

Лекция №2

Структура и функции белков как природных нанообъектов

По химическому составу тело человека и животных включает 5 основных классов веществ (для человека массой 65 кг): 1) белки 11 кг (17%); 2) жиры 9 кг (13,8%); 3) углеводы 1 кг (1,5%); 4) вода 40 кг (61,6%); 5) минералы 4 кг (6,1%).

В составе организмов присутствуют карбоновые кислоты, углеводороды, амины, спирты, альдегиды. В отдельные группы должны быть выделены вещества, присутствующие в тканях живых организмов в небольших количествах, но играющих первостепенную роль в регуляции обмена веществ: пептиды, гормоны, витамины, простагландины, кинины, нуклеарные регуляторные факторы и др.

Белки являются основными биополимерами клеток, за счет которых осуществляются практически все функции организма. Термин “белок” происходит от немецкого слова “Eiweiß“, что означает яичный белок или вообще белок. Другое название - протеины, происходит от греческого слова “протос” - первичный.

Белки являются линейными неразветвленными полимерами построенными из аминокислот.. Информация о структуре белка закодирована в ДНК. Все живые организмы используют 20 идентичных аминокислот и, за некоторым исключением, имеют одинаковый генетический код.

Белки преимущественно состоят из 5 главных элементов: С – 50-55%, Н – 6-7,3%, О – 19-24%, N – 13-19%, S – 0-4%. Кроме вышеперечисленных, белки могут содержать также другие элементы, такие как Р, Fe, Cu, I, Mg, Zn и др. В большинстве белков имеется постоянное содержание азота, равное 16%. Поэтому количество белков иногда выражают через азот: количество белка = содержание азота × 6,25. Различные ткани отличаются по содержанию белков. В пересчете на сухую массу в селезенке 84%, в легких 82%, в мышцах 80%, а в костях 24-28% белков.

Белки относятся к высокомолекулярным соединениям, в состав которых входят сотни и даже тысячи аминокислотных остатков. Молекулярная масса белков колеблется от 6000 до 1000000 Да и выше в зависимости от количества отдельных полипептидных цепей в составе единой молекулярной структуры белка. Молекулярная масса пептидов меньше 6000 Да.

Для определения молекулярной массы белков используют следующие методы.

1. *Химический метод* требует точного знания количественного содержания аминокислоты в белке. Например, в простом белке содержится 0,6% триптофана с молекулярной массой 204. Тогда М.м. белка = $204 \times 100 / 0,6 = 34\ 000$ Да. Применение ограничено.

1 Да (дальтон) весьма близок к массе атома водорода. 1000 Да = 1 кДа (килодальтон).

2. *Электронная микроскопия.* Точная навеска окрашивается осмиевой кислотой и подсчитывается количество частиц. Делят навеску на число частиц и находят массу одной молекулы.

3. *Метод ультрацентрифугирования.* В пробирке ультрацентрифуги создается центробежное ускорение, превышающее земное притяжение до 500000g. По мере перемещения молекул белка в таком центробежном поле они разделяются по молекулярной массе. При этом образуются границы белок-растворитель, которые регистрируют и рассчитывают скорость их перемещения. Вначале вычисляют константу седиментации белка (S), которая зависит от массы и формы белковой молекулы

$$S = \frac{v}{\omega^2 \times r}, \text{ где:}$$

v – скорость перемещения границы белок-растворитель; ω – угловая скорость ротора (рад/с); r – расстояние от центра ротора до середины пробирки с раствором белка, см. Константа седиментации имеет размерность времени (ее выражают в секундах). Величина константы седиментации, равная $1 \cdot 10^{-13}$ с принята за единицу и названа Сведбергом (S).

Величина молекулярной массы вычисляется по уравнению Сведберга.

$$M.M. = \frac{R \times T \times S}{D(1 - \bar{v}\rho)}$$

где R – газовая постоянная, эрг/(моль·град); T – абсолютная температура (по шкале Кельвина); S – константа седиментации; ρ – плотность растворителя; \bar{v} – парциальный удельный объем молекулы белка; D – коэффициент диффузии.

4. *Гель-фильтрация и диск-электрофорез.* Калибруют колонку, заполненную стандартными гранулами сефадекса (учитывается расстояние между гранулами и величина пор в гранулах), белками с известной молекулярной массой (рис. 2.2). Находят зависимость между элюционным объемом (Vэ) и молекулярной массой. Чем меньше молекулярная масса, тем больше элюционный объем (т.е. объем растворителя, с которым белок выходит из колонки).

В настоящее время для определения молекулярной массы нативного (находящегося в структурном состоянии для выполнения функции) белка используют методы гельхроматографии или аналитического ультрацентрифугирования. Сочетание обоих подходов позволяет оценить как молекулярную массу белка, так и его протомеров. Однако эти методы не годны для решения современных задач протеомики. Точное определение массы белковых молекул осуществляется методом масс-спектрометрии после разделения белков методом изоэлектрофокусирования с последующим двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле.

Различают 2 группы: простые и сложные (конъюгированные) белки.

1. *Простые белки* (альбумин, кератин и др.) состоят только из аминокислот и делятся на:

а) *фибриллярные белки* имеют палочкообразную вытянутую форму, нерастворимы в воде и физически прочные (отношение длины молекулы к диаметру больше 10); они выполняют структурные и защитные функции;

б) *глобулярные белки* представляют собой компактные сферические молекулы, водорастворимы (отношение длины молекулы к диаметру не превышает 4); глобулярные белки выполняют динамические функции (ферменты, иммуноглобулины и транспортные белки гемоглобин и альбумины).

2. *Сложные (конъюгированные) белки* состоят из простого белка комбинированного с небелковым компонентом. Небелковая часть называется *простетической группой* (или конъюгированной группой). Белок без простетической группы называется *апопротеином*. Белковая часть с простетической группой называется *холопротеином*. Простетическая группа играет ключевую роль в *функционировании белка*.

Пищевая ценность белков определяется наличием незаменимых аминокислот. Согласно этой классификации белки делятся на 3 группы:

1. *Полноценные белки* – содержат 10 незаменимых аминокислот в необходимых пропорциях для обеспечения нормального роста (например, яичный белок, казеин молока).

2. *Частично полноценные белки*. Эти белки содержат сниженное количество одной или более незаменимых аминокислот и могут обеспечивать только умеренный рост (например, белок пшеницы и риса содержат недостаточное количество лизина, триптофана). Известно правило, что скорость синтеза белка зависит от незаменимой аминокислоты, концентрация которой наименьшая.

3. *Неполноценные белки*. Эти белки не содержат одну или более незаменимых аминокислот. Не могут обеспечить нормальный рост организма (например, желатин не содержит аминокислоту триптофан).

Аминокислоты являются *структурной единицей белков*. Аминокислоты содержат *аминогруппу* ($-\text{NH}_2$), *карбоксильную группу* ($-\text{COOH}$), *атом водорода и боковую цепь*, связанную с α -углеродным атомом. Одна из 20 аминокислот, пролин, является, иминокислотой ($-\text{NH}-$), остальные 19 являются α -аминокислотами.

В природе выявлено около 300 аминокислот. Из них 20 являются стандартными (протеиногенными) аминокислотами, которые обнаружены в структуре белков, полученных из различных организмов – животных, растений и микроорганизмов. Это - результат универсальной природы генетического кода, обеспечивающей включение 20 аминокислот при биосинтезе белков.

Классификация протеиногенных аминокислот по строению радикала: 1) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин; 2) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан; 3) алифатические, содержащие гидроксильную группу (серин, треонин); 4)

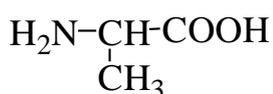
алифатические, содержащие сульфгидрильную группу (цистеин); 5) основные (лизин, аргинин, гистидин); 6) кислые (аспарагиновая и глутаминовая кислоты); 7) алифатические, содержащие карбоксамидную группу (аспарагин, глутамин).

Аминокислотные остатки в полипептидной цепи имеют сокращенные названия: аланин (ала, А), глицин (гли, G), валин (вал, V), лейцин (лей, L), изолейцин (иле, I), аспарагиновая кислота (асп, D), глутаминовая кислота (глу, E), серин (сер, S), треонин (тре, T), цистеин (цис, C), метионин (мет, M), аргинин (арг, R), лизин (лиз, K), гистидин (гис, H), пролин (про, P), фенилаланин (фен, F), тирозин (тир, Y), триптофан (три, W), аспарагин (асн, N), глутамин (глен, Q).

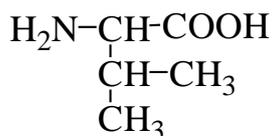
Существует несколько специальных классификаций аминокислот, основанные на структуре и химической природе, заменимости, путях метаболизма и т.д.

Классификация аминокислот по полярности радикалов

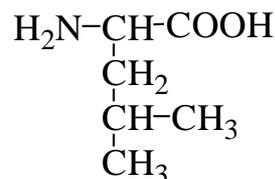
1. *Неполярные аминокислоты* (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, пролин). Эти аминокислоты гидрофобны. Имеют незаряженный радикал. При сближении в пространстве радикалы этих аминокислот обеспечивают *гидрофобное взаимодействие*.



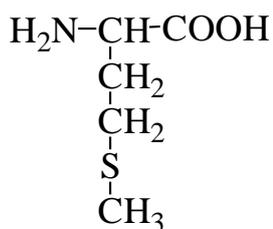
Аланин (Ала)



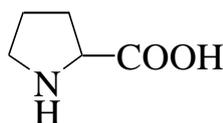
Валин (Вал)



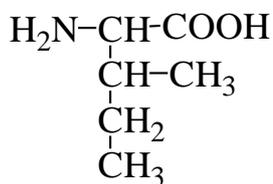
Лейцин (Лей)



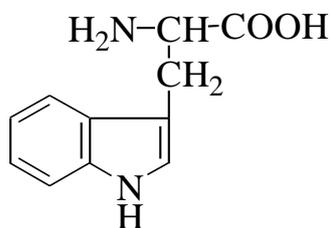
Метионин (Мет)



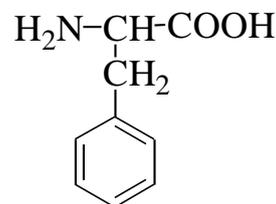
Пролин (Про)



Изолейцин (Иле)



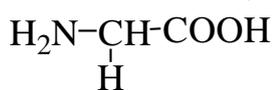
Триптофан (Три)



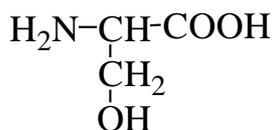
Фенилаланин (Фен)

2. *Полярные, гидрофильные, незаряженные аминокислоты* (глицин, треонин, цистеин, тирозин, серин, аспарагин, глутамин). Содержат такие полярные функциональные группы как гидроксильная, сульфгидрильная и амидогруппа. При сближении в пространстве радикалы этих аминокислот

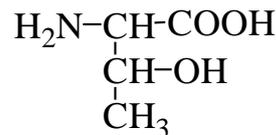
образуют *водородные связи*. Связанные дисульфидной связью два остатка цистеина называют цистином.



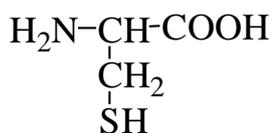
Глицин (Гли)



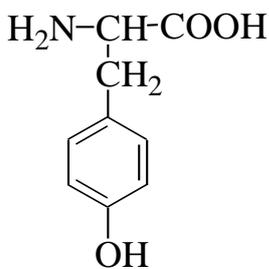
Серин (Сер)



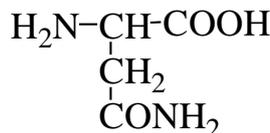
Треонин (Тре)



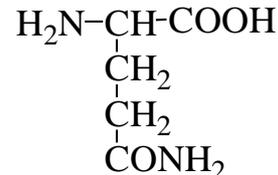
Цистеин (Цис)



Тирозин (Тир)

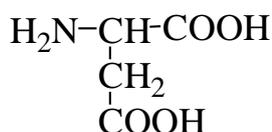


Аспарагин (Асп)

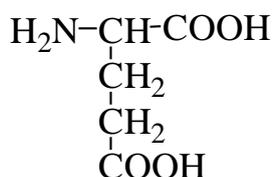


Глутамин (Глн)

3. *Кислые аминокислоты* (отрицательно заряженные аминокислоты) имеют отрицательный заряд (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) при pH 7,0

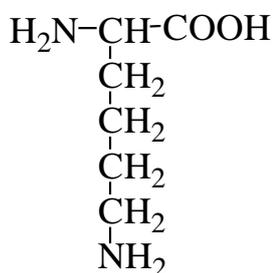


Аспарагиновая кислота (Асп)

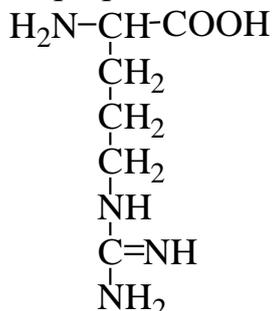


Глутаминовая кислота (Глн)

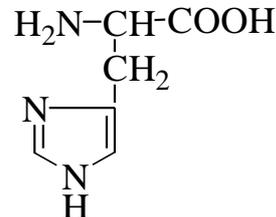
4. *Основные аминокислоты* (положительно заряженные аминокислоты) имеют положительный заряд при pH 7,0.



Лизин (Лиз)



Аргинин (Арг)



Гистидин (Гис)

Радикалы аминокислот 3 и 4 групп участвуют в образовании *ионных связей*.

Аминокислоты классифицируются на заменимые и незаменимые (эссенциальные).

1. *Незаменимые* (эссенциальные) аминокислоты не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей. Они необходимы для обеспечения и поддержания роста: аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин (шесть аминокислот 1-й группы, одна – второй и три – четвертой).

2. *Заменяемые аминокислоты*. Организм может синтезировать около 10 аминокислот для обеспечения биологических потребностей, поэтому поступление их с пищей не обязательно (аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин, тирозин).

Аминокислоты, связанные пептидной связью, образуют полипептидную цепь и каждая аминокислота в ней называется *аминокислотный остаток*. В полипептиде выделяют *N-конец* (терминальная альфа-аминогруппа) и *C-конец* (терминальная альфа-карбоксильная группа). Большинство природных полипептидных цепей, содержащих от 50 до 2000 аминокислотных остатков, называют белками (протеинами). Полипептидные цепи меньшей длины называют олигопептидами или просто пептидами. В некоторых белках полипептидные цепи связываются поперечными дисульфидными связями, образованными окислением двух остатков цистеина. Внеклеточные белки часто содержат дисульфидные связи, а внутриклеточные белки часто утрачивают их. В некоторых белках образуются поперечные связи при взаимодействии радикалов других аминокислотных остатков (коллаген, фибрин).

Физико-химические свойства белков

1. *Растворимость*. Белки формируют коллоидные растворы, что обусловлено размером частиц (размеры частиц 0,1-0,001 мкм). Для растворов белков характерны следующие характеристики: низкое осмотическое давление, высокая вязкость, низкая способность к диффузии. В лабораторной практике используют 2 свойства коллоидных растворов белков: нефелометрическое определение количества белка на основе эффекта Тиндаля; диализ – очистка белков от низкомолекулярных примесей.

2. *Амфотерность белков*. Белки обладают кислыми и основными свойствами из-за присутствия карбоксильных и аминогрупп. *Изоэлектрическая точка белков (pI)* – значение pH, при котором суммарный заряд белка равен нулю. В pI белок электронеutralен с минимальной растворимостью, максимальной преципитацией и наименьшей буферной способностью. Изоэлектрическая точка определяется количеством NH₂ и COOH групп в молекуле белка. Если количество NH₂ и COOH групп равны, pI лежит в слабокислой среде (ионизация карбоксильных групп несколько выше, чем аминных) при pH ≤ 7. Если количество NH₂ > COOH, то pI лежит в щелочной среде. Если количество NH₂ < COOH, то pI лежит в кислой среде. При pH > pI заряд белка всегда отрицательный, так как карбоксильные группы переходят в форму COO⁻, а аминные группы в форму NH₂. При pH < pI заряд белка положительный, т.к. при уменьшении pH все больше аминогрупп переходит в форму NH₃⁺, а диссоциация карбоксильных групп подавляется.

3. *Способность к осаждению (преципитации).* Существуют два фактора устойчивости белков в коллоидном растворе: заряд и гидратная оболочка. Белки могут быть преципитированы путем дегидратации и/или нейтрализации полярных групп.

Преципитация в pI. Белки мало растворимы в изоэлектрической точке. Например, белок молока казеин сворачивается, если молоко кислое. Это объясняется тем, что молочная кислота, образуемая бактериями, снижает pH, приближая его к изоэлектрической точке казеина ($pI = 4,6$).

Высаливание. Процесс преципитации добавлением нейтральных солей (сульфата аммония или сульфата натрия) называется высаливанием. Этот процесс объясняется дегидратацией молекул белков солями, что приводит к молекулярной агрегации и преципитации. Количество соли, необходимой для преципитации, зависит от молекулярной массы белка. Чем больше молекулярная масса белка, тем меньше соли необходимо для преципитации. Например, глобулины сыворотке осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония, в то время как альбумин – насыщенным раствором. Высаливание используется для разделения белков сыворотки крови.

Добавление незначительного количества нейтральных солей повышает растворимость белков.

Осаждение солями тяжелых металлов. Ионы тяжелых металлов (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) вызывают осаждение белков. Металлы имеют положительный заряд и в щелочной среде вызывают преципитацию белков.

Осаждение анионами или алкалоидными реактивами. Белки осаждаются трихлоруксусной кислотой, сульфосалициловой кислотой, пикриновой кислотой, таниновой кислотой. Белки являются катионами и добавление анионов кислот приводит к образованию комплексов белок-анион.

Структура белковой молекулы

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

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

Характеристика пептидной связи

1. *Копланарность* – все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости (рис. 3.1.).

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

3. Связь между атомом углерода карбонильной группы и атомом азота имеет *частично двойной характер* из-за p, π -сопряжения (сопряжение

свободной пары электронов атома азота с π -электронами двойной связи C=O). Поэтому свободное вращение вокруг пептидной связи невозможно.

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

Роль первичной структуры

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

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

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

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

Принято чтение последовательности аминокислотных остатков в полипептидной цепи начинать с N-конца. В пентапептиде ала-гли-глу-фен-лей (AGEFL) аланин является N-концевым остатком, а лейцин – C-концевым остатком аминокислот. При наименовании пептидов суффиксы *-ин* (аланин), *-ан* (триптофан) и *-ат* (глутамат) заменяются на *-ил*, за исключением последней аминокислоты.

Вторичная структура – регулярная организация полипептидной цепи в виде упорядоченной структуры, стабилизируемой *водородными связями*, которые образуются между NH- и CO-группами пептидных групп.

Вторичная структура определяется первичной структурой. Поскольку первичная структура генетически детерминирована, формирование вторичной структуры может происходить при выходе полипептидной цепи из рибосомы. Различают *α -спираль*, *β -структуру* и неупорядоченную конформацию (*клубок*).

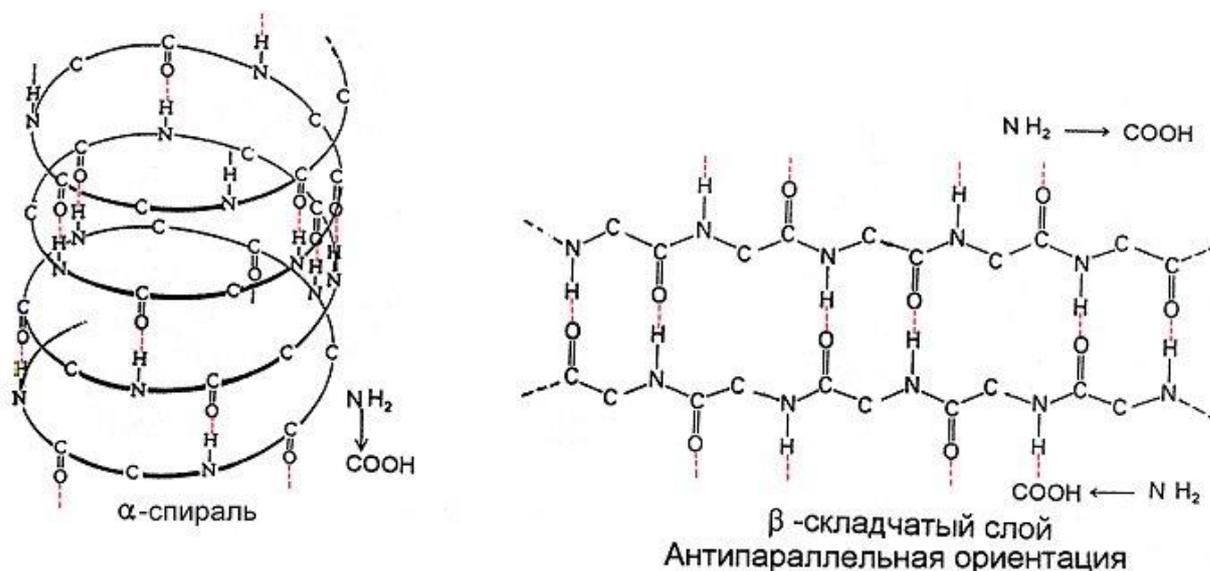
α -Спираль. Структура α -спирали была предложена Л. Полингом и Р. Кори (1951). Это разновидность вторичной структуры белка, имеющая вид регулярной спирали. α -Спираль – это палочкообразная структура, в которой пептидные связи расположены внутри спирали, а боковые радикалы аминокислот – снаружи.

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

На один виток спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка, шаг спирали 0,54 нм, на один аминокислотный остаток приходится 0,15 нм. Угол подъема спирали 26° . Период регулярности α -спирали равен 5 виткам или 18 аминокислотным остаткам. Наиболее распространены правые α -спирали, т.е. закручивание спирали идет по часовой стрелке. Образованию α -спирали препятствует пролин, аминокислоты с заряженным и объемными радикалами

(электростатическое и механическое препятствие).

Для решения задач: средняя молекулярная масса аминокислоты 110 Да, размер аминокислотного остатка в полипептидной цепи 0,15 нм



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

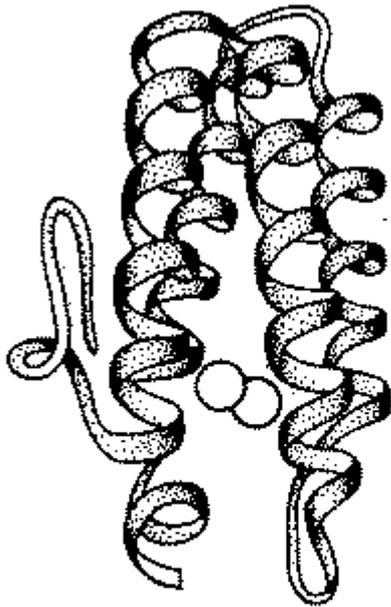
β -структура (β -складчатый слой). Встречается в глобулярных белках, а также в некоторых фибриллярных белках, например, фиброин шелка. Структура имеет *плоскую форму*. Полипептидные цепи почти полностью вытянуты, а не туго скручены, как в α -спирали. Плоскости пептидных связей расположены в пространстве подобно равномерным складкам листа бумаги. Стабилизируется водородными связями между СО- и NH-группами пептидных групп соседних полипептидных цепей. Эти водородные связи *перпендикулярны* оси молекулы. Если полипептидные цепи, образующие β -структуру идут в одном направлении (т.е. совпадают С- и N-концы) –

параллельная β -структура; если в противоположном – антипараллельная β -структура. Боковые радикалы одного слоя помещаются между боковыми радикалами другого слоя. Если одна полипептидная цепь изгибается и идет параллельно себе, то это антипараллельная β -кросс-структура. Водородные связи в β -кросс-структуре образуются между пептидными группами петель полипептидной цепи.

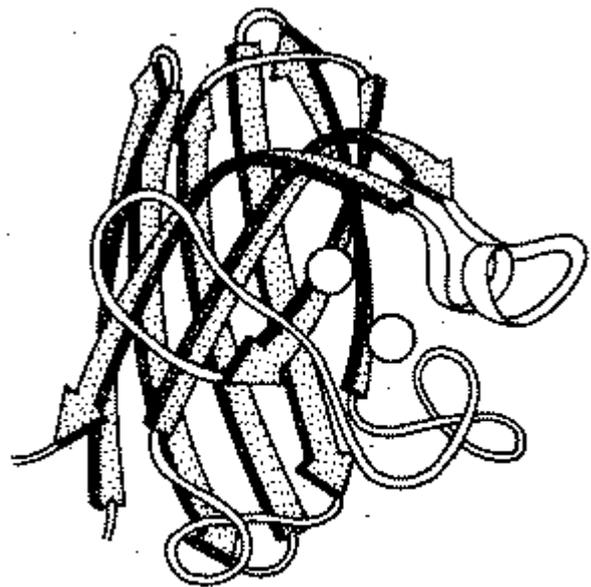
Доказано, что образованию α -спирали чаще всего способствуют *глу, ала, лей*, а β -структуры – *вал, иле, фен*; в местах изгиба полипептидной цепи – *гли, про, асп*. Следовательно, характер вторичной структуры зависит от аминокислотного состава сегмента первичной структуры.

Простые α -спиральные структуры обычно длиной не более 4,5 нм, но устойчивыми являются более длинные структуры – 100 нм и более (миозин и тропомиозин в мышцах, фибрин кровяного сгустка, кератин волос).

Третичная структура - способ укладки полипептидной цепи в *трехмерном пространстве*. Третичная структура стабилизируется связями между боковыми радикалами аминокислот. К ним относятся ковалентная (дисульфидная) и нековалентные (водородная, ионная связи и гидрофобное взаимодействие). По форме третичной структуры белки делятся на глобулярные и фибриллярные. *Глобулярные* белки имеют эллипсоидную форму, а *фибриллярные* – нитевидную, вытянутую форму (форма палочки, веретена). При образовании глобулярных белков гидрофобная часть полипептидной цепи располагается внутри структуры, а гидрофильная – снаружи.



Третичная структура миогемэритрина — белка, представляющего собой пучок четырех α -спиралей



Третичная структура супероксиддисмутазы — β -структурного белка

Восемь отрезков β -структуры соединены поворотами или петлями, есть небольшой участок α -спирали. Кружками показано расположение ионов металлов

Многие белки в третичной структуре имеют спирализованные, складчатые и

неупорядоченные сегменты. При этом в функциональном и структурном отношении важно взаимное расположение аминокислотных радикалов.

Домены – анатомически выделяемые участки третичной структуры белка, отвечающие за выполнение определенной функции белка.

Гидрофобные карманы – полости в третичной структуре, выстланные радикалами гидрофобных аминокислот и необходимы для погружения в молекулу белка гидрофобных лигандов.

Гидрофобные кластеры – участки поверхности белка, где сконцентрированы радикалы гидрофобных аминокислот и служат для взаимодействия с гидрофобными кластерами других молекул.

Каждый белок в *нативном* состоянии имеет *уникальную трехмерную структуру (конформация* белка), в которой белок выполняет функцию.

Белок приобретает нативную структуру для выполнения функции путем складывания полипептидной цепи.

Денатурация – разрушение третичной и частично вторичной структуры белка с сохранением первичной структуры, т.е. потеря нативной структуры. Денатурация отличается от гидролиза белка тем, что при гидролизе необратимо разрушается первичная структура путем разрыва пептидных связей.

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

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

3. При денатурации первичная *структура не изменяется*, т.е. не происходит разрыва пептидных связей.

4. Денатурированные под действием соляной кислоты белки в желудочно-кишечном тракте более легко *перевариваются* под действием пищеварительных ферментов.

Факторы, вызывающие денатурацию

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

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

Четвертичная структура

Представляет собой организацию *нескольких полипептидных цепей*, каждая из которых имеет третичную структуру, в единую функциональную молекулу белка. Четвертичной структурой обладают белки с молекулярной массой более 50000 Да. *Протомер* – отдельная полипептидная цепь в третичной структуре, не выполняющая функцию белка. *Субъединица* – протомер или объединение несколько протомеров, способных выполнять часть функций белка. *Олигомер (мультимер)* – сочетание протомеров или

субъединиц в четвертичной структуре белка, несущих полную функциональную активность белка. Четвертичная структура стабилизируется *нековалентными связями* между *протомерами* (водородные, электростатические, гидрофобные взаимодействия). При разрушении связей, стабилизирующих четвертичную структуру, происходит разделение субъединиц и потеря функции белка.

Способность к специфическому узнаванию и специфическому взаимодействию является основой биологических функций всех белков. Специфически узнать молекулу - это значит найти поверхность молекулы с такой мозаикой радикалов, с которой можно образовать максимально возможное количество связей. Специфически взаимодействовать - это значит образовывать между участками поверхностей молекул максимально возможное число связей. Поверхности молекул, которые при образовании связей дополняют друг друга, называются *комплементарными*: положительному заряду должен соответствовать отрицательный, группе с поляризованным протоном должен соответствовать атом с неподеленной парой электронов, одной гидрофобной группе стерически должна соответствовать другая.

Правило: две молекулы, поверхности которых комплементарны, находят друг друга и взаимодействуют.

Уникальность белков в том, что они могут менять свою конформацию, делая поверхность комплементарной лиганду. Например: взаимодействие активного центра фермента с субстратом (по Кошланду). Различные лиганды связываются с белковыми молекулами по центрам связывания. Очевидно, что эти центры связывания должны быть комплементарны функциональным группам лиганда. Связи между лигандом и центром связывания белка нековалентные (водородные, ионные, гидрофобные). Поэтому такое связывание обратимо. *Мономерные белки связываются с лигандом по гиперболической зависимости; мультимерные - по сигмоидной зависимости из-за кооперативного эффекта.* Связывание белка с лигандом зависит от числа мест (центров) связывания и количества лиганда. Если количество молекул лиганда превышает число центров связывания на белке, дальнейшего связывания не происходит (белок насыщен лигандом). Специфическое взаимодействие за счет комплементарных поверхностей объясняет большинство функций белков (фермент - субстрат; гормон - рецептор; антиген - антитело и т.д.).

Образование белковых наноккомплексов.

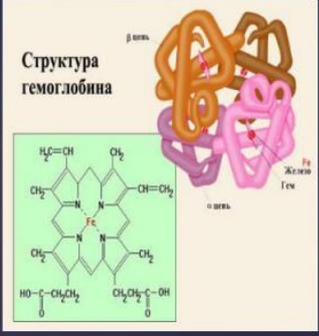
Молекулы полипептидов обладают способностью объединяться в комплексы – олигомерные структуры. Этот процесс объединения полипептидов (протомеров, субъединиц) в олигомерную структуру (олигомерную молекулу) получил название олигомеризации белков. Многие ферменты, мембранные и другие белки живых организмов имеют олигомерную природу. Олигомерные структуры могут состоять как из одинаковых, так и из различных протомеров. Протомеры (субъединицы) связываются между

собой в процессе олигомеризации нековалентными связями. Поэтому олигомерные комплексы легко распадаются на исходные протомеры.

Олигомерные белки

- Олигомерные белки чаще построены из четного числа протомеров (от 2 до 4, реже от 6 до 8) с одинаковыми или разными молекулярными массами – от нескольких тысяч до сотен тысяч.
- В частности, молекула гемоглобина состоит из двух одинаковых α - и двух β -полипептидных цепей, т.е. представляет собой тетрамер.

Структура гемоглобина



The diagram illustrates the structure of hemoglobin. On the right, a 3D model shows a tetramer composed of two α chains (orange) and two β chains (pink), with a heme group (Fe) and a proximal histidine (His) residue. On the left, a chemical structure of the heme ring is shown, featuring a central iron atom coordinated to four nitrogen atoms in a porphyrin-like ring, with various side chains including vinyl, methyl, and propionate groups.

PPt4WEB.ru

Как выяснили ученые, олигомеризация повышает устойчивость полипептидов к действию расщепляющих белки ферментов и других химических агентов среды.

Олигомеризация оказалась не единственным способом объединения белковых молекул. Вторым способом является агрегация белков - взаимодействие белковых молекул посредством участков правозакрученных альфа-спиралей с образованием надмолекулярных агрегатов. Если таких вторичных структур нет, например, у окончательно оформленных глобул, естественная агрегация белковых молекул невозможна. Только при «расплавлении» (развертывании) глобулы и образовании участков альфа-спиралей молекула белка обретает способность к агрегации. Надмолекулярные белковые агрегаты отличаются широкой вариабельностью состава и размеров. Этим они резко отличаются от олигомерных белковых комплексов, которые имеют постоянный состав и размеры. Естественная агрегация белков наблюдается при переходе клетки из покоя в активное состояние: при раздражении клетки, сокращении мышечной клетки и других явлениях. Поскольку покоящаяся клетка содержит мало надмолекулярных белковых агрегатов, ее цитоплазма прозрачная. Цитоплазма активной клетки становится мутной (непрозрачной) из-за накопления продуктов естественной агрегации белков.

При некоторых заболеваниях (катаракта глаза, коровье бешенство и др.), а также в процессе старения организма наблюдается неестественная (патологическая) агрегация белков. В отличие от естественной агрегации она имеет, как правило, необратимый характер.

Олигомерные белковые комплексы и надмолекулярные белковые агрегаты представляют собой своеобразные естественные наноконплексы..

Конструирование наноструктур на основе белков

Модификация, олигомеризация и агрегация белков демонстрируют чрезвычайно широкие возможности простых молекул (полипептидов) в формировании молекул сложных белков и надмолекулярных наноструктур. В естественных условиях живые организмы образуют из простых белков (протеинов) сложные белки (нуклеопротеины, гликопротеины, липопротеины и др.), олигомерные белковые структуры, надмолекулярные белковые агрегаты, тысячи разнообразных наноструктур и наноконструктов.

Образующиеся белковые наноструктуры чрезвычайно разнообразны по форме (трехмерной структуре) и размерам. Такое разнообразие белковых наноструктур является следствием: во-первых, большого количества аминокислотных остатков в молекуле полипептида (от нескольких десятков до нескольких сотен), во-вторых, способностью каждого такого остатка приобретать около 10 пространственных конфигураций и вступать в разнообразные связи с другими молекулами белка.

Примечательно то, что в живом организме форма и размеры исходных белковых наноблоков более строго определяют форму и структуру надмолекулярных комплексов, чем в искусственных условиях. Это обстоятельство заинтересовало наноконструкторов и нанотехнологов. Используя такие отличия поведения белковых молекул в искусственных условиях, можно получать практически любые необходимые наноструктуры (наноконструкты) на основе белка. Даже такие, которые никогда не возникают в живых организмах.

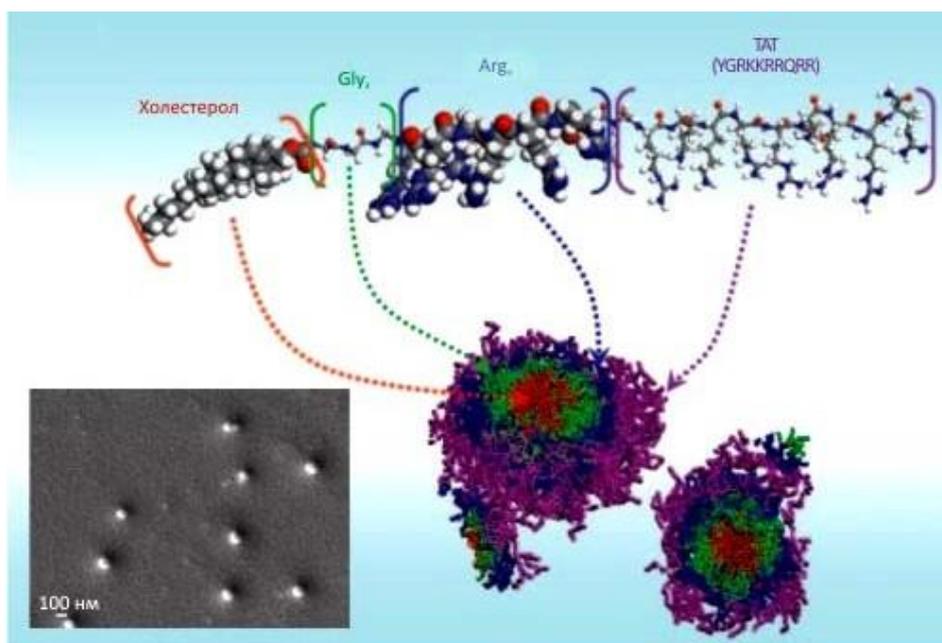
С помощью белковых молекул можно наладить автоматическую сборку наночастиц. Российские ученые из Института биоорганической химии РАН разработали технологию автоматической сборки наночастиц с помощью молекул белков барнас и барстар. Упомянутые белки были выделены из палочкообразных бактерий. Этим двум видам белков была отведена роль «роботов» на сборочной линии. Наночастицы, собранные таким образом, представляют интерес как для медицины, так и для новых биотехнологий. К наночастицам можно присоединять молекулы лекарственных препаратов, радиоактивные изотопы для диагностики и лечения раковых заболеваний. В наночастицу можно вмонтировать радиоактивный изотоп, флуоресцентную частицу, лекарства, токсины.

Белковыми наночастицами можно заменить антибиотики. В первую очередь те антибиотики, к которым у микроорганизмов уже выработалась устойчивость.

Исследователи из Института биоинженерии и нанотехнологий Сингапура обратили внимание на катионные белки – белки, которые в растворе

обретают положительный заряд. На основе молекул этих белков исследователи создали самособирающиеся наночастицы. Такие наночастицы обладают антимикробным действием и могут заменять традиционные антибиотики. При этом белковые наночастицы действуют сразу на множество микроорганизмов и уничтожают даже те, которые выработали устойчивость против большинства современных антибиотиков.

Механизм действия антимикробных белковых наночастиц заключается в следующем: белковые наночастицы продырявливают оболочку бактерий во многих местах и такие микроорганизмы с обнаженной цитоплазмой незамедлительно погибают. В сравнении с антибиотиками белковые наночастицы обладают двумя несомненными преимуществами: 1) проникают через клеточные и тканевые барьеры, «сооружаемые» организмом вокруг органов, в том числе и больных органов; 2) не дают нежелательных побочных эффектов при их применении. Антимикробные белковые наночастицы успешно прошли лабораторные испытания на подопытных животных.



Образование белковой наночастицы с антимикробными свойствами: холестерол образует гидрофобное ядро (красного цвета), а положительно заряженные в растворе белки (показаны зеленым, синим и сиреневым цветами) окружают его. На врезке (в левом нижнем углу) – электронная микрофотография, позволяющая оценить размер образующихся наночастиц ($\approx 100\text{--}150$ нм).

Изучение рецепторной функции мембраны и разработка новых нанобиотехнологий

В исследованиях рецепторной функции клеточной мембраны особо перспективным является изучение рецепторов, формируемых

трансмембранными белками под названием GPCR. Это обусловлено тем, что около трети всех производимых лекарств оказывают воздействие на клетки лишь после того, как взаимодействуют с их белками-рецепторами GPCR. Поэтому эффективность применения многих лекарств зависит от того, смогут ли они связаться с локализованными в клеточных мембранах белками GPCR. Поскольку лекарство будет выступать в роли лиганда, необходимо добиться максимального соответствия между ним и участком узнавания лиганда, имеющимся у рецептора. Для этого необходимо знать пространственную структуру белка-рецептора.

Однако изучение конфигурации белков-рецепторов оказалось очень трудным и безрезультатным: после извлечения из клеточной мембраны трансмембранные белки-рецепторы сразу же утрачивали свою естественную конфигурацию. Те немногие белки-рецепторы, трехмерную структуру которых все же удалось определить, оказались неподходящими рецепторами для молекул лекарственных препаратов. Подход к решению проблемы определения пространственной конфигурации белка - рецептора был найден в лаборатории биологических систем Технологического института штата Джорджия (США). Группа исследователей под руководством Джеффри Скольника просто смоделировала структуру белков-рецепторов, используя компьютер. Для этого была применена специальная компьютерная программа TASSER, разработанная исследователями в 2004 году.

Программа TASSER позволяет на основе последовательности аминокислот в белковой молекуле предсказывать с высокой точностью ее пространственную (трехмерную) конфигурацию. В качестве исходных данных были взяты генетические коды 907 белков GPCR, не превышающих по длине 500 аминокислот. Для 820 из них удалось получить модели, пригодные для использования в дальнейших исследованиях. В перспективе в лаборатории планируется моделирование молекул различных лекарств и изучение их взаимодействия с трансмембранными белками-рецепторами.

Нанобиосенсоры, их применение в диагностике и лечении заболеваний

На основе механизмов функционирования белков-переносчиков и белков-рецепторов учеными разработаны нанобиосенсоры. Они позволяют осуществлять высокочувствительное выявление специфических белков, вирусов или ДНК в органах, тканях, клетках и биологических жидкостях.

Конструктивно нанобиосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей – биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом.

Нанобиосенсоры могут быть запрограммированы на обнаружение в биологических жидкостях (слюна, кровь и др.) комплекса белков,

являющихся индикаторами развития тех или иных заболеваний. Ученые полагают, что нанобиосенсоры способны внести революционные изменения в медицинскую диагностику заболеваний.



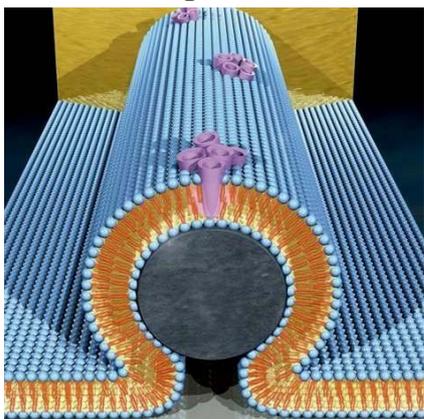
Схема конструкции нанобиосенсора. Биохимический преобразователь представлен сенсорным белком (белком-рецептором). С ним взаимодействует тестируемая субстанция (анализируемое вещество), в результате чего происходят конформационные изменения (изменения пространственной структуры) белка-рецептора. Последние вызывают изменения в физическом преобразователе, который включает флуоресцентный белок. По интенсивности флуоресценции определяется наличие (количество) искомого вещества в тестируемой субстанции

Исследователи из наноцентра в Вене (Австрия) обратили внимание на свойство некоторых белков образовывать регулярные структуры в виде кристаллических решеток. Многие бактерии, в частности, формируют на своей поверхности одномолекулярные слои кристаллического белка, называемые S-слоями.

Исследователи удалили белковый S-слой с поверхности бактерии и разбили его на «субъединицы». Поместив затем субъединицы в раствор, они добились объединения их в кристаллическую решетку, формируемую уже на кремниевых, металлических и синтетических подложках. К помещенному на подложку S-слою были добавлены специальные сенсорные молекулы, которые вместе со слоем сформировали точный биоаналитический сенсор.

Подобным образом австрийскими исследователями был создан сенсор глюкозы на основе S-слоя и молекулы фермента оксидазы глюкозы. Во время реакции фермента с глюкозой, через нанобиосенсор проходит электрический

ток. Измеряемая величина тока характеризует содержание глюкозы.



Нанопровод (темно-серого цвета) с изоляцией на основе бимолекулярного слоя липидов клеточной мембраны (оранжево-голубого цвета) и молекулами белков-рецепторов (сиреневого цвета)

Размещение на поверхности нанопровода белков-рецепторов привело к созданию нанобиосенсоров иного типа. В таком нанобиосенсоре на поверхность нанопровода нанесен слой специальных белков-рецепторов (сенсорных молекул). Последние обладают способностью специфически связываться с биологическими макромолекулами. В результате образования такой связи изменяется электрическая проводимость нанопровода. Эти изменения сигнализируют о выявлении определенного вещества.

В настоящее время на основе нанопроводов создан уникальный нанобиосенсор, позволяющий выявлять единичные вирусы. Связывание вируса со специфическим белком-рецептором (антителом), нанесенным на поверхность нанопровода, вызывает значимое изменение электрической проводимости.

Если на поверхности одного нанопровода разместить несколько различных белков-рецепторов (антител), чувствительных к различным видам вирусов, то связывание с белками-рецепторами любого из этих вирусов регистрируется изменение проводимости нанопровода. Тем самым определяется присутствие вируса. Такие устройства, несомненно, найдут широкое применение в медицинской диагностике.

Особого внимания заслуживают наносенсоры, которые выявляют последовательность нуклеотидов в ДНК. В одном из таких уже созданных устройств рецепторы, нанесенные на нанопровода, способны обнаруживать мутантные гены, вызывающие заболевание муковисцидоз.

Всем известно значение как можно более раннего выявления раковых заболеваний. Для успешного их лечения важно выявить первые появившиеся раковые клетки в органе. Обнаружение единичных злокачественных клеток возможно с помощью нанобиосенсоров на основе углеродных нанотрубок.

Известно, что в ответ на появление в организме чужеродных веществ, называемых антигенами, иммунная система вырабатывает антитела. Последние представляют собой специфические глобулярные белки. Каждый вид антител избирательно взаимодействует с определенным антигеном (белковым рецептором). Ученые попытались применить антитела, специфичные к рецепторам (антигенам) мембраны раковых клеток. Ими они покрыли углеродные нанотрубки. Получившиеся нанобиосенсоры способны обнаруживать злокачественные клетки в организме и определять вид опухоли.

Кроме диагностики заболеваний нанобиосенсоры могут найти применение в направленном транспорте лекарственных веществ к клеткам - мишеням. В настоящее время создаются наноконтейнеры (липосомы, мицеллы, полимерные наночастицы), поверхность которых покрыта специальными сенсорными молекулами (своеобразными антителами), обеспечивающими возможность найти клетку-мишень в любой части организма. Внутри наноконтейнера могут помещаться молекулы лекарственного вещества или, например, ген, кодирующий белок, который запускает процесс самоуничтожения клетки. При связывании антител с рецепторами «больных» клеток содержимое контейнера перемещается внутрь клетки, что приводит к «выздоровлению» больных клеток или гибели раковых клеток.

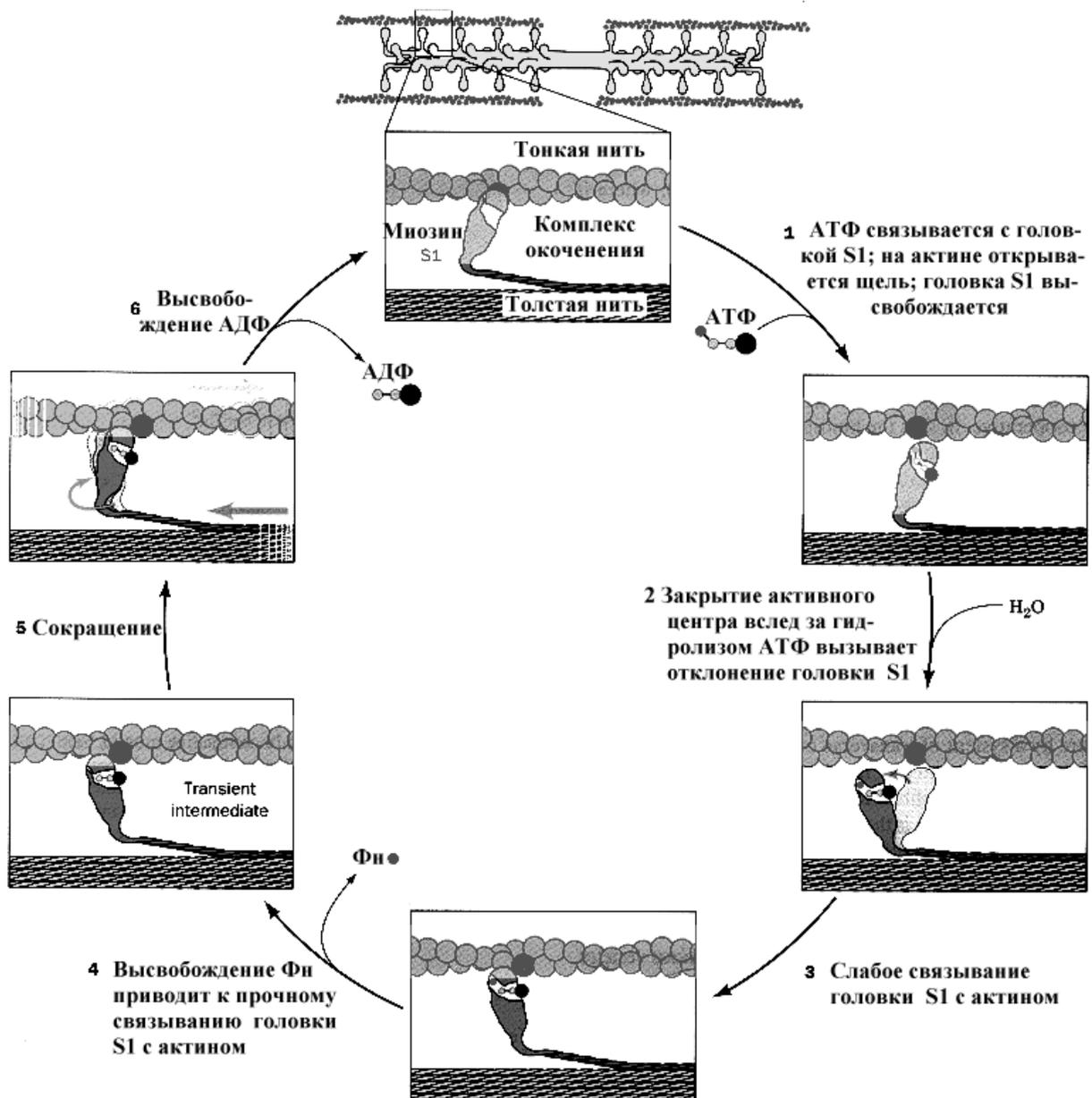
Таким образом, наибольший интерес для медицины представляют два направления использования нанобиосенсоров в совокупности с наноконтейнерами: 1) обнаружение антител, специфичных к антигенам больных клеток; 2) избирательная доставки лекарственных средств непосредственно к больным клеткам.

Белковые «наномоторы» в живых клетках

В клетках живущих сейчас организмов работают наномоторы, сконструированные Природой более 3 млрд лет тому назад. Белковые «моторы» участвуют в протекающих в клетках естественных нанопроцессах. Так, синтез универсального источника энергии в клетке – АТФ протекает с участием белковой наноструктуры – фермента АТФ-синтазы. Этот фермент представляет собой механическое устройство, образованное двумя совместно работающими роторными наномоторами. Механическая энергия, сообщаемая моторами, используется при синтезе молекул АТФ.

Кроме роторных моторов в клетках живых организмов встречается более сотни наномоторов, обеспечивающих прямолинейное движение. Эти моторы расположены в различных частях клетки, существенно различаясь по своим функциям. Некоторые из наномоторов осуществляют сложные действия, состоящие из нескольких сотен шагов, а некоторые предназначены для

выполнения только одиночных действий. Белковые моторы существенно различаются не только по своим действиям, но и по массе. В настоящее время активно изучаются белковые моторы линейного движения, относящиеся к трем большим семействам белков: миозин, динеин, кинезин. Белок миозин известен биологам с 1864 года. Однако только во второй половине XX века было установлено использование им механической энергии. Молекула миозина представляет собой по сути простейшую механическую руку, осуществляющую один цикл по перемещению и выходящую из процесса движения.



При этом она может несколько раз принимать участие в процессе движения. Несмотря на полуторавековую историю изучения миозина, ученые так и не выяснили, что принуждает белок принимать участие в движении. Белок кинезин можно рассматривать как наноробот, располагающий двумя конечностями, при помощи которых он идет по направляющей. Направляющая является белковой последовательностью. Эта последовательность поляризована на концах. Кинезин движется по ней от отрицательного полюса к положительному. Кинезиновые нанороботы встречаются в клетках различных типов в большом количестве.

В бактериальных организмах, например, в кишечной палочке встречается еще один интересный пример механических белковых нанороботов. Это группа механических роботов, которые перемещением своих конечностей обеспечивают процесс плавания клетки.

Размер этих роботов составляет примерно 45 нм в диаметре. Их деятельность обеспечивает жизненно важную функцию, поскольку перемещение из менее благоприятной среды в более благоприятную является основой выживания таких организмов как кишечная палочка. Ученые выяснили, что основным приводящим устройством у механических роботов является роторный наномотор. При этом в состав роботов входят другие крайне загадочные механизмы, например, счетчики частиц, измерительные приборы. Много предстоит сделать в изучении структуры этих роботов и, прежде всего, чтобы выяснить, как взаимодействуют около 20 типов белков, формирующих такой наноробот.