

# 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



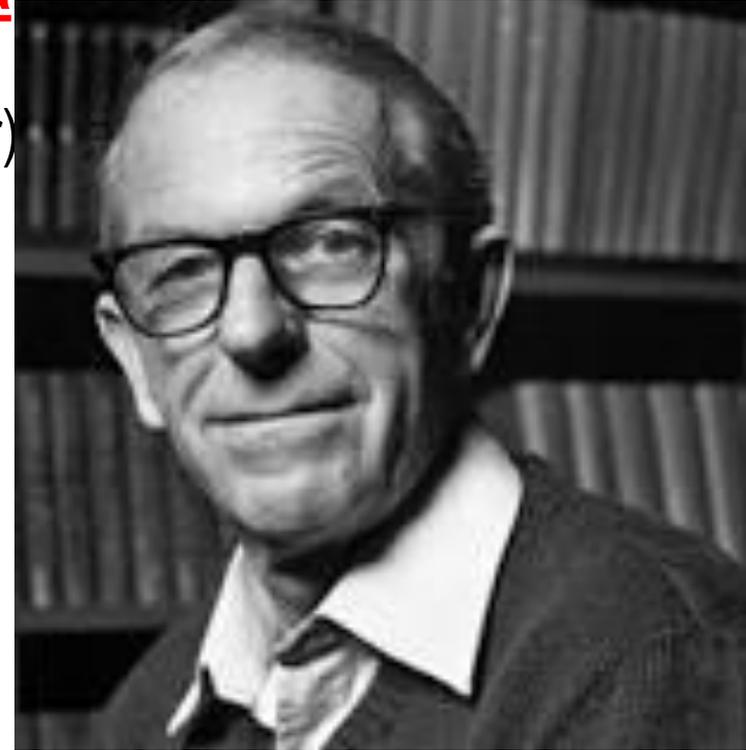
Четвертичная структура

# 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**

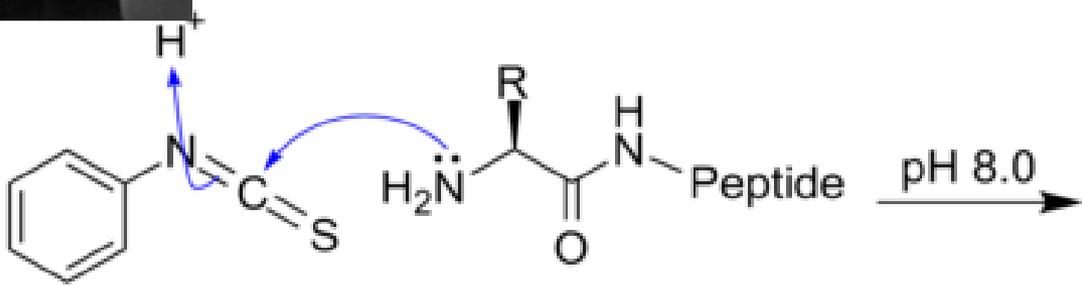
**1918 – 2013**

**N – 1958, 1980**

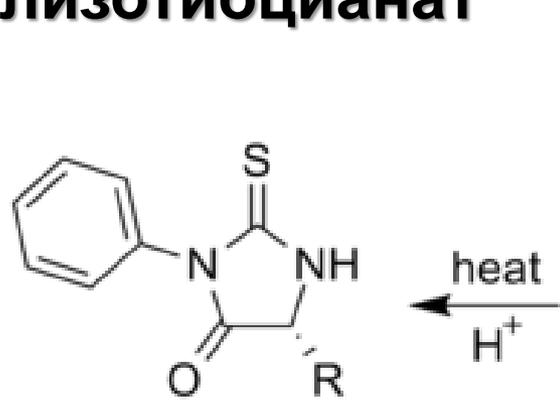
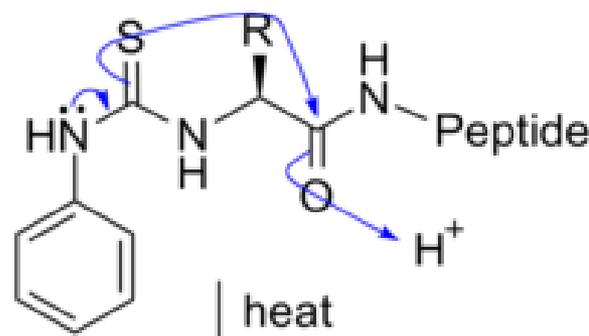


# Метод Эдмана

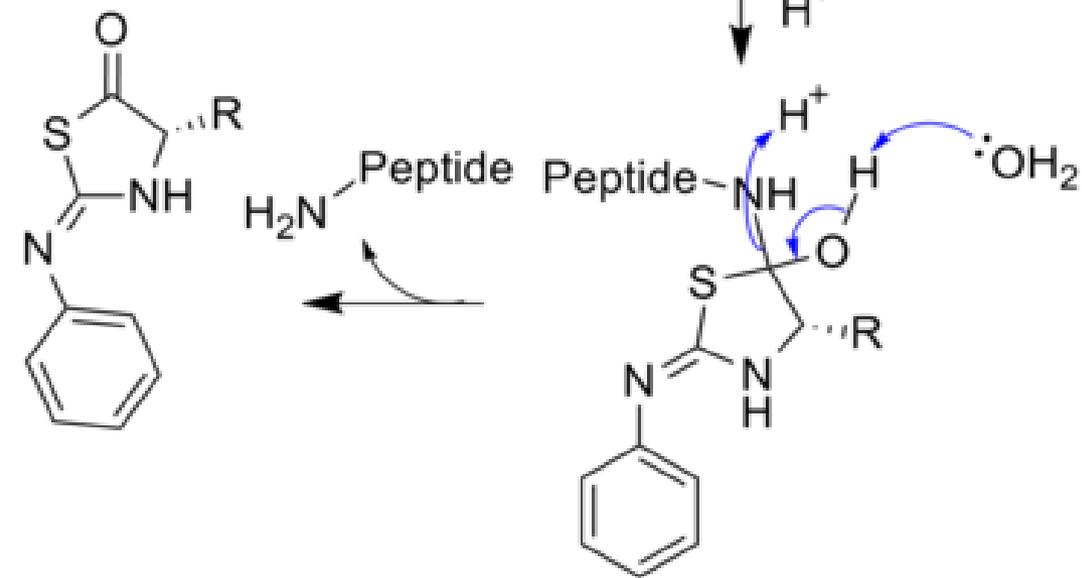
Пэр Виктор  
Эдман  
1916 - 1977



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.

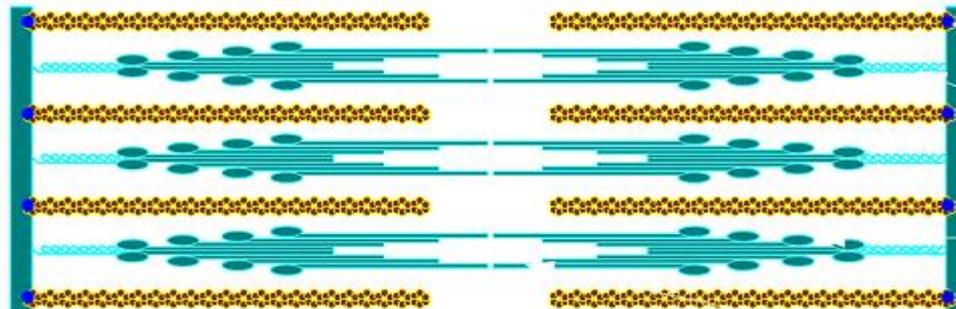
**Титин/коннектин**) - СОСТОИТ ИЗ

**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  $\text{NH}_2$  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  $\text{NaBH}_4$  (АК +  $\alpha$ -аминоспирт)

# Серповидноклеточная анемия.

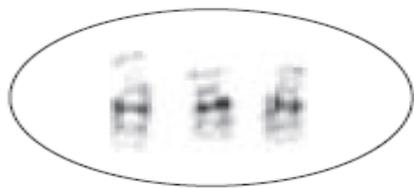
Синтезируется аномальный **Hb S**, в молекуле которого вместо **Glu** в 6 положении  $\beta$ -цепи находится **Val**.

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

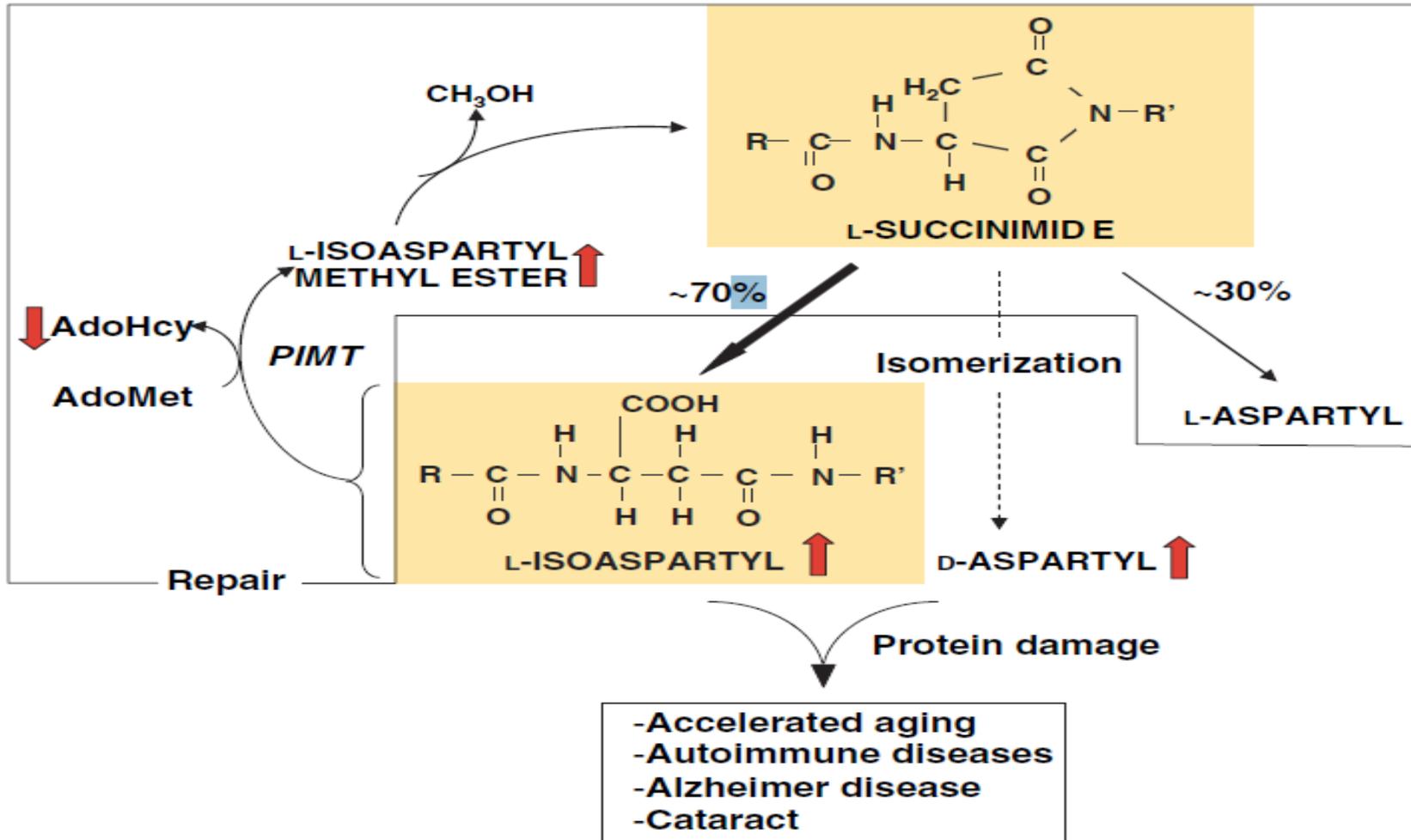
↑ SOD1

Chronic oxidative stress



Asn

Deamidation ↑  
NH<sub>3</sub>



**“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:

- ✓  $\alpha$  – спираль
- ✓  $\beta$ -складчатый лист ( $\beta$ -структура)
- ✓ петли
- ✓ повороты
- ✓ изгибы

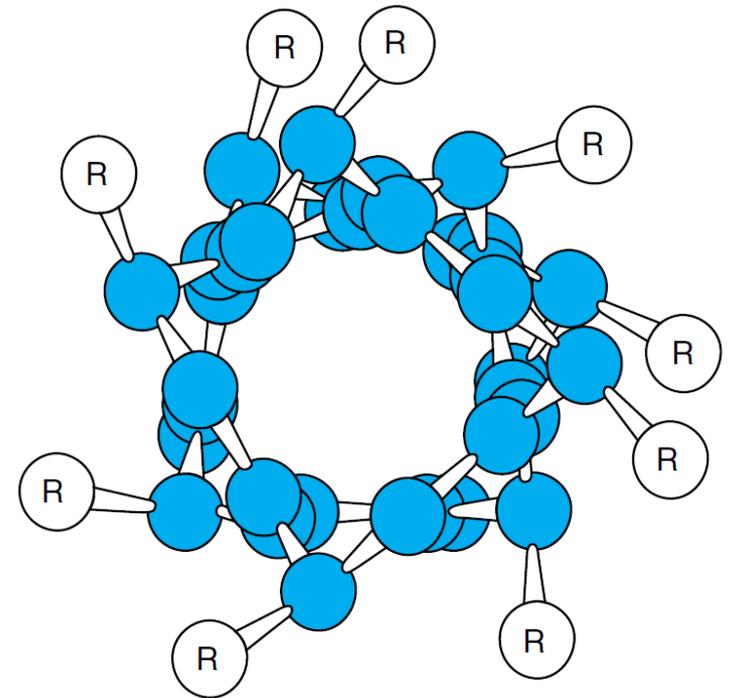
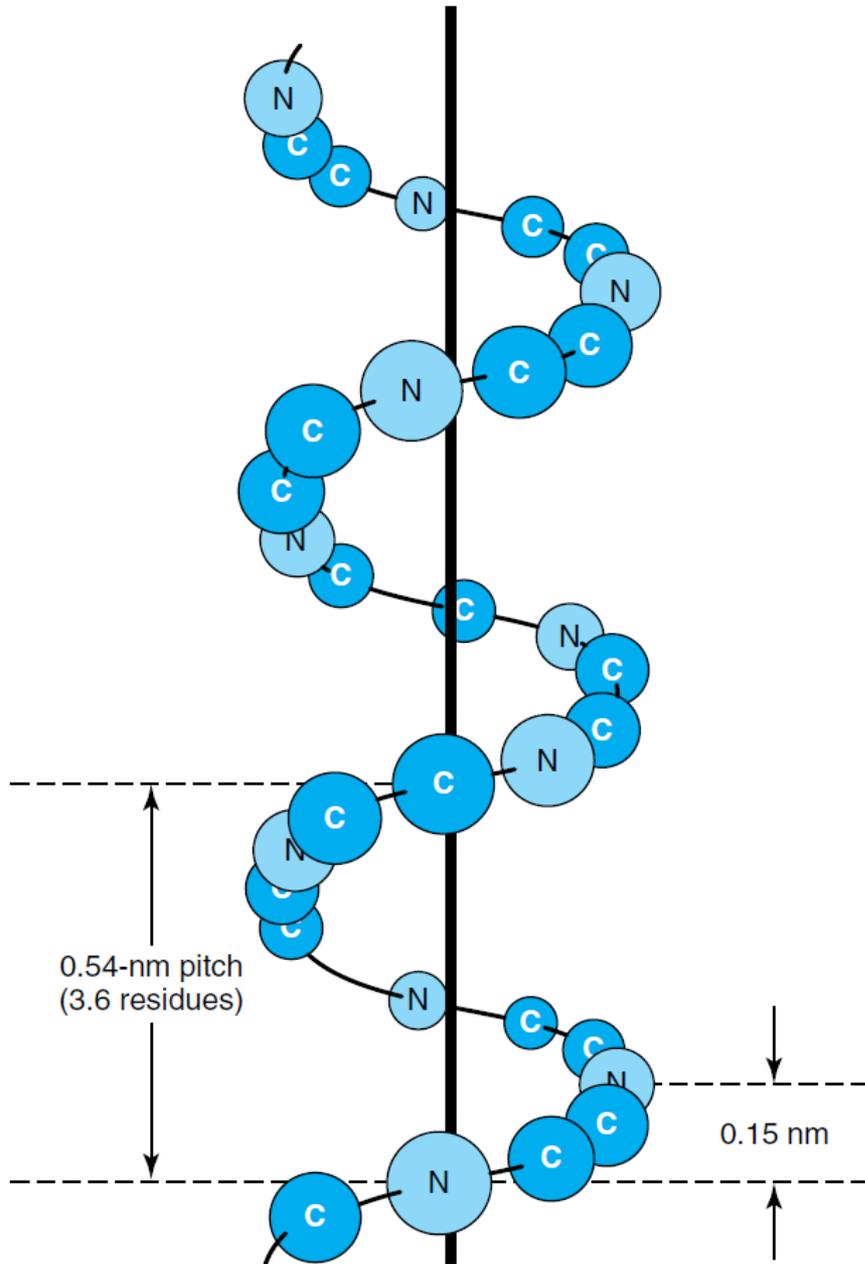
# Вторичная структура белка -

**$\alpha$  - спираль** - обусловленная разными углами поворота пептидных связей разных АК.

$\alpha\text{C} - \text{N}$  ( **$\varphi$**  [фи] угол -  **$57^\circ$** )

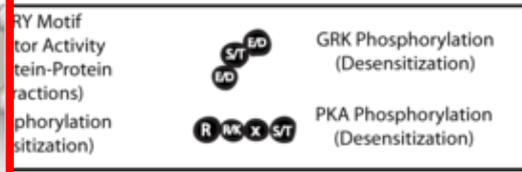
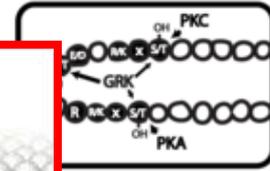
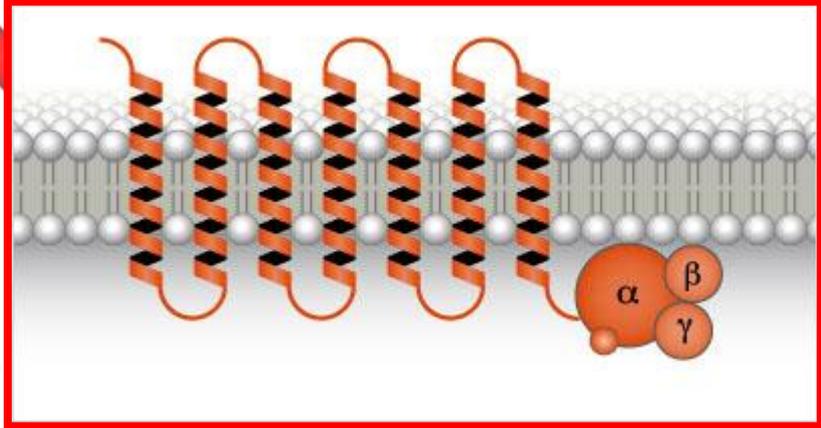
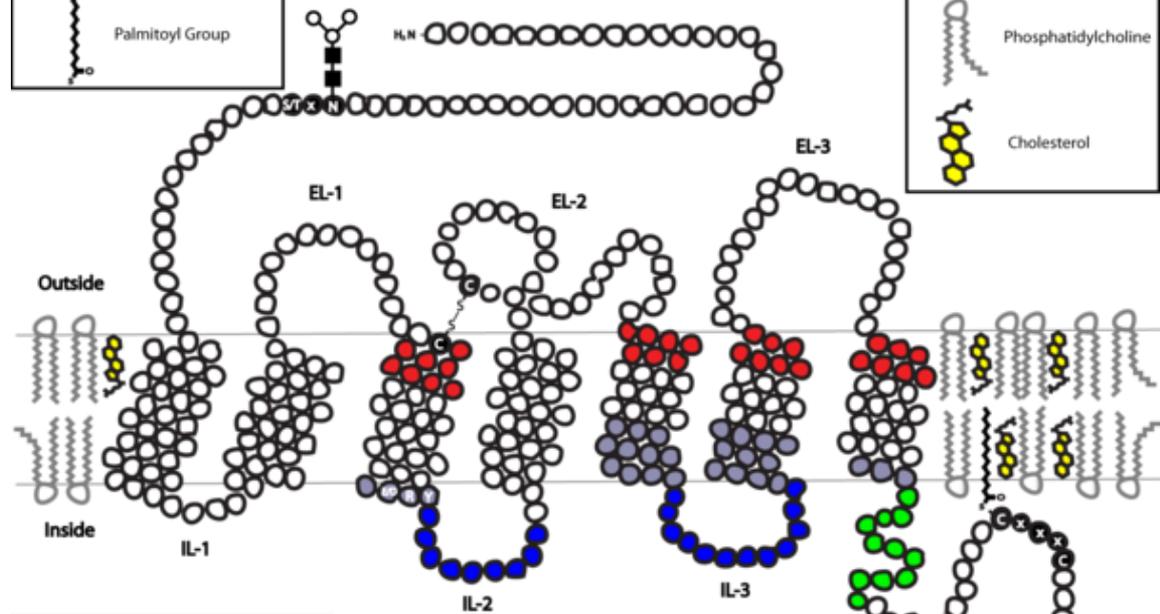
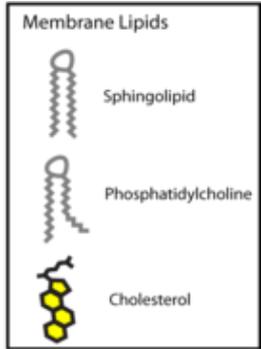
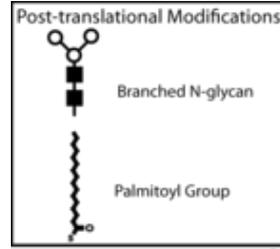
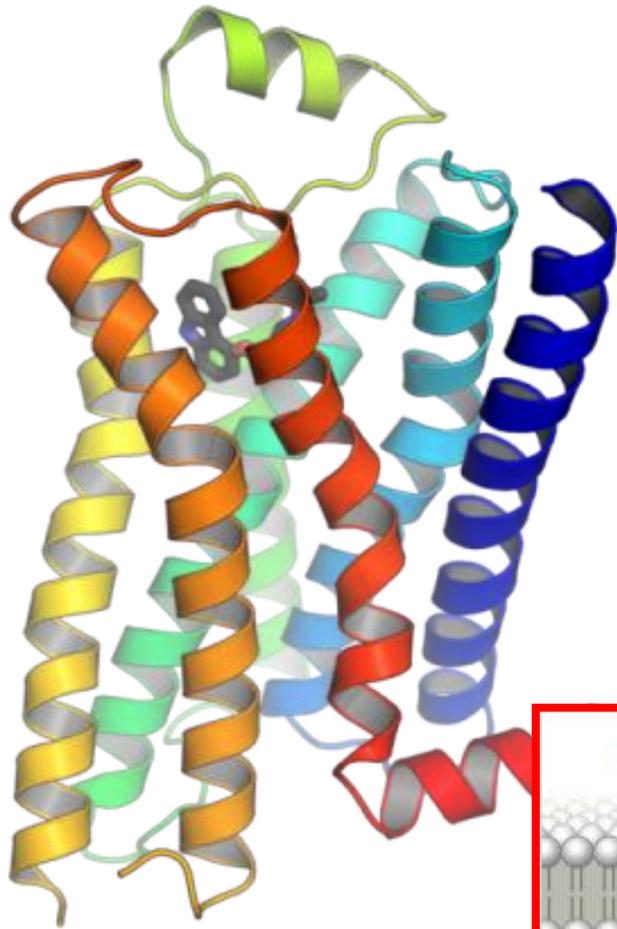
$\alpha\text{C} - \text{C}$  ( **$\psi$**  [пси] угол -  **$47^\circ$** )

# Структура α спирали



## Доля $\alpha$ спиралей в белках

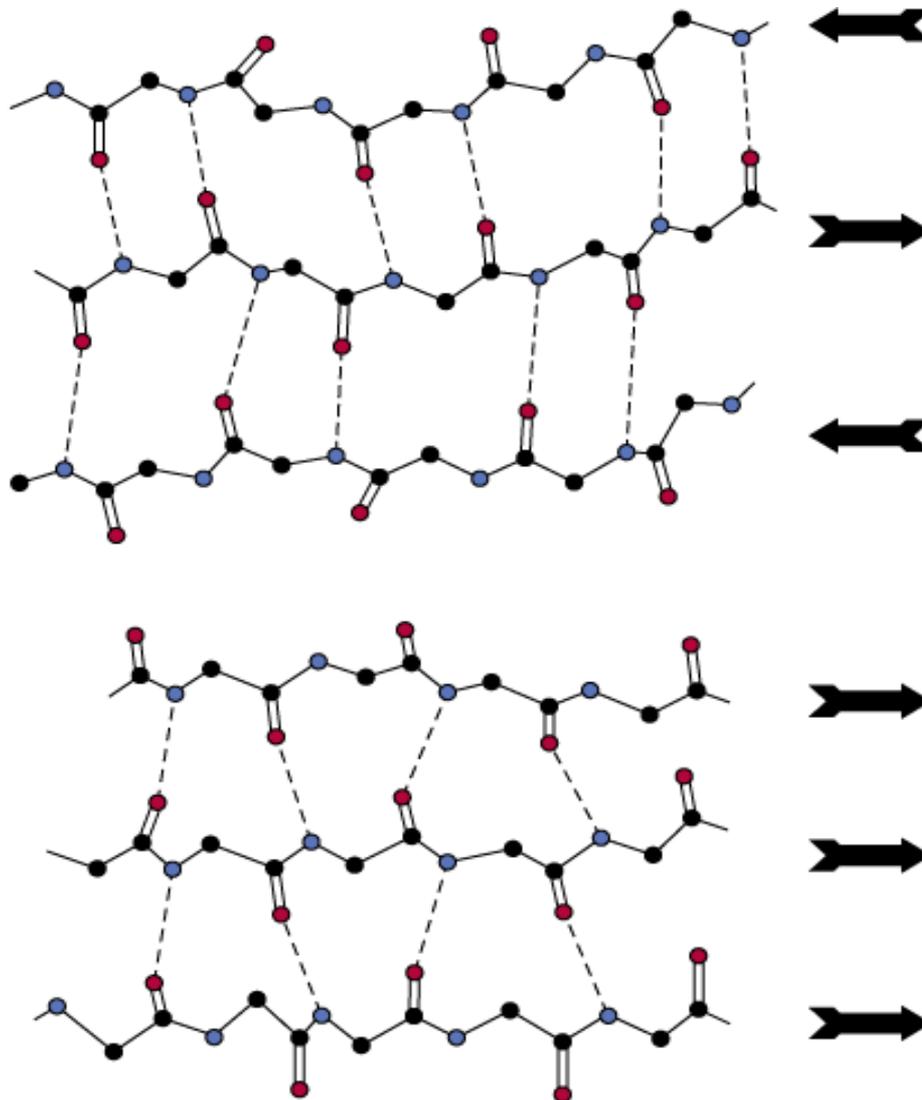
- ✓ **ГЕМОГЛОБИН – 80%**
- ✓ **ИНСУЛИН - 46-60%**
- ✓ **АЛЬБУМИН (яйца) – 30-45%**
- ✓ **ПЕПСИН - 20-30%**
- ✓ **КАЗЕИН - 10%**



Beta-2-adrenergic-receptor

GPCR in membrane. N 2012  
B Kobilka, R Lefkowitz

# $\beta$ -складчатый лист ( $\beta$ -структура)



# ПО НАЛИЧИЮ $\alpha$ -СПИРАЛЕЙ И $\beta$ -СТРУКТУР ГЛОБУЛЯРНЫЕ БЕЛКИ МОЖНО РАЗДЕЛИТЬ

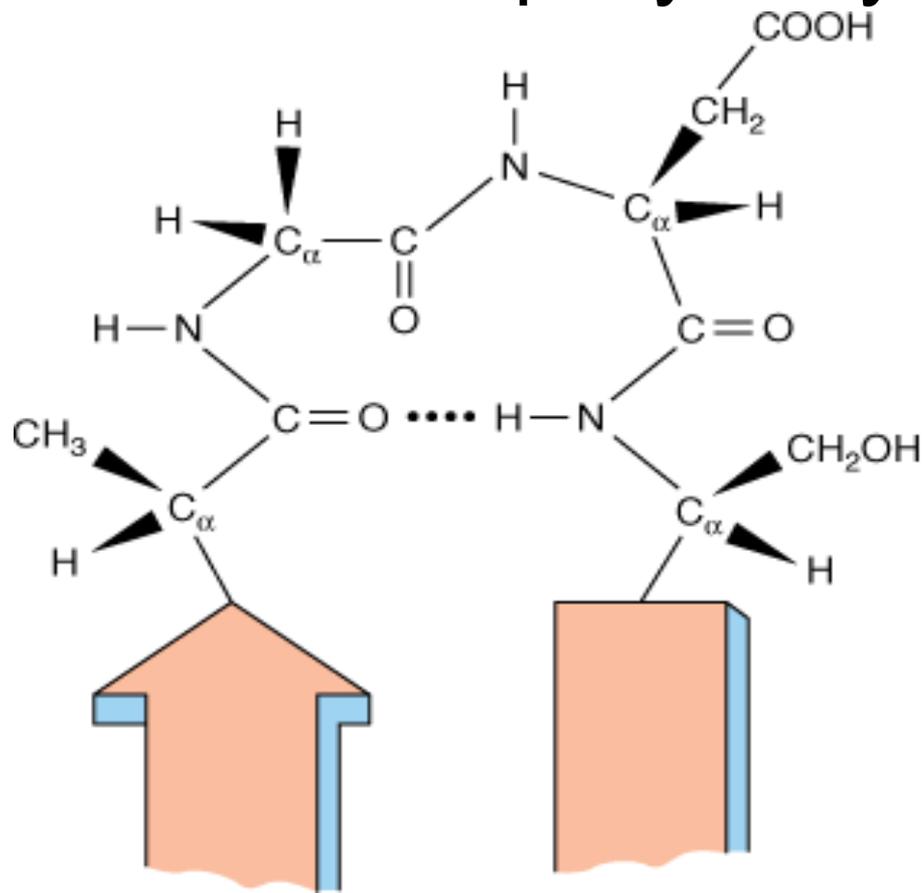
## НА 4 КАТЕГОРИИ:

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

**$\beta$  повороты** имеют 4 остатка АК.

Первый остаток имеет водородную связь с четвёртым ( $180^\circ$  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<sup>c</sup>** – prion related protein;

**208 (253) АК**

**PrP<sup>sc</sup>** – scrapie.

**Прионные болезни:**

**Губчатый энцефалит коров**

(**bovine spongiform encephalopathy**

(**mad cow disease**);

**Скрейпи (почесуха) овец;**

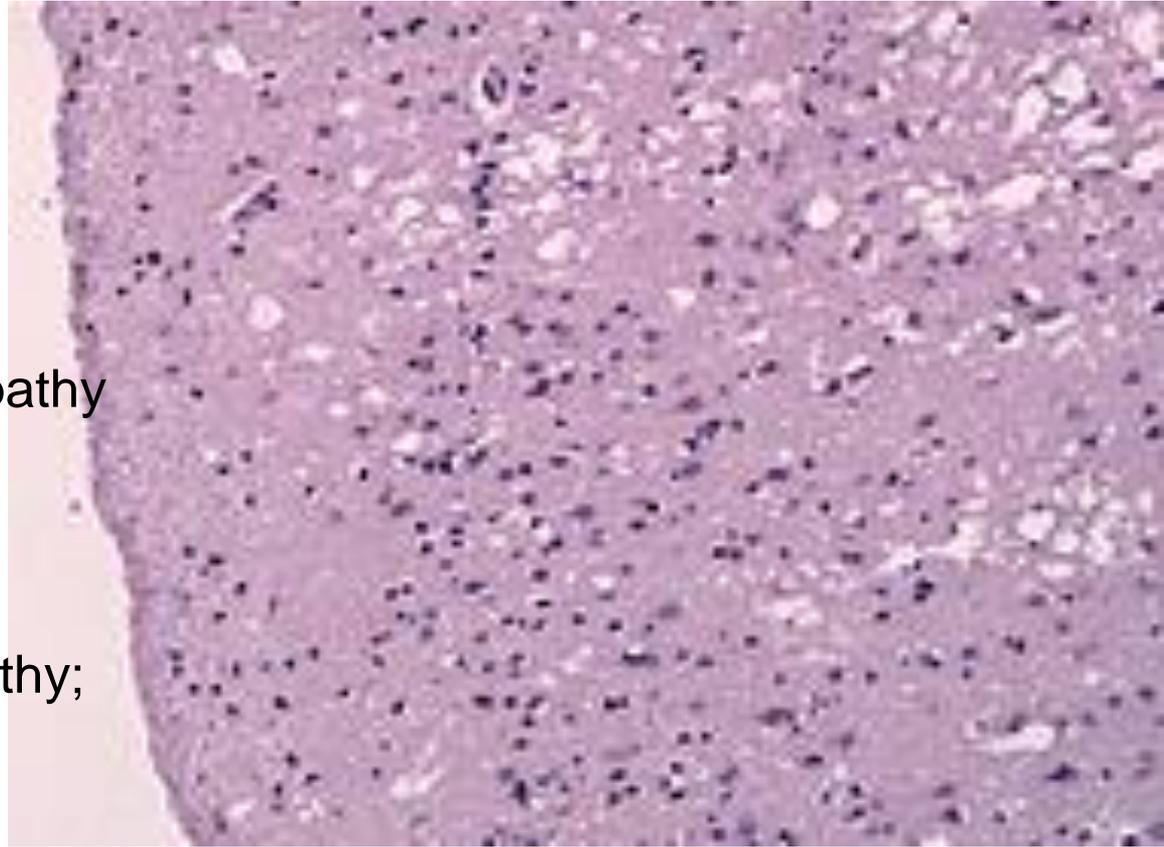
**Feline spongiform encephalopathy;**

**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, **Cu<sup>2+</sup>** 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<sup>C</sup>** enhanced cellular uptake of **Zn<sup>2+</sup>** via binding to the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (**AMPA**)-type **glutamate receptor**, and that **PrP<sup>C</sup>** acts as a **Zn<sup>2+</sup>** sensor in the synapse.

**PrP<sup>C</sup>** is implicated in **Zn** homeostasis.

**PrP** reportedly facilitates **Zn<sup>2+</sup>** influx into the brain and attenuates Zn-induced neurotoxicity.

**Sadakane Y. 2018**

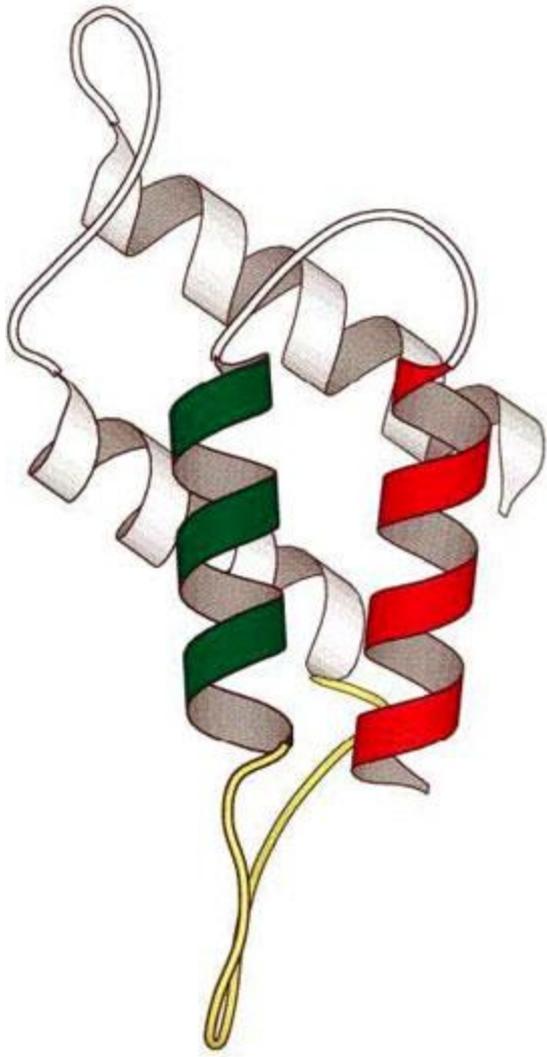
**Прионы** участвуют в формировании клеточных механизмов:

**PrP – долговременной памяти(2006)**

**PrP – обновлении стволовых клеток (2006)**

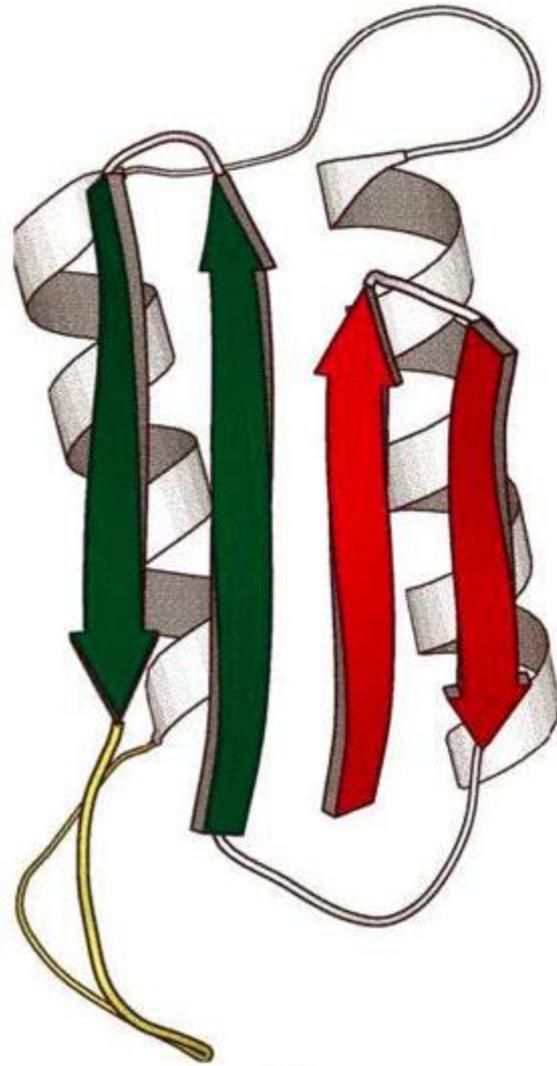
**PrP – восстановлении миелина периферических нервов (2010)**

**PrP – регулируют клеточную гибель (2018)**



(a)

**PrP<sup>c</sup>**



(b)

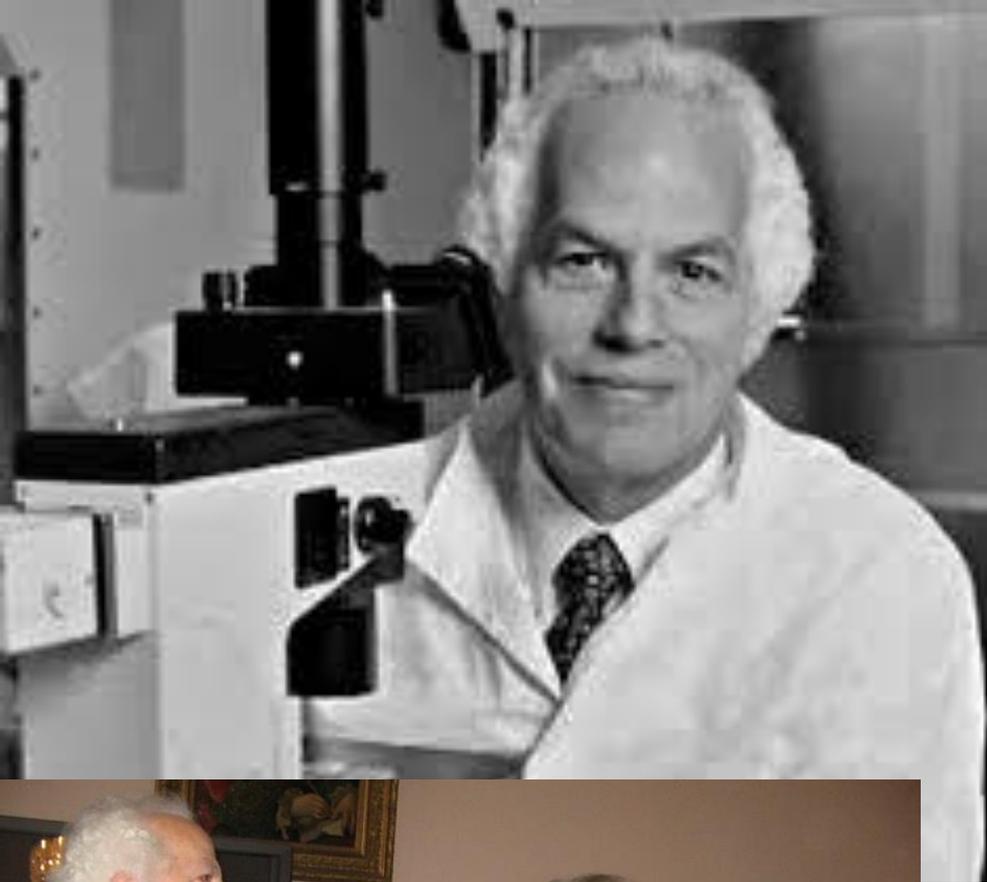
**PrP<sup>sc</sup>**



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.

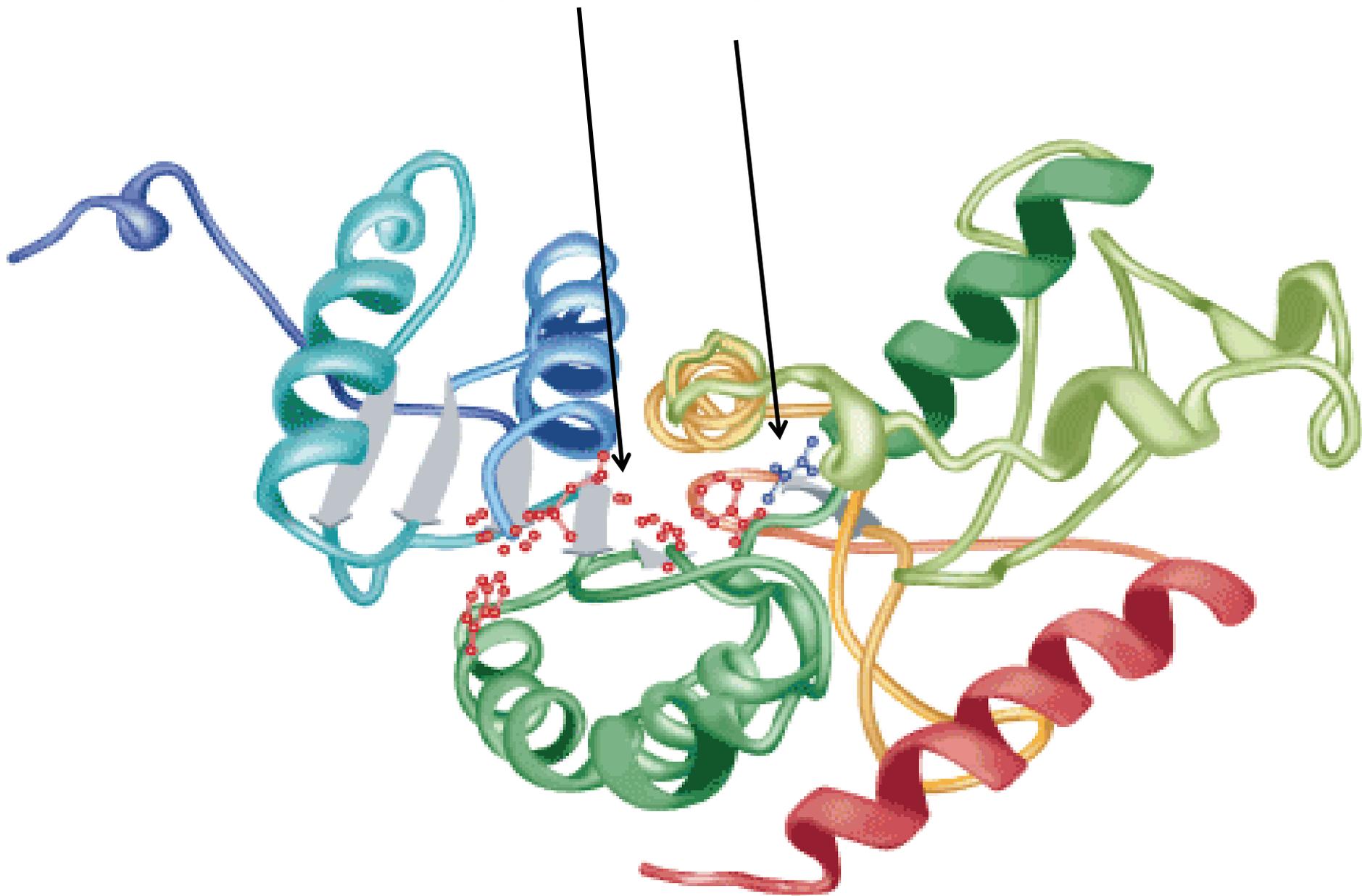
Относится ко всей трехмерной пространственной конформации полипептида.

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) –

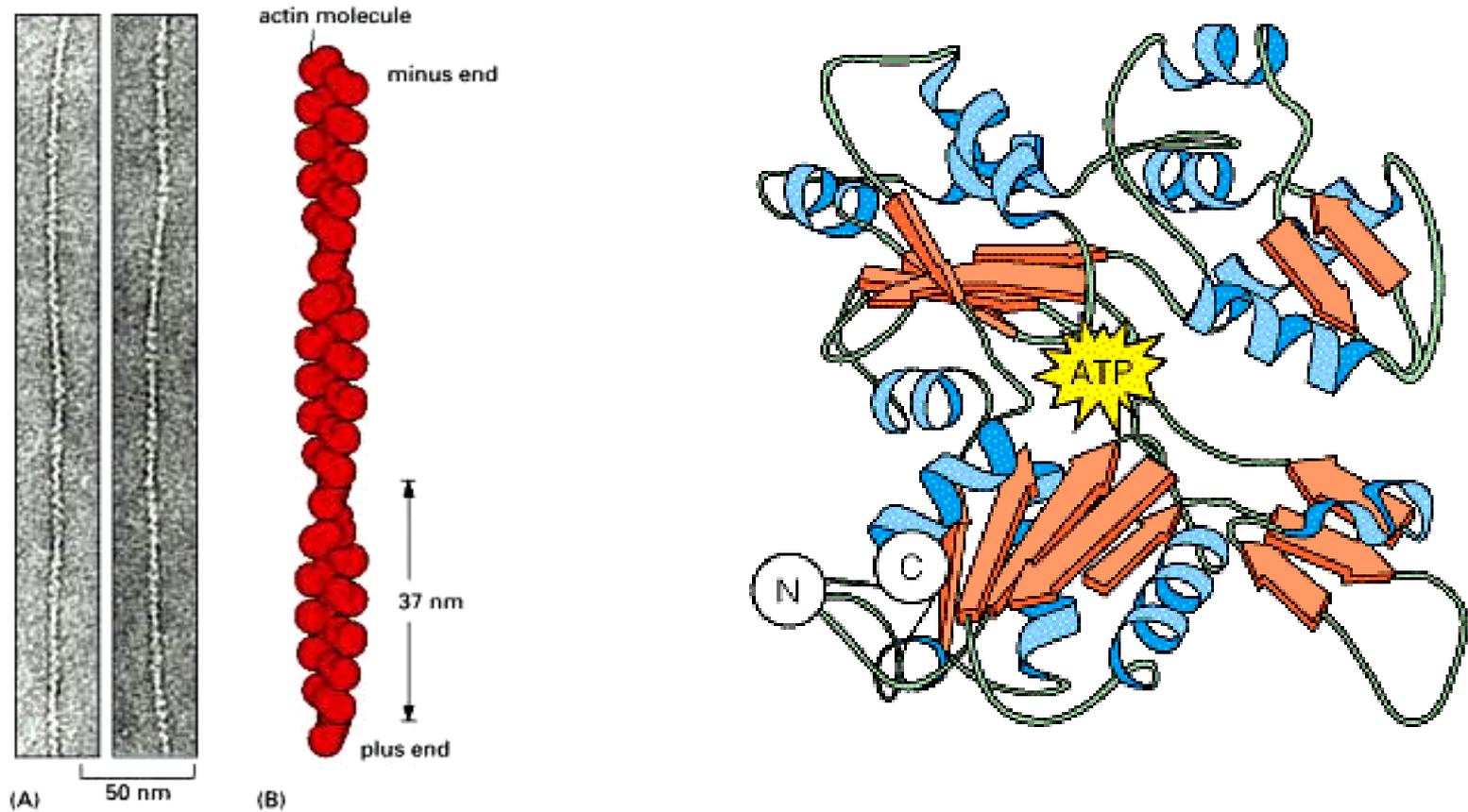
способ укладки в пространстве нескольких отдельных полипептидных цепей (**субъединиц**), при формировании **единого** в структурном и функциональном отношении макромолекулярного образования.

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

Actin

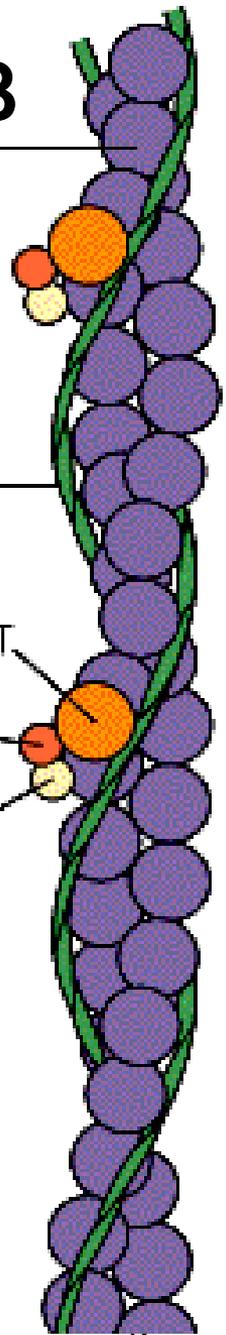
Tropomyosin

Troponin Complex

TnT

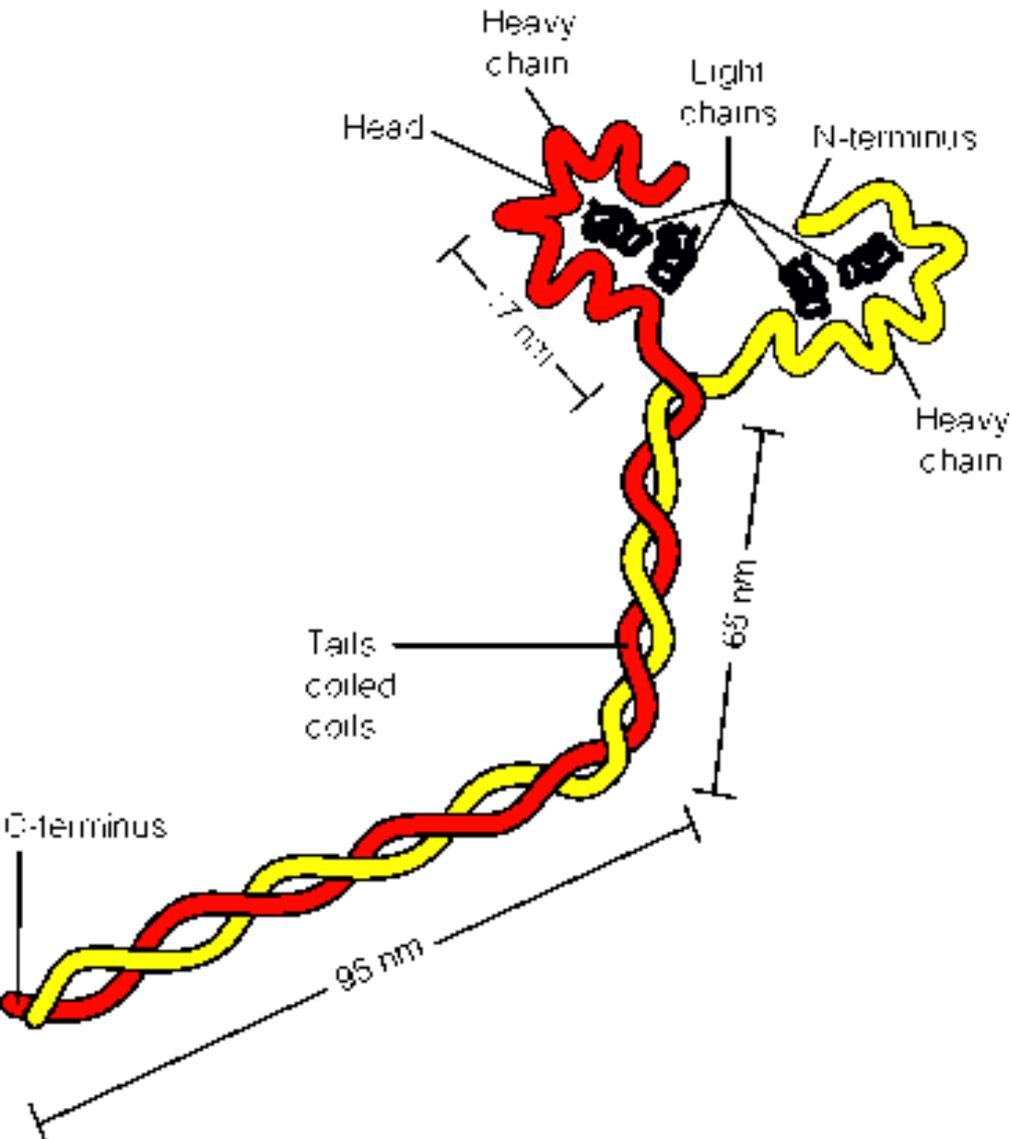
TnC

TnI



- 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 **Ca<sup>2+</sup>** присутствует в низкой концентрации до  $\sim 10^{-5}$  M.
  - В расслабленной мышце, **Ca<sup>2+</sup>**  $\sim 10^{-7}$  M

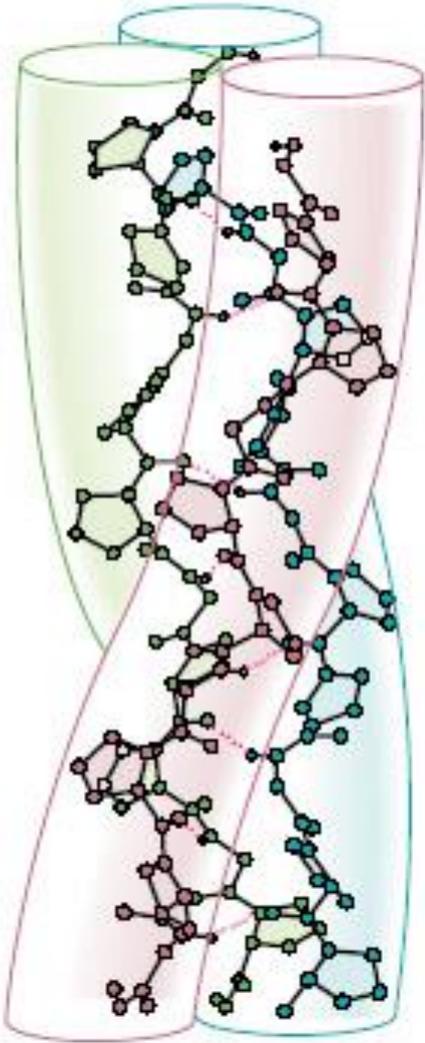
# МИОЗИН



- 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**

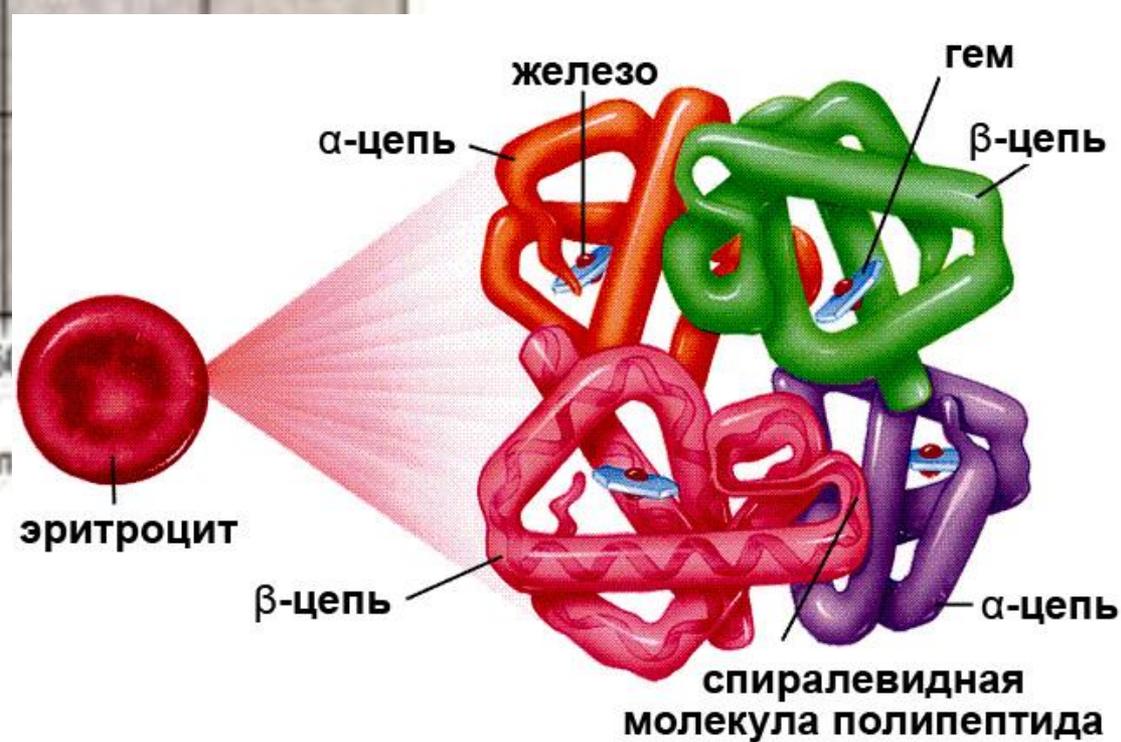
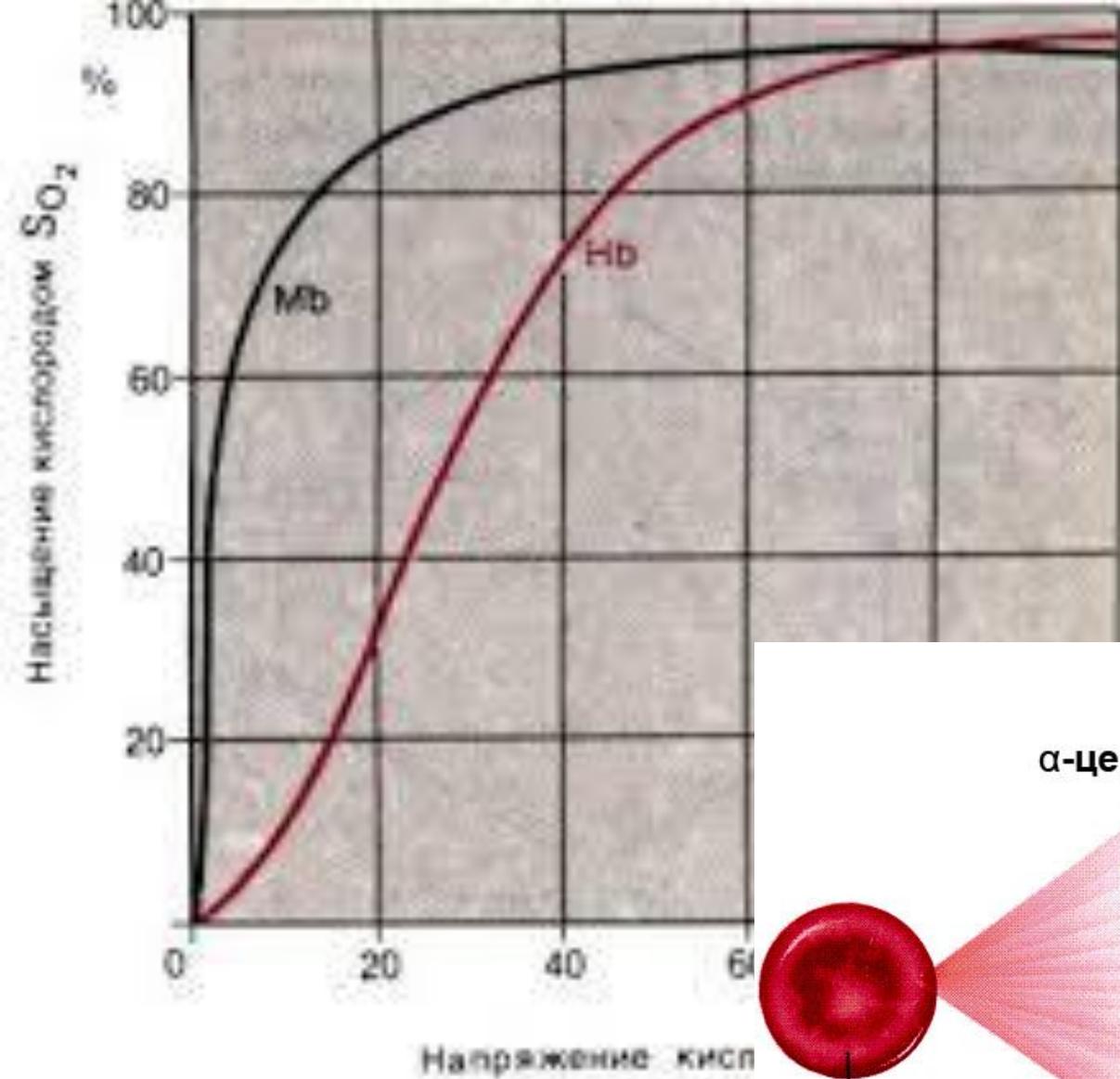
- Основная высокоупорядоченная структура представлена длинным и тонким палочковидным белком.



- **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**.

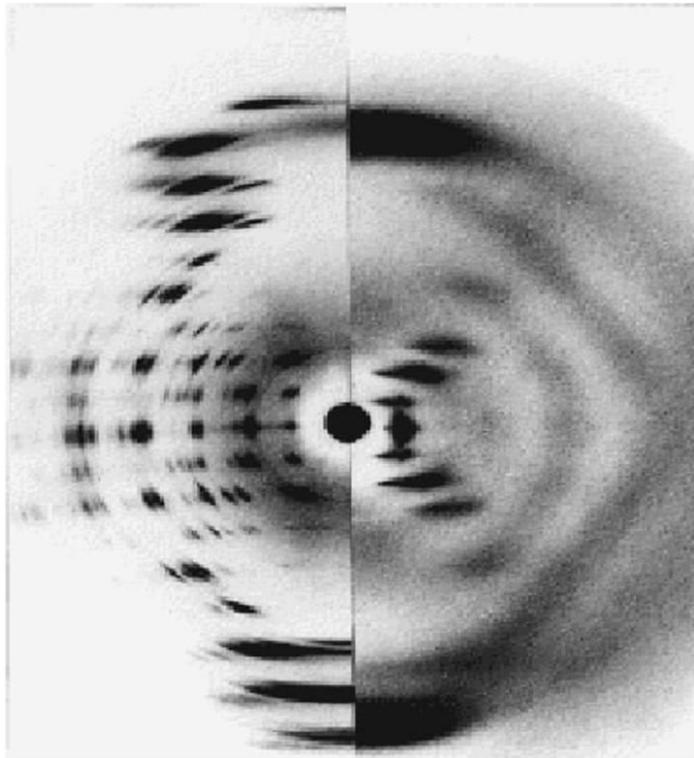
# Преимущества субъединичного строения белков:

- ✓ 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



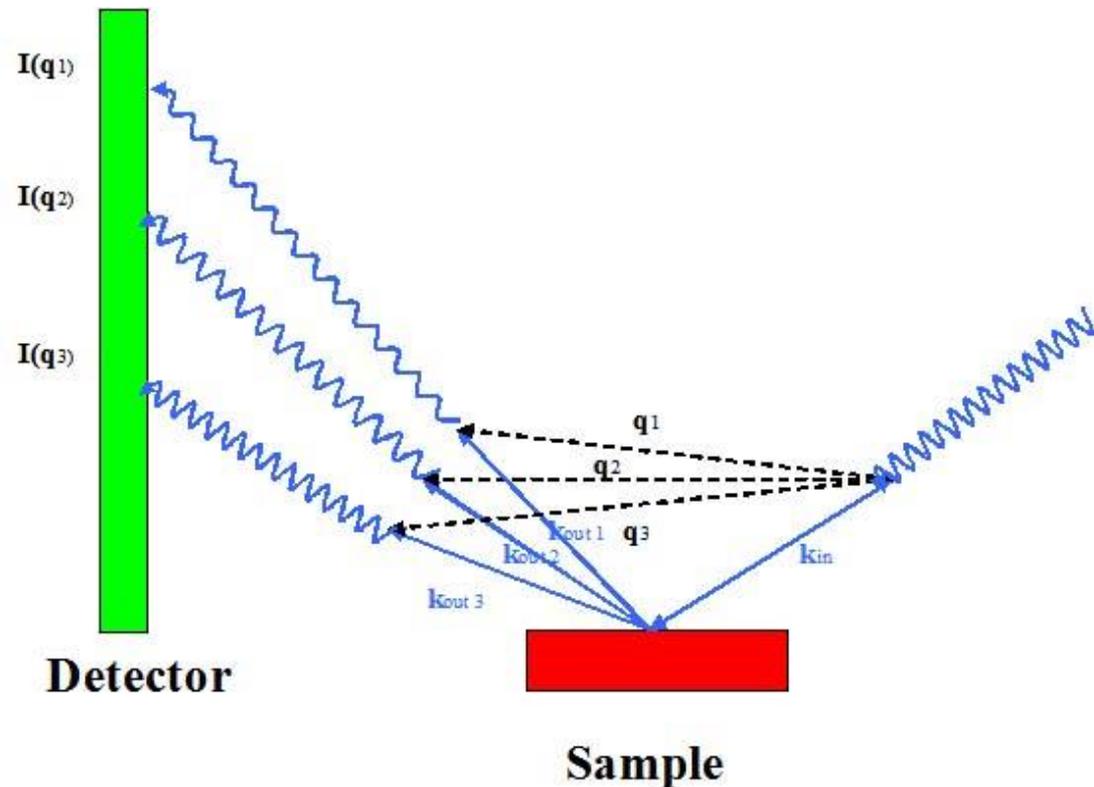
# Методы изучения трёхмерной структуры белка :

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

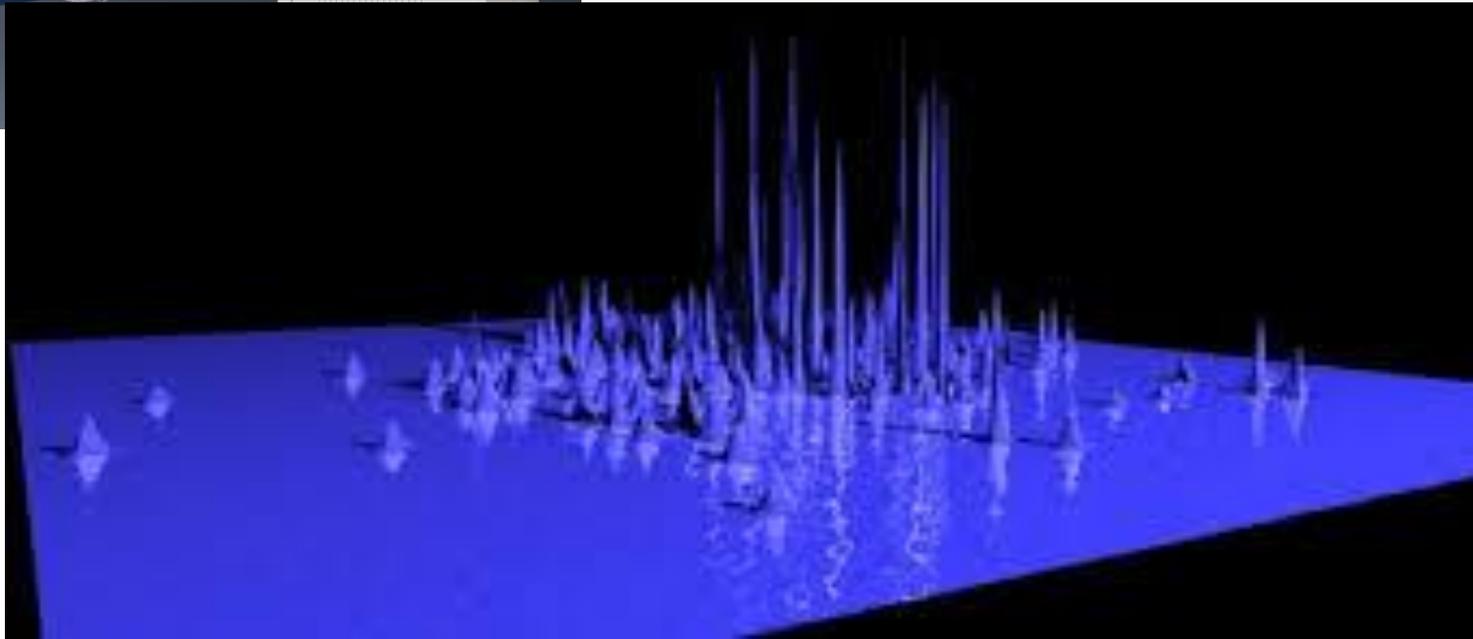


A-DNA

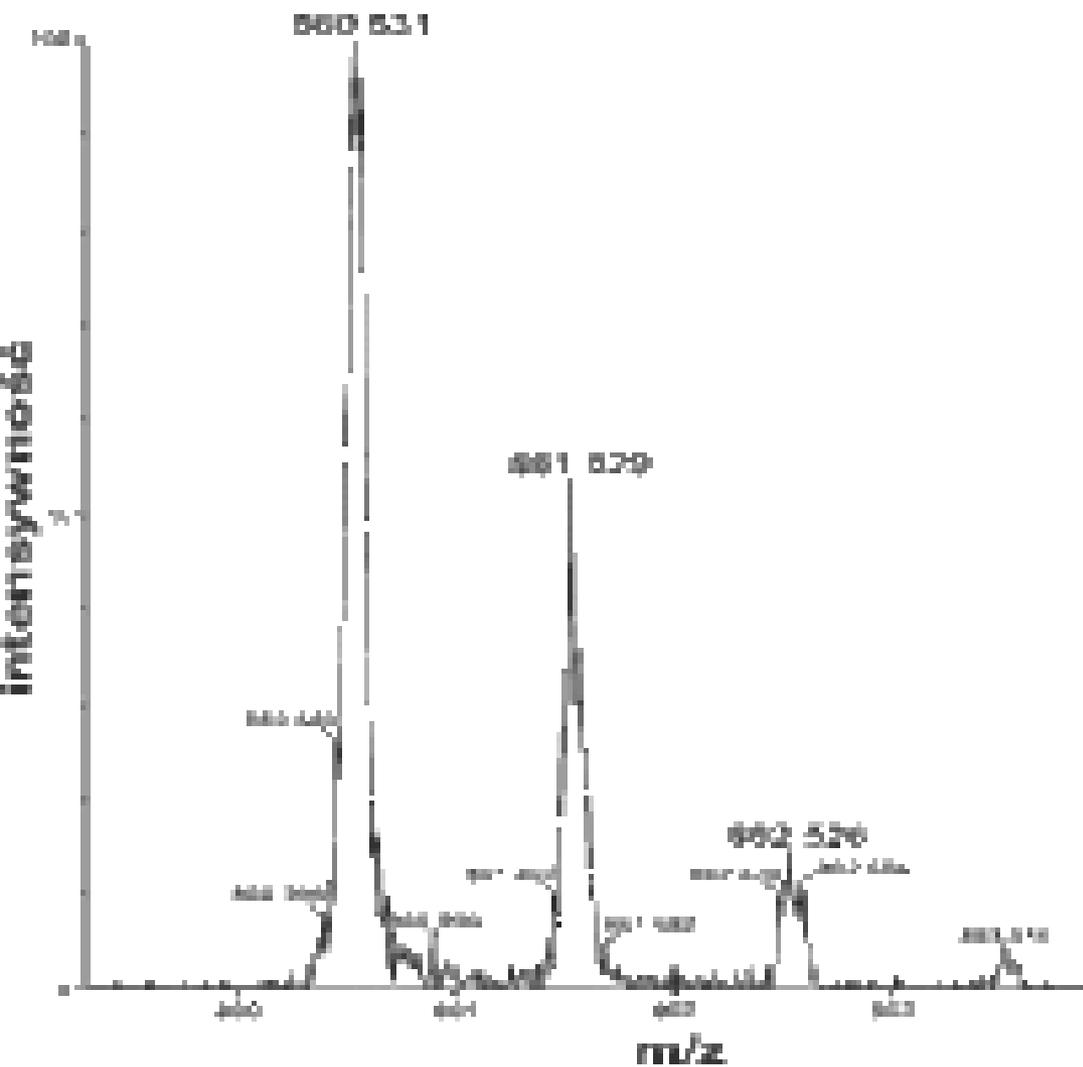
B-DNA



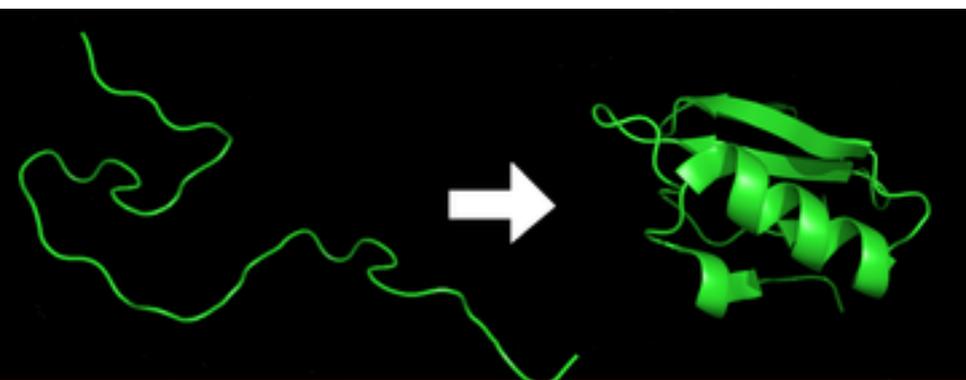
# ЯМР спектроскопия



# 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