

Лекция №5

СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ

Свойства белка. Белки, как и другие неорганические и органические соединения, обладают рядом физико-химических свойств, вытекающих из их структурной организации. Это во многом обуславливает функциональную активность каждой молекулы.

Во-первых, белки — преимущественно водорастворимые молекулы и, следовательно, могут проявлять свою функциональную активность только в водных растворах.

Во-вторых, белковые молекулы несут большой поверхностный заряд. Это определяет целый ряд электрохимических эффектов, например изменение проницаемости мембран каталитической активности и других функций.

В-третьих, белки термолабильны, т.е. проявляют свою активность в узких температурных рамках.

Действие повышенной температуры, а также обезвоживание, изменение pH и другие воздействия вызывают разрушение структурной организации белков. Вначале разрушается самая слабая структура — четвертичная, затем третичная, вторичная и при более жестких условиях — первичная. Утрата белковой молекулой своей структурной организации называется денатурацией.

Денатурация-ренатурация белка. Глобулярный белок способен к спонтанной самоорганизации *in vitro* (ренатурации), если после биосинтеза он не подвергся сильной химической модификации. В этом случае его архитектура, "мягко" (без разрыва цепи) разрушенная температурой, растворителем и т.д., — спонтанно восстанавливается при "нормализации" среды. Правда, эффективная ренатурация нуждается в тщательном подборе экспериментальных условий — иначе ей может воспрепятствовать агрегация белка.

Явление спонтанной самоорганизации белков было открыто в группе Анфинсена в 1961 г. на бычьей рибонуклеазе А.

Самоорганизация пространственных структур белков (а также РНК) — уникальное физическое явление, не имеющее аналогов в "неживой" природе. Эта самоорганизация напоминает образование кристаллов, — но кристаллов, во-первых, не имеющих периодической пространственной структуры; во-вторых, чрезвычайно сложно устроенных; и, наконец, очень маленьких.

Самоорганизация белковых структур относится, с физической точки зрения, к классу явлений "возникновение порядка из порядка" (по классификации Пригожина): трехмерный "аперiodический кристалл" (говоря словами Шредингера) структуры белка порождается заранее фиксированным порядком звеньев в его цепи. Видимо, самоорганизация трехмерной структуры белков (и РНК, и кристаллов вообще) возникает из стремления молекул к термодинамическому равновесию — и тем принципиально отличается от той самоорганизации типа "порядок из беспорядка" (будь то самоорганизация в осциллирующей химической реакции Белоусова-Жаботинского или самоорганизация в экологической системе "хищник-жертва"), которую обычно имеют в виду, говоря о самоорганизации в неравновесных, работающих на потоке энергии системах.

Рибосома выдает белковую цепь постепенно и не вполне равномерно — есть паузы, приостановки биосинтеза цепи; предполагается, что соответствие пауз границам структурных доменов способствует их спокойному, без вмешательства извне, созреванию.

Далее в клетке белковая цепь сворачивается под действием специальных белков — шаперонов. "Малые" шапероны типа hsp70 (heat shock protein, 70 килодальтон) связываются с белком, предохраняя его от агрегации, а потом сбрасываются (на что

расходуется АТФ). "Большие" шапероны типа GroEL и GroES или TriC работают в основном с многодоменными белками, и особенно — с белками, чьи домены составлены из отдаленных кусков цепи. Эти шапероны образуют как бы пробирку (диаметром в несколько нанометров — и с крышечкой!), куда поступает новосинтезированный (и предварительно облепленный шаперонами типа hsp70 и/или hsp40) белок или его домен. Эта "пробирка" (иногда ее называют "ячейкой Анфинсена") защищает новорожденный белок и от агрегации, и от действия концентрированного клеточного "супа". При этом пробирка "трясется" и время от времени активно открывается (на что расходуется АТФ) и закрывается, — но отпускает она белок только тогда, когда он уже свернется и перестанет липнуть к пробирке.

Кроме того, самоорганизация белков может ускоряться некоторыми ферментами типа пролил-изомеразы (катализирующей медленно само по себе идущее превращение *trans* пролинов в *cis* и обратно) или дисульфид-изомеразы (катализирующей сшивание и расщивание SS связей).

Однако опыт показывает, что работа всей этой клеточной машинерии может быть заменена подбором соответствующих внешних условий (малой концентрации белка, нужного окислительно-восстановительного потенциала). Эта замена не меняет результат сворачивания: уж если белок не выпал в осадок, а свернулся *in vitro* — то он свернулся в ту же структуру, что и *in vivo*. Правда, часто это займет больше (а иногда — и меньше!) времени, чем самоорганизация *in vivo*, — но результат будет тот же.

Все это показывает, что вся необходимая для построения трехмерной структуры белка информация содержится в химической последовательности аминокислот в его цепи.

Похоже, что — помимо самого синтеза белковой цепи — биосинтетический аппарат клетки (рибосома + шапероны + ...) служит лишь чем-то вроде инкубатора для сворачивания пространственной структуры белка: этот "инкубатор" не определяет структуру белка, но он создает условия для ее созревания, — так же, как обычный инкубатор обеспечивает выведение птенца, не предопределяя, кто выведется — цыпленок или утенок.

Загадочность самоорганизации белков (и РНК) суммируется "парадоксом Левинтала". Загадка состоит вот в чем. У белковой цепи есть бездна возможных конформаций (каждый аминокислотный остаток имеет около 10 возможных конформаций, то есть цепь из 100 остатков — порядка 10^{100} возможных конформаций). Так что белок должен искать "свою" пространственную структуру среди порядка 10^{100} возможных. И так как переход из одной конформации в другую занимает $\sim 10^{-13}$ секунды как минимум, перебор всех 10^{100} структур должен был бы занять порядка 10^{80} лет, на фоне которых время жизни нашей Вселенной — 10^{10} лет — величина бесконечно малая... Вопрос: как белок может "найти" свою структуру за минуты?

Парадокс же заключается в следующем. С одной стороны, нативная (природная) пространственная структура по *всем* тестам ведет себя как самая стабильная из всех структур цепи: белковая цепь попадает в нее при разных кинетических процессах [и при сворачивании на рибосоме в процессе биосинтеза, и после секреции сквозь мембрану, и при сворачивании в пробирке (ренатурации), — чем бы и как бы она ни была в этой пробирке развернута]. С другой стороны, нет никаких гарантий, что эта структура — самая стабильная из всех возможных: у белковой цепи просто нет времени на то, чтобы убедиться в этом!

Как же белок выбирает свою нативную структуру среди бесчисленного множества возможных? — спросил Левинталь, и ответил: — По-видимому, самоорганизующийся белок следует по какому-то специальному "пути сворачивания", и та структура, где этот путь заканчивается, и является его нативной структурой. Иными словами, Левинталь предположил, что нативная структура белка определяется не стабильностью, не термодинамикой, а кинетикой, т.е. она соответствует не глобальному, а просто быстро достижимому минимуму свободной энергии цепи.

Вопрос о том, что именно — кинетика или термодинамика — определяет укладку белковой цепи — отнюдь не чисто умозрительный. Он постоянно возникает на пути решения конкретных задач физики белка, — идет ли речь о предсказании структуры белка по его аминокислотной последовательности (надо знать, что предсказывать: самую стабильную или самую быстро сворачивающуюся его структуру), или о дизайне новых, не встречающихся в природе белков (надо знать, что делать: максимально усиливать стабильность желаемой структуры или пролагать максимально быстрый путь к ней).



Рис. Стадийная модель сворачивания белка по О.Б.Птицину (1973). Выделены вторичные структуры — α -спирали (цилиндры) и β -участки (стрелки).

Чем выше уровень организации белка, тем слабее поддерживающие его связи. Под влиянием различных физических и химических факторов — высокой температуры, действия химических веществ, лучистой энергии и др. — «слабые» связи рвутся, структуры белка — четвертичная, третичная и вторичная — деформируются, разрушаются и свойства его изменяются. Нарушение природной, уникальной структуры белка называют денатурацией. Степень денатурации белка зависит от интенсивности воздействия на него различных факторов: чем интенсивнее воздействие, тем глубже денатурация.

Нарушение нативной пространственной структуры белка при различных воздействиях (повышение температуры, изменение концентрации металлов, кислотности раствора и др.) называется денатурацией и в ряде случаев обратимо (обратный процесс называется ренатурацией). Молекулы белка — кооперативные системы: поведение их зависит от взаимодействий составляющих частей. Кооперативность молекул белка определяется тем, что повороты отдельных звеньев из-за внутримолекулярных взаимодействия зависят от конформации соседних звеньев. В основе денатурации белка при изменении внешних условий обычно лежат кооперативные конформационные превращения (например, переходы α -спираль — β -структура, α -спираль — клубок, β -структура — клубок для полипептидов, переход глобула — клубок для глобулярных белков, переход спираль — клубок для нуклеиновых. При слабом воздействии изменение белка может ограничиться распадом четвертичной структуры (1). Более сильное воздействие приведет к частичному разворачиванию третичной структуры (2). При еще более сильном воздействии макромолекула может развернуться полностью и остаться в форме своей первичной структуры (3, 4).



Рис. 1

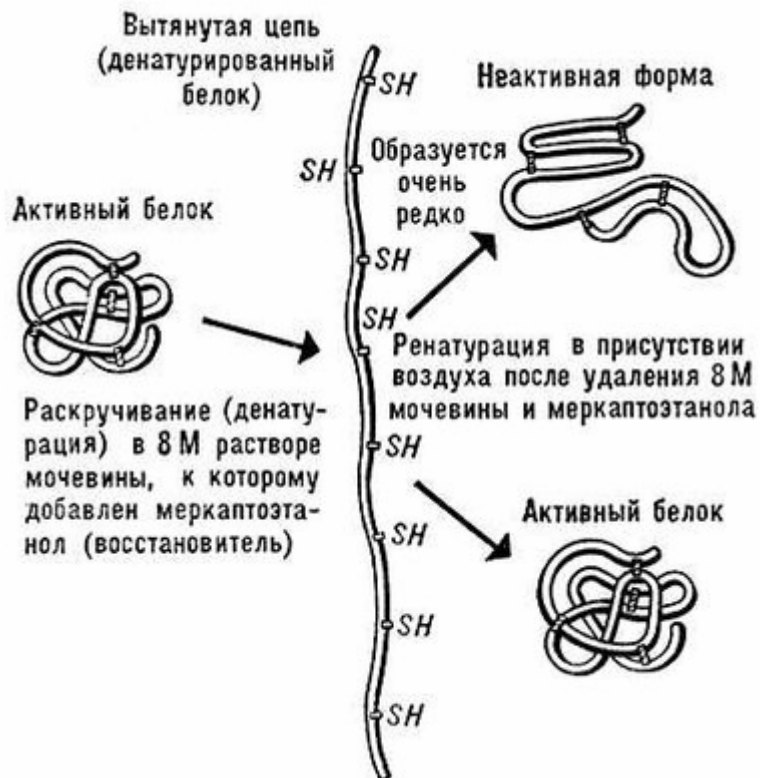


Схема денатурации и ренатурации глобулярного белка (на примере фермента рибонуклеазы)

Белки отличаются друг от друга по легкости денатурации. денатурация яичного белка происходит, например, при температуре 60—70°C, а сократительный белок мышц денатурируется при 40—45°C.

Многие белки денатурируются от действия ничтожных концентраций химических веществ, а некоторые даже от незначительного механического воздействия.

Как показывают исследования, процесс денатурации обратим, т.е. денатурированный белок может перейти обратно в природный. Даже полностью развернутая макромолекула белка способна самопроизвольно восстановить свою структуру. Отсюда следует, что все особенности строения макромолекулы природного белка определяются его первичной структурой, т.е. составом аминокислот и порядком их следования в цепи.

Если изменение условий среды не приводит к разрушению первичной структуры молекулы, то при восстановлении нормальных условий среды полностью воссоздается структура белка и его функциональная активность. Такой процесс носит название **ренатурации**. Это свойство белков полностью восстанавливать утраченную структуру широко используется в медицинской и пищевой промышленности для приготовления некоторых медицинских препаратов, например антибиотиков, вакцин, сывороток, ферментов; для получения пищевых концентратов, сохраняющих длительное время в высушенном виде свои питательные свойства.

Функции белков. Функции белков в клетке чрезвычайно многообразны. Одна из важнейших — **пластическая (строительная)** функция: белки участвуют в образовании всех клеточных мембран и органоидов клетки, а также вне клеточных структур. Прежде всего белки — это строительный материал клетки.

Исключительно важное значение имеет **каталитическая** роль белков. Все биологические катализаторы – *ферменты* – вещества белковой природы, они ускоряют химические реакции, протекающие в клетке, в десятки и сотни тысяч раз.

Остановимся на этой важнейшей функции несколько подробнее. Термин «катализ» который в биохимии встречается не менее часто, чем в химической промышленности, где широко используются катализаторы, буквально означает «развязывание», «освобождение». Вещества, относимые к катализаторам, ускоряют химические превращения, причем состав самих катализаторов после реакции остается таким же, каким он был до реакции. Сущность каталитической реакции, несмотря на огромное разнообразие катализаторов и типов реакций, в которых они принимают участие, в основных чертах сводится к тому, что исходные вещества образуют с катализатором промежуточные соединения. Они сравнительно быстро превращаются в конечные продукты реакции, а катализатор восстанавливается в первоначальном виде. Ферменты – те же катализаторы. Им свойственны все законы катализа. Но ферменты имеют белковую природу, и это сообщает им особые свойства. **Фермент катализирует только одну реакцию или один вид реакций**, т.е. он более специфичен, чем неорганический катализатор (рис. 2).

По химической структуре ферменты – обычные белки, т.е. они состоят из обычных **аминокислот**, обладают вторичной, третичной и т.д. структурами. В большинстве случаев ферменты катализируют превращение веществ, размеры молекул которых по сравнению с макромолекулами ферментов очень малы. Например, фермент каталаза имеет молекулярную массу 250000, а перекись водорода, распад которой катализирует каталаза, всего 34.

Такое соотношение между размерами фермента и его субстрата (вещество, на которое действует фермент) **наводит на мысль, что каталитическая активность ферментов определяется не всей его молекулой, а только небольшим ее участком, который называют активным центром фермента.**

По-видимому, активный центр представляет собой какое-то сочетание аминокислотных радикалов, расположенных на соседних полипептидных цепях в третичной или четвертичной структуре фермента. Такое представление хорошо объясняет тот факт, что при денатурации фермента он лишается своей каталитической активности. Очевидно, при нарушении третичной или четвертичной структуры взаимное расположение полипептидных цепей изменяется, структура активного центра искажается и фермент лишается активности.

Почти каждая химическая реакция в клетке катализируется своим особым ферментом. Структура активного центра фермента и структура субстрата точно соответствуют один другому. Они подходят друг к другу, как ключ к замку. Благодаря наличию пространственного соответствия между структурой активного центра и

структурой субстрата они могут тесно сблизиться между собой, что и обеспечивает возможность реакции между ними.

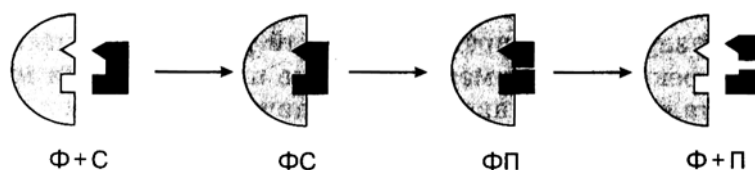


Рис. 2. Взаимодействие фермента (Ф) с веществом (С), в результате чего образуются продукты реакции (П)

Температура всегда влияет на скорость химических реакций. Большинство реакций с неорганическими катализаторами идет при очень высоких температурах. При повышении температуры скорость реакции, как правило, увеличивается. Для ферментативных реакций это увеличение ограничено определенной (оптимальной) температурой (рис. 3). Дальнейшее повышение температуры вызывает изменения в структуре молекулы фермента (см. денатурация белков), ее активность снижается, а затем прекращается. Однако некоторые ферменты микроорганизмов, обнаруженных в водах горячих природных источников, не только выдерживают температуры, близкие к точке кипения воды, но даже проявляют в этих условиях свою максимальную активность.

Но и для них температурные рамки довольно узки и определяются температурой среды, в которой обитают микроорганизмы. Для большинства же ферментов температурный оптимум близок к 35-40°C.

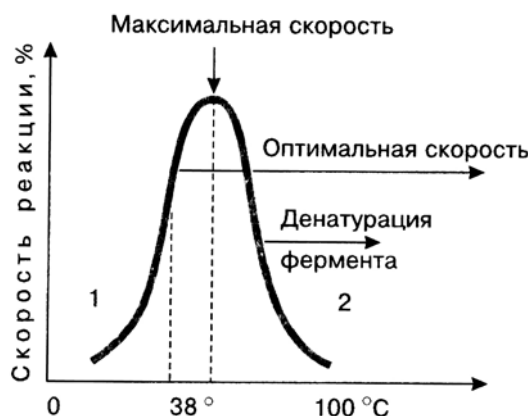


Рис. 3. Влияние температуры на активность фермента: 1 – увеличение, 2 – уменьшение скорости реакции

Ферменты активны только при физиологических значениях кислотности раствора, только при такой концентрации ионов водорода, которая совместима с жизнью и нормальным функционированием клетки, органа или системы.

Классификация и номенклатура ферментов. По рекомендации Международного биохимического союза, ферменты разделяют на 6 классов: 1) оксидоредуктазы, 2) трансферазы, 3) гидролазы, 4) лиазы, 5) изомеразы, 6) лигазы. Рекомендована следующая нумерация ферментов. Шифр (индекс) каждого фермента содержит 4 числа, разделенных точками. Первая цифра указывает класс, вторая — подкласс, третья — подподкласс, четвертая — порядковый номер в данном подподклассе. Так, фермент аргиназа, расщепляющий аргинин на орнитин и мочевину, имеет шифр 3.5.3.1, т.е. относится к классу гидролаз, подклассу ферментов, действующих на непептидные С – N связи, и подподклассу ферментов, расщепляющих эти связи в линейных (не циклических) соединениях.

Класс **оксидоредуктаз** включает ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, и разделяется на 14 подклассов в зависимости от природы той группы в молекуле субстрата, которая подвергается окислению (спиртовая, альдегидная, кетонная и т. д.). Подподклассы оксидоредуктаз индексируются в зависимости от типа участвующего в реакции акцептора водорода (электронов) – кофермента, цитохрома, молекулярного кислорода и т.д. Т.о., первые три цифры шифра определяют тип фермента, так, например, 1.2.3 обозначают оксидоредуктазу, действующую на альдегид с молекулярным кислородом в качестве акцептора электронов.

Класс **трансфераз**, объединяющий ферменты, катализирующие реакции переноса групп, подразделяется на 8 подклассов в зависимости от природы переносимых групп, которыми могут быть одноуглеродные или гликозильные остатки, азотистые или содержащие серу группы и т.д. У трансфераз третья цифра характеризует тип переносимых групп (например, одноуглеродная группа может быть метилом, карбоксилем, формилом и т.д.).

К **гидролазам** принадлежат ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление различных соединений; разделяются на 9 подклассов в зависимости от типа гидролизуемой связи – сложно эфирной, пептидной, гликозидной и т.д. Третья цифра у гидролаз уточняет тип гидролизуемой связи.

Лиазы – ферменты, отщепляющие от субстрата ту или иную группу (негидролитическими путями) с образованием двойной связи или, наоборот, присоединяющие группы к двойным связям, У лиаз 5 подклассов, вторая цифра шифра обозначает тип подвергающейся разрыву связи (углерод – углерод, углерод – кислород и т.д.), а третья – тип отщепляемой группы.

Изомеразы, катализирующие реакции изомеризации, разделяются на 5 подклассов в зависимости от типа катализируемой реакции; третья цифра шифра детализирует характер превращения субстрата.

Лигазами (или **синтезазами**) называют ферменты, которые катализируют соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пиррофосфатной связи в молекуле аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) или аналогичного трифосфата. Первая цифра шифра лигаз обозначает тип вновь образуемой связи (углерод – азот, углерод – кислород т.д.), а вторая – природу образующегося соединения.

Классификация и номенклатура ферментов, кроме шифра, включает также систематические и тривиальные (рабочие) названия. Так, например, систематическое название карбоксилаза 2-оксокислот соответствует тривиальному названию пируватдекарбоксилаза, а систематическое название L-аргинин – амидиногидролаза – рабочему названию аргиназа.

Двигательная функция живых организмов обеспечивается специальными сократительными белками. Эти белки участвуют во всех видах движения, к которым способны клетки и организмы: мерцание ресничек и биение жгутиков у простейших, сокращение мышц у многоклеточных животных, движение листьев у растений и др.

Транспортная функция белков заключается в присоединении химических элементов (например, кислорода гемоглобином) или биологически активных веществ (гормонов) и переносе их к различным тканям и органам тела. Специальные транспортные белки перемещают РНК, синтезированные в клеточном ядре, в цитоплазму. Широко представлены транспортные белки в наружных мембранах клеток; они переносят различные вещества из окружающей среды в цитоплазму.

При поступлении в организм чужеродных белков или микроорганизмов в белых кровяных тельцах – лейкоцитах образуются особые белки – **антитела**. Они связываются с несвойственными организму веществами (**антигенами**) по принципу соответствия пространственных конфигураций молекул (принцип – «ключ-замок»). В результате этого образуется безвредный, нетоксичный комплекс – «антиген-антитело», который

впоследствии фагоцитируется и переваривается другими формами лейкоцитов – это **защитная функция**.

Белки могут служить и одним из источников энергии в клетке, т.е. выполняют **энергетическую функцию**. Белки распадаются в клетке до аминокислот. Часть аминокислот употребляется для синтеза белков, часть же подвергается глубокому расщеплению, в ходе которого освобождается энергия. **При полном расщеплении 1 г белка до конечных продуктов выделяется 17,6 кДж (4,2 ккал) энергии**. Однако белки в таком качестве используются редко.

Литература

1. <http://bio.fizteh.ru/> Макеев А.В. Основы биологии.
2. <http://bio.fizteh.ru/student/files/biology/biolections/> Лекции по биологии. Факультет молекулярной и биологической физики МФТИ
3. БСЭ, т. 27