

Классификация белков.

1. По структуре белки делят на простые и сложные.

Простые белки состоят только из аминокислот. В состав сложных белков входит небелковый компонент, название которого включается в название сложного белка. Это нуклеопротеины, липопротеины, гликопротеины, металопротеины, фосфопротеины, хромопротеины (окрашенные белки), дикомпонентные ферменты.

2. По физико-химическим свойствам:

а) фибрилярные белки. Имеют упорядоченную, регулярную структуру (повторяемость в пространстве одинаковых участков молекулы). Они образуют огромной величины и молекулярной массы агрегаты (фибриллы). Например, коллаген, масса которого составляет около 30% от общего количества тканевых белков. Коллаген основной белок межклеточного пространства, хрящей, сухожилий, костей, зубов (в пищевом отношении это неполноценный белок, поскольку содержит мало незаменимых аминокислот). Коллаген отличается высоким содержанием глицина (35%), аланина (11%), пролина и оксипролина (21%). Белок имеет трехцепочечную спиральную структуру, обладает большой механической прочностью (у тропоколлагена – прочность такая же как и у стальной проволоки).

б) глобулярные белки – имеют глобулярную структуру, водорастворимые, гидрофильные. Структура этих белков наименее регулярная (повторяется). в)-мембранные белки – “живут” в мембранах, они частично либо полностью гидрофобные, обладают в большей или меньшей степени регулярной структурой.

3. По функциям. Белки выполняют в организме большинство функций и с ними связаны практически все проявления жизни.

Белки делят на такие группы:

1. Каталитические белки. Это специализированный класс белков – ферменты.
2. Сократительные белки. Выполняют функцию движения (актин и миозин).
3. Защитные белки (антитела, другие антимикробные факторы; защита от кровопотери – фибриноген, факторы свертывания крови т.д.)
4. Регуляторные белки. Сигнальные белки и олигопептиды, гормоны, рецепторы и т.д.
5. Транспортные белки (транспорт веществ в крови, через мембранны). Сейчас известно свыше 6 тысяч транспортных белков.
6. Структурные белки – мембранные, соединительной ткани (коллаген, эластин т.д.), волос (α-кератин) т.д.
7. Пищевые – содержатся в продуктах питания.
8. Запасные и т.д.

4. По генам, которые отвечают за структуру белков. Это наиболее современная классификация белков. В таблице приведена классификация белков – цитохромов Р-450 по классификации соответствующих генов - суперсемейство генов цитохрома Р-450.

	Суперсемейство Р 450		
Семейство	1	2	3...51
Подсемейство	1A, 1B...	2A, 2B, 2C, 2D, 2E и	3A, 3B, 4A, 7, 11.

		др.	17...51
Отдельные белки	1A1, 1B1 1A2	2A1 2B1 2C9 2A2 2B6 2C19	3A1 3A4

Альбумины: обнаружены во многих тканях (главным образом в цитоплазме клеток, в мышцах – миоальбумины; в молоке – лактальбумины; нервная ткань – содержит нейроальбумины, высокое содержание в сыворотке крови – 40-50г/л), имеют сходные свойства. Молекулярная масса – до 70000, это кислые белки, ИЭТ около 4,7, содержат много глутаминовой кислоты, имеют глобулярную структуру, растворимы в воде. Альбумины крови синтезируются в печени, обуславливают онкотическое давление крови (при снижении альбуминов возникают отеки). Альбумины крови это основные транспортные белки в организме, они обеспечивают транспорт водо- и жирорастворимых витаминов, билирубина, лекарств.

Глобулины – имеют большую массу (выше 150000 Да), плохо растворимы в воде и легче альбуминов, осаждаются солями, электрофорезе глобулины крови разделяются на несколько фракций (α -, β - и γ -глобулины), в которых обнаруживаются такие белки как – протромбин, церулоплазмин, иммуноглобулины.

Протамины и гистоны: ядерные белки (в ядре клетки связаны с нуклеиновыми кислотами), содержат много аргинина и лизина (гистоны до 30%, а протамины до 60%), которые обуславливают положительный заряд этих белков (катионные белки), ИЭТ в щелочной среде.

Проламины и глютелины – растительного происхождения белки (глютелин – белок пшеницы, зеин – выделен из кукурузы), содержат недостаточные количества незаменимых аминокислот, поэтому в пищевом отношении это неполноценные белки

Пептиды – выделяют несколько групп пептидов (нейропептиды - эндорфины, энкефалины), пептиды кининовой системы и др.

Простые (однокомпонентные) ферменты – пепсин, трипсин.

Сократительные белки - актин, миозин.

Белковоподобные вещества (склеропротеины)...

Физико – химические свойства белков.

Молекулярная масса.

Молекулярная масса белков превышает 6000 Да (до сотен тысяч и даже несколько миллионов), например – альбумины – ~70000, глобулины – 150000. Полимеры аминокислот с массой менее 6000 называют пептидами. Методы определения молекулярной массы белков: ультрацентрифугирование, гель-фильтрация, аминокислотный анализ.

Амфотерность.

В составе боковых цепей белковой молекулы имеется много групп $-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_2$, которые обеспечивают возникновение положительных и отрицательных зарядов. Поэтому белки являются полиамфопонами (амфотерные вещества). Большинство белков заряжены отрицательно (-), потому что в их составе преобладают остатки кислых аминокислот Глу и Асп. Катионными (положительно заряженными) являются белки ядра клетки, например, гистоны и протамины, в их составе преобладают аминокислоты Лиз и Арг.

Изоэлектрическая точка (ИЭТ) – это такое значение pH, при котором белок является электронейтральным. Для кислых белков изоэлектрическая точка лежит в кислой среде ($\text{pH}<7$), а для основных (катионных) – в щелочной среде ($\text{pH}>7$). Белки в таком

состоянии быстро выпадают в осадок. Электрофорез белков основан на их способности двигаться в электрическом поле (чем меньше масса и больше заряд тем их подвижность выше), это свойство используется для разделения сложных по белковому составу биологических жидкостей - сыворотки крови и т.д.

Гидрофильность, гидрофобность, растворимость.

Большинство белков – гидрофильны и водорастворимы, что связано с наличием гидрофильных (полярных – заряженных и незаряженных групп в составе аминокислот). Эти группы притягивают диполи воды и вокруг молекулы белка образуется «водная оболочка» (шуба), которая удерживает белковую молекулу в растворе. Белки как коллоиды – белковые молекулы имеют размеры коллоидных частиц (10^{-5} – 10^{-7} см), поэтому растворы белков обладают свойствами коллоидных растворов

Денатурация. При нагревании, изменении кислотности среды и других воздействиях происходит разрушение вторичной, третичной и четвертичной структуры белка с сохранением первичной. Это явление называют денатурацией.

Денатурация белка



Пример денатурации – свертывание яичных белков при варке яиц. Денатурация бывает **обратимой** (при употреблении алкоголя (денатурация, вызванная спиртами и другими органическими растворителями), солёной пищи (явление высыпания)) и **необратимой**. Необратимая денатурация может быть вызвана высокими температурами, радиацией, при отравлении организма солями тяжелых металлов, спиртами, кислотами (подробно рассмотрены в методическом пособии по практике).

Ферменты.

Ферменты (энзимы) – это биокатализаторы белковой природы, которые ускоряют (или осуществляют) химические реакции в организме (лат. «fermentatio» - брожение; греч. «επιζύμε» - в дрожжах, в закваске). Энзимология (ферментология) – наука, изучающая ферменты.

Классификация ферментов (выделяют 6 классов):

В 1961 г в Москве V Международный биохимический союз принял современную классификацию ферментов. В соответствии с этой классификацией все ферменты делятся:

- на классы – по типу катализируемой реакции,

- каждый класс подразделяется на подклассы – по природе атакуемой химической группы,
- подклассы делятся на подподклассы – по характеру атакуемой связи или по природе акцептора.

Выделяют 6 классов ферментов:

1. **Оксидоредуктазы** (перенос H^+ , e^- , H ; входят дегидрогеназы, оксидазы, оксигеназы, цитохромы)
2. **Трансферазы** (перенос химических групп; входят метил-, сульфо-, амино-, фосфо-, ацил-гликозил- трансферазы, киназы)
3. **Гидролазы** (реакции гидролиза – расщепление субстрата при участии H_2O ; входят пептидазы, эстеразы, гликозидазы, фосфатазы)
4. **Лиазы** (расщепление связей между атомами C , O , N , S без H_2O , входят декарбоксилазы, альдолазы, дегидратазы)
5. **Изомеразы** (реакции изомеризации; входят мутазы, цис-транс-изомеразы, рацемазы, эпимеразы)
6. **Лигазы** (синтетазы) (реакции синтеза с использованием энергии АТФ).

Каждому ферменту присвоен четырехзначный классификационный номер, включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.



Например, алкогольдегидрогеназа имеет номер КФ 1.1.1.1. – это оксидоредуктаза, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с первым порядковым номером в своем подподклассе; лактатдегидрогеназа – КФ 1.1.1.27, действует на ОН-группу донора с НАД в качестве акцептора с порядковым номером 27 в своем подподклассе

Чтобы дать ферменту **название** существует два способа:

1. **Систематическое название** – согласно современной классификации <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Часто такое название длинно и сложно для использования, поэтому как производное систематического названия у многих ферментов имеется одно или несколько рабочих названий.

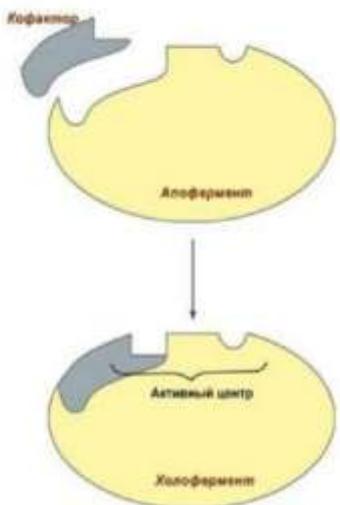
2. **Тривиальное название** – название, сложившееся исторически. Например, пепсин, трипсин. Для некоторых ферментов (чаще для гидролаз) к названию субстрата добавляется окончание "-аза" – уреаза, амилаза, липаза. Тем не менее, и у таких ферментов имеется систематическое название.

Давно выяснено, что все ферменты являются белками и обладают всеми свойствами белков. Поэтому подобно белкам ферменты **делятся на простые и сложные**.

Простые ферменты состоят только из аминокислот – например, пепсин, трипсин, лизоцим.

Сложные ферменты (холоферменты) имеют в своем составе белковую часть, состоящую из аминокислот – апофермент, и небелковую часть – кофактор. Кофактор, в свою очередь, может называться коферментом или простетической группой. Примером могут быть сукцинатдегидрогеназа (содержит ФАД) (в цикле трикарбоновых кислот), аминотрансферазы (содержат пиридоксальфосфат) (функция), пероксидаза (содержит гем). Для осуществления катализа необходим полноценный комплекс апобелка и кофактора, по отдельности катализ они осуществить не могут.

Как многие белки, ферменты могут быть мономерами, т.е. состоят из одной субъединицы, и полимерами, состоящими из нескольких субъединиц.



Структурно-функциональная организация ферментов.

В составе фермента выделяют области, выполняющие различную функцию:

1. Активный центр – комбинация аминокислотных остатков (обычно 12-16), обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ. Аминокислотные радикалы в активном центре могут находиться в любом сочетании, при этом рядом располагаются аминокислоты, значительно удаленные друг от друга в линейной цепи.

У ферментов, имеющих в своем составе несколько мономеров, может быть несколько активных центров по числу субъединиц. Также две и более субъединицы могут формировать один активный центр. У сложных ферментов в активном центре обязательно расположены функциональные группы кофактора.

В свою очередь в активном центре выделяют два участка:

- **якорный (контактный, связывающий)** – отвечает за связывание и ориентацию субстрата в активном центре,
- **катализический** – непосредственно отвечает за осуществление реакции.



2. Аллостерический центр (allos – чужой) – центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов.

Связывание с аллостерическим центром какой-либо молекулы (называемой активатором или ингибитором, а также эффектором, модулятором, регулятором) вызывает изменение конформации белка-фермента и, как следствие, скорости ферментативной реакции. В качестве такого регулятора может выступать продукт данной или одной из последующих реакций, субстрат реакции или иное вещество.

Аллостерические ферменты являются полимерными белками, активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах.

Механизмы катализа

Кислотно-основной катализ – в активном центре фермента находятся группы специфичных аминокислотных остатков, которые являются хорошими донорами или акцепторами протонов.

Такие группы представляют собой мощные катализаторы многих органических реакций.

Доноры	Акцепторы
-COOH	-COO-
-NH3+	-NH2
-SH	-S-

Ковалентный катализ – ферменты реагируют со своими субстратами, образуя при помощи ковалентных связей очень нестабильные фермент-субстратные комплексы, из которых в ходе внутримолекулярных перестроек образуются продукты реакции.

Реакции присоединения (отщепления, замещения)

электрофильные, нуклеофильные – в активном центре фермента находятся гетероатомы смещающие электронную плотность.

Окислительно-восстановительные реакции – в активном центре фермента находятся атомы, имеющую разную электроотрицательность.

Радикальные реакции.

Этапы катализа (катализитической реакции).

В ферментативной реакции можно выделить следующие этапы:



1. Присоединение субстрата (S) к ферменту (E) с образованием фермент-субстратного комплекса (E-S).

2. Преобразование фермент-субстратного комплекса в один или несколько переходных комплексов (E-X) за одну или несколько стадий.

3. Превращение переходного комплекса в комплекс фермент-продукт (E-P).

4. Отделение конечных продуктов от фермента.

Сходства и отличия ферментов и неорганических катализаторов

Сходства	Отличия
<ol style="list-style-type: none"> Катализируют только энергетически возможные реакции. Не изменяют направления реакции. Ускоряют наступление равновесия реакции, но не сдвигают его. Не расходуются в процессе реакции. 	<ol style="list-style-type: none"> Скорость ферментативной реакции намного выше. Высокая специфичность. Мягкие условия работы (внутриклеточные). Возможность регулирования скорости реакции. Скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству фермента.

Активность фермента

В повседневной биохимической практике практически не оценивается количество фермента, а только его активность. **Активность** – более широкое понятие, чем количество. Она подразумевает, в первую очередь, **результат реакции**, а именно убыль субстрата или накопление продукта. Естественно, при этом нельзя игнорировать время, которое проработал фермент и число молекул фермента. Но так как число молекул фермента подсчитать обычно нереально, то используют количество биологического материала, содержащего фермент (объем или массу).

Таким образом, при определении активности ферментов нужно одновременно учитывать три меняющихся фактора:

- масса полученного продукта или исчезнувшего субстрата,
- время, потраченное на реакцию,
- количество биологического материала, содержащего фермент.

Активность фермента выражается в скорости накопления продукта или скорости убыли субстрата в пересчете на количество материала, содержащего фермент.

$$\text{Активность фермента} = \frac{\text{Количество продукта или субстрата}}{\text{Единица времени} \times \text{Единица массы или объема пробы}}$$

В практике обычно используют:

единицы количества вещества – моль (и его производные ммоль, мкмоль), грамм (кг, мг), единицы времени – минута, час, секунда, единицы массы или объема – грамм (кг, мг), литр (мл).

Скорость реакции зависит от:

- температуры
- pH среды
- концентрации субстрата
- концентрации фермента
- наличия в среде активаторов и ингибиторов

Специфичность ферментов

Специфичность, т.е. высокая избирательность действия ферментов, основана на комплементарности структуры субстрата и активного центра фермента.

1. **Стереоспецифичность** – катализ только одного из стереоизомеров, например:

- специфичность к L- или D-аминокислотам – например, почти все ферменты человека взаимодействуют с L-аминокислотами,
- специфичность к цис- и транс-изомерам. Например, аспартаза реагирует только с транс-изомером – фумаровой кислотой, но не с малеатом (цис-изомер).

2. **Абсолютная специфичность** – фермент производит катализ только одного вещества. Например, расщепление мочевины уреазой.

3. **Групповая специфичность** – катализ субстратов с общими структурными особенностями, т.е. при наличии определенной связи или химической группы:

- например, наличие пептидной связи:
 - бактериальный фермент субтилизин специчен к пептидной связи независимо от строения образующих ее аминокислот,
 - пепсин катализирует разрыв пептидной связи, образованной карбоксильными группами ароматических аминокислот (пепсин),
 - тромбин расщепляет пептидную связь только между аргинином и глицином.

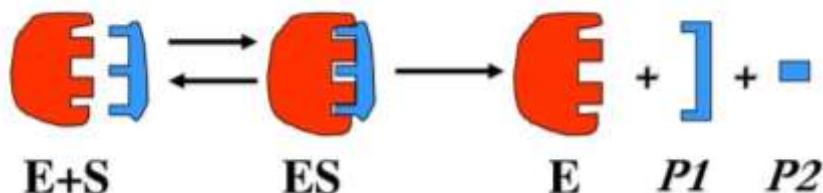
- например, наличие OH-группы:
алкогольдегидрогеназа (реакция) окисляет до альдегидов одноатомные спирты (этанол, метанол, пропанол).

4. **Относительная групповая специфичность** – превращение субстратов с некоторыми общими признаками. Например, цитохром Р450 окисляет только гидрофобные вещества, которых насчитывается около 7000.

Теории о специфичности действия ферментов

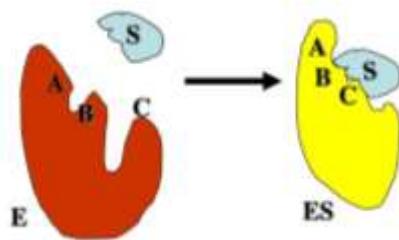
1. Модель «ключ – замок»

Для объяснения высокой специфичности ферментов по отношению к субстратам Эмиль Фишер в 1894 г. выдвинул гипотезу о строгом соответствии геометрической формы субстрата и активного центра фермента.



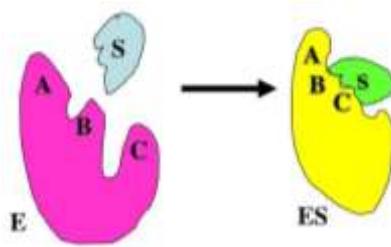
2. Теория «индуцированного соответствия»

Существует не только геометрическое, но и электростатическое соответствие



Теория индуцированного (вынужденного) соответствия Дениеля Кошланда (1959г): полное соответствие фермента и субстрата наступает лишь в процессе их взаимодействия: субстрат индуцирует необходимые конформационные изменения фермента, после чего они соединяются.

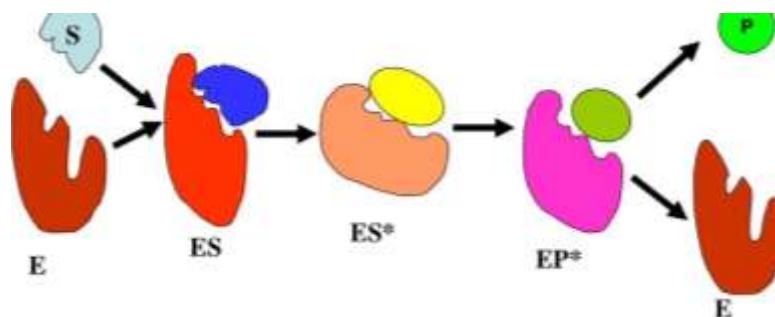
3. Теория «индуцированного соответствия» (современные представления)



При взаимодействии фермента и субстрата оба подвергаются модификации и подстраиваются друг под друга. Возникающие в субстрате изменения способствуют превращению его в продукт.

4. Теория переходных состояний (промежуточных соединений)

При взаимодействии фермента E с субстратом S образуется комплекс ES^* , в котором реакционная способность субстрата выше, чем в нативном состоянии. Через ряд промежуточных соединений происходит превращение субстрата в продукт реакции P.



Ингибиование ферментов

Выделяют два основных направления ингибиования

1) по прочности связывания фермента с ингибитором ингибиование бывает **обратимым и необратимым**.

При **необратимом** ингибиовании происходит связывание или разрушение функциональных групп фермента, необходимых для проявления его активности.

При **обратимом** ингибиовании происходит непрочное связывание ингибитора с функциональными группами фермента, вследствие чего активность фермента постепенно восстанавливается.

2) по отношению ингибитора к активному центру фермента ингибиование делят на **конкурентное и неконкурентное**.

При **конкурентном** ингибиовании ингибитор по своей структуре похож на субстрат фермента. Поэтому он соперничает с субстратом за активный центр, что приводит к уменьшению связывания субстрата с ферментом и нарушению катализа. В этом состоит особенность конкурентного ингибиования – возможность усилить или ослабить ингибиование через изменение концентрации субстрата.

Неконкурентное ингибиование связано с присоединением ингибитора не в активном центре, а в другом месте молекулы. Это может быть аллостерическое ингибиование, когда активность фермента снижается естественными модуляторами, или связывание с ферментом каких-либо токсинов.