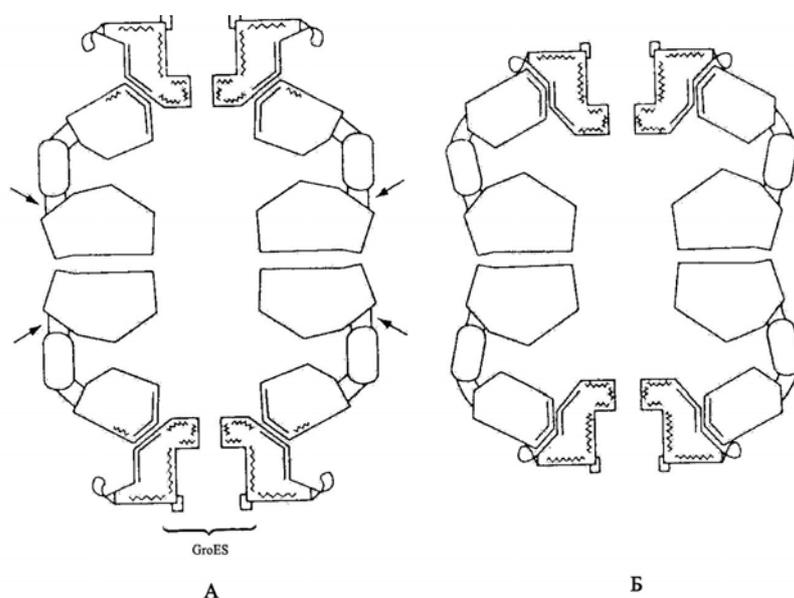


Рис. 5.2. Предполагаемая модель строения комплекс GroEL/GroES [7]

Внутри этого комплекса возникает закрытое пространство (шириной примерно 7 нм и высотой – 6,5 нм), где и происходит сворачивание полипептидной цепи в нативный белок. Формирование нативной структуры белка происходит постепенно в течение нескольких циклов диссоциации-реассоциации комплекса шаперонинов. Причем, в этот период сворачивающийся белок, находясь внутри комплекса, оказывается защищенным от нежелательных контактов с окружающей средой (рис. 5.3) [7].

Первоначально вновь синтезированный полипептид связывается с комплексом шаперонинов в кольце, не занятом GroES (стадия 1). Далее следует этап гидролиза АТФ и связывания (стадия 2), в результате чего GroES отходит от комплекса (переход от стадии 2 к стадии

3), а затем вновь (в комплексе с очередной порцией АТФ) присоединяется к GroEL (стадия 4). На этой стадии GroES «закрывает» полипептид в полости GroEL, где он сворачивается во время гидролиза АТФ (стадии 5 и 6).

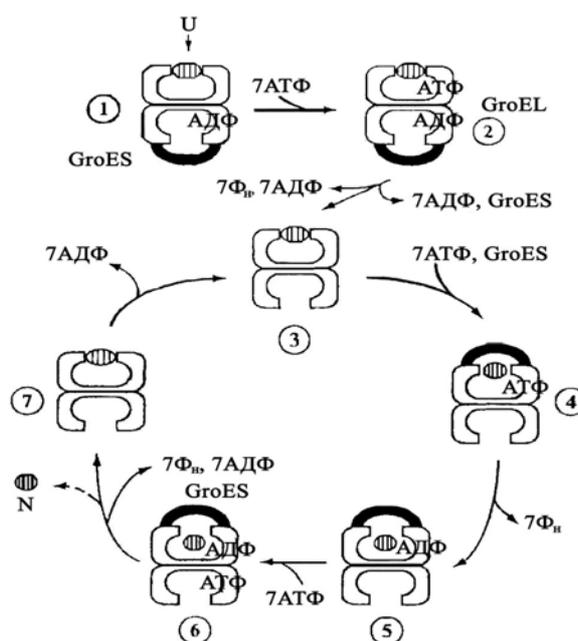


Рис. 5.3. Модель фолдинга белков с участием GroEL/GroES-комплекса шаперонинов [7]. Комплексы шаперонинов показаны вертикальным разрезом через кольца. Стадии цикла, ведущие от несвернутого белка (U) к нативному белку (N), описаны в тексте

Каждый отдельный цикл фолдинга идет в течение 15-20 с и завершается гидролизом еще 7 молекул АТФ. Это приводит к освобождению GroES из комплекса с GroEL (переход от стадии 6 к стадии 7). Далее следует высвобождение свернутого полипептида через отверстие полости цилиндра GroEL.

Таким образом, ключевая роль данной системы работы шаперонов состоит в том, что она просто изолирует сворачивающийся белок, предварительно устраняя в нем «неправильные» взаимодействия, и затем дает ему возможность самому найти оптимальную пространственную структуру. Если белок является олигомерным, то роль системы GroEL/GroES заключается в том, что она обеспечивает правильный фолдинг отдельных субъединиц и затем поставляет их в готовом

виде в цитозоль. Сама же сборка субъединиц в олигомерные структуры происходит вне полостей данной системы.

Как было отмечено выше, фолдинг новых белков может происходить *ко-трансляционно*, то есть по мере его синтеза (роста) на рибосоме, но некоторые полипептидные молекулы претерпевают пространственные модификации *посттрансляционно*, то есть уже после завершения синтеза всей полипептидной цепи.

Поскольку фолдинг белков осуществляется с очень большой скоростью, то в клеточных компартментах должны быть особые факторы фолдинга. Ими являются белки двух групп: 1) ферменты фолдинга (фолдазы); 2) молекулярные шапероны.

К фолдазам относятся такие ферменты, как: 1) протеиндисульфид-изомеразы, которая связана в основном с эндоплазматическим ретикулумом (этот фермент катализирует перемещение в белках дисульфидных связей, то есть происходит изомеризация дисульфидных связей, что дает формирующемуся белку возможность найти такую комбинацию этих связей, которой соответствует энергетически наиболее оптимальная пространственная структура); 2) пептидил-пролил-цис-трансизомеразы (катализирует переход радикалов в области пептидной связи пролина из транс-конфигурации в цис-конфигурацию и обратно. При этом происходит временный разрыв данной пептидной связи и, следовательно, становится возможным поворот вокруг ее плоскости, а после поворота связь снова замыкается. Это приводит к появлению таких изгибов, которые создают наиболее оптимальную пространственную структуру белка).

Функции шаперонов очень разнообразны, но можно выделить несколько основных групп проявлений активности этих белков. Во-первых, это обеспечение правильного фолдинга новосинтезированных белков. В эту функцию можно включить как предупреждение «неправильных» внешних взаимодействий в ходе фолдинга, так и предупреждение «неправильных» внутренних взаимодействий (в пределах одной полипептидной цепи). Если же такие связи уже образовались, то шапероны обеспечивают лабильность этих «неправиль-

ных» слабых связей с той целью, чтобы пептидная цепь не оказывалась зафиксированной в «неправильной» конформации, а могла достичь наиболее оптимальной пространственной структуры. Правильное комплементарное связывание субъединиц в четвертичную структуру, которое осуществляют шапероны, – это тоже относится к правильному фолдингу белков.

Во-вторых, шапероны осуществляют контроль за рефолдингом. То есть под действием различных причин (высокая температура, облучение, появление оксидантов и пр.) давно синтезированные и функционирующие белки теряют свою нативную конформацию (они денатурируют и приобретают способность к агрегации). Такие белки подвергаются в клетке рефолдингу, поскольку в них клетка еще нуждается. Поскольку количество шаперонов значительно возрастает в клетке при длительном температурном стрессе, при котором возникает острая необходимость восстанавливать белки, утратившие нативную структуру, то эти шапероны называли *белками теплового шока (Hsp)*. Белки теплового шока предупреждают агрегацию белковых молекул, а также создают условия для уменьшения лабильности связей в измененных под действием температур белках. В результате всех вышеперечисленных манипуляций с белковой молекулой шапероны делают возможным для белка вновь образовать нативную структуру со всеми возможными связями, то есть обеспечивают создание наиболее энергетически более выгодную конформацию полипептидной цепи.

В-третьих, шапероны принимают участие в некоторых видах внутриклеточного транспорта полипептидов (например, в лизосомы направляются те из белков, которые не поддаются рефолдингу, или отслужившие свой срок молекулы, а в митохондриях – те, которые вновь синтезированы и необходимы для функционирования этих органелл). Интересным является тот факт, что в митохондриях имеются собственные шапероны, обеспечивающие формирование нативной конформации поступивших из цитозоля вновь синтезированных белков. Шапероны цитозоля необходимы для того, чтобы молекулы бел-

ка, предназначенная для митохондрий, не смогла свернуться до момента ее транспорта в эти органеллы. Дело в том, что белки легче транспортируются через мембраны (а их в митохондриях две), если они представляют собой развернутые молекулы. А уже в субкомпартаментах митохондрий (межмембранном пространстве и в матриксе) собственные шапероны помогают полипептидной молекуле свернуться в функционально активную молекулу.

В-четвертых, шапероны способны поддерживать белки в состоянии незавершенного фолдинга, и остаются в связанном с белком состоянии. Одним из примеров такого комплекса (шаперон-белок с незавершенным фолдингом) является цитозольный белок-рецептор гликокортикоидных гормонов, который в отсутствие гормонов связан с комплексом шаперонов. У такого белка, связанного с шаперонами, ядерная метка (область полипептидной молекулы, необходимая для прохождения через ядерные поры внутрь ядра) экранирована (закрыта). Однако после связывания гликокортикоидов с белком-рецептором, шапероны отходят от белка, завершается фолдинг и ядерная метка открывается (оказывается на поверхности белка). Другим примером может служить находящийся в кариоплазме белок-рецептор к эстрагенам и прогестерону, который в отсутствие соответствующих гормонов пребывает в связанном с шаперонами состоянии. В составе комплекса белок-шапероны, этот белок не способен связываться с ДНК, но после взаимодействия с гормонами, белок-рецептор и шапероны диссоциируют, фолдинг завершается и белок вместе с гормоном связывается с соответствующим локусом молекулы ДНК, реализуя, тем самым, свою функцию.

К настоящему времени достаточно хорошо изучены системы у бактерий, ответственные за фолдинг вновь синтезированных белков и рефолдинг поврежденных полипептидных молекул. Известно, что у шаперонов могут быть «помощники» – ко-шапероны. Так, у шаперона *DnaK* (относящегося к шаперонам семейства Hsp70) имеется ко-шаперон *DnaJ*. Считают, что эти два белка осуществляют ко-трансляционный фолдинг, то есть они способны связываться с поли-

пептидными цепями, еще не завершившими синтез и еще не сошедшими с рибосомы. Очевидно, что в этом случае шапероны корректируют не только «неправильные» контакты и взаимодействия внутри синтезирующейся молекулы белка, но препятствуют агрегации высвобождающихся с рибосом полипептидов. Этот процесс энергоемкий и требует затраты большого количества АТФ. После завершения работы (окончания фолдинга) для отделения шаперонов от нативного белка необходим еще один белок – GrpE.

Установлено, что если синтезированный белок принял еще не полностью нативную конформацию, то с ним повторно может соединиться комплекс шаперона *DnaK/DnaJ*. Таких циклов связывания может быть несколько – до тех пор, пока вновь синтезированный белок, наконец, не примет нативную конформацию.

Шапероны принимают участие в формировании бактериофагов, а именно – для фолдинга белков вирусных частиц. Так, например, бактериофаг (вирион) Т4 построен из трех основных частей: головки, хвоста, хвостовых фибрилл двух типов (коротких и длинных). Головка представляет собой капсид в виде многогранника и молекулу ДНК, которая очень компактно и плотно упакована в этом капсиде. ДНК фага Т4 содержит примерно 250 генов, которые кодируют специфические белки, обозначаемые буквами *gp* (от англ. gene product) и соответствующей цифрой. Но фаговую частицу составляют не более ста различных белков. Остальные белки, которые кодируются вирусной ДНК, выполняют вспомогательные функции: обеспечивают реализацию фаговой инфекции, делают возможным фолдинг собственных структурных белков (с помощью шаперонов, кодируемых ДНК вириона), участвуют в сборке готовых вирионов.

Однако при фолдинге некоторых белков фага используются и бактериальные шапероны – GroEL и др. Так, для фолдинга главного белка капсида – gp23 – необходимо наличие фагового шаперона gp31 и бактериального шаперона GroEL (рис. 5.4) [12].

Исследования показали, что вирусный шаперон gp31 очень похож на GroES тем, что имеет сходную пространственную структуру,

молекулярную массу, для формирования «крышки» тоже использует 7 субъединиц.

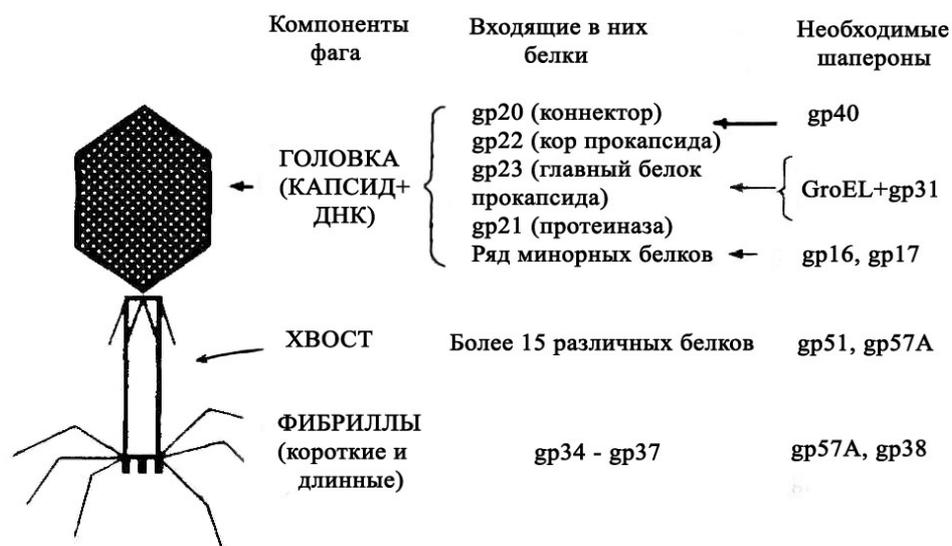


Рис. 5.4. Структура фага T4 и участие различных шаперонов в фолдинге вирусных белков [10]

Помимо шаперонов, которые приводят к правильной кладке полипептидной цепи (нативной конформации), являющейся энергетически и функционально наиболее оптимальной, в клетках могут существовать и антишапероны. Так, в головном мозге обнаруживается белок, называемый *прионовым белком* – **PrP<sup>c</sup>** (от англ. prion protein, constitutive). Функция этого нормального белка пока неизвестна. Однако при некоторых заболеваниях нативная конформация белка изменяется таким образом, что в ней начинают преобладать участки с  $\beta$ -конформацией (которая почти отсутствует в нативном белке) и она приобретает склонность к агрегации с другими белковыми молекулами. Такой измененный белок называется *прионом* (от англ. proteinaceous infection particle – белковая инфекционная частица) – **PrP<sup>sc</sup>**.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Анисимов С.В., Бохелер К.Р., Хавинсон Х.В., Анисимов В.Н. Изучение действия пептидов вилона и эпиталона на экспрессию генов в сердце мышцы с помощью технологии на основе микрочипов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 3. С. 340-347.
2. Белки и пептиды: В 2 т. М.: Наука, 1995. Т.1. 448 с.
3. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.
4. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. Екатеринбург: «Уральский рабочий», 1994. 380 с.
5. Гринстейн Б., Гринстейн А. Наглядная биохимия. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. 119 с.
6. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия. 2-е изд. М.: Мир, 2004. 469с.
7. Коничев А.С., Севастьянова Г.А. Молекулярная биология. М.: Издательский центр «Академия», 2003. 400 с.
8. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи соврем. биологии. 1995. Т. 115. № 3. С. 353-367.
9. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. М.: Мир, 1985. Т.1. 367 с.
10. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980. В 3-х томах. Т.1. 407 с.
11. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, 2000. 158 с.
12. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Медицинское информационное агентство, 2003. 544 с.
13. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Высш. шк., 1989. 495 с.
14. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815с.
15. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков / под ред. А.С. Спирина. М.: Высш. шк., 1996. 335 с.

16. Фаллер Д.М., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М.: БИНОМ-Пресс, 2003. 272 с.
17. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М.: Книжный дом «Университет», 2002. 376 с.
18. Шапиро Я.С. Биологическая химия. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2004. 368 с.
19. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). СПб.:Наука, 2003. 222 с.
20. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М.: Мир, 1982. 354 с.
21. Abbas Abul K., Lichtman Andrew H. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders. 2005. 564 p.
22. Iverson B.L. Betas are brought into the fold // Nature, 1997. V.385. N.6612. P. 113-115.

## Оглавление

Предисловие .....	3
Глава 1 Аминокислоты.....	6
Глава 2 Пептиды .....	18
2.1. Химическая природа и свойства пептидов.....	18
2.2. Строение и функции некоторых пептидов.....	23
2.2.1. Пептидные гормоны.....	23
2.2.2. Нейропептиды .....	27
2.2.3. Пептидные токсины .....	34
2.2.4. Пептидные антибиотики.....	39
2.2.5. Пептиды, обладающие вкусом.....	44
Глава 3 Белки.....	46
3.1. Пептидная связь и первичная структура белков.....	47
3.2. Водородные связи и вторичная структура белков.....	52
3.3. Третичная структура белков.....	60
3.4. Четвертичная структура белков .....	72
Глава 4 Денатурация белков .....	78
Глава 5 Сворачивание белков .....	85
Библиографический список .....	97

**Ольга Николаевна Макурина**

**ХИМИЯ БЕЛКА И ФЕРМЕНТОВ**

Часть I

**ХИМИЯ БЕЛКА**

Печатается в авторской редакции  
Компьютерная верстка, макет В.И. Никонов

Подписано в печать 30.08.07

Гарнитура Times New Roman. Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.

Усл.-печ. л. 6,25. Уч.-изд. л. 4,69. Тираж 100 экз. Заказ № 704

Издательство «Универс групп», 443011, Самара, ул. Академика Павлова, 1

Отпечатано ООО «Универс групп»