

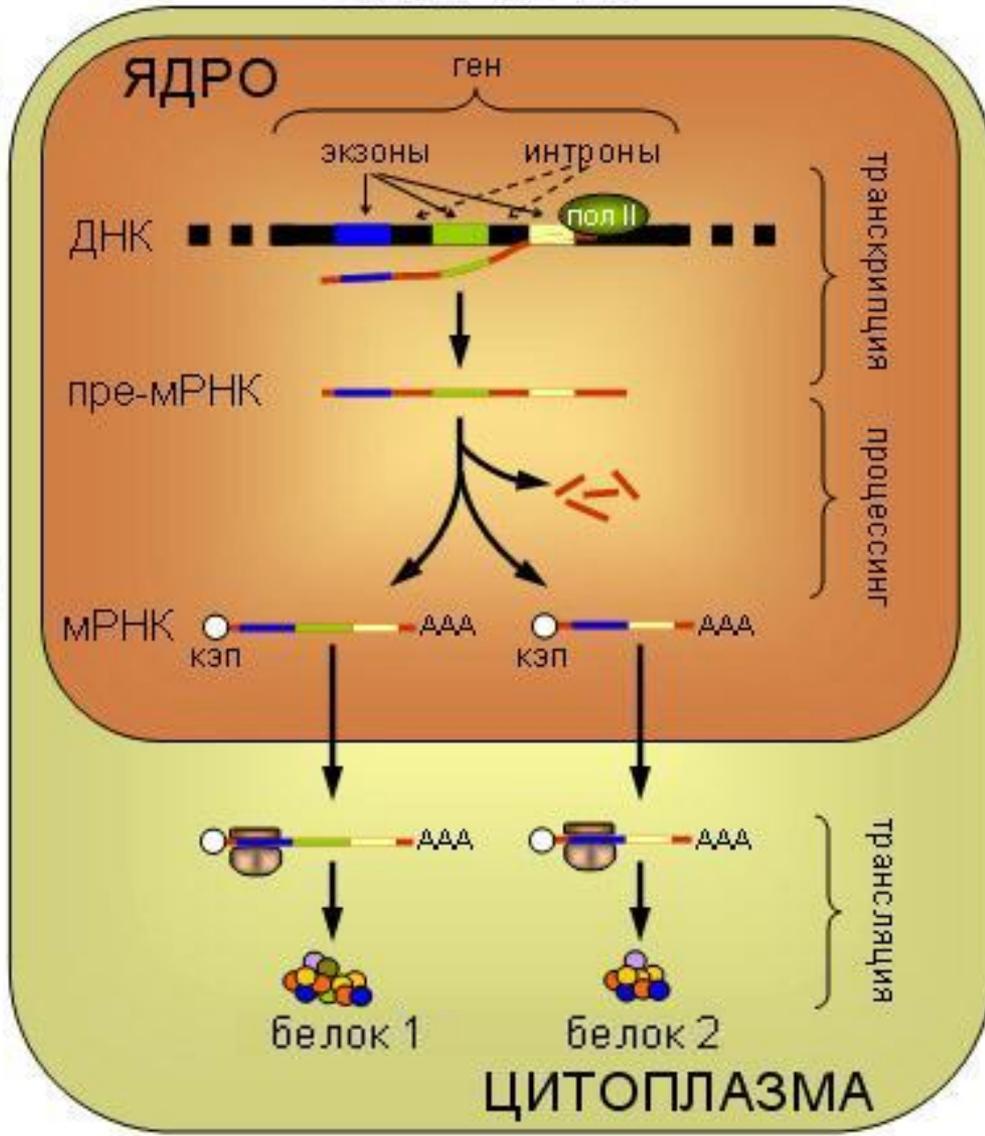
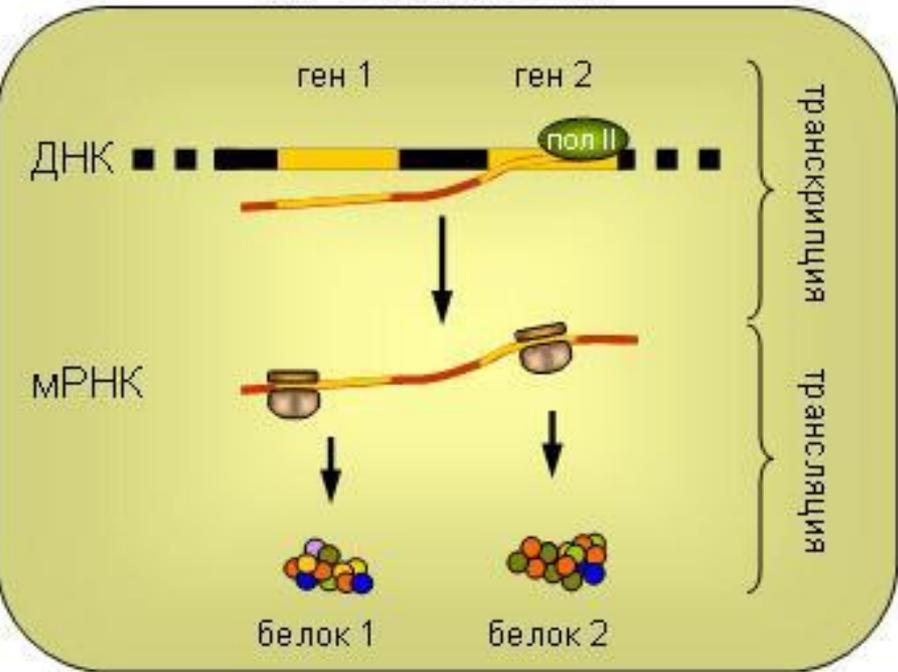
Кружок «Основы молекулярной генетики»

Х Х

- Классификация белков согласно их биологическим функциям.
- Белки-переносчики, сигнальные, защитные, структурные, рецепторные, регуляторные, ферменты.
- Понятие о прионных заболеваниях.
- Понятие о протеомике.

ПРОКАРИОТЫ

ЭУКАРИОТЫ

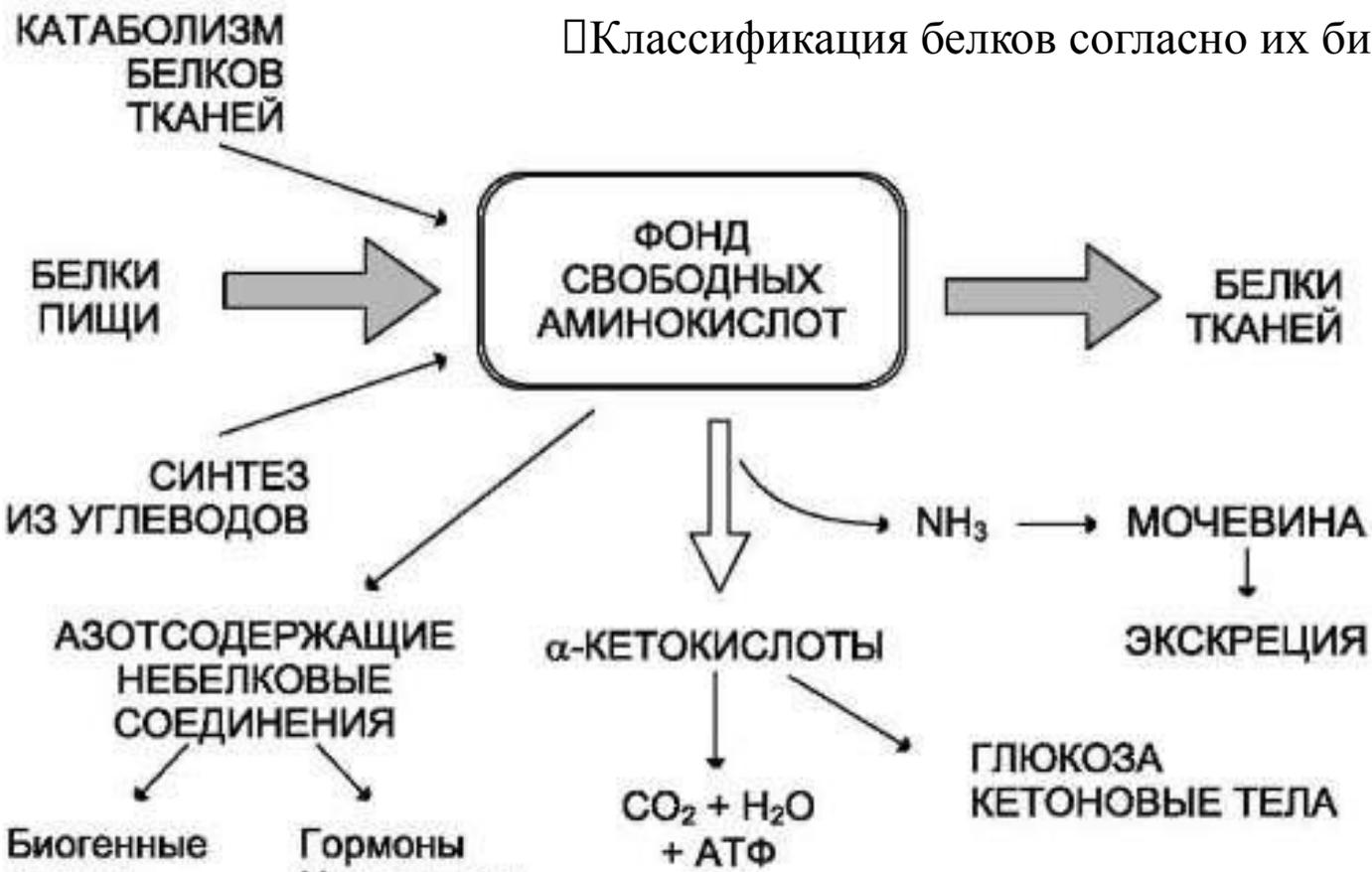


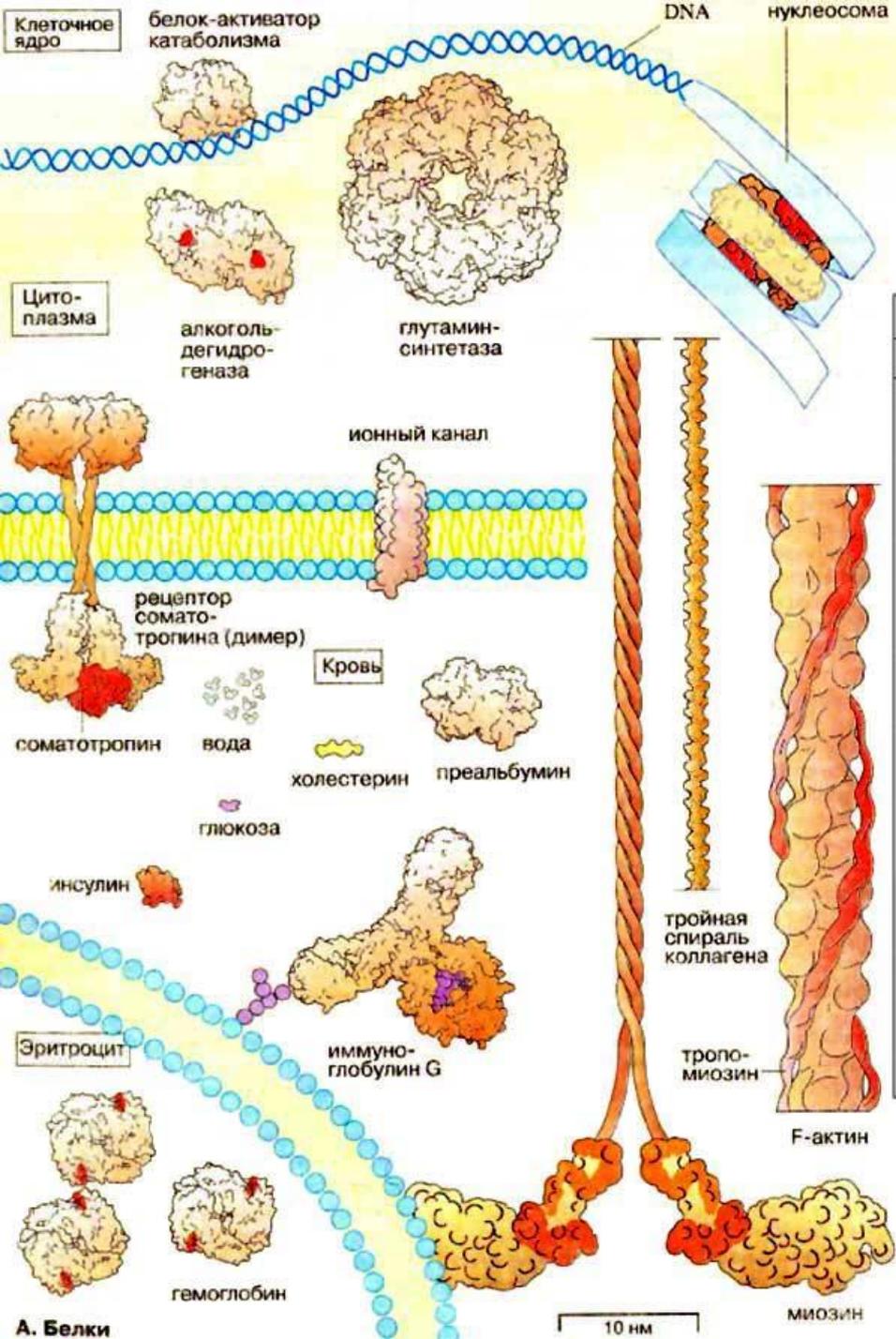
□Классификация белков согласно их биологическим функциям.

Аминокислоты

Заменимые	Незаменимые	
Глицин	Валин	
Аланин	Лейцин	
Цистеин	Изолейцин	
Глутаминовая кислота	Треонин	
Аспарагиновая кислота	Метионин	
Тирозин	Фенилаланин	
Пролин	Триптофан	
Серин	Лизин	
Аспарагин	Гистидин	Условно незаменимые
Глутамин	Аргинин	

□ Классификация белков согласно их биологическим функциям.





Классификация белков согласно их биологическим функциям.

Состав плазмы

Компонент	Содержание	Компонент	Содержание
1	2	1	2
Вода	900–910 г/л	Мочевая кислота	179–476 мкмоль/л
Белки	65–85 г/л	Креатинин	44–150 ммоль/л
Альбумины	38–50 г/л	Натрий	135–145 ммоль/л
α_1 -глобулины	1,4–3,0 г/л	Калий	3,3–4,9 ммоль/л
α_2 -глобулины	5,6–9,0 г/л	Кальций общий	2,23–2,57 ммоль/л
β -глобулины	5,4–9,0 г/л	Кальций свободный	1,15–1,27 ммоль/л
γ -глобулины	9,0–16,0 г/л	Магний	0,65–1,1 ммоль/л
Фибриноген	2,0–4,0 г/л	Хлориды	97–110 ммоль/л
Билирубин общий	3,4–22 ммоль/л	Железо общее	9,0–31,0 ммоль/л
Липиды	2,0–4,0 г/л	Медь общая	11,0–24,3 ммоль/л
ЛПОНП	0,8–1,5 г/л	Гидрокарбонат	23,0–33,0 ммоль/л
ЛППП	0,2–0,75 г/л	Фосфат	0,8–1,2 ммоль/л
ЛПНП	3,2–4,5 г/л	Сульфат	0,4–0,6 ммоль/л
ЛПВП	2,7–4,3 г/л	Аммиак	19,0–43,0 ммоль/л
Триглицериды натощак	< 2,85 ммоль/л	Остаточный азот	14–28 ммоль/л
Глюкоза	3,6–6,5 ммоль/л		

ЛПОНП — липопротеиды очень низкой плотности;
 ЛППП — липопротеиды промежуточной плотности;
 ЛПНП — липопротеиды низкой плотности;
 ЛПВП — липопротеиды высокой плотности.

□Классификация белков согласно их биологическим функциям.

Важнейшие транспортные белки плазмы крови

Белок	Лиганд
1	2
Альбумин	Жирные кислоты, билирубин, гем, тироксин, кортизол, тестостерон
Аполипопротеины	Триглицериды, фосфолипиды, холестерол
Гаптоглобин	Гемоглобин, поступающий в плазму из разрушенных эритроцитов
Трансферрин	Железо
Церулоплазмин	Медь
Преальбумин	Тироксин, витамин А
Транскортин	Кортизол
Транскобаламин II	Кобаламин (витамин В ₁₂)
Связывающий ретинол белок	Ретинол
Витамин D-связывающий α-глобулин	Витамин D
Гемопексин	Свободный гем из разрушенных эритроцитов

□ Классификация белков согласно их биологическим функциям.

Ферментативная (каталитическая) функция

Понятие о ферментах

- **Ферменты – белковые катализаторы химических реакций в живом организме**
- состоят из L- α -аминокислот, соединенных пептидными связями
- имеют 4 уровня организации молекул
- характерна конформационная лабильность
- при денатурации теряют активность
- синтезируются как белковые молекулы
- ❖ И.П. Павлов: переваривающая способность желудочного сока зависит от количества белка в нем (отсюда следует, что пепсин – белок)

Высокая эффективность ферментативного катализа



- самопроизвольно ($E_a = 70$ кДж/моль)
- при участии железа ($E_a = 42$ кДж/моль), скорость реакции увеличивается в 10^3 раз
- в присутствии каталазы ($E_a = 7$ кДж/моль), скорость реакции увеличивается в 10^{10} раз

Структура фермента: активный центр

- **Активный центр фермента (АЦ)** – это участок молекулы фермента, способный комплементарно (специфически) связываться с субстратом и обеспечивать его каталитическое превращение
 - Формируется на уровне III структуры белка
 - У простых ферментов состоит только из аминокислотных остатков
 - У сложных ферментов имеет кофактор (кофермент)
 - **Участок связывания активного центра** обеспечивает сродство к субстрату и формирование фермент-субстратного комплекса (ES), например, за счет ионных взаимодействий
 - **Каталитический участок активного центра** осуществляет химическую реакцию

Схема строения активного центра

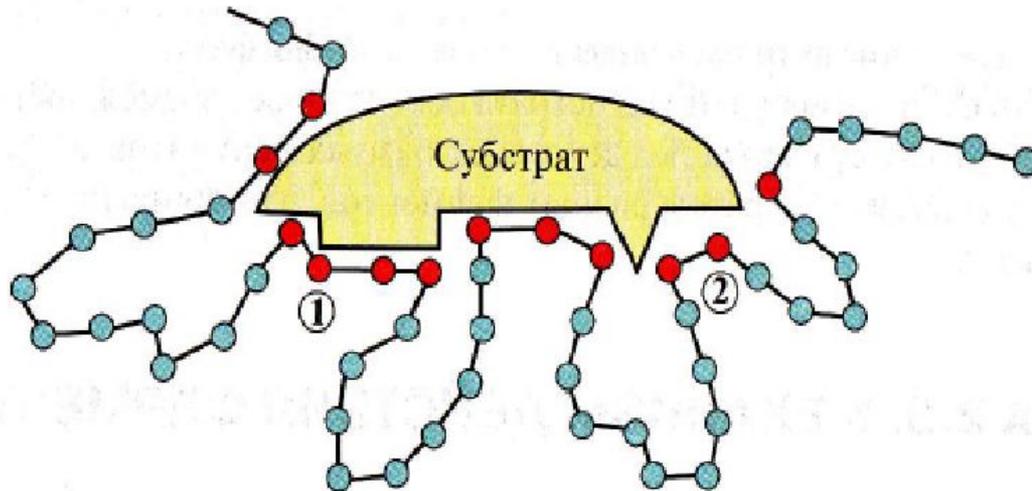


Схема строения активного центра фермента.

Красным цветом отмечены аминокислоты, образующие активный центр фермента: 1 — участок связывания; 2 — каталитический участок

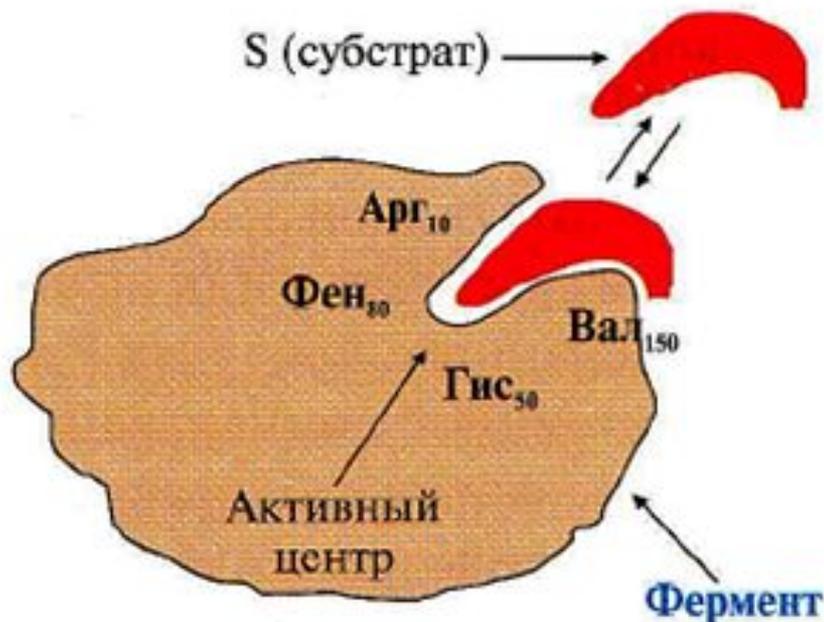
Субстрат (S) – вещество, вступающее в ферментативную реакцию

Субстрат комплементарен АЦ фермента («ключ-замок»)

Продукт (P) – вещество, которое образуется в процессе реакции

Продукт не имеет сродства к активному центру фермента

Связывание субстрата в активном центре фермента



Связывание субстрата в активном центре фермента

Арг₁₀, Фен₈₀, Гис₅₀, Вал₁₅₀ — аминокислотные остатки, радикалы которых принимают участие в формировании активного центра фермента

Итак, высокая каталитическая эффективность ферментов обусловлена

- **Высокой специфичностью связывания АЦ фермента и субстрата** и образованием ES-комплекса
- **Конформационной лабильностью ферментов,** которая является основой их высокой специфичности

Специфичность ферментов

- **Каталитическая (реакционная) специфичность** – способность фермента катализировать одну химическую реакцию или один тип реакций
- **Исключение:** лиазы, в одном направлении, катализируют негидролитическое расщепление субстрата, а в другом – присоединение простой молекулы по кратной связи

Специфичность ферментов

- **Субстратная специфичность** – способность фермента взаимодействовать с одним (**абсолютная**) или несколькими субстратами со сходным строением и типом связей (**относительная, групповая**)
 - абсолютная субстратная специфичность
уреаза: гидролиз мочевины
аргиназа: гидролиз аргинина
 - относительная субстратная специфичность
пищеварительные ферменты
 - стереоспецифичность
лактатдегидрогеназа: окисление только L-лактата

Сложные ферменты

Белок (**апофермент**) + кофактор (кофермент) → активный фермент (**холофермент**)

- апофермент – не активен
- большинство природных ферментов – сложные белки-протеиды
- **кофактор** – небелковая часть сложного фермента (лат. «вместе делающий»)

Кофакторы

- **По химической природе:**

- неорганические вещества (ионы металлов)
- органические вещества (производные витаминов) - *коферменты*

- **По виду химической связи:**

- **слабые взаимодействия** (присутствуют в активном центре фермента только в момент реакции, являясь косубстратом)
- **ковалентная связь** (*простетическая группа*)

- **Роль кофактора:**

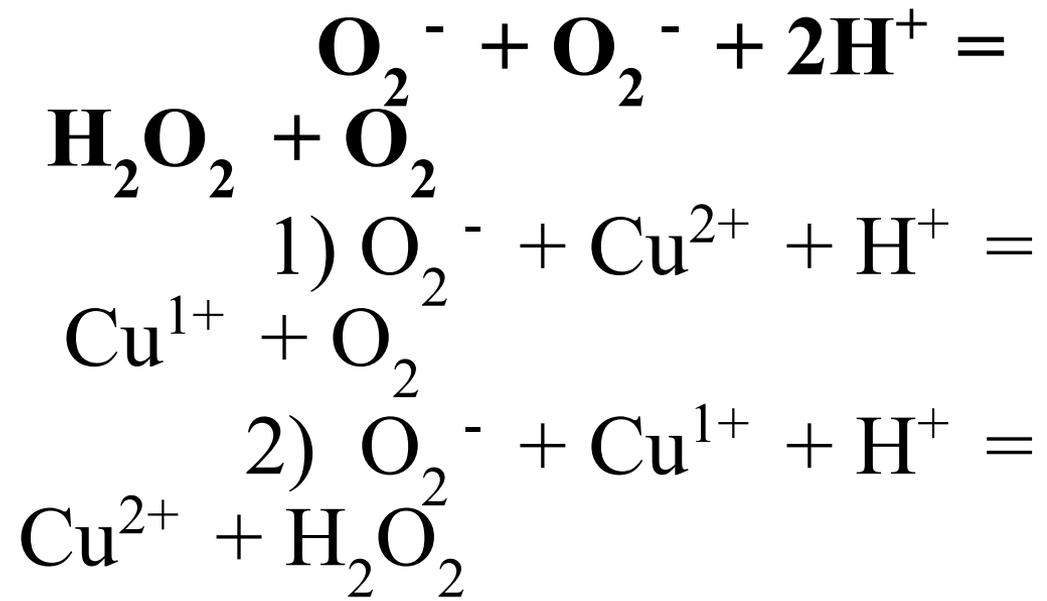
- изменение конформации фермента, субстрата
- непосредственное участие в реакции

Кофакторы – ионы металлов: способы участия в ферментативном катализе

- Изменяют конформацию субстрата (Mg^{2+} - АТФ)
- Стабилизируют конформацию апофермента (Zn^{2+} стабилизирует IV структуру алкогольдегидрогеназы)
- Участвует в катализе (ионы железа, меди участвуют в переносе электронов)

Cu, Zn-супероксиддисмутаза (СОД)

- Zn необходим для стабилизации молекулы
- Cu – активный участник в реакции дисмутации супероксид-аниона:



Коферменты, обратимо связанные с апоферментом

- NAD^+ , NADP^+ – кофермент оксидоредуктаз (анаэробных дегидрогеназ), источник синтеза – никотиновая кислота (vit PP, или B_3)
- *HS-CoA (кофермент A)* - кофермент ацетил-, ацилтрансфераз, некоторых лигаз, источник синтеза – пантотеновая кислота (vit B_5)
- *тетрагидрофолат (H_4 -фолат)* - кофермент трансфераз - переносчиков C1-фрагментов, источник синтеза – фолиевая кислота (vit B_9)

Кинетика ферментативного катализа: условия протекания ферментативных реакций

- Активность фермента, или скорость ферментативной реакции определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени
 - активность фермента (1МЕ) = мкмоль (S или P) / мин
 - 1 кат = 6×10^7 МЕ
 - уд. активность фермента = мкмоль (S или P) / (мин • мг белка)

Факторы, определяющие активность фермента (скорость реакции)

- Количество фермента
- **Количество субстрата**
- Количество продукта (для аллостерических ферментов)
- Концентрация кофактора (для сложных ферментов)
- **Присутствие активаторов или ингибиторов**
- **Температура**
- **pH среды**

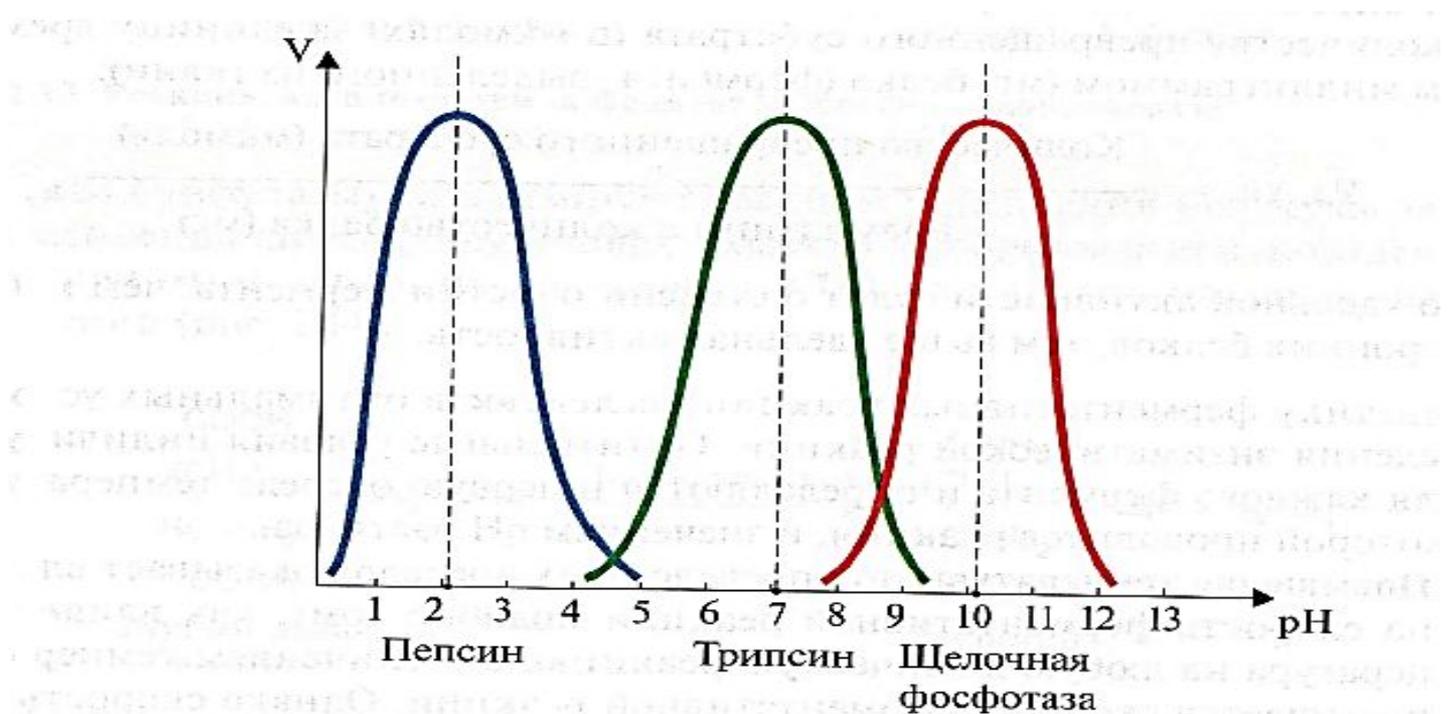
Скорость реакции и температура



Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от температуры

Влияние температуры обусловлено броуновским движением молекул (от нуля до 40 °C) и денатурацией белка (выше 40° C)

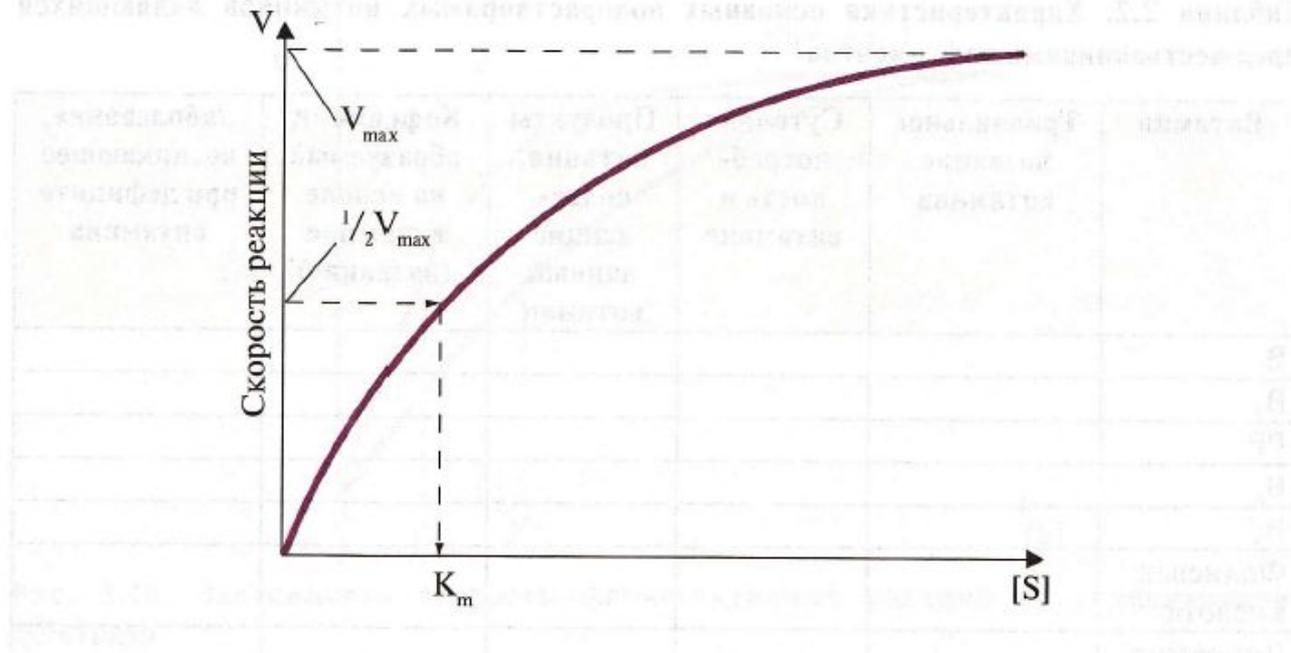
Скорость реакции и рН



Зависимость скорости ферментативной реакции (V) от рН среды

Влияние рН обусловлено изменением ионизации функциональных групп активного центра фермента и субстрата, а также денатурацией фермента при значительных изменениях рН

Скорость реакции и концентрация субстрата



Зависимость скорости реакции (V) от концентрации субстрата S:

V_{max} — максимальная скорость реакции при данной концентрации фермента в оптимальных условиях проведения реакции; K_m — константа Михаэлиса

Константа Михаэлиса (концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна 1/2 от максимальной). Характеризует сродство фермента к субстрату (чем меньше значение, тем выше сродство). Является величиной постоянной.

Скорость реакции и концентрация субстрата

- Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата описывает уравнение Михаэлиса и Ментен:

$$V = V_{\max} \cdot [S] / [S] + K_m$$

Отсюда,

$$[S] = K_m \cdot V / V_{\max} - V$$

Активаторы ферментов

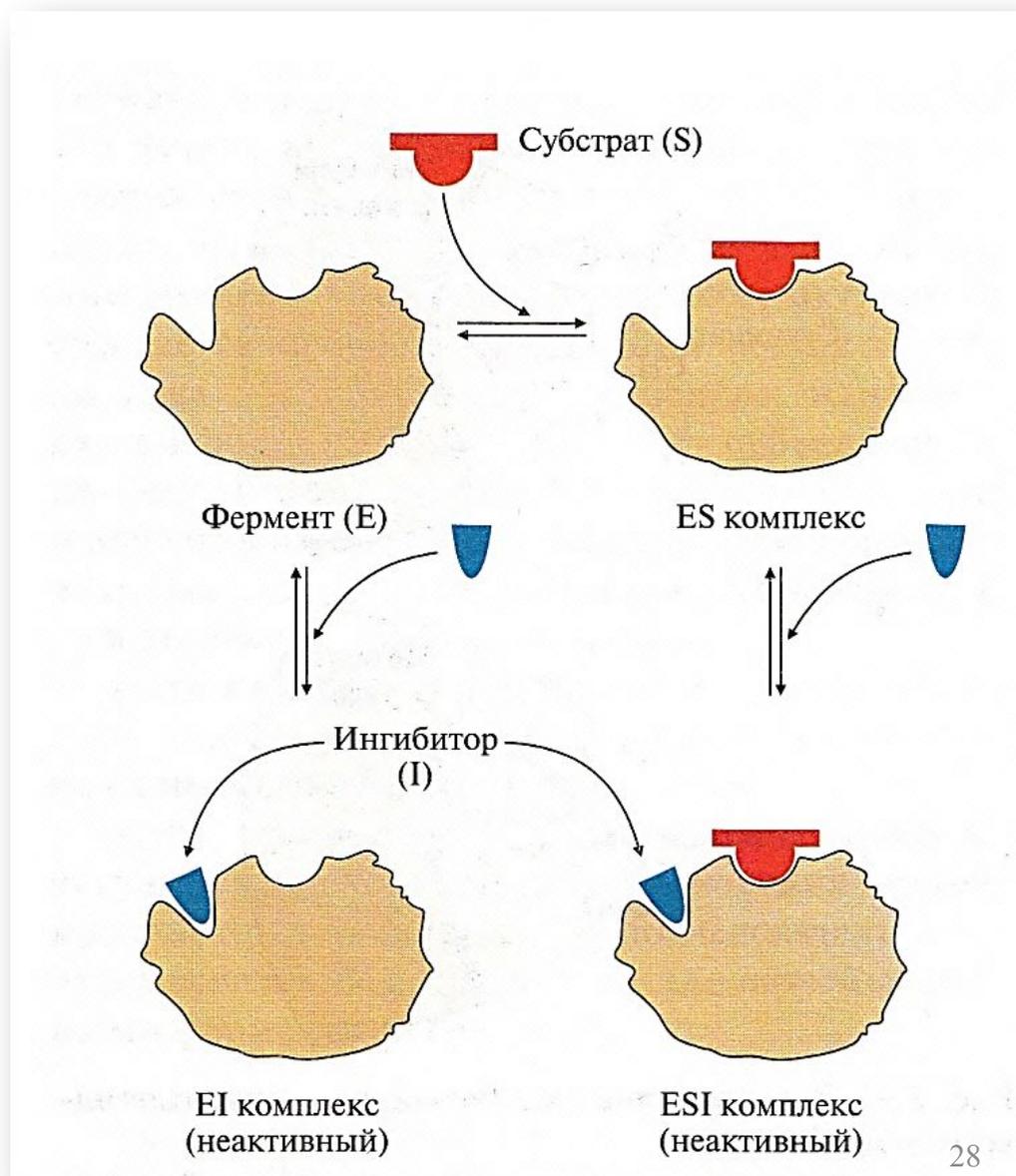
- **Активаторы – вещества, повышающие каталитическую активность ферментов**
- Часто активаторами являются микро-, макроэлементы
- **Активаторы не являются кофакторами** Известно, что в присутствии хлорид-ионов активность амилазы слюны значительно возрастает, а в отсутствии катионов кальция не проявляется. Какую роль в проявлении активности фермента играют кальций и хлор?

Ингибиторы ферментов

- **Ингибиторы – вещества, снижающие каталитическую активность фермента**
- **По типу химической связи:**
 - обратимые (слабые связи)
 - необратимые (ковалентная связь)
- **По механизму действия:**
 - конкурентные
 - неконкурентные

Неконкурентное ингибирование

- Ингибитор связывается не с активным центром
- Образуется комплекс ESI
- Ингибитор изменяет конформацию фермента и активного центра
- Снижают V_{max}
- Не изменяют K_m



Регуляция активности ферментов – основа регуляции метаболических путей

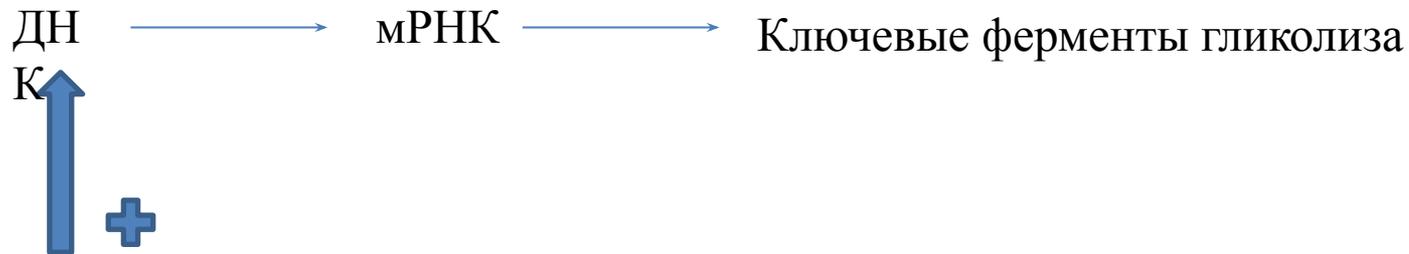
Способы регуляции активности ферментов:

- Изменение количества фермента (индукция или репрессия синтеза)
- Изменение каталитической активности фермента вследствие изменения его конформации

Ферменты, активность которых регулируется при участии гормонов или каких-либо метаболитов, называются регуляторными, или ключевыми. С помощью ключевых ферментов регулируется скорость метаболических процессов.

Изменение количества фермента

Регуляция на уровне транскрипции: индукция синтеза



Инсулин

Инсулин индуцирует синтез ключевых ферментов гликолиза (окисления глюкозы).

Активация гликолиза в клетках приводит к снижению уровня глюкозы в крови.

Конститутивные ферменты – ферменты, которые синтезируются постоянно, независимо от наличия субстрата

Индукцибельные (адаптивные) ферменты – ферменты, которые синтезируются только при наличии субстрата

ПРИМЕР: алкогольдегидрогеназа

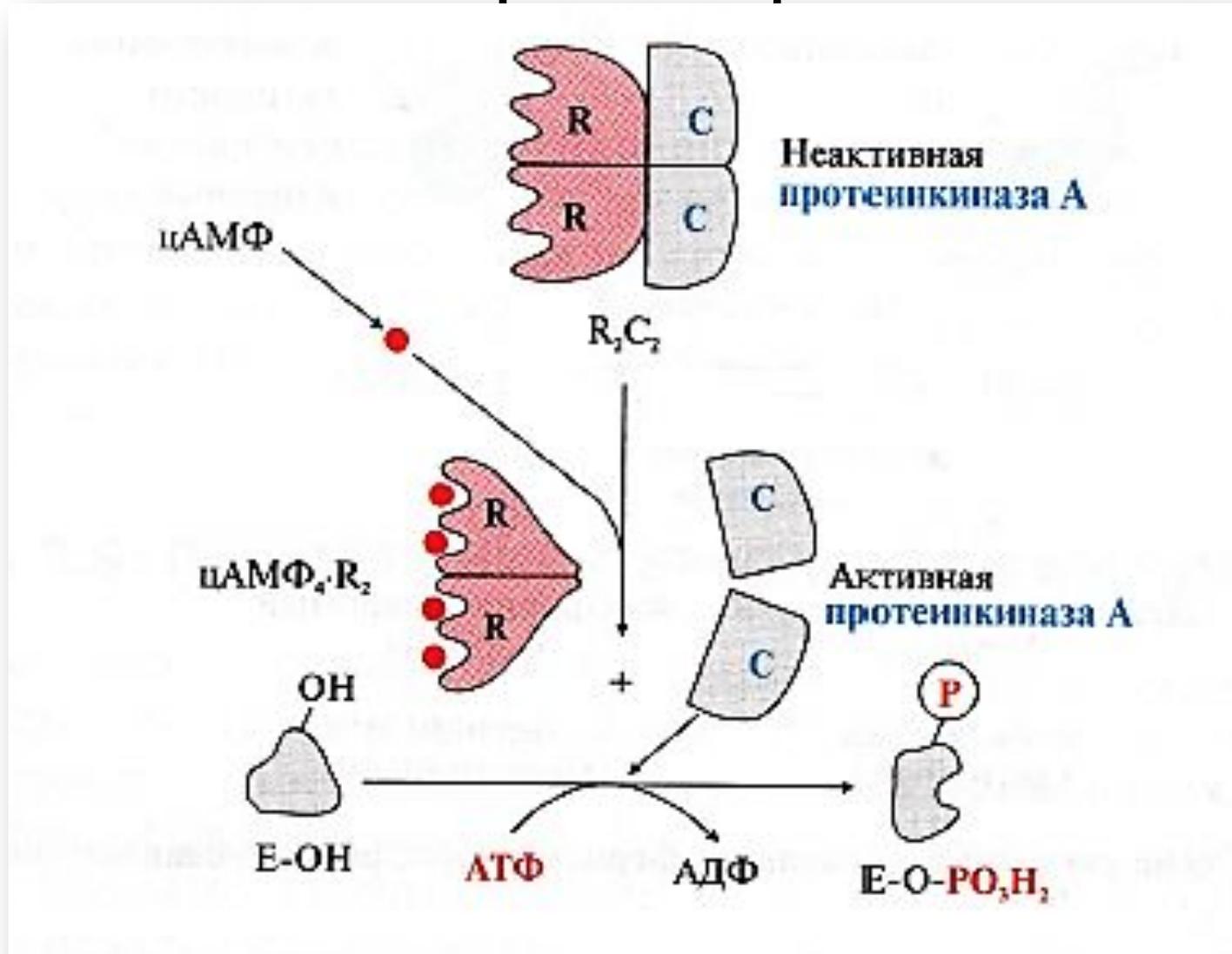
Механизмы регуляция каталитической активности ферментов

- ❑ Взаимодействие с белком-активатором**
- ❑ Ассоциация и диссоциация протомеров**
- ❑ Фосфорилирование и дефосфорилирование**
 - ❑ Частичный протеолиз**
 - ❑ Аллостерическая регуляция**

Взаимодействие с белком-активатором

- Фермент переваривания пищевого жира в тонком кишечнике – *панкреатическая липаза* – активируется путем присоединения белка-фермента *колипазы*
- Мембранный фермент *аденилатциклаза*, участвующий в передаче сигнала гормонов в клетку, активируется путем взаимодействия с альфа-субъединицей G-белка

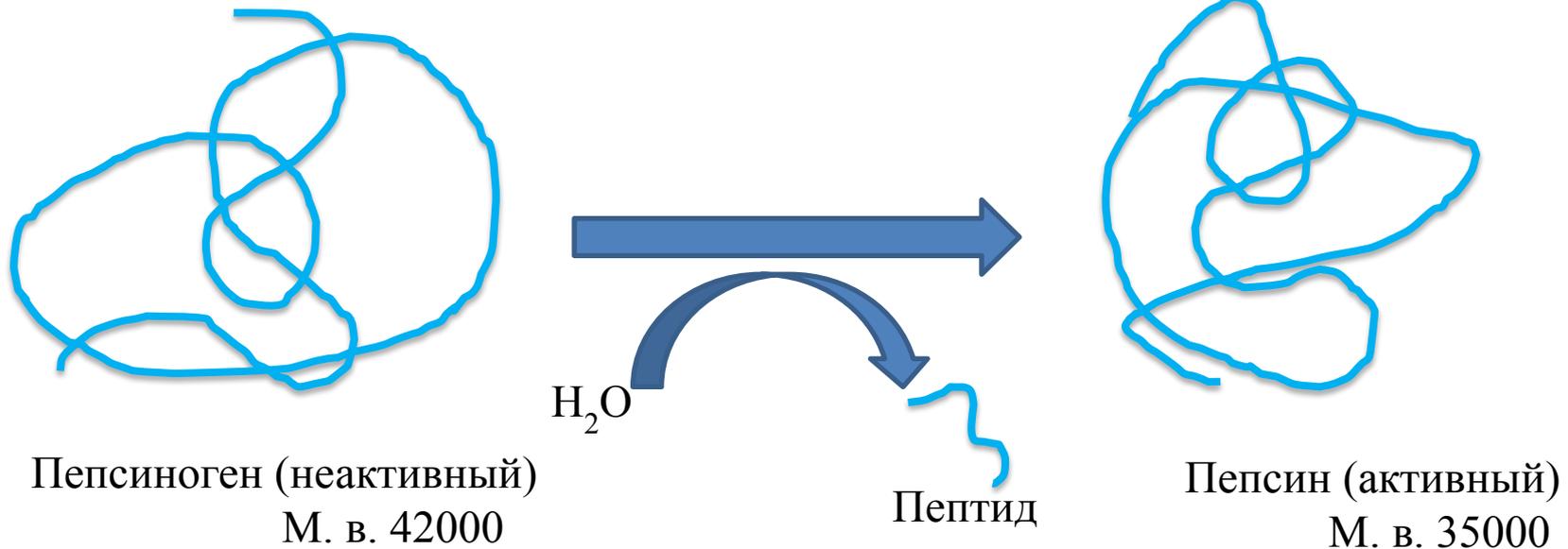
Ассоциация-диссоциация протомеров



Фосфорилирование - дефосфорилирование

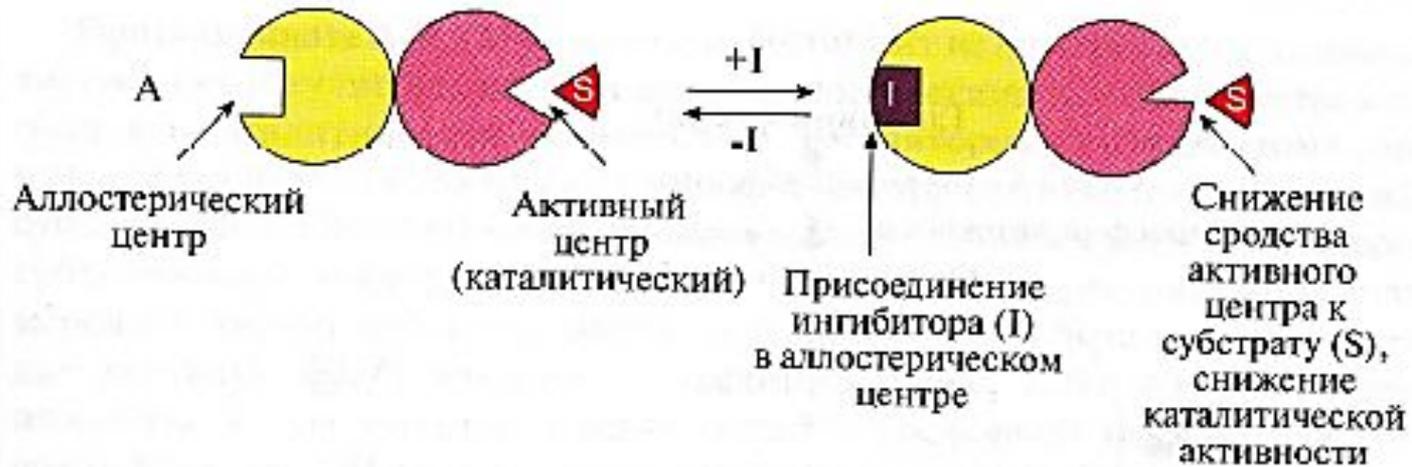


Частичный протеолиз



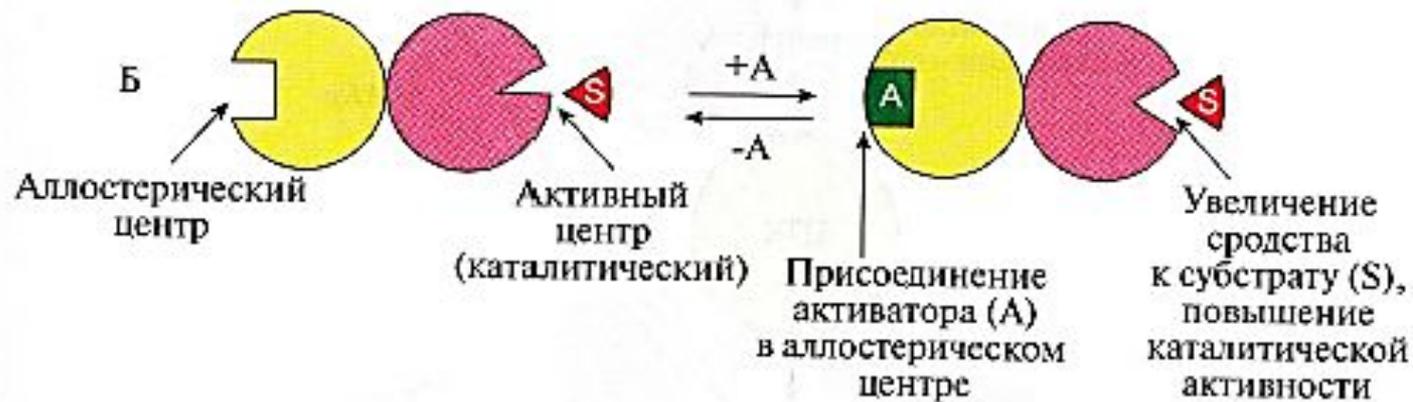
- Изменение первичной структуры белка
- Изменение конформации молекулы, формирование активного центра
- Необратимая регуляция

Аллостерическая регуляция



Активный фермент

Неактивный фермент



Неактивный фермент

Активный фермент

Аллостерические ферменты

- Олигомерные белки (2 и более субъединиц)
- Имеют аллостерический центр (один или несколько)
- Активный и аллостерический центры находятся в разных протомерах
- Регуляторы активности - эффекторы (активаторы, ингибиторы)
- Изменение конформации регуляторного протомера приводит к изменению конформации молекулы в целом, а значит и активного центра
- Катализируют ключевые реакции
- Аллостерическая регуляция обратима
- **ПРИМЕРЫ** эффекторов:
продукты реакции (ингибиторы)
АТФ – ингибитор, АДФ – активатор ключевых ферментов энергетического обмена

Заключение

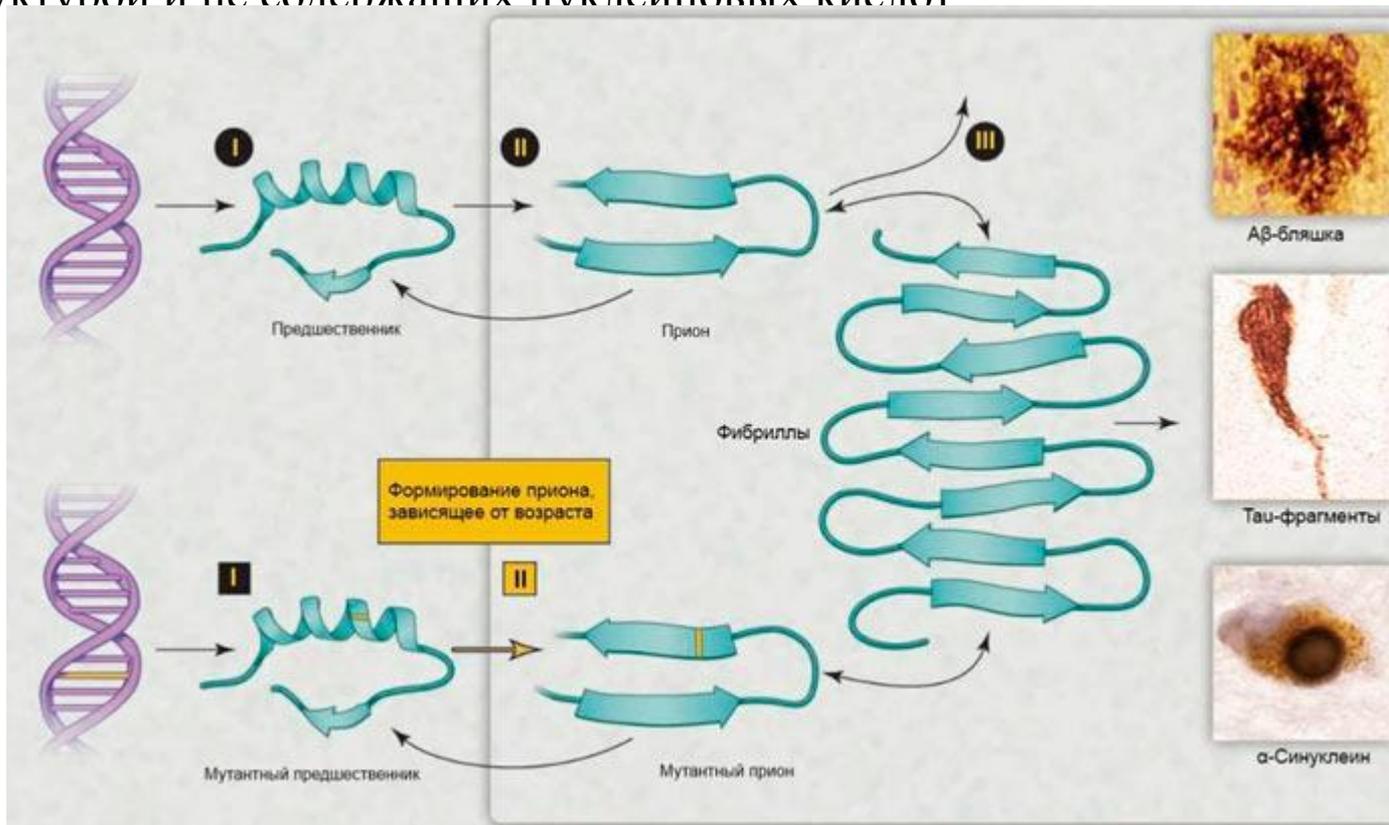
- Основа физиологических процессов – биохимические реакции
- Скорость биохимических реакций в организме катализируют белки-ферменты, многие из которых нуждаются в кофакторах – микроэлементах и производных витаминов
- Ферментам свойственна высокая каталитическая эффективность, специфичность действия, конформационная лабильность, способность осуществлять катализ в «мягких» условиях внутренней среды организма
- Активность ферментов регулируется. Это свойство ферментов является основой регуляции метаболических процессов в организме

□Классификация белков согласно их биологическим функциям.

Функция белка	Сущность	Примеры
Каталитическая (ферментативная)	Ускорение химических реакций в организме	Пепсин, трипсин, каталаза, цитохромоксидаза
Транспортная	Транспорт (перенос) химических соединений в организме	Гемоглобин, альбумин, трансферрин
Структурная (пластическая)	Обеспечение прочности и эластичности тканей	Коллаген, эластин, кератин
Сократительная	Укорочение саркомеров мышцы (сокращение)	Актин, миозин
Регуляторная (гормональная)	Регуляция обмена веществ в клетках и тканях	инсулин, соматотропин, глюкагон, кортикотропин
Защитная	Защита организма от повреждающих факторов	Интерфероны, иммуноглобулины, фибриноген, тромбин
Энергетическая	Высвобождение энергии за счёт распада аминокислот	Белки пищи и тканей

□ Понятие о прионных заболеваниях.

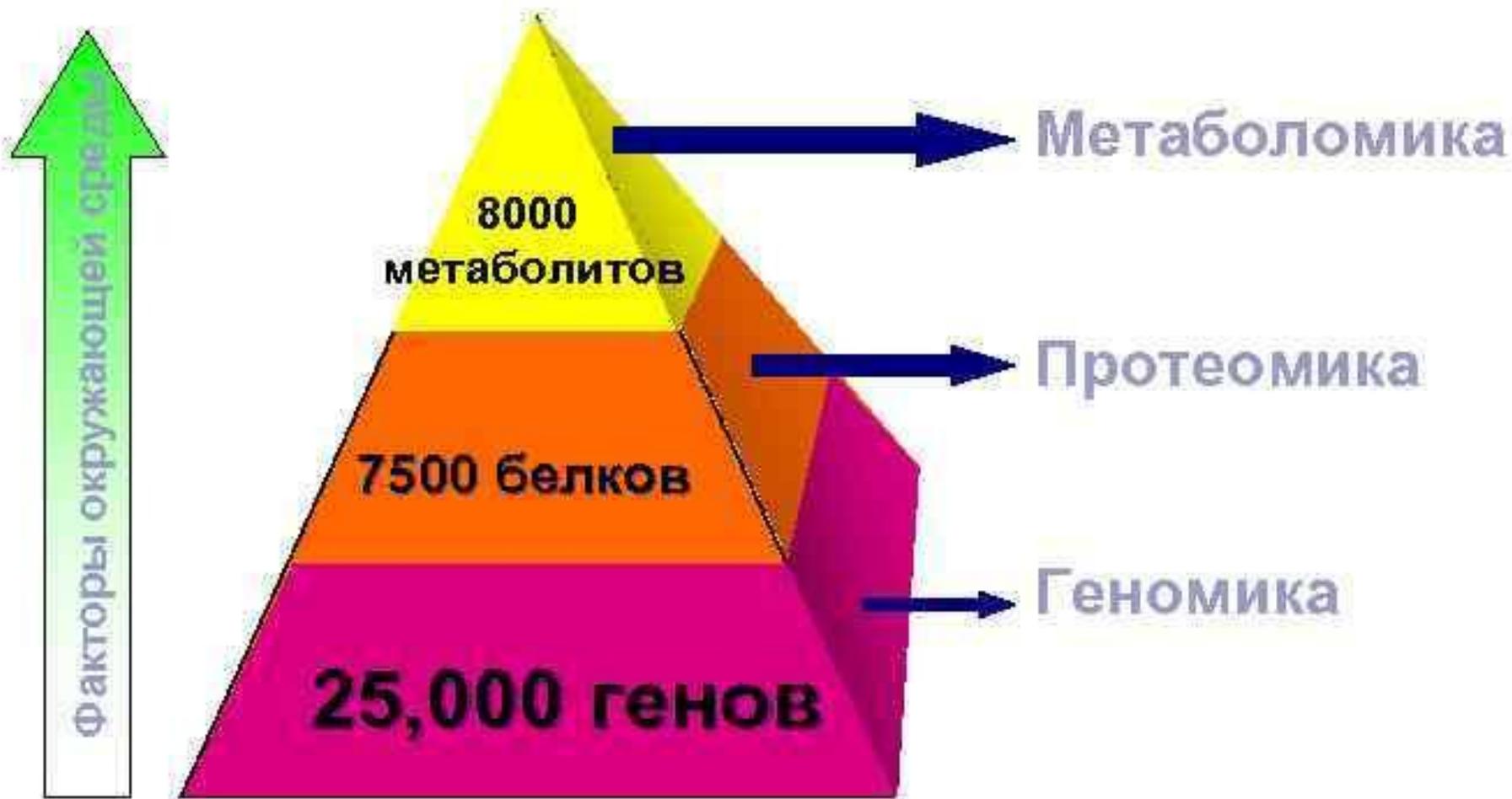
Прионы (англ. prion от protein «белок» + infection «инфекция» — особый класс инфекционных агентов, представленных белками с аномальной третичной структурой и не содержащих нуклеиновых кислот



Процессы нейродегенерации, вызванной прионами. *Сверху*: накопление «нормального» прионного белка повышает его вероятность перехода в токсичную конформацию, которая описывается большим содержанием β -структуры. Прионы наиболее патогенны в форме олигомеров; после образования фибрилл токсичность снижается. В зависимости от того, о каком конкретно прионном белке идет речь, в патологическом состоянии он может образовывать бляшки, клубки или тельца включения. Возможные пути лекарственного вмешательства: (I) снижение концентрации «нормального» белка-предшественника; (II) ингибирование образования прионной формы; (III) уничтожение токсичных агрегатов. ***Снизу***: Наследственная старческая нейродегенерация объясняется двумя событиями: наличием мутантной формы предшественника и образованием из него приона, готового к олиго- и полимеризации с образованием токсичных форм.

Парадигма молекулярной биологии





Протеомика (англ. Proteomics) — область молекулярной биологии, посвящённая идентификации и количественному анализу белков (иными словами, высокопроизводительному исследованию белков).

1950

1950



Группа шведа Пера Эдмана предлагает химический метод секвенирования пептидов.

1958

1959

1958



Определение под началом британца Фредерика Сэнгера структуры короткого белка инсулина. Доказано, что отдельные белки не аморфны в плане состава, а обладают постоянной последовательностью аминокислотных остатков.

1975

1959



Американцы Розалин Ялоу и Соломон Берсон создают первый иммуноанализ, в том числе, для определения белков.

1984

1985

1967

Создан первый автоматический белковый секвенатор, работающий по методу Эдмана.

1970

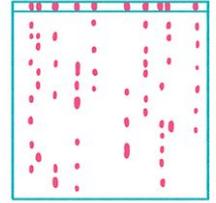
Швейцарец Ульрих Лэмбли предложил оптимальный метод гель-электрофореза белков в денатурирующих условиях – с использованием додецилсульфата натрия.

2001

2005

2007

2014



1975

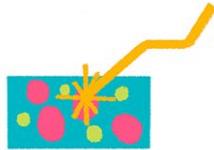
Американец Патрик О'Фарелл и немец Йохим Клозе независимо изобретают 2D-электрофорез белков и получают первые протеомные карты.

1984



Под руководством американца Джона Фенна разработана ионизация молекул электрораспылением. Впоследствии она позволила осуществлять масс-спектрометрию макромолекул, включая белки, без их разрушения.

1985



Коичи Танака из Японии предлагает мягкую ионизацию макромолекул лазером для масс-спектрометрии. Немцы Франц Гилленкамп и Михаэль Карас применяют сходный метод для белков и пептидов. Возникает метод ионизации MALDI.

1994



Возникает масс-спектрометрическая пептидная карта.

1996

«протеом»

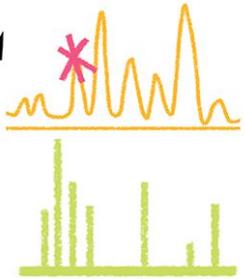
Термин «протеом», как белковое дополнение к геному, вводит австралийский аспирант Марк Уилкинс.

1999



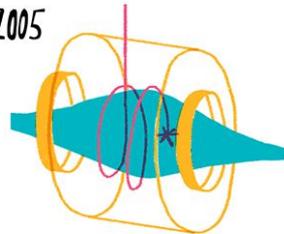
Появляются первые поисковые программы для идентификации белков масс-спектрометрией по геномным последовательностям.

2001



Скорострельная ("shotgun") протеомика.

2005



Российским физиком Александром Макаровым, работающим за рубежом, изобретена ионная ловушка нового типа – Orbitrap.

2005



Американцы Кристи Хантер и Ли Андерсон демонстрируют использование масс-спектрометрического метода мониторинга множественных реакций (MRM) для количественного анализа природных пептидов.

2007

Под руководством американца Стивена Гиги предлагается новый метод оценки уровня ложноположительных результатов скорострельной протеомики с использованием «фальшивых» последовательностей (анализ "target-decoy").

2014



Скорострельная протеомика достигает уровня идентификации около 10 тысяч белков человека в одном образце – примерно половина кодируемых в геноме. Под руководством немца Бернхарда Кустера и американца Ахилеша Пандея независимо публикуются работы, декларирующие черновые версии полного протеома человека.