

Структурная организация белка

Наумов

Александр Васильевич

Пептидные цепи - аминокислотные остатки, соединенные пептидными связями.

За счет внутримолекулярных взаимодействий белки образуют определенную

пространственную структуру, называемую -

«К О Н Ф О Р М А Ц И Я Б Е Л К А»

Различают **4 уровня** структурной организации белков:

- первичная,
- вторичная,
- третичная
- четвертичная



Первичная структура



Вторичная структура



Третичная структура



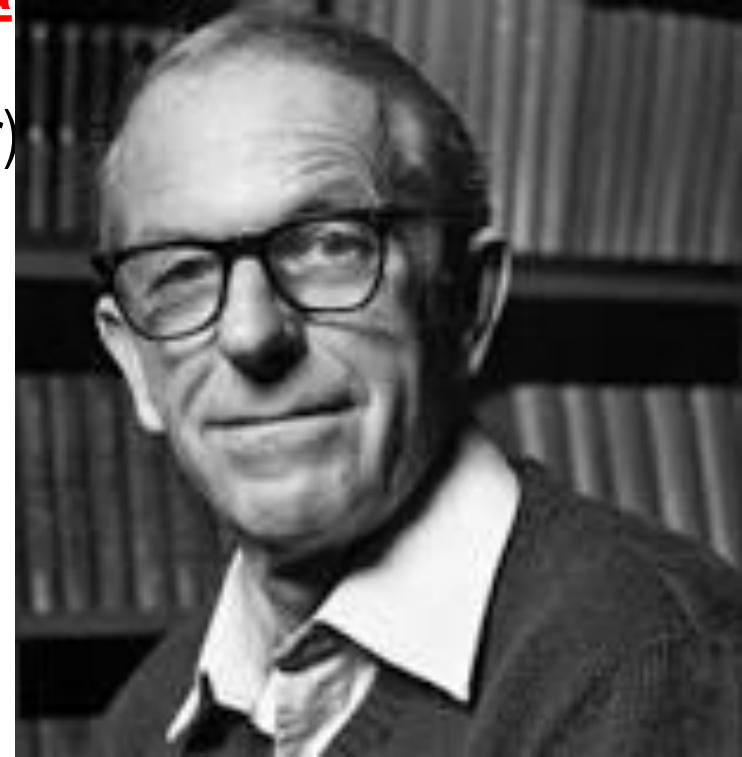
Четвертичная структура

Первичная структура белка

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА – определенная линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

История изучения I структуры белка

- 1 этап:** (1953 г) работы **Ф.Сенгера** (F. Sanger)
АК последовательность инсулина
(динитрофторбензол).
- 2 этап:** начало 70-х годов XX века.
П. Эдман. Применение
автоматического **секвенатора**
- 3 этап:** начало 80-х годов XX века.
Разработка скоростных ме-
тодов анализа нуклеотидной
последовательности ДНК



**Фредерик
Сенгер**

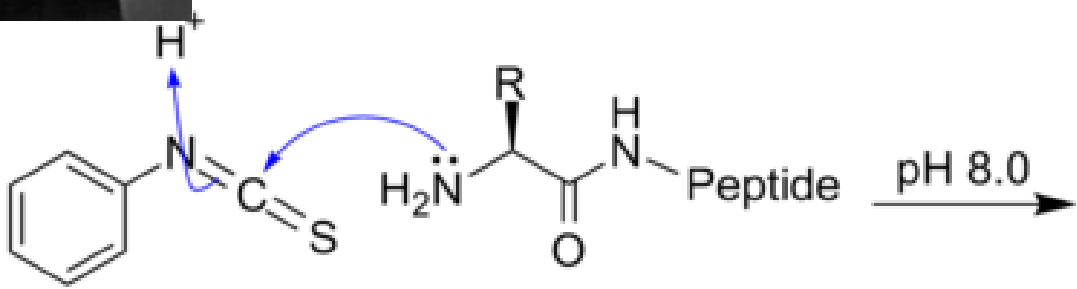
1918 – 2013

N – 1958, 1980

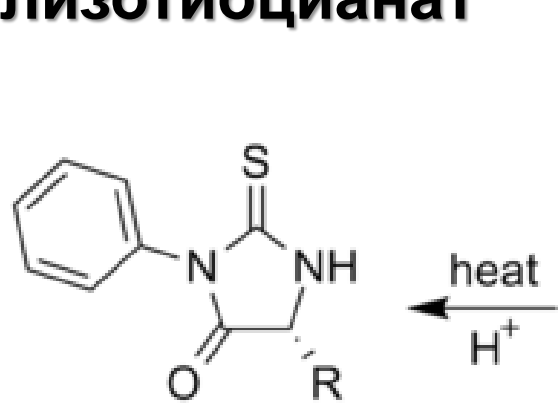
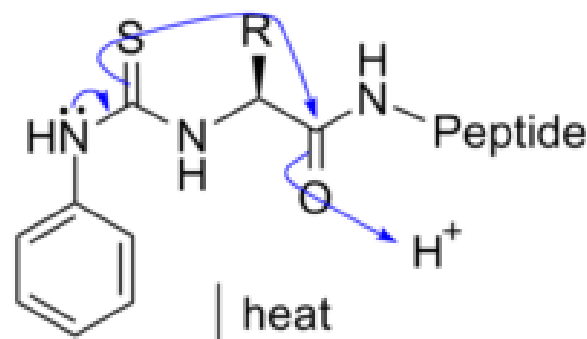


Метод Эдмана

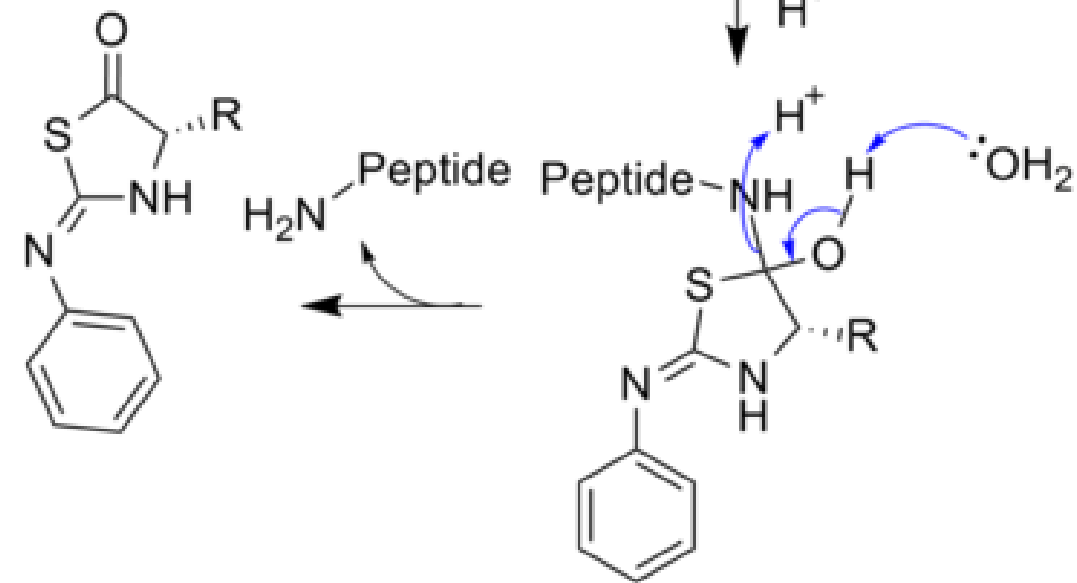
Пэр Виктор
Эдман
1916 - 1977



фенилизотиоцианат



Phenylthiohydantoin (PTH)



Первичная структура белка -

определенная последовательность аминокислот в полипептидной цепи.

Первичная структура каждого индивидуального белка закодирована в участке ДНК - **гене**.

Геном человека содержит **22—25 тыс.** генов — то есть только **1,5 %** всего ДНК

Кодирует белки или функциональные РНК.

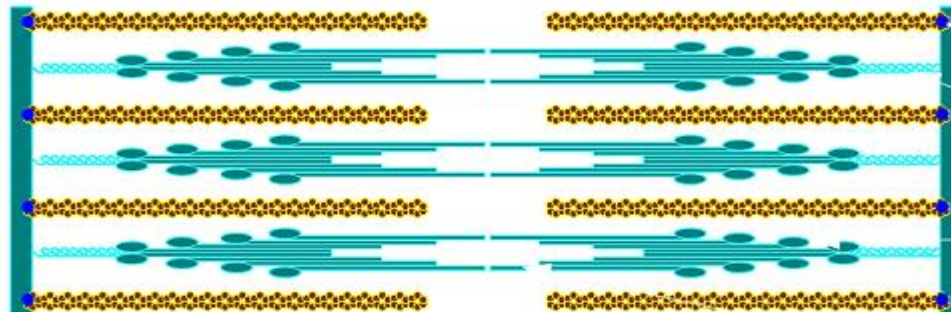
Титин/коннектин) - СОСТОИТ ИЗ

38 138 аминокислот

— самый большой из известных белков.

Молекулярная масса равна ~ **2 993 443** Da.

Полное химическое название содержит **189 819** букв и считается самым длинным словом в любом языке.



Предварительные исследования перед определением I структуры белка

1. Очистка белка.
2. Предварительная обработка белков с 4-й структурой для диссоциации на субъединицы.
3. Определение молекулярной массы.
4. Определение типа и числа простетических групп.
5. Определение наличия внутри- или межмолекулярных дисульфидных связей, а также сульфгидрильных групп.

Стадии определения I структуры белка

1. Определение АК состава (гидролиз, аминокислотный анализатор).
2. Идентификация N- и C-концевых АК.
3. Расщепление полипептидной цепи на фрагменты (трипсин, химотрипсин, бромциан, гидроксилламин и др.)
4. Идентификация N- и C-концевых АК у фрагментов.
5. Определение аминокислотной последовательности пептидных фрагментов (**секвенатор**).
6. Расщепление исходной полипептидной цепи другими способами и установление АК последовательности фрагментов.
7. Установление порядка расположения пептидных фрагментов по перекрываемым участкам (**метод пептидных карт**) -
- программы суперкомпьютера.

Методы избирательного гидролиза белка

1. **Бромциан** (CNBr) – вызывает гидролиз пептидных связей по остаткам метионина (**Met**)
2. **Гидроксиламин** – между **Asp** и **Gly**
3. **Пепсин** – у карбоксильного участка ароматических АК - **Phe**, **Trp** и **Tyr**
4. **Трипсин** – у карбоксильного участка **Arg** и **Lys**
5. **Химотрипсин** – пептидные связи у которых аминокетильная группа принадлежит **Trp**, **Tyr**, **Phe** и **Leu**

Методы определения N-концевых аминокислот

- Применение аминопептидазы.
- **Метод Сенгера** - динитрофторбензольный.
- **Метод Эдмана** с фенилизотиоцианатом (секвенатор).
- Реакция с **дансилхлоридом** - взаимодействует с первичными NH_2 алифатических и ароматических аминов, образуя стабильные флуоресцентные сульфониламидные производные сине-зелёного цвета.

C-концевых аминокислот

- Применение карбоксипептидазы.
- Метод **Акабори** (гидразинолиз) - (аминоацилгидразины + АК)
- Применение борогидрида натрия NaBH_4 (АК + α -аминоспирт)

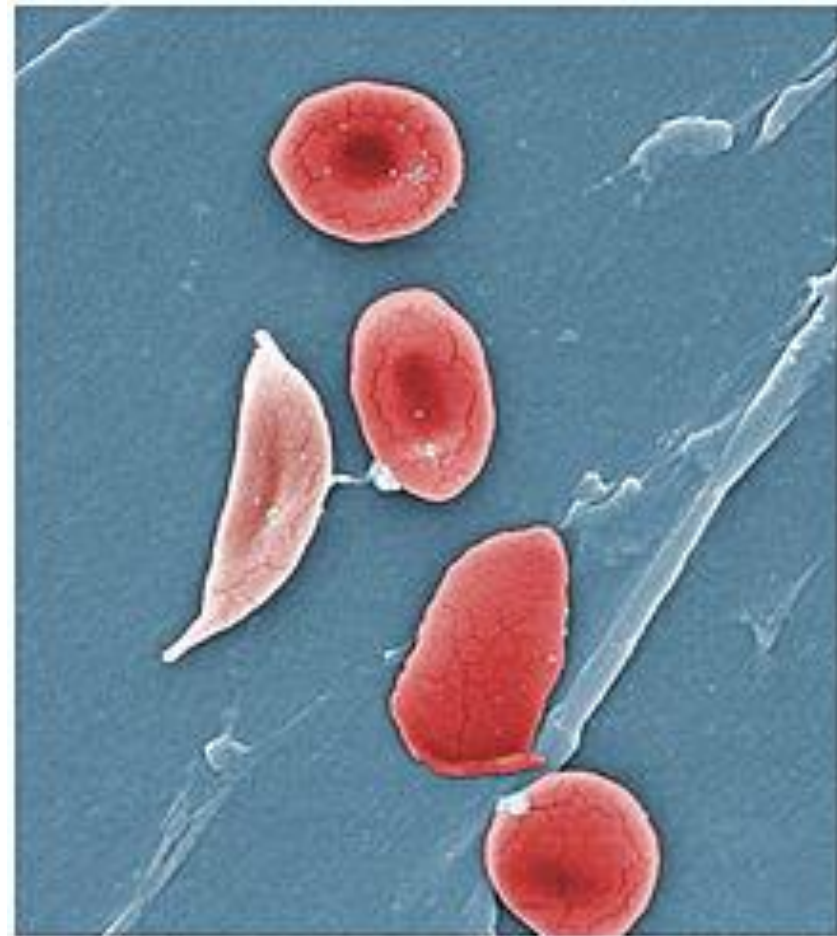
Серповидноклеточная анемия.

Синтезируется аномальный **Hb S**, в молекуле которого вместо **Glu** в 6 положении β -цепи находится **Val**.

В условиях гипоксии **Hb S** полимеризуется и образует длинные тяжи, в результате чего эритроциты приобретают серповидную форму.

Гомозиготы по гену серповидноклеточности гибнут при рождении.

Гетерозиготы живут и обладают устойчивостью против малярийного плазмодия.





TRISOMY 21

Gene dosage effect

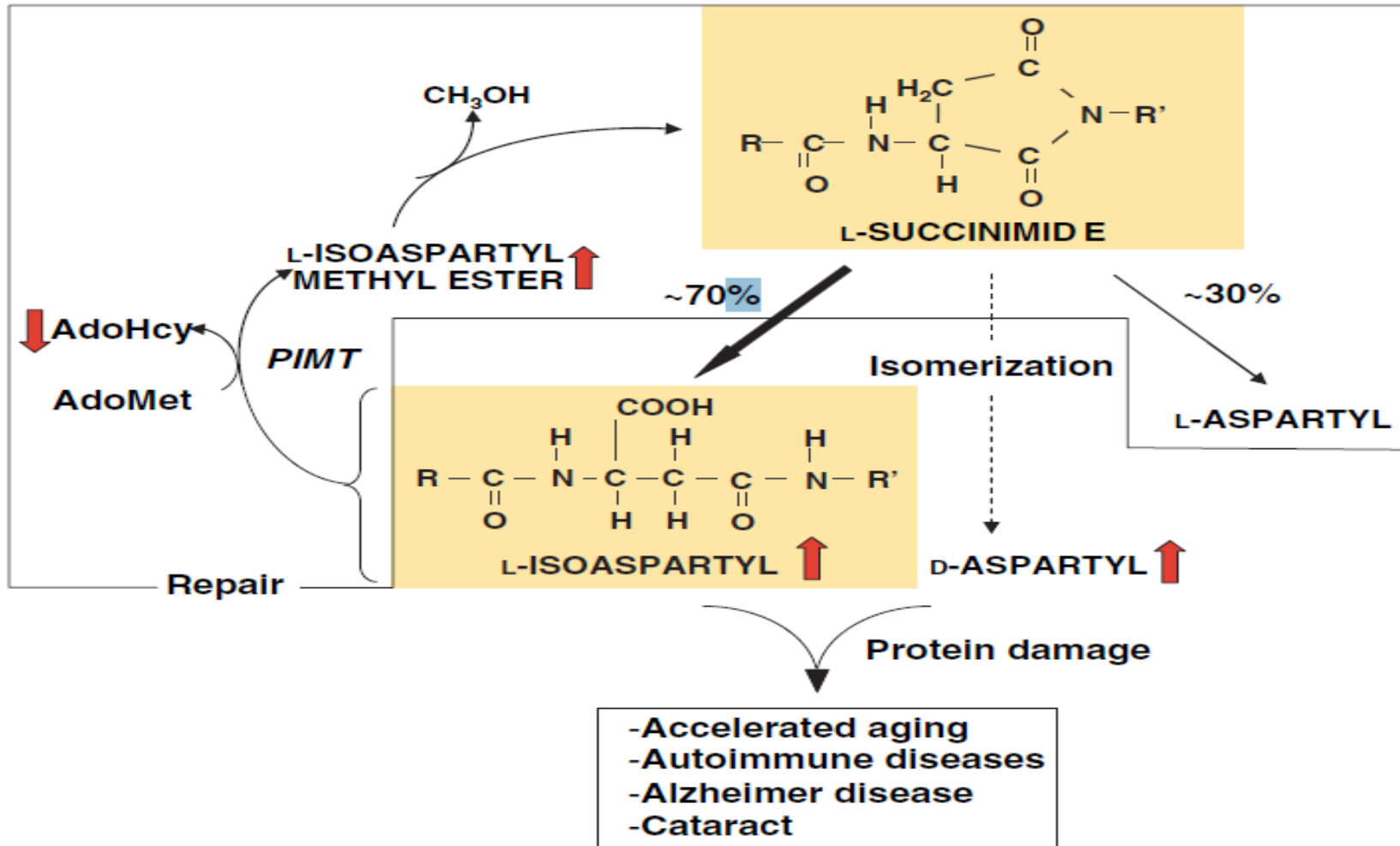
↑ SOD1

Chronic oxidative stress



Asn

Deamidation ↑
NH₃



“conformational disease”

Galletti P. 2007.

Вторичная структура белка



Первичная структура



Вторичная структура



Третичная структура



Четвертичная структура

Вторичная структура белка -

- **локальная** пространственная конформация небольших (3 – 30 АК) участков полипептидной цепи.

Основные разновидности II структуры белка:

- ✓ α – спираль
- ✓ β -складчатый лист (β -структура)
- ✓ петли
- ✓ повороты
- ✓ изгибы

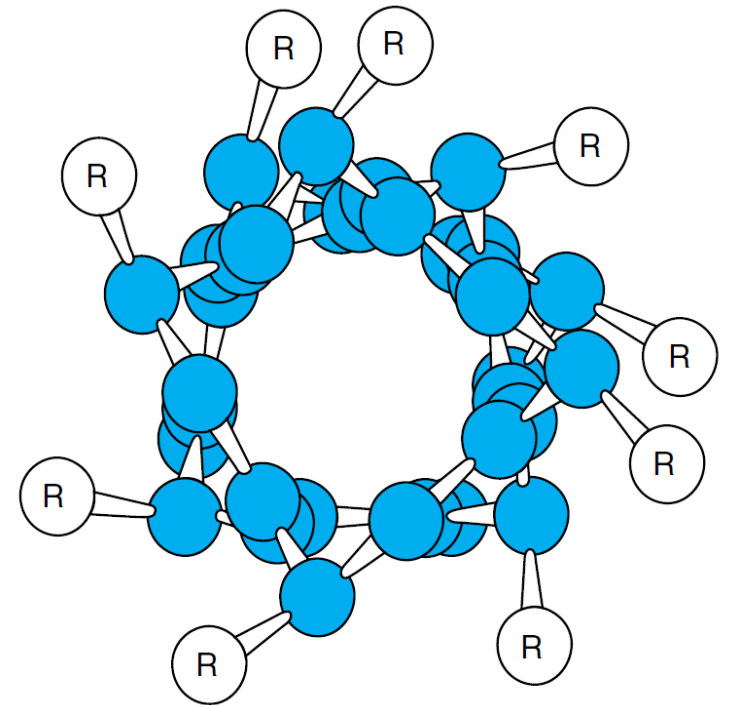
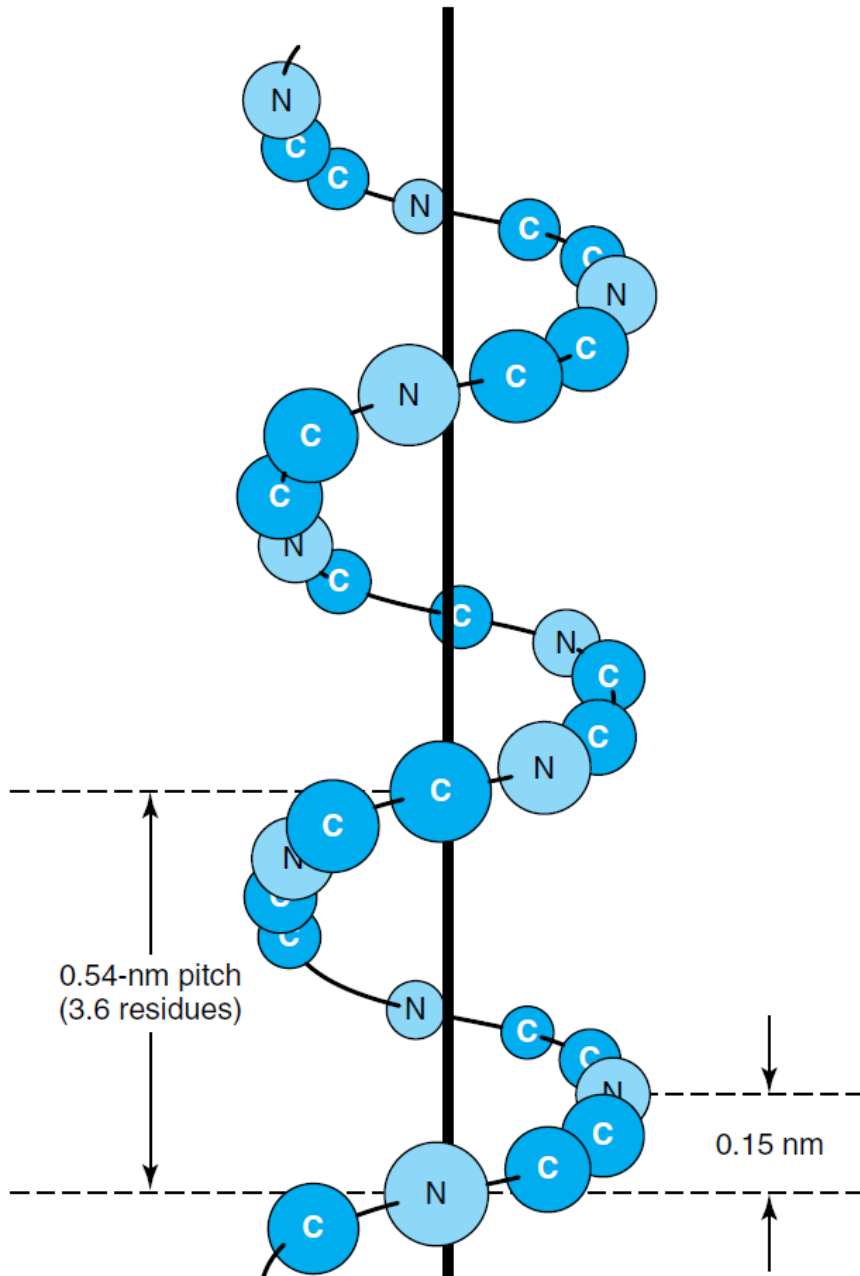
Вторичная структура белка -

α - спираль - обусловленная разными углами поворота пептидных связей разных АК.

$\alpha\text{C} - \text{N}$ (**φ** [фи] угол - **57°**)

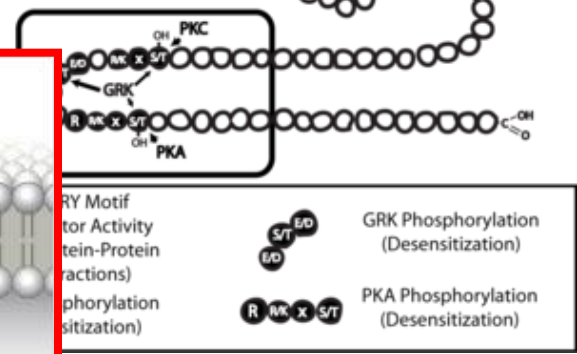
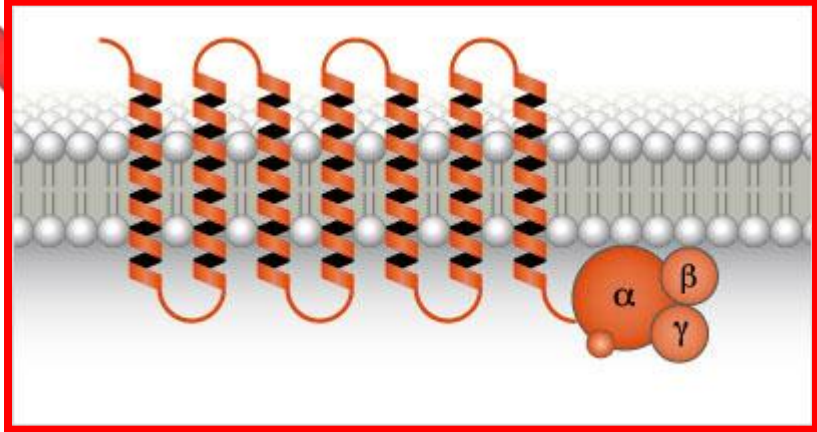
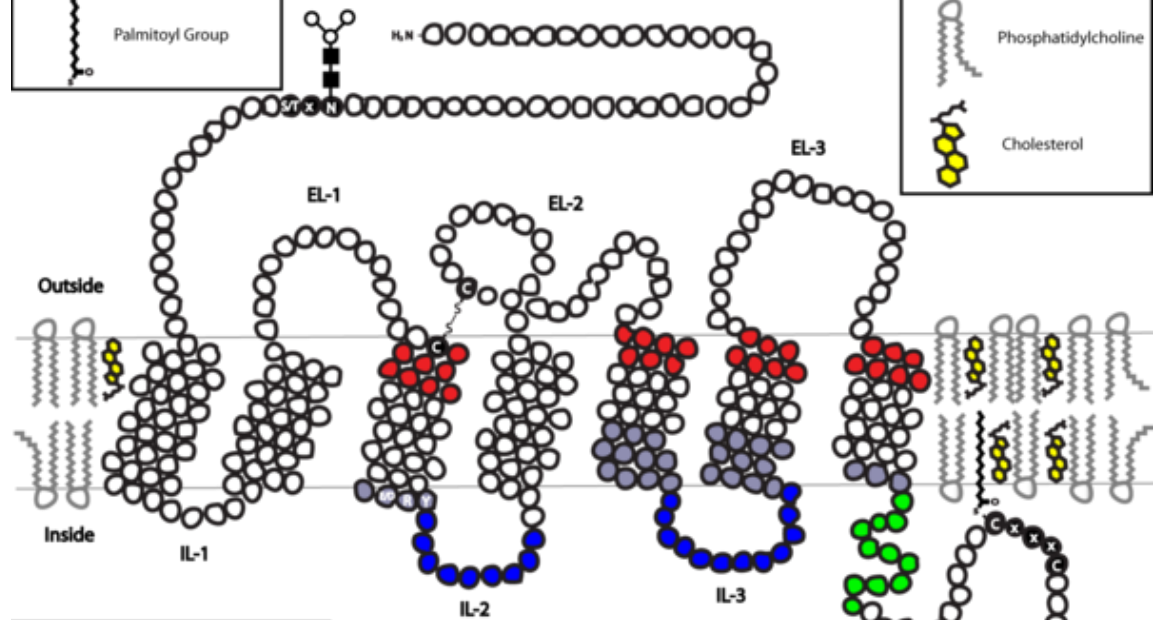
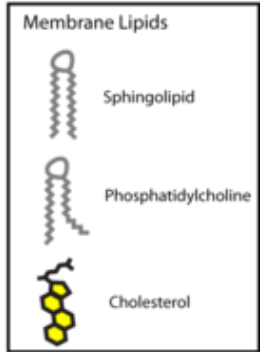
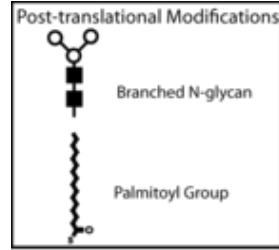
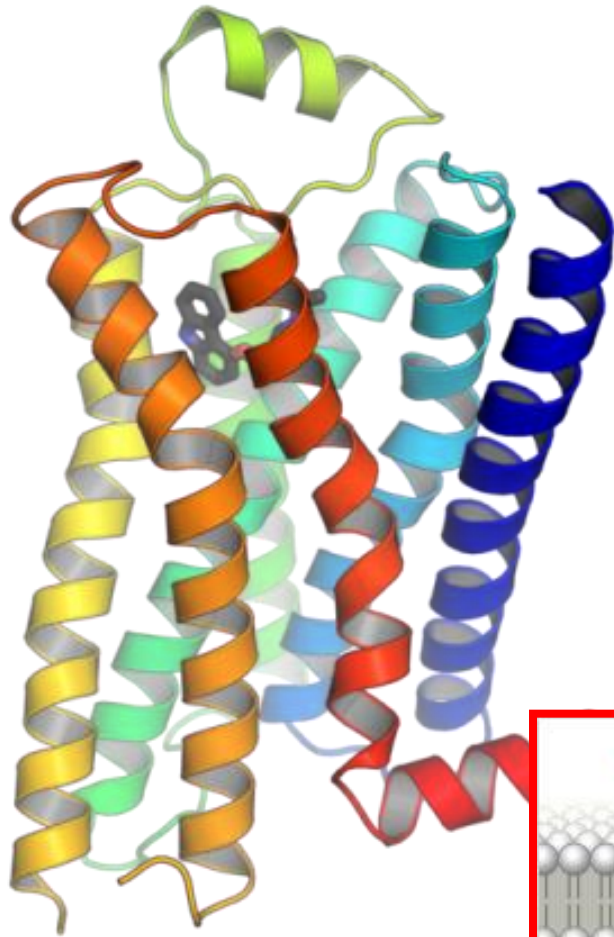
$\alpha\text{C} - \text{C}$ (**ψ** [пси] угол - **47°**)

Структура α спирали



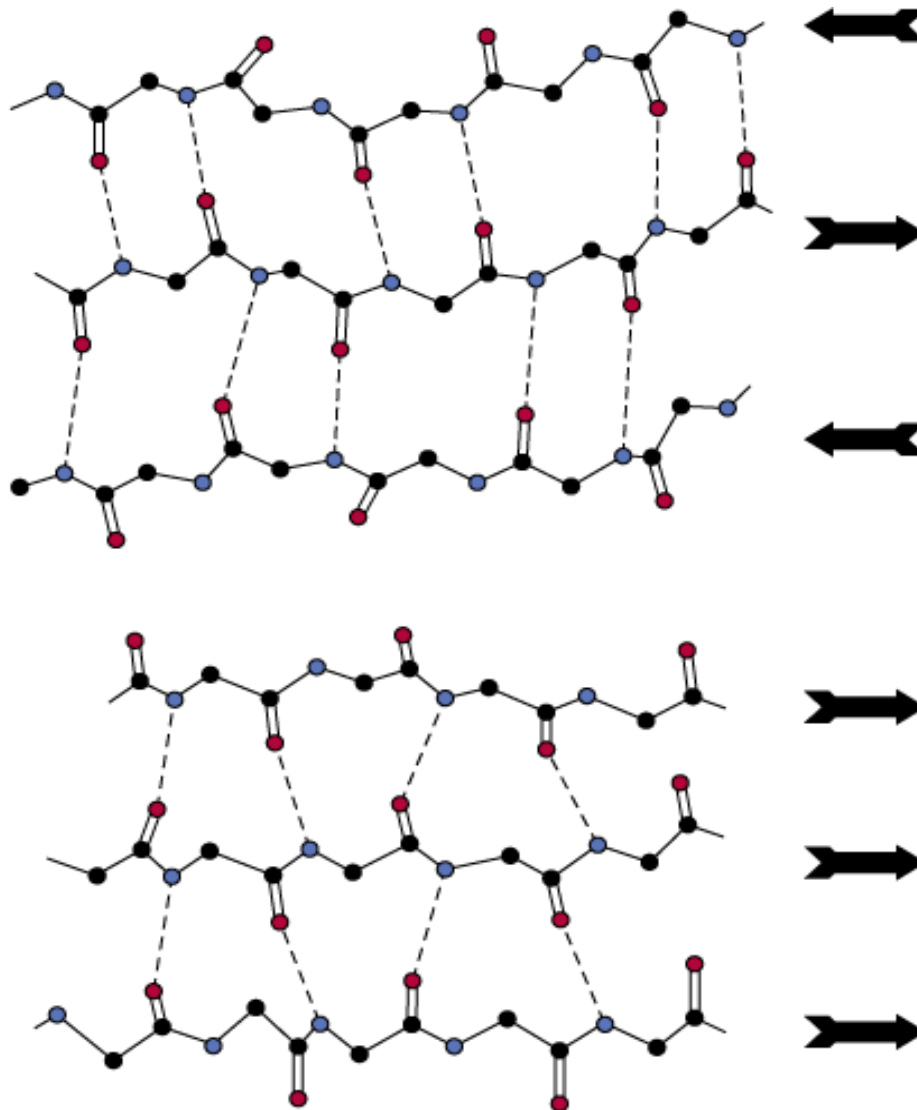
Доля α спиралей в белках

- ✓ **ГЕМОГЛОБИН – 80%**
- ✓ **ИНСУЛИН - 46-60%**
- ✓ **АЛЬБУМИН (яйца) – 30-45%**
- ✓ **ПЕПСИН - 20-30%**
- ✓ **КАЗЕИН - 10%**



Beta-2-adrenergic-receptor

β -складчатый лист (β -структура)



ПО НАЛИЧИЮ α -СПИРАЛЕЙ И β -СТРУКТУР ГЛОБУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ МОЖНО РАЗДЕЛИТЬ

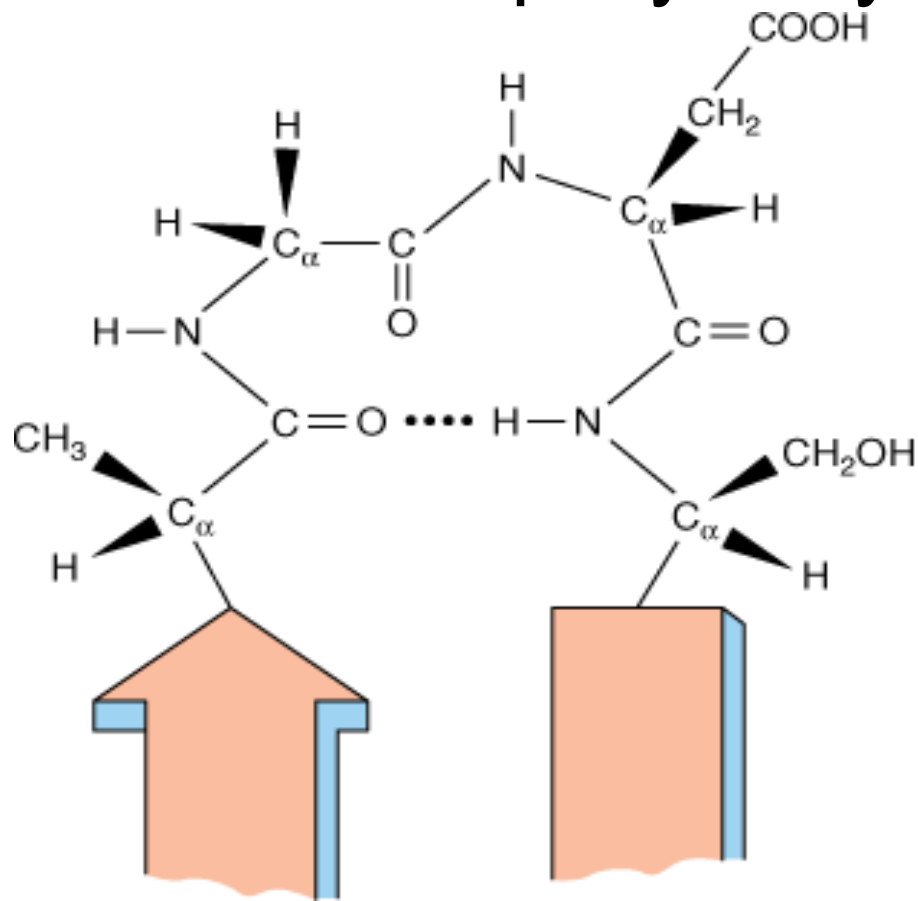
НА 4 КАТЕГОРИИ:

1. Белки, в структуре которых обнаружена преимущественно α -спираль – **миоглобин, гемоглобин**.
2. Белки с α -спиралями и β -структурами (**лактатдегидрогеназа, фосфоглицераткиназа**).
3. Белки, имеющие преимущественно β -структуру (**иммуноглобулины, супероксиддисмутаза**).
4. Белки, имеющие лишь незначительное количество регулярных вторичных структур.

β повороты имеют 4 остатка АК.

Первый остаток имеет водородную связь с четвёртым (180° поворот цепи).

В структуре поворотов часто присутствуют **Gly** и **Pro**.



Петли - участки, содержащие остатки АК сверх минимального количества, необходимого для соединения соседних образований вторичной структуры.

У многих ферментов **петли** имеют АК остатки участвующие в **катализе**.

Относятся к **надвторичной структуре**:

- **цинковые пальцы** - ДНК-связывающие белки. Фрагмент из 20 АК, в которых Zn^{2+} связан с радикалами 4 АК.
- **лейциновая застёжка молния** (гистоны).
- **спираль-петля-спираль (helix-loop-helix)** (с ДНК-связывающие белки, факторы транскрипции).

Прионы

PrP^c – prion related protein;

208 (253) АК

PrP^{sc} – scrapie.

Прионные болезни:

Губчатый энцефалит коров

(**bovine spongiform encephalopathy**

(**mad cow disease**);

Скрейпи (почесуха) овец;

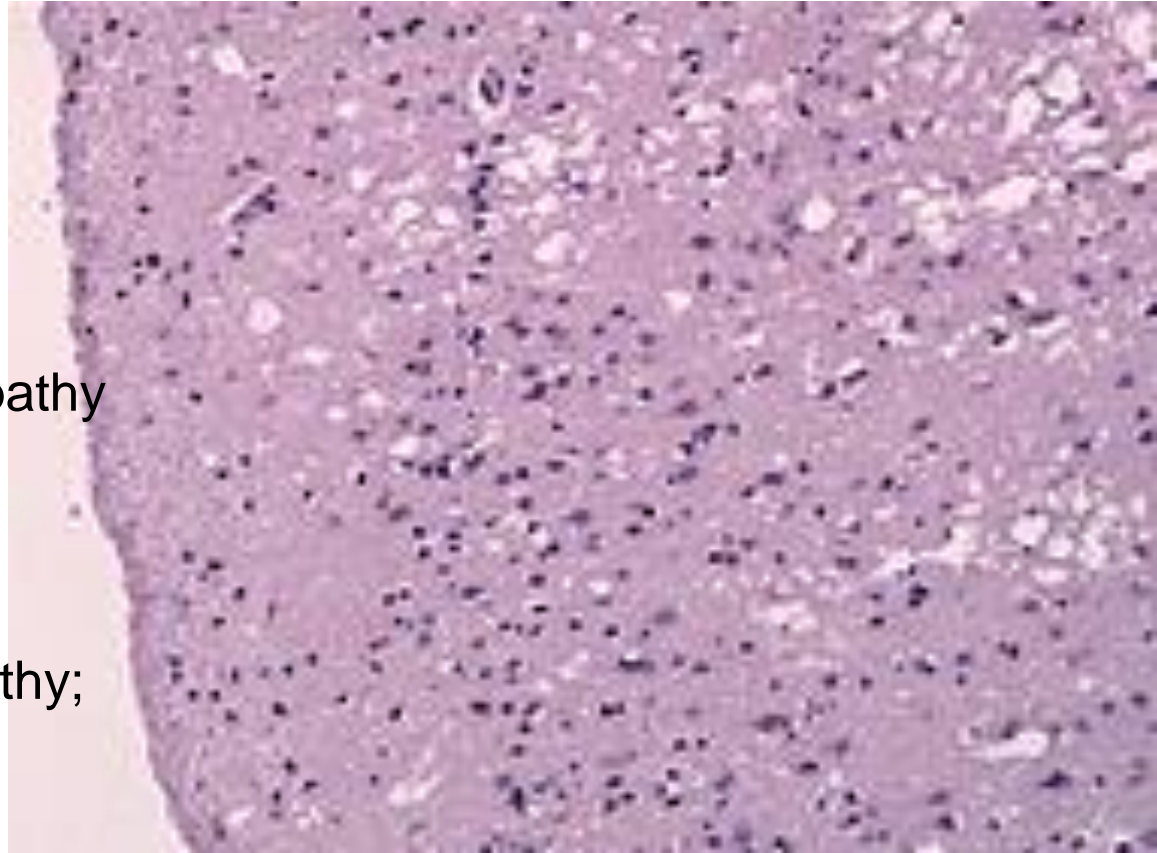
Feline spongiform encephalopathy;

Куру;

Летальная семейная инсомния;

Болезнь Крейцфельда-Жакоба (куру, коровье бешенство, губчатая энцефалопатия).

“Conformational disease”



Physiological roles of **PrP**.

Brown et al. reported that **PrP**-knockout mice exhibited the decreased **Cu** and the reduced activity of **Cu**-dependent enzymes.

They also demonstrated that **PrP** plays as a **Cu/Zn superoxide dismutase** (SOD) in the brain and has anti-oxidative stress roles. **PrP**-deficient neurons are susceptible to free radicals such as hydrogen peroxide.

PrP regulates the excitability of **N-methyl-D-aspartate (NMDA)**-type glutamate receptor in a **Cu**-dependent manner.

Meanwhile, **Cu²⁺** influences the gene expression and cellular trafficking of **PrP**.

Therefore, the depletion of **PrP** and the resulting **Cu** dyshomeostasis may trigger **neurodegenerative processes**.

Sadakane Y. 2018. ! Implications of Metal Binding and Asparagine Deamidation for Amyloid Formation. 30126231

PrP^C enhanced cellular uptake of **Zn²⁺** via binding to the α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (**AMPA**)-type **glutamate receptor**, and that **PrP^C** acts as a **Zn²⁺** sensor in the synapse.

PrP^C is implicated in **Zn** homeostasis.

PrP reportedly facilitates **Zn²⁺** influx into the brain and attenuates Zn-induced neurotoxicity.

Sadakane Y. 2018

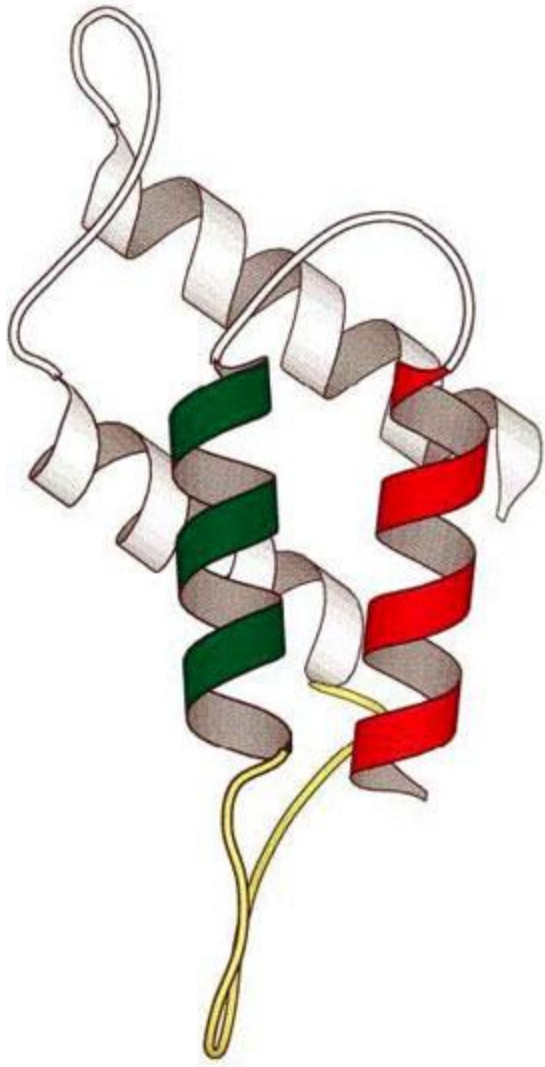
Прионы участвуют в формировании клеточных механизмов:

PrP – долговременной памяти(2006)

PrP – обновлении стволовых клеток (2006)

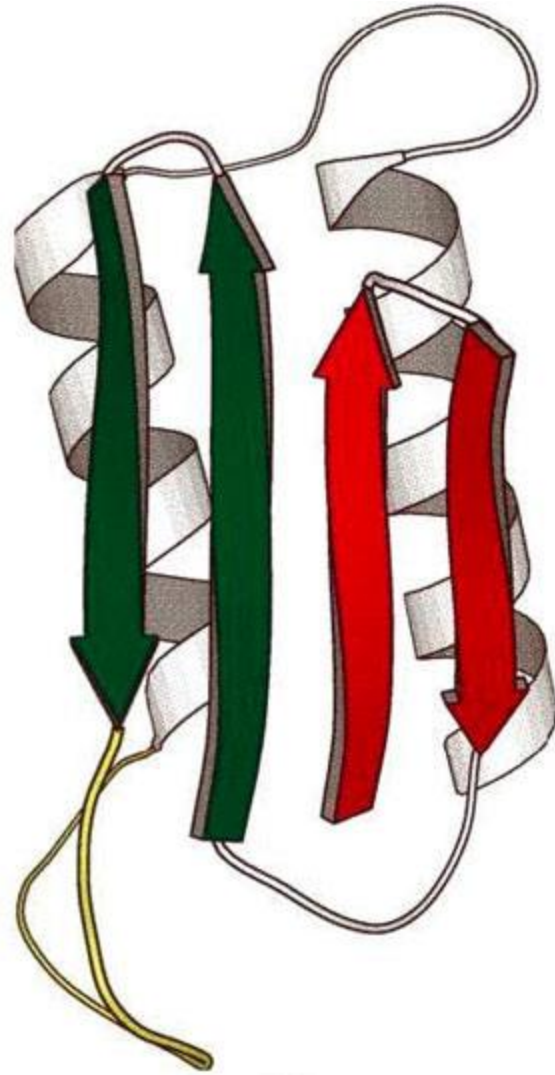
PrP – восстановлении миелина периферических нервов (2010)

PrP – регулируют клеточную гибель (2018)



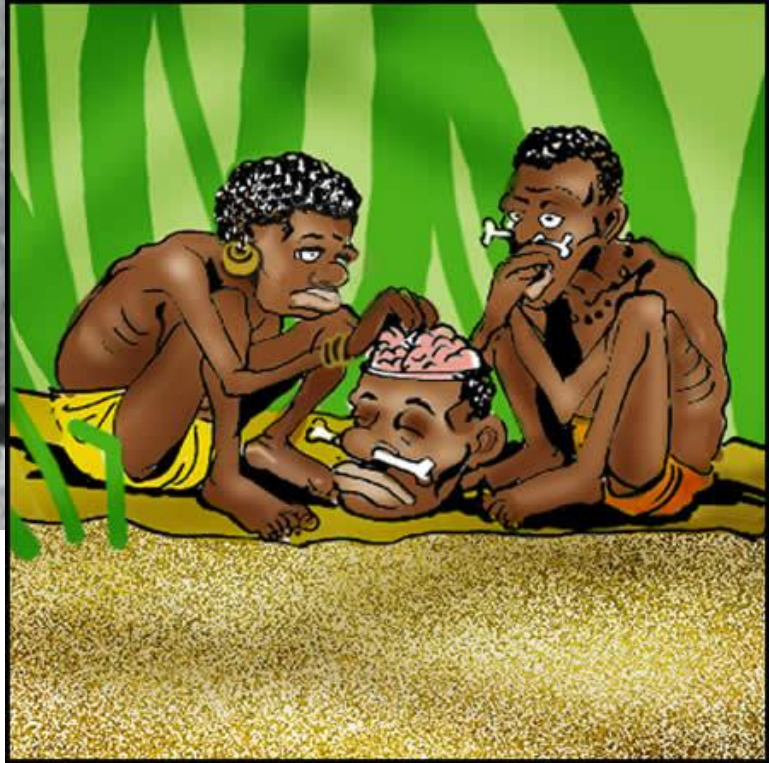
(a)

PrP^c



(b)

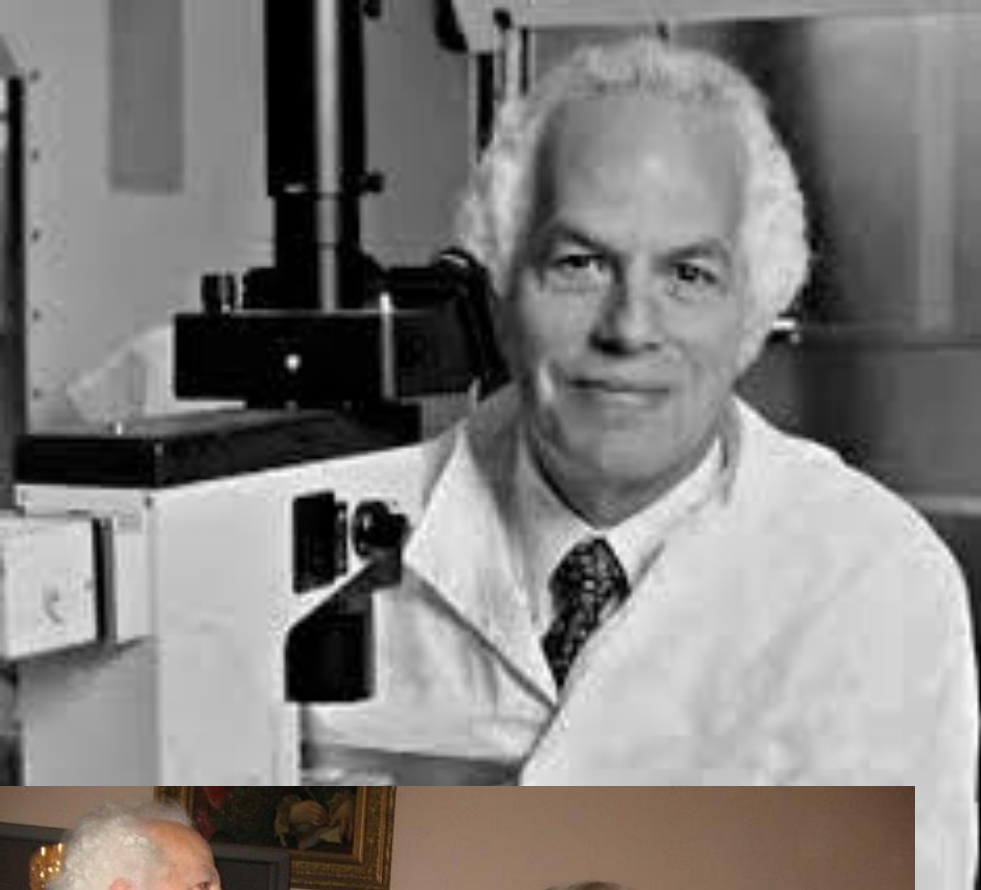
PrP^{sr}



Попуасы, больные куру.

Каннибализм - фактор риска
болезни Крейтцфельдта-Якоба

Стенли Прузинер



1997 год

380 **G>T** (p.**Gly** 127 **Val**)

Wild-type protein

...GGYML...

...GGYML...

126

130

V127

...G**V**YML...

...GGYML...



Protection from
kuru + sCJD

...G**V**YML...

...G**V**YML...



Complete
protection

Третичная структура белка



Первичная структура



Вторичная структура



Третичная структура



Четвертичная структура

Третичная структура белка

- это в трехмерное пространственное расположение полипептидной цепи со вторичными структурами и **доменами*** в растворах.

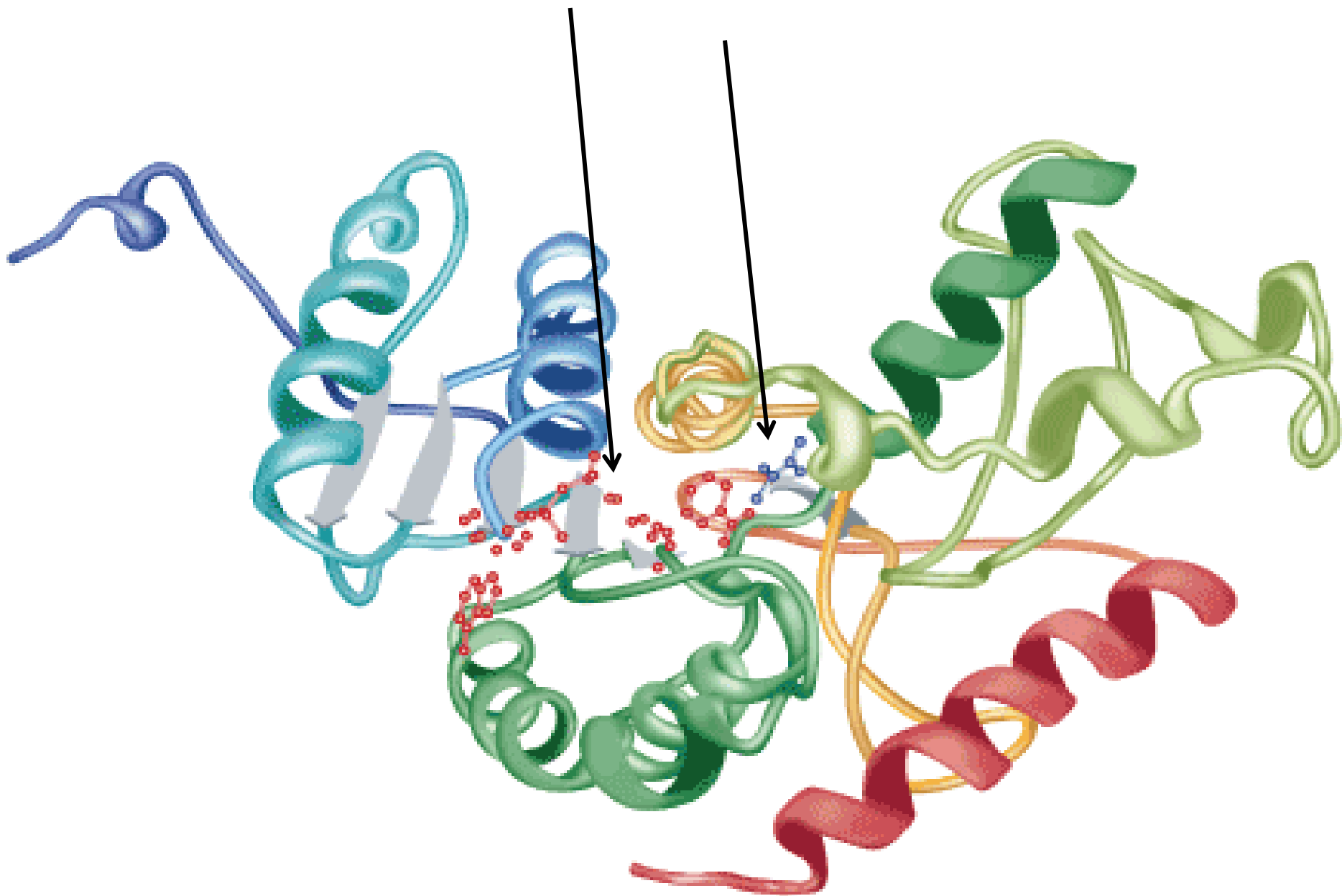
Относится ко всей трехмерной пространственной конформации полипептида.

Существование **ВОЗМОЖНО ТОЛЬКО В растворе!**

***Домен** - участок структуры белка, выполняющего конкретную задачу –

связывание субстрата, лиганда, гидрофобные взаимодействия.

Два домена ЛДГ (НАД и ПК).



Четвертичная структура белка



Первичная структура



Вторичная структура



Третичная структура



Четвертичная структура

Четвертичная структура белка (субъединичная, доменная) –

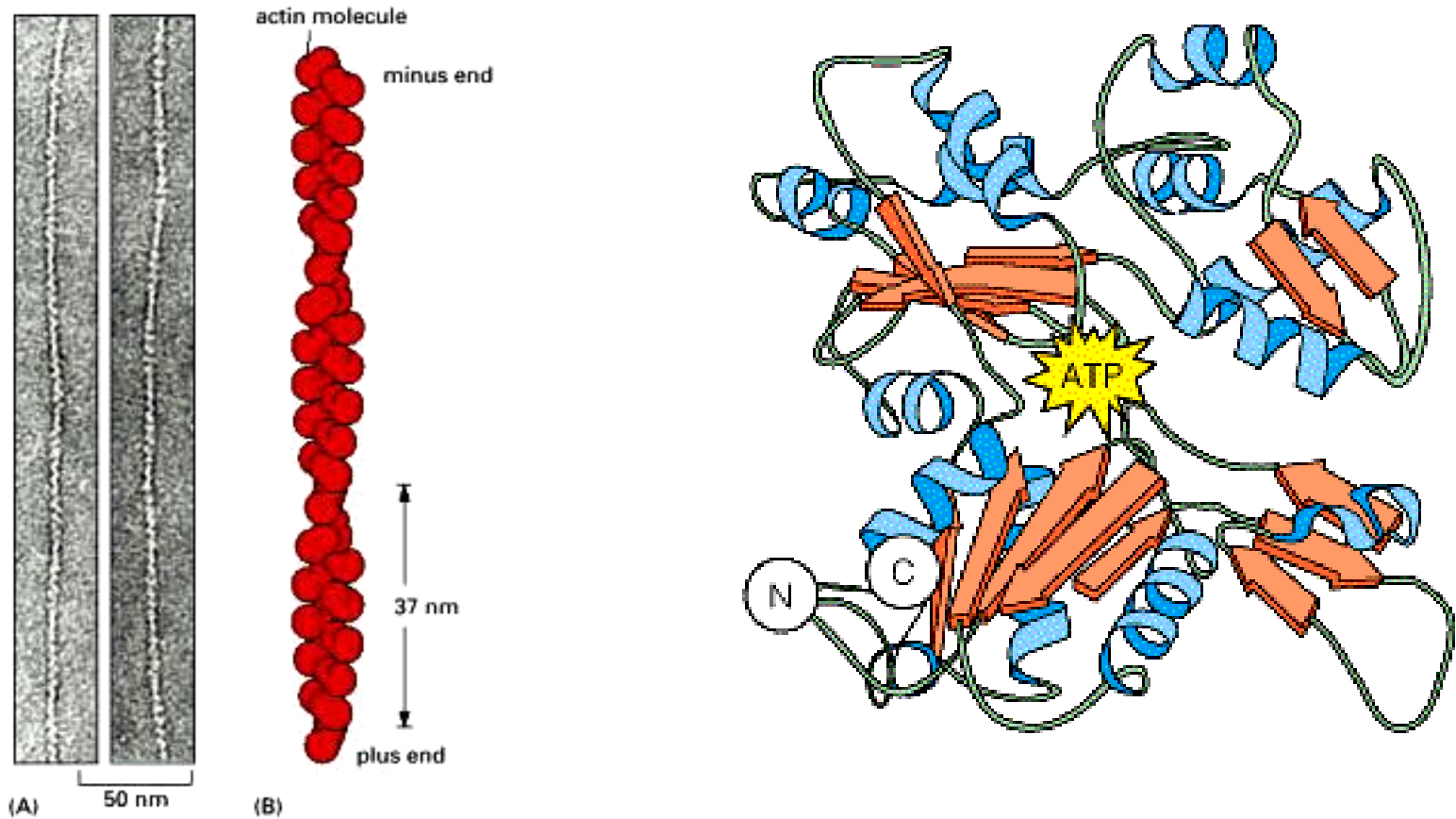
способ укладки в пространстве нескольких отдельных полипептидных цепей (**субъединиц**), при формировании **единого** в структурном и функциональном отношении макромолекулярного образования.

Исключительно **нековалентные** взаимодействия

Наиболее важны:

- **гидрофобные** взаимодействия (окружающая вода);
- **водородные** и **солевые** мостики между карбоксилатами Glu и Asp;
- взаимодействие **противоположно заряженных** боковых цепей протонированных остатков Lys, Arg и His;

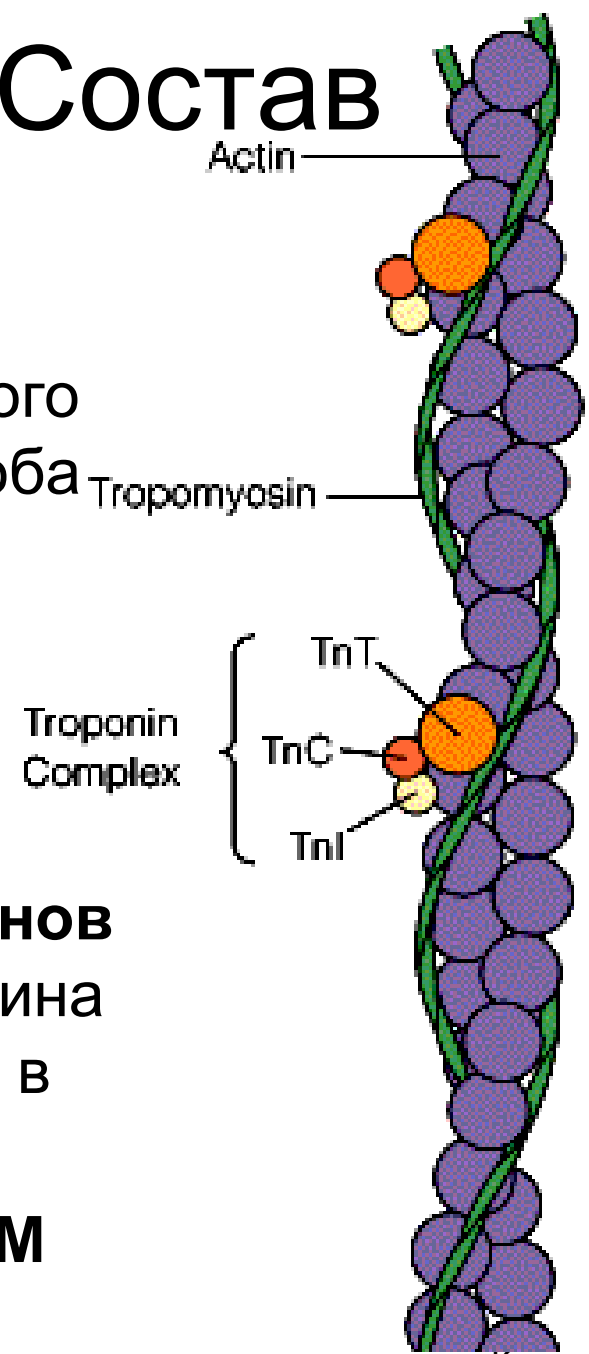
Actin



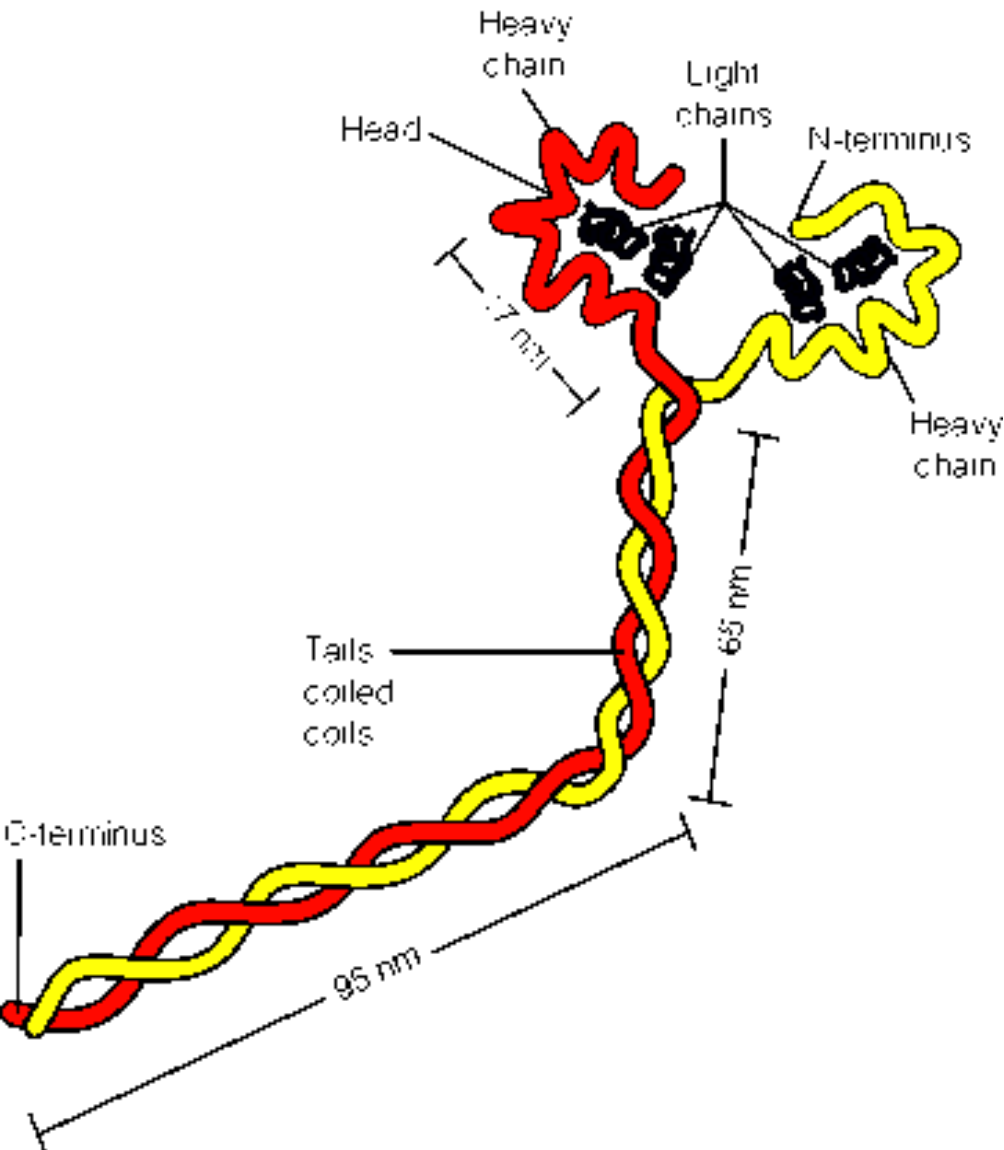
- спиральный полимер (**волокно актина**, или **F-актин**) глобулярного белка мономера (**G-актин**).

Тонкие филаменты. Состав

- Тонкие филаменты состоят из:
 - спирали **F-актина**,
 - **тропомиозина** (волоконистого длинного белка-димера, лежащего вдоль жёлоба спирали F-актина),
 - трёх небольших белков **тропонинов I, C и T**.
- Присутствие **тропомиозина** и **тропонинов** препятствует связыванию головки миозина с актином, пока ионы **Ca²⁺** присутствует в низкой концентрации до $\sim 10^{-5}$ М.
 - В расслабленной мышце, **Ca²⁺** $\sim 10^{-7}$ М



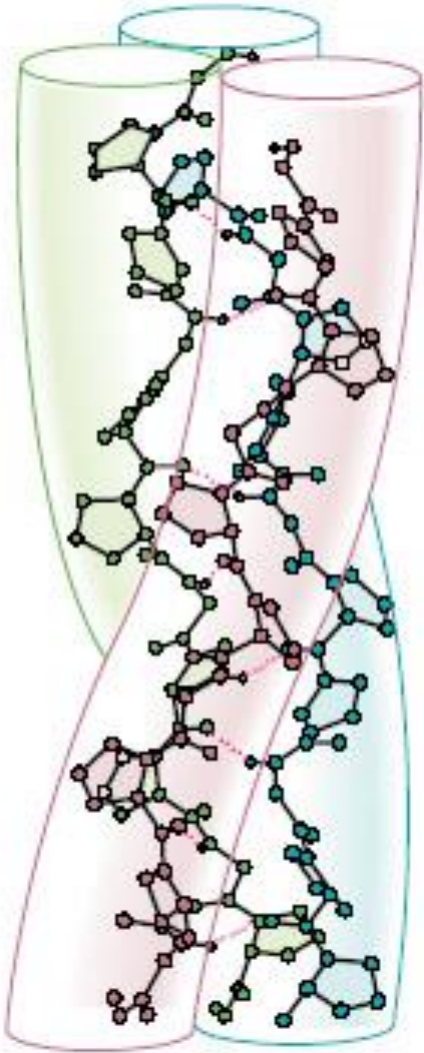
Миозин



- Молекула миозина состоит из шести полипептидных цепей:
 - двух **тяжёлых цепей**
 - двух (различных) **лёгких цепей**.
- Вместе они образуют комплекс с м.в. 540 kDa.

Структура **коллагена**

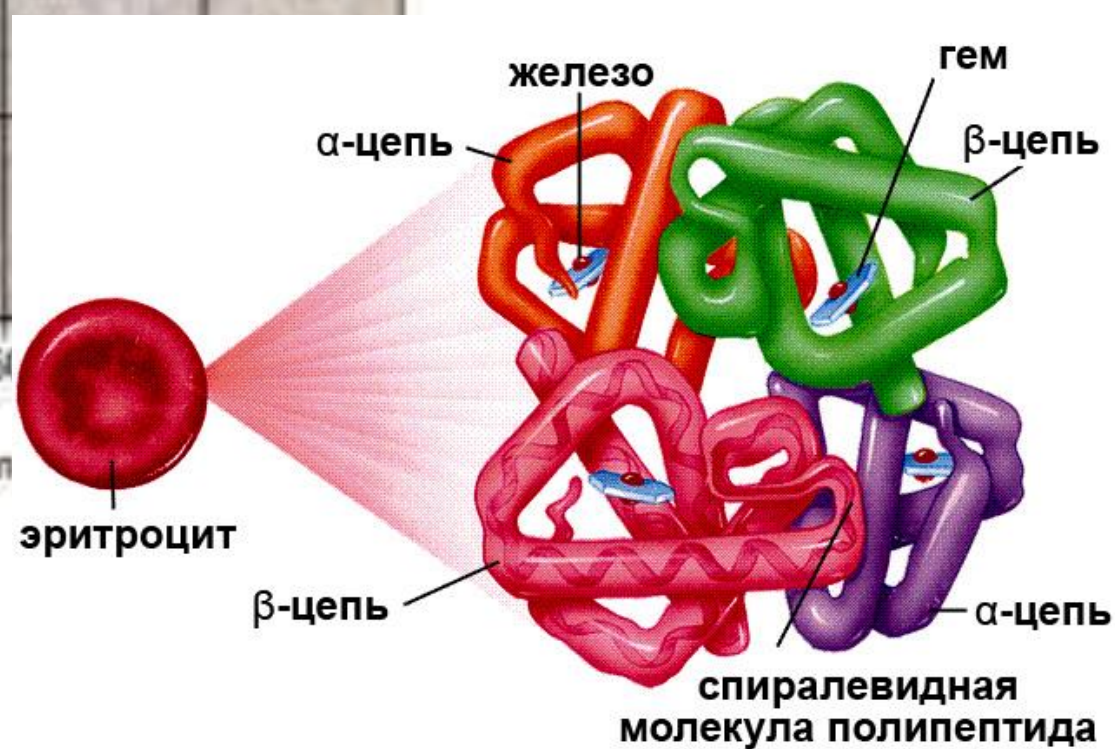
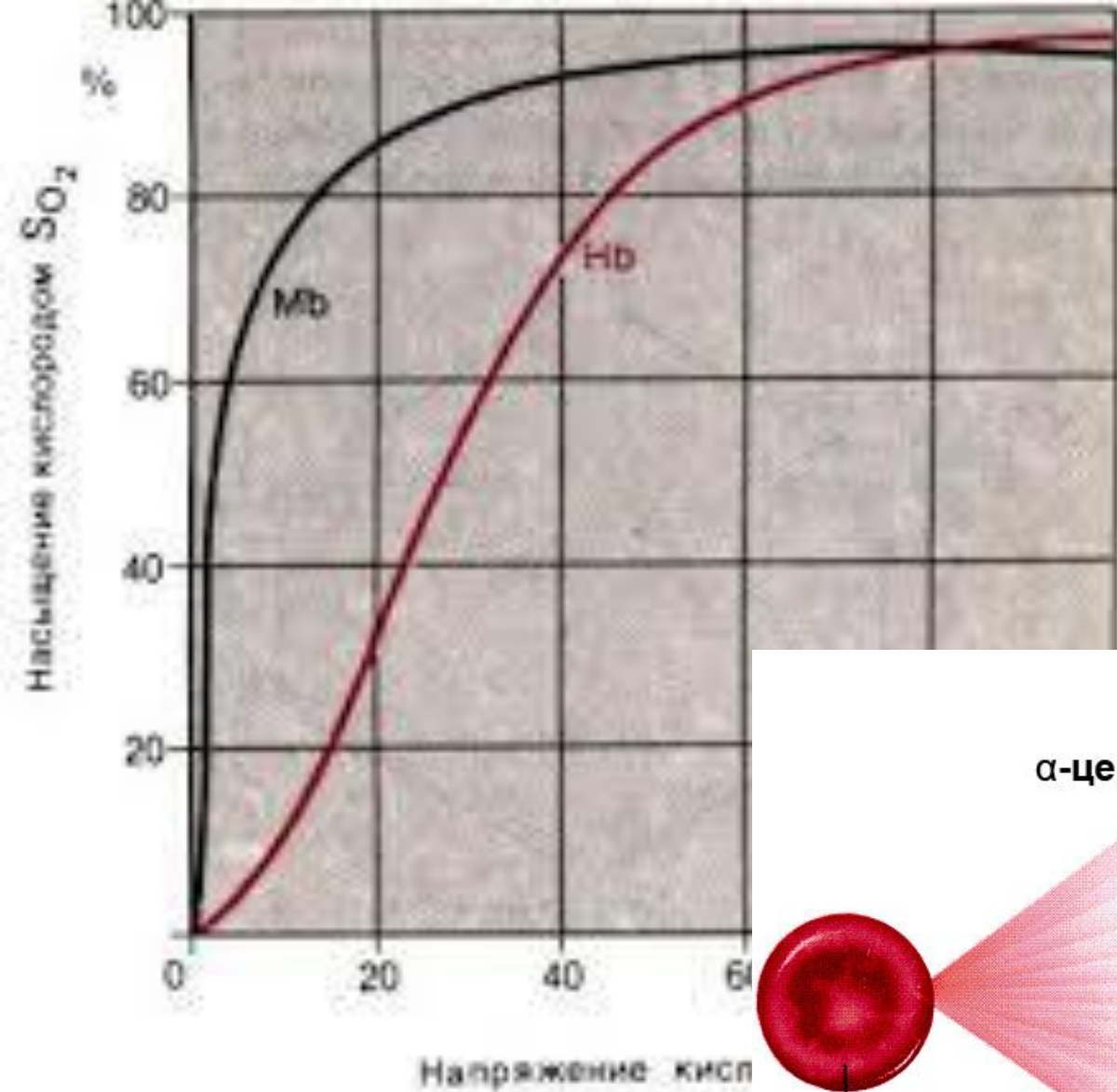
- Основная высокоупорядоченная структура представлена длинным и тонким палочковидным белком.



- **Коллаген I** типа - 300 нм длиной и 1.5 нм в диаметре состоит из 3 сплетенных субъединиц - двух $\alpha 1(I)$ цепей и одной $\alpha 2(I)$ цепи в виде правозакрученной **тройной спирали**.
- Каждая цепь имеет **1050 АК**.
 - **3 АК** участвуют в каждом обороте спирали и **каждая 3 АК** – глицин (**Gly**).
- **Коллаген** богат **пролином** и **гидроксипролином**.

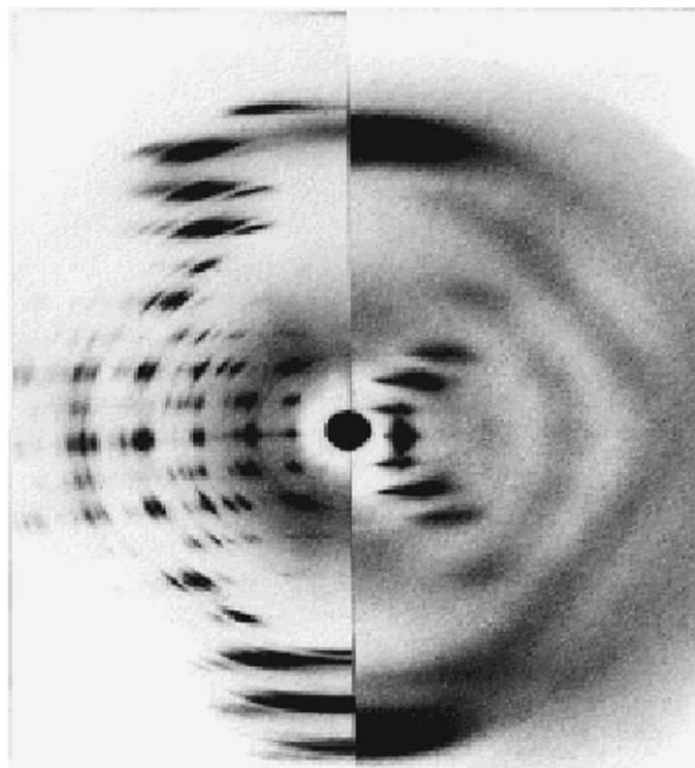
Преимущества субъединичного строения белков:

- ✓ субъединичная структура “экономит” генетический материал;
- ✓ небольшая величина цепей уменьшает влияние случайных ошибок при биосинтезе белка и облегчает выбраковку «неправильных» ошибочных субъединиц;
- ✓ легче регулировать активность белков путем смещения равновесия «ассоциация-диссоциация» в ту или иную сторону;
- ✓ субъединичная структура облегчает и ускоряет процесс молекулярной эволюции



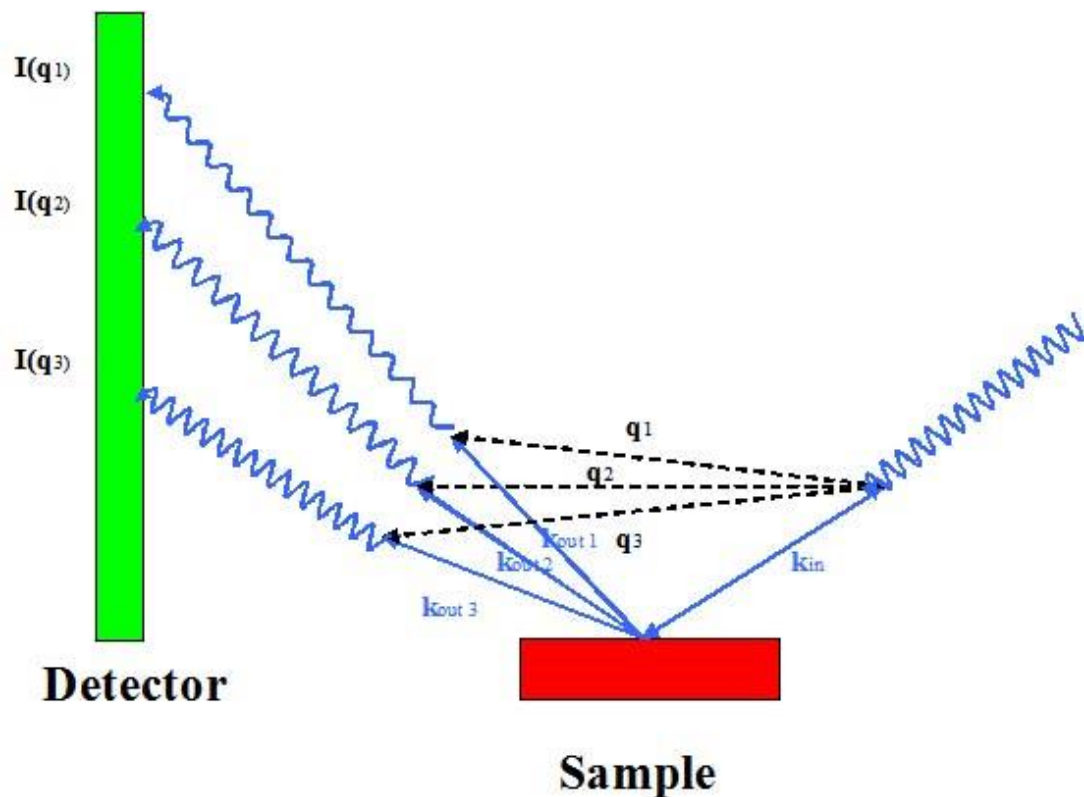
Методы изучения трёхмерной структуры белка :

- ✓ рентгеноструктурная кристаллография;
- ✓ ЯМР спектроскопии.
- ✓ Масс-спектрометрия

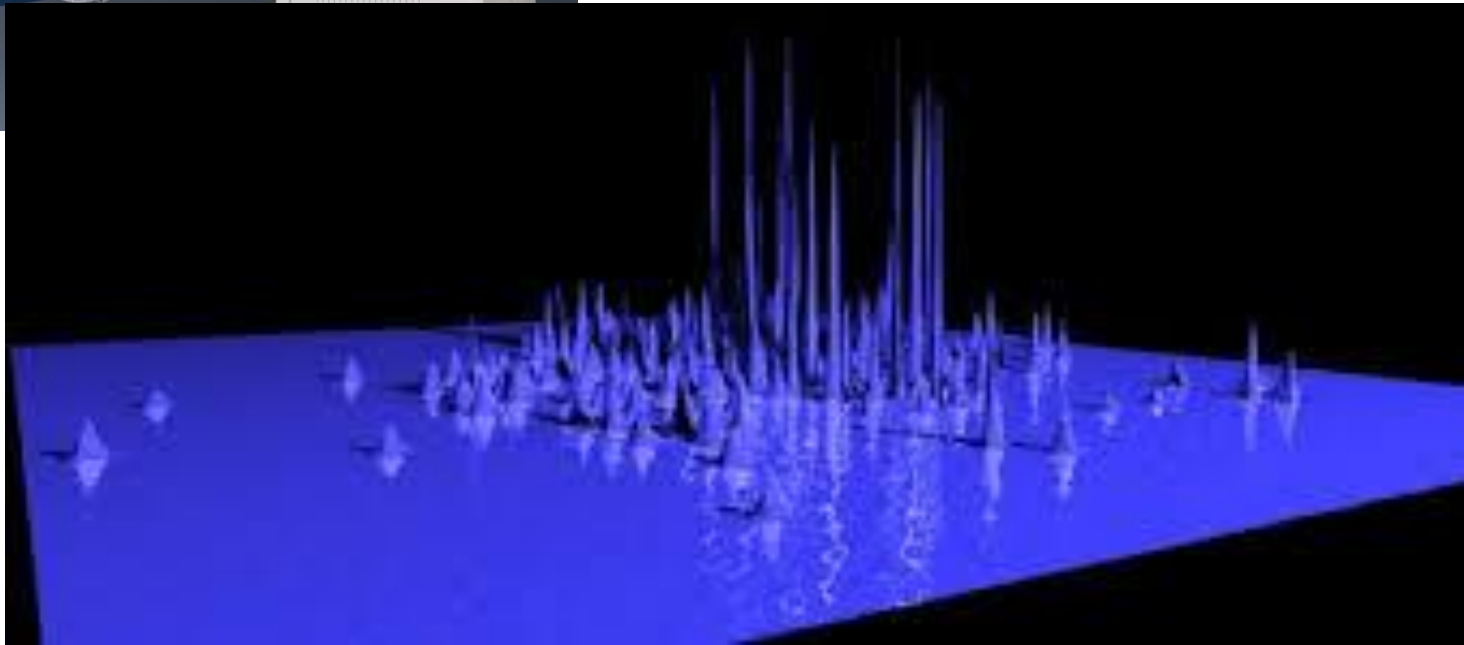


A-DNA

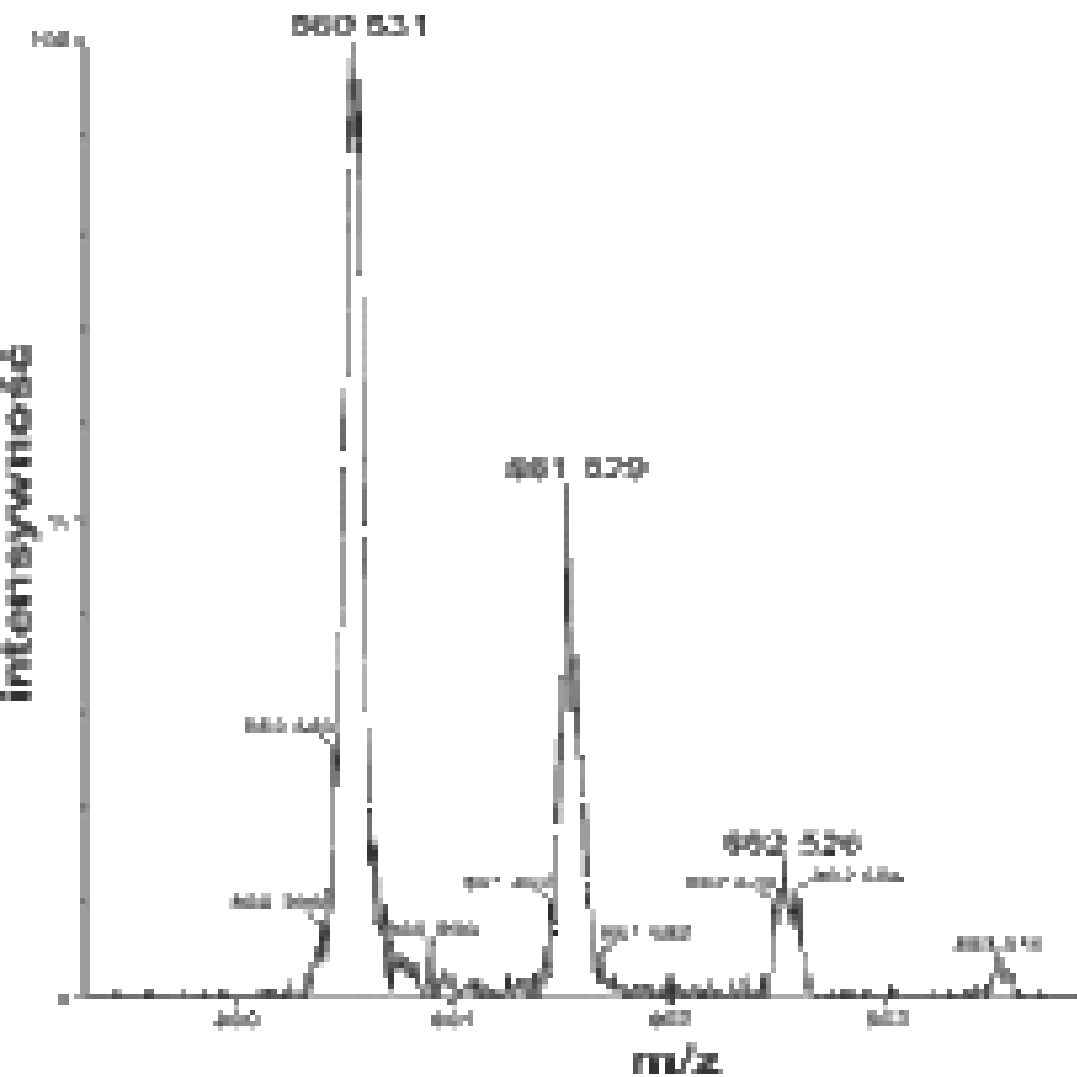
B-DNA



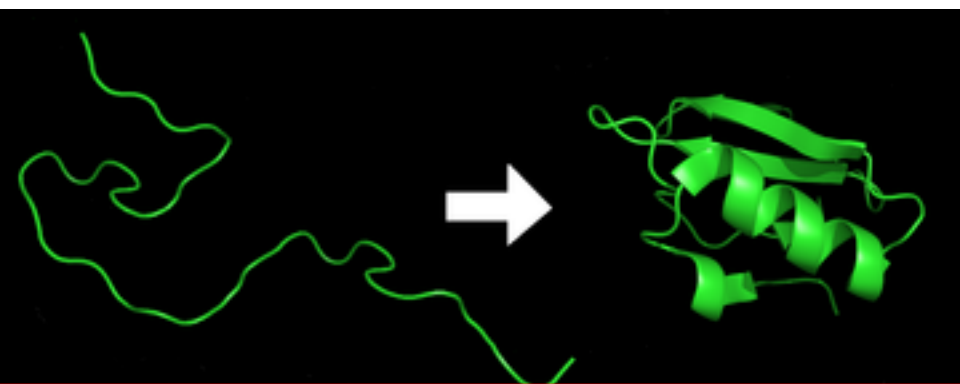
ЯМР спектроскопия



Масс спектрометрия



Фолдинг белка (укладка, от *англ.* folding) - процесс спонтанного сворачивания полипептидной цепи в уникальную нативную пространственную структуру (третичная структура).



Шапероны – белки-ферменты, «ассистенты» фолдинга. В эндоплазматической сети:

- ✓ общие – HSP70, GRP-170 (glucose-regulated protein-170).
- ✓ специальные – PDI (*изомераза дисульфидов белка*), ERp57.

Спасибо за внимание

Спасибо за внимание