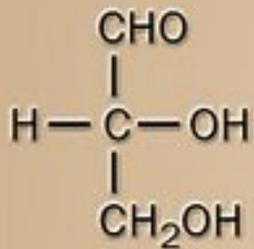
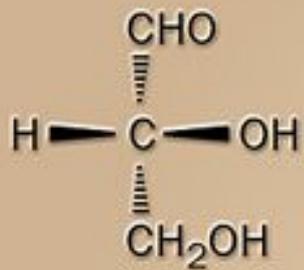
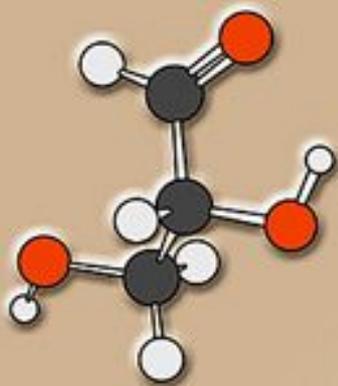


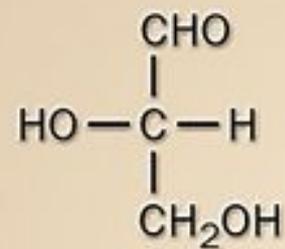
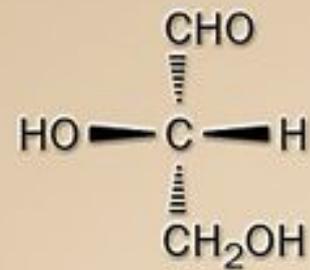
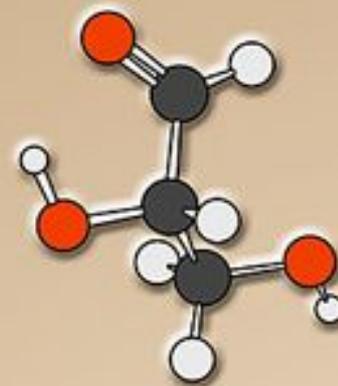
Структура и функции белков, основы протеомики



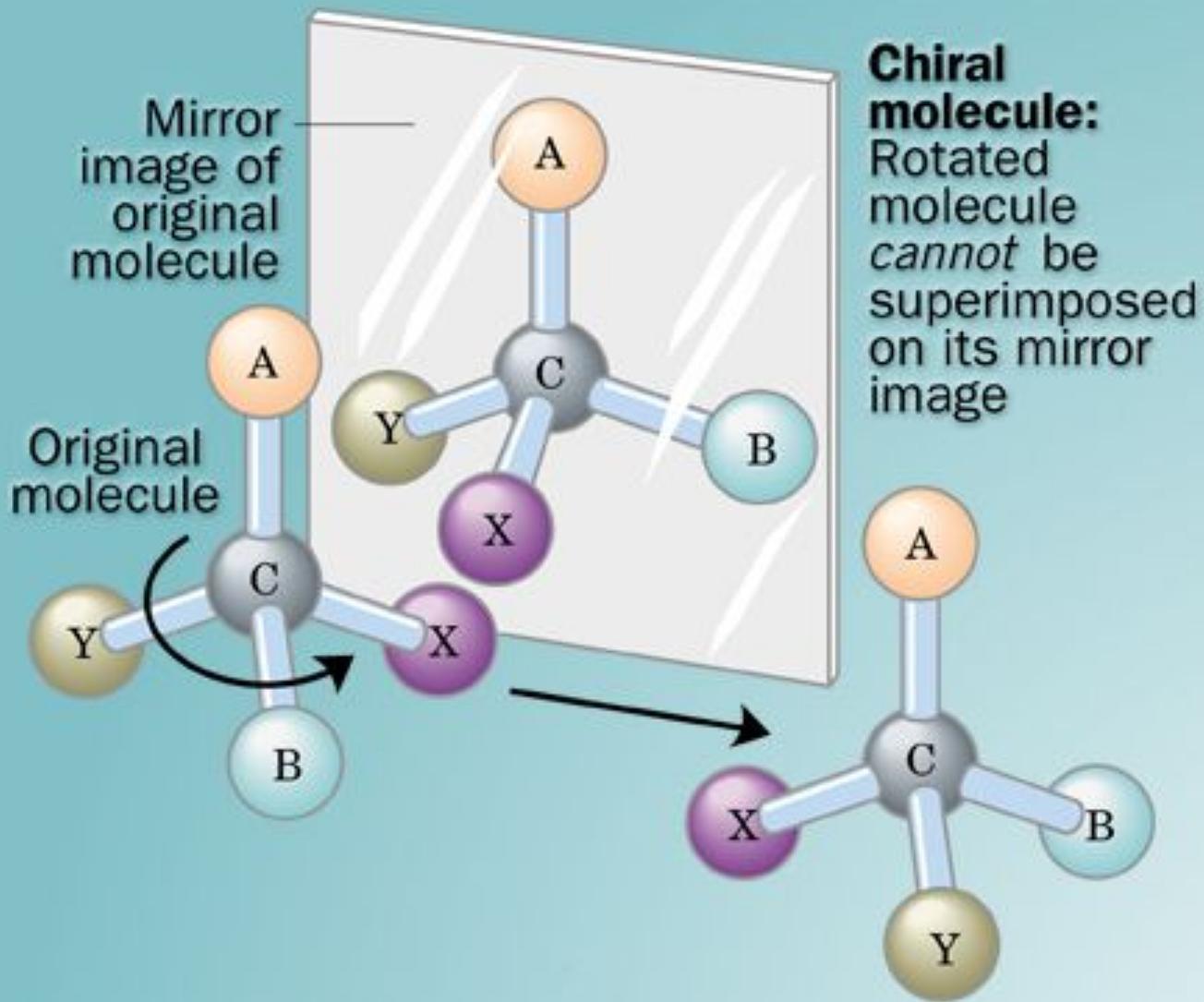
- Карта электронной плотности F1-АТФазы, ассоциированной с кольцом из 10 с-субъединиц.
- Функции – синтез АТФ при переносе протонов через мембрану.



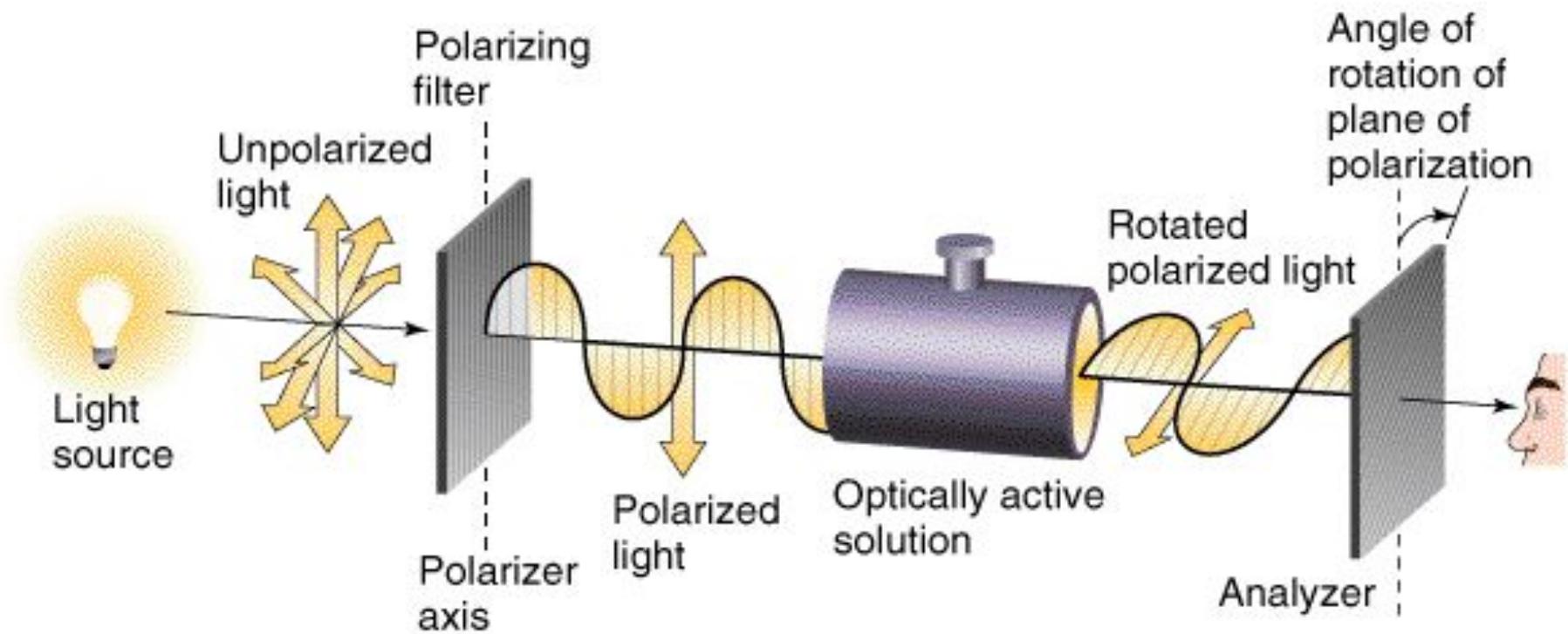
D-глицеральдегид



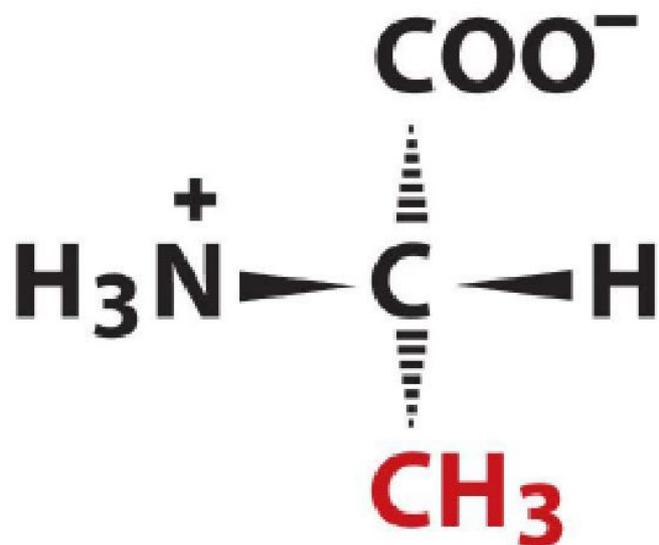
L-глицеральдегид



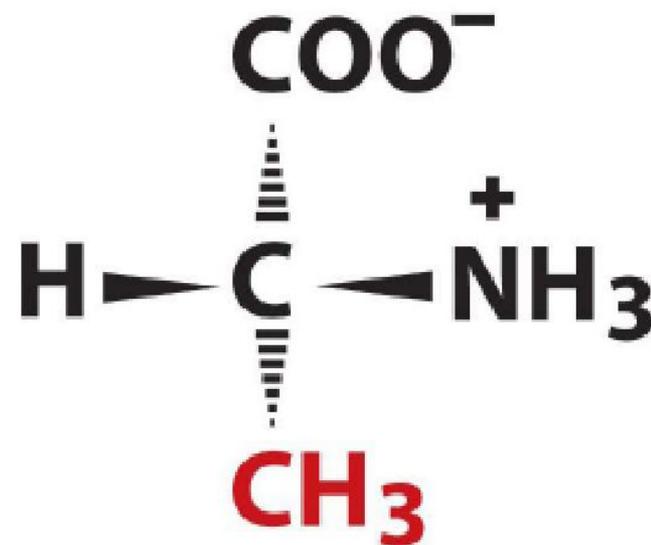
Хиральность



D- и L-аминокислоты



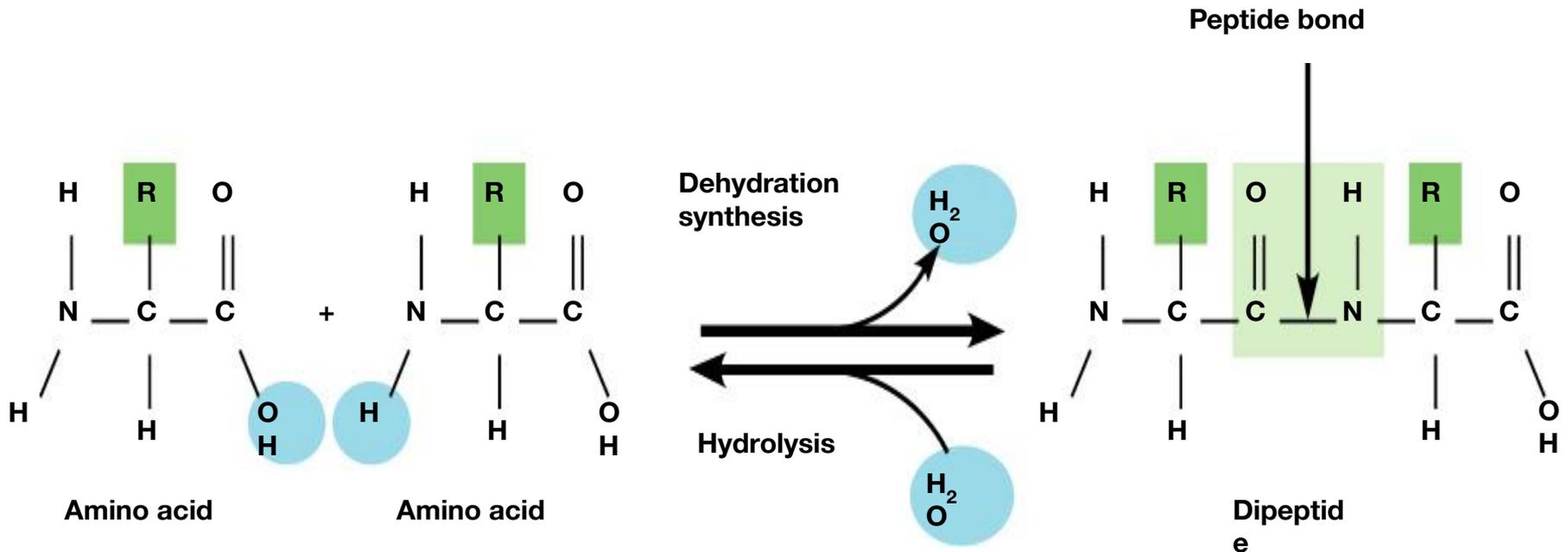
L - Аланин



D - Аланин

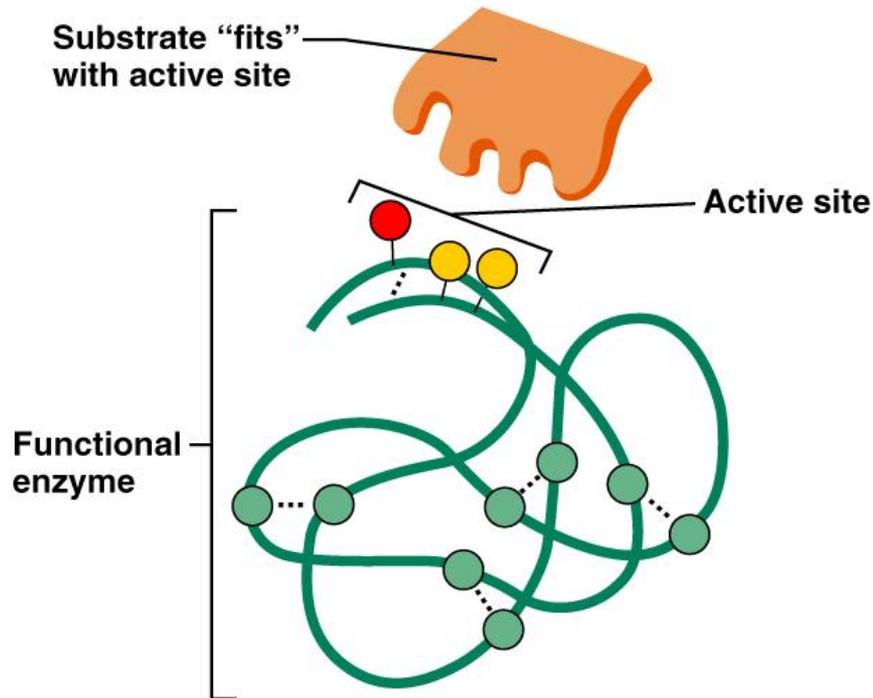
Белки

- Макромолекулы, состоящие из комбинаций 20 типов аминокислот, связанных пептидными связями



Денатурация белка

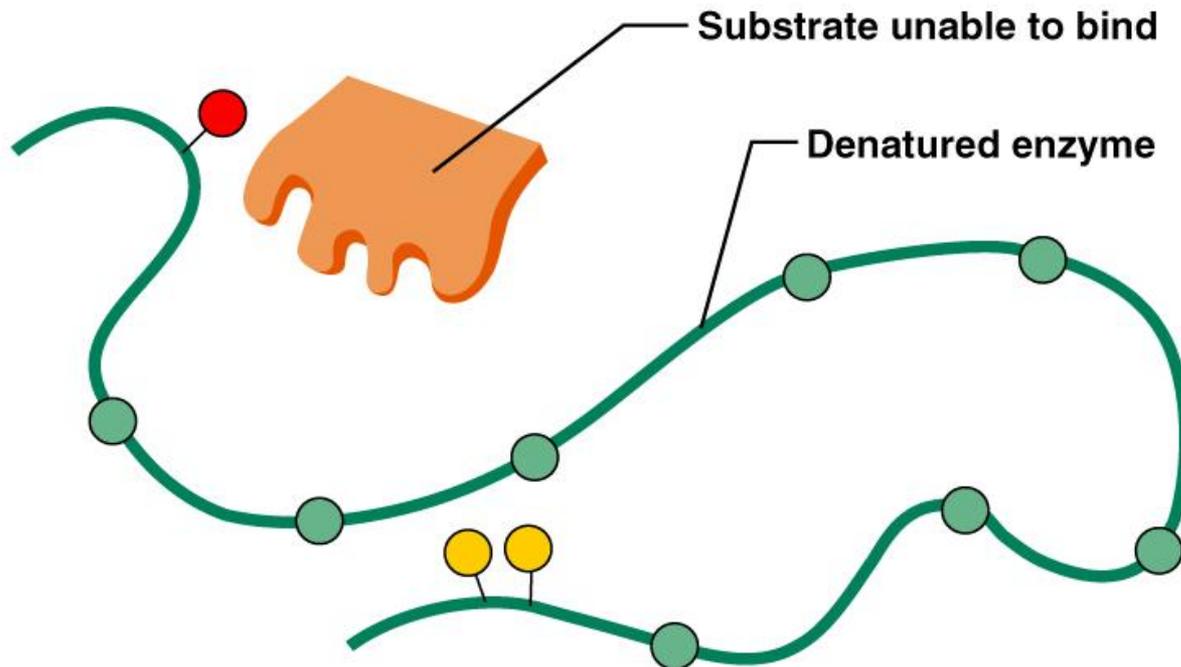
- Обратимая (не сильное изменение рН, температуры)



(a)

Денатурация белка

- Необратимая (сильное изменение pH, температуры)



(b)

(a)

MOLECULAR STRUCTURE

Primary (sequence)

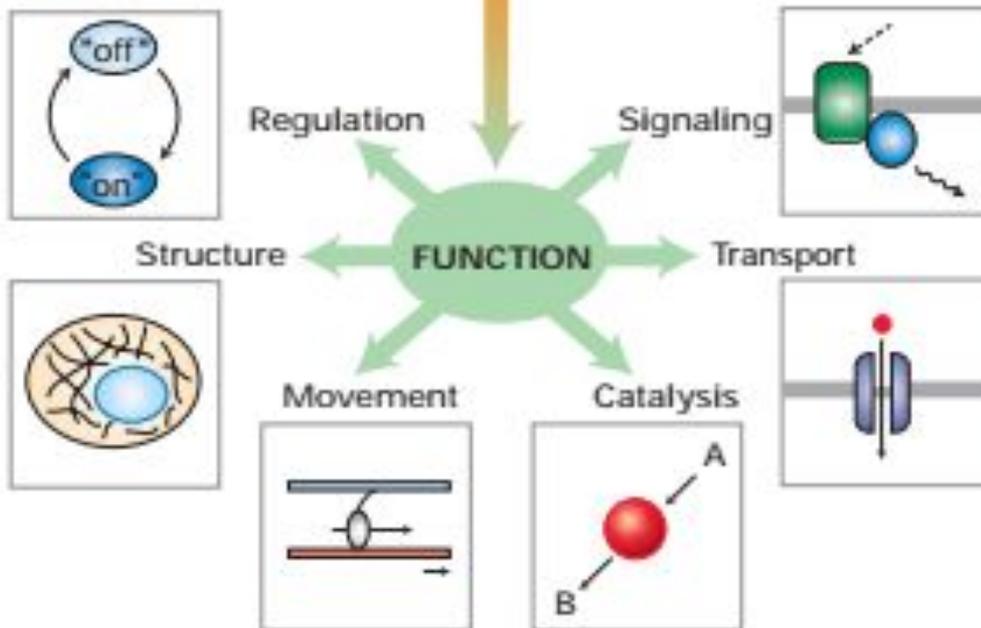
Secondary (local folding)

Tertiary (long-range folding)

Quaternary (multimeric organization)

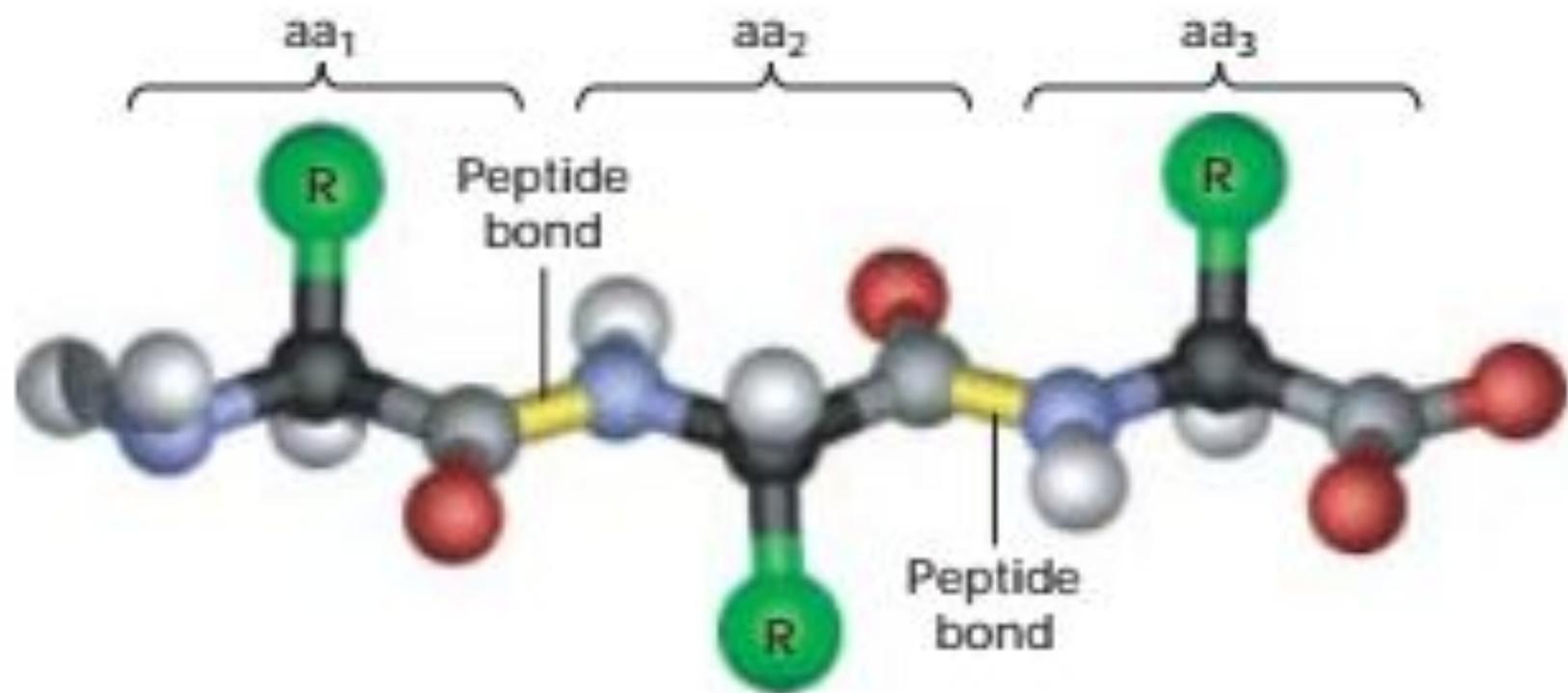
Supramolecular (large-scale assemblies)

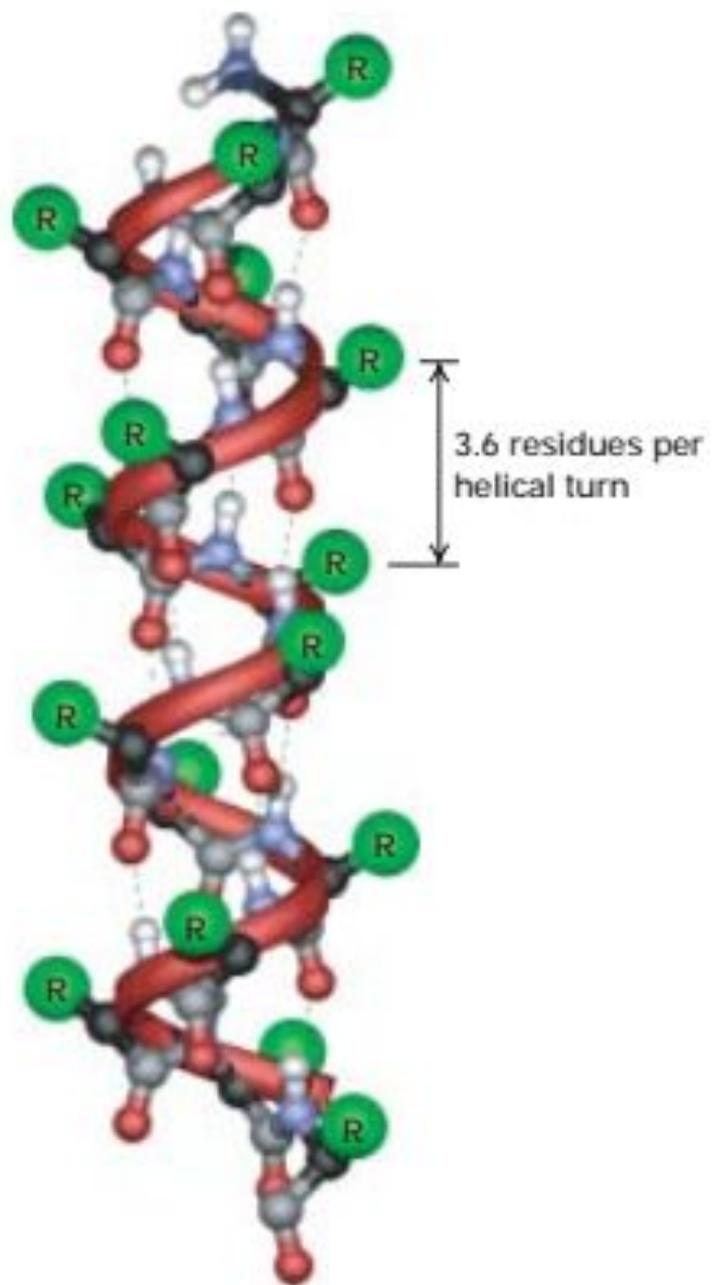
(b)



- Линейная последовательность аминокислот (первичная структура) формирует спиральные или складчатые участки (вторичная структура). Участки упакованы в глобулярные или фибриллярные формы (третичная структура). Некоторые белки ассоциируются в крупные комплексы (четвертичные структуры), которые могут состоять из десятков и сотен субъединиц.

- Функции белков:
- Катализ,
- Транспорт,
- Сигналы,
- Регуляция,
- Организация генома и



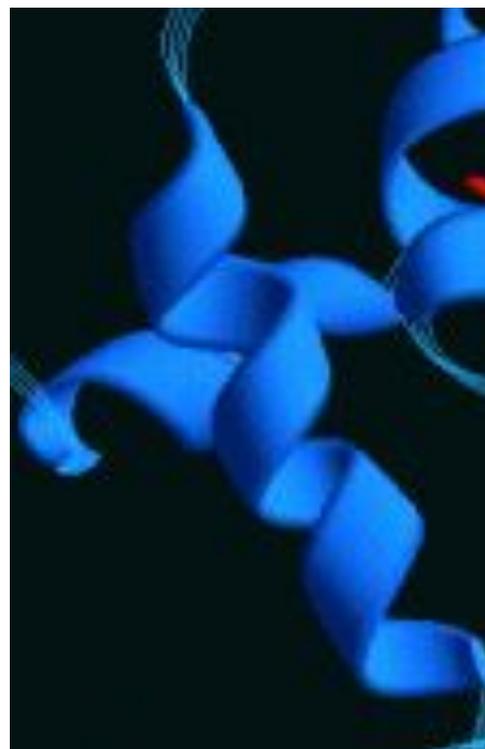
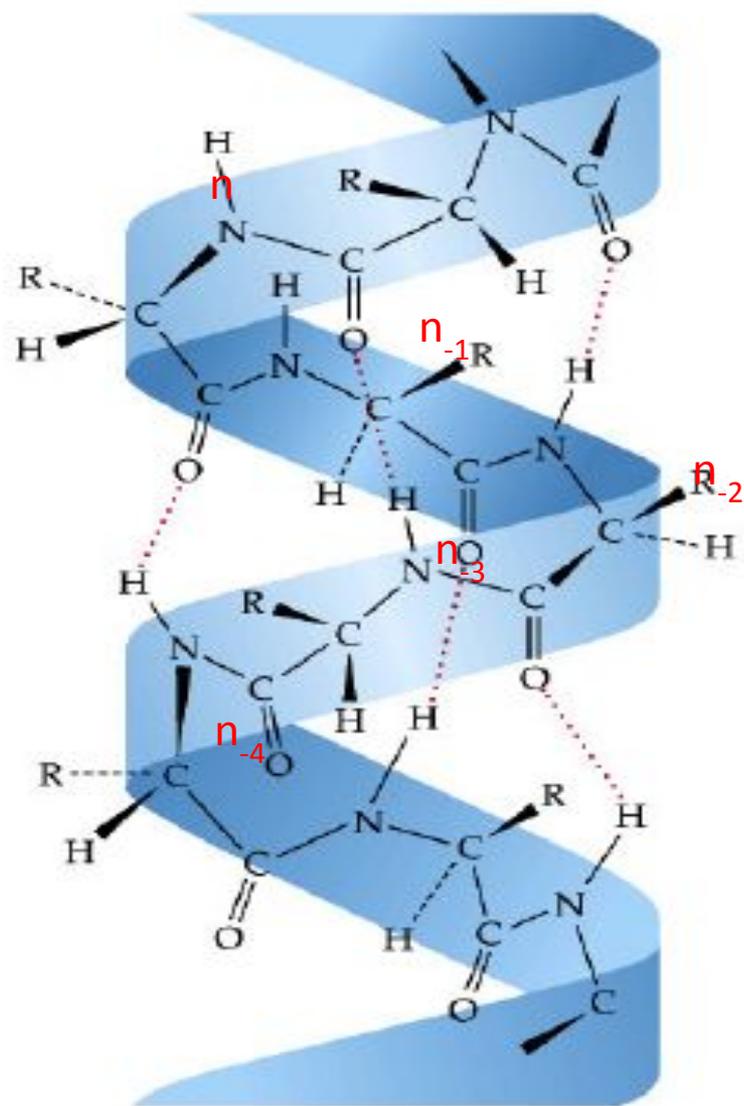


Спираль

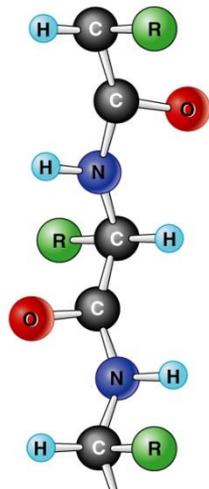
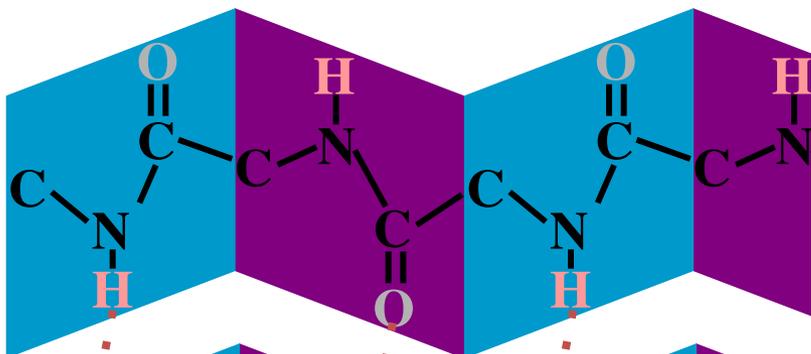
- Наиболее распространенным элементом вторичной структуры является **правая α -спираль** (α_R). Пептидная цепь здесь изгибается винтообразно.
- На каждый виток приходится 3,6 аминокислотного остатка, *шаг винта* (т.е. минимальное расстояние между двумя эквивалентными точками) составляет 0,54 нм. α -Спираль стабилизирована почти линейными водородными связями между NH-группой и CO-группой четвертого по счету аминокислотного остатка.
- Таким образом, в протяженных спиральных участках каждый аминокислотный остаток принимает участие в формировании двух водородных связей. Неполярные или амфифильные α -спирали с 5-6 витками часто обеспечивают заякоривание белков в биологических мембранах (*трансмембранные спирали*).

а - спираль

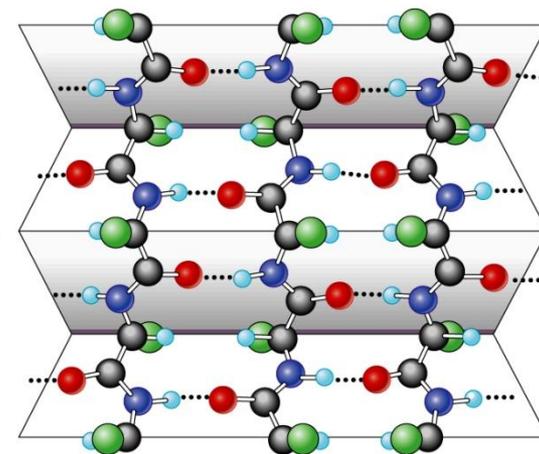
Вторичная структура белка
стабилизирована
водородными связями



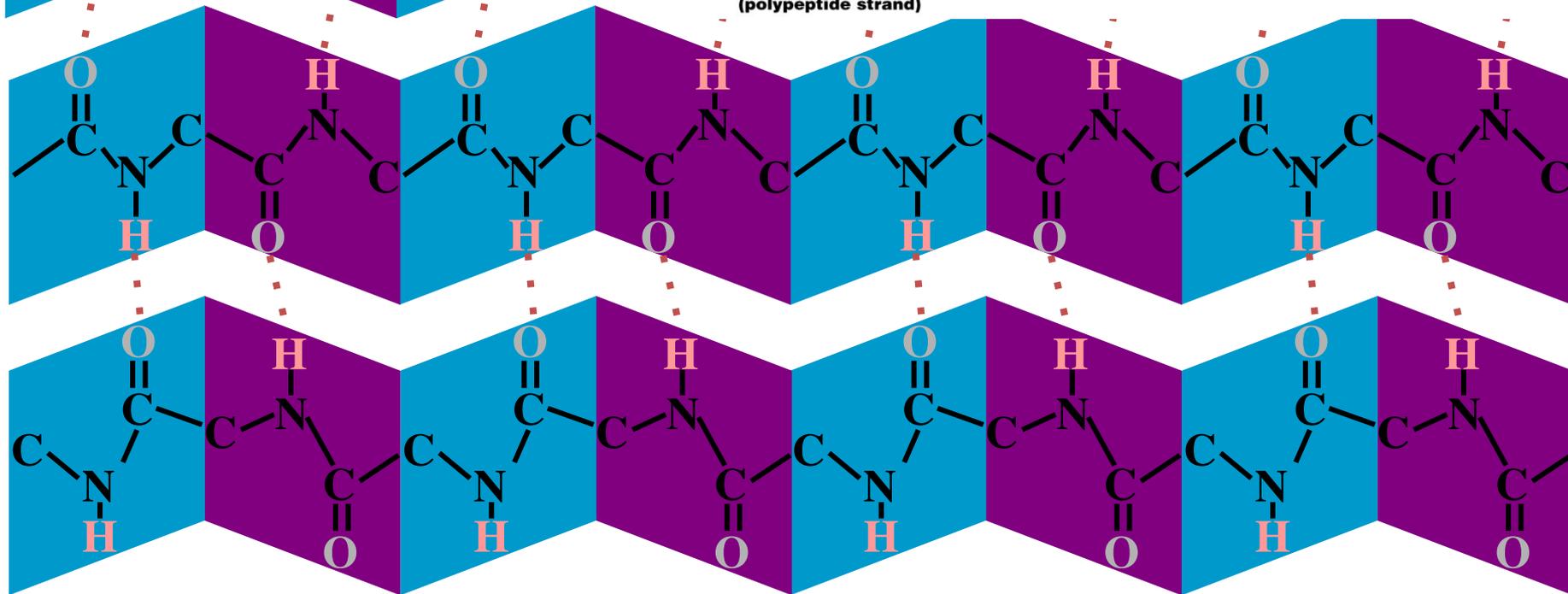
β – складчатый слой



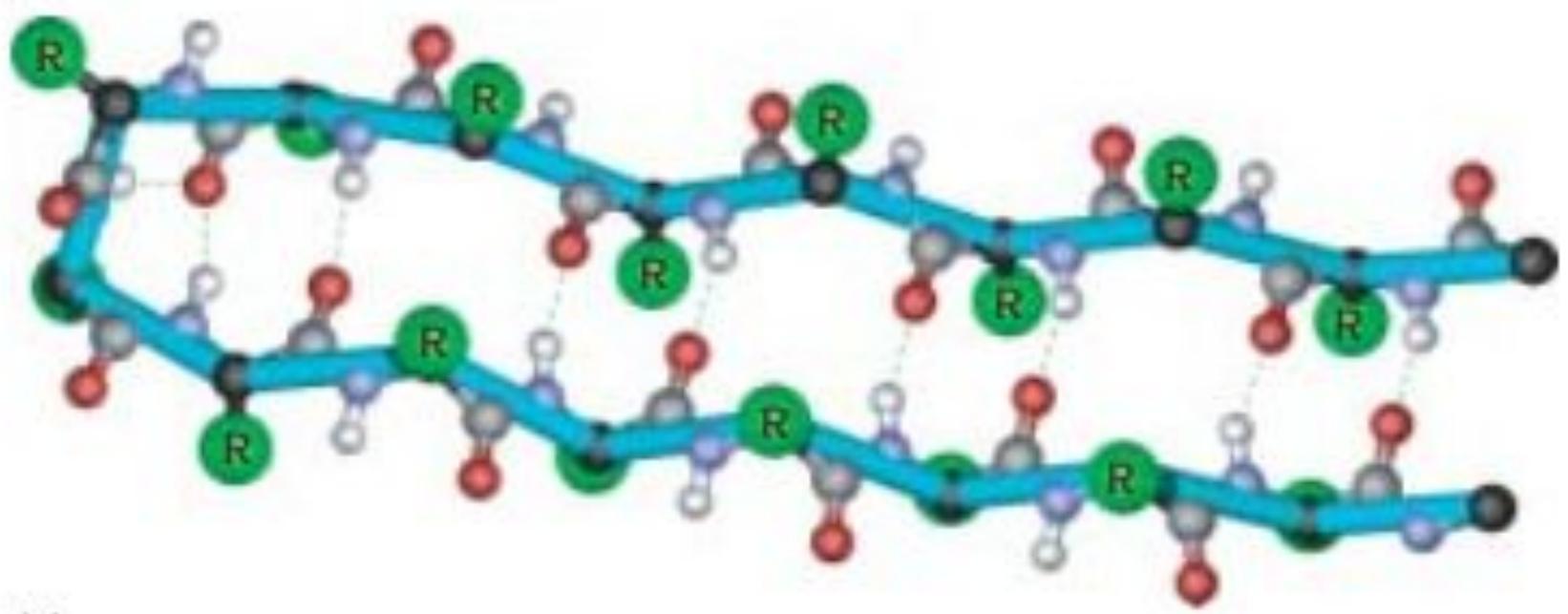
(a) Primary structure (polypeptide strand)



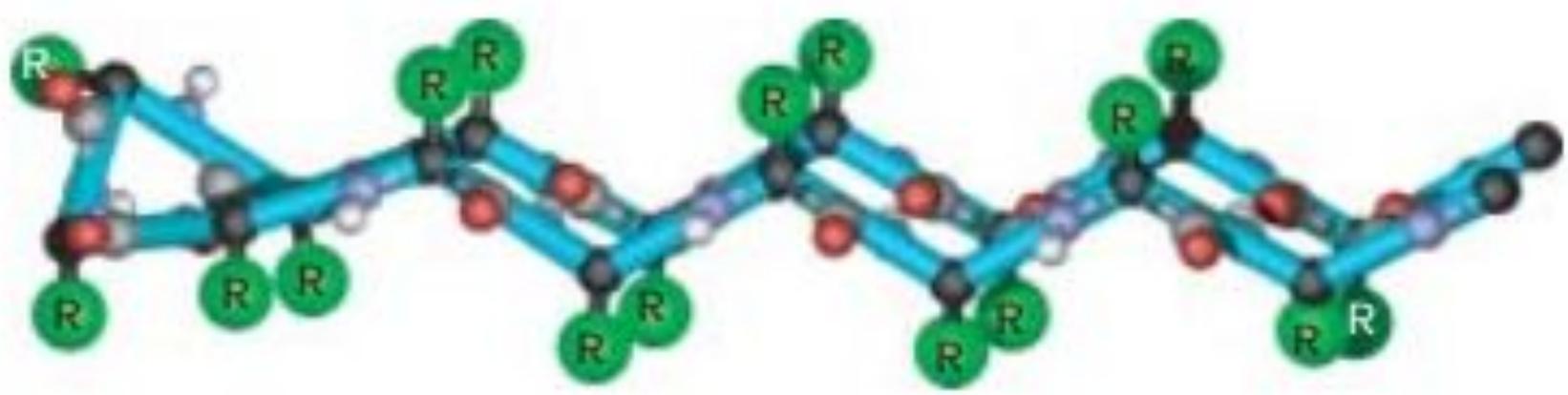
(c) Secondary structure (β -pleated sheet)



(a)

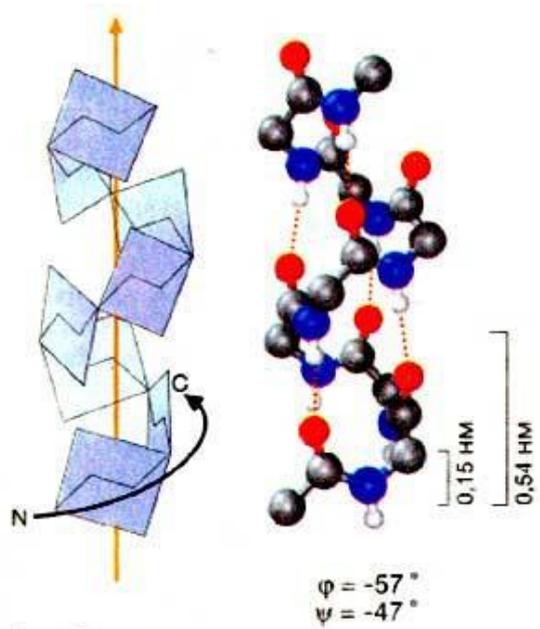


(b)

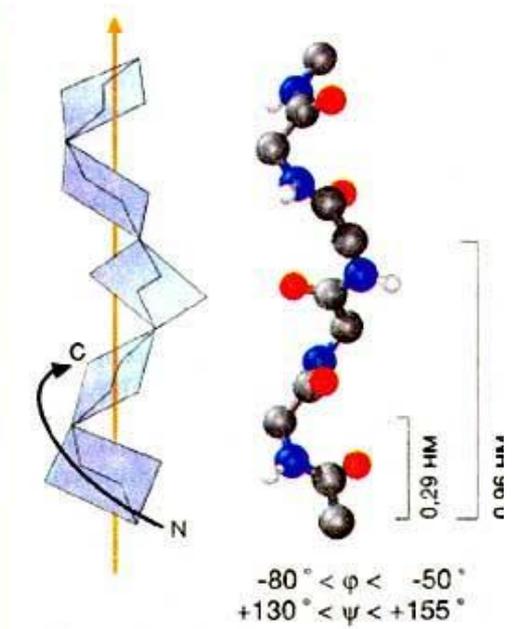


Складчатость

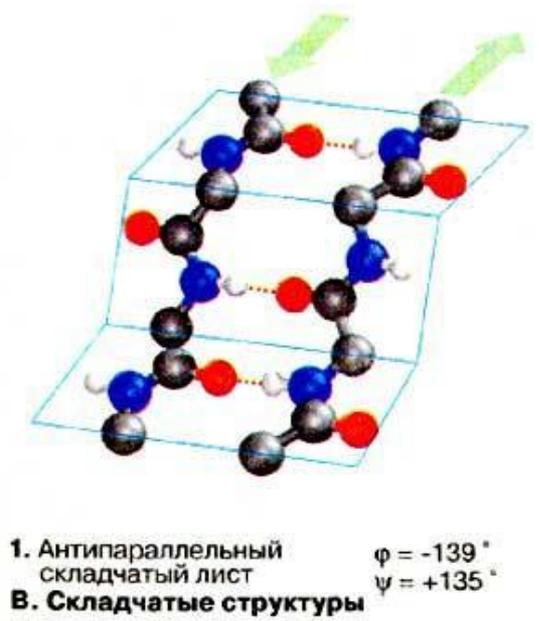
- Плоскости пептидных связей расположены в пространстве подобно равномерным складкам листа бумаги. В складчатых структурах также образуются *поперечные* *межцепочечные* водородные связи. Если цепи ориентированы в противоположных направлениях (1), структура называется антипараллельным складчатым листом (β_{α}), а если цепи ориентированы в одном направлении (2), структура называется параллельным складчатым листом (β_{\parallel}).
- В складчатых структурах α -С-атомы располагаются на перегибах, а боковые цепи ориентированы почти перпендикулярно средней плоскости листа, попеременно вверх и вниз. Энергетически более предпочтительной оказывается β_{α} -*складчатая структура с почти линейными* Н-мостиками. В растянутых складчатых листах отдельные цепи чаще всего не параллельны, а несколько изогнуты относительно друг друга.



А. α -Спираль



Б. Спираль коллагена



1. Антипараллельный складчатый лист
В. Складчатые структуры



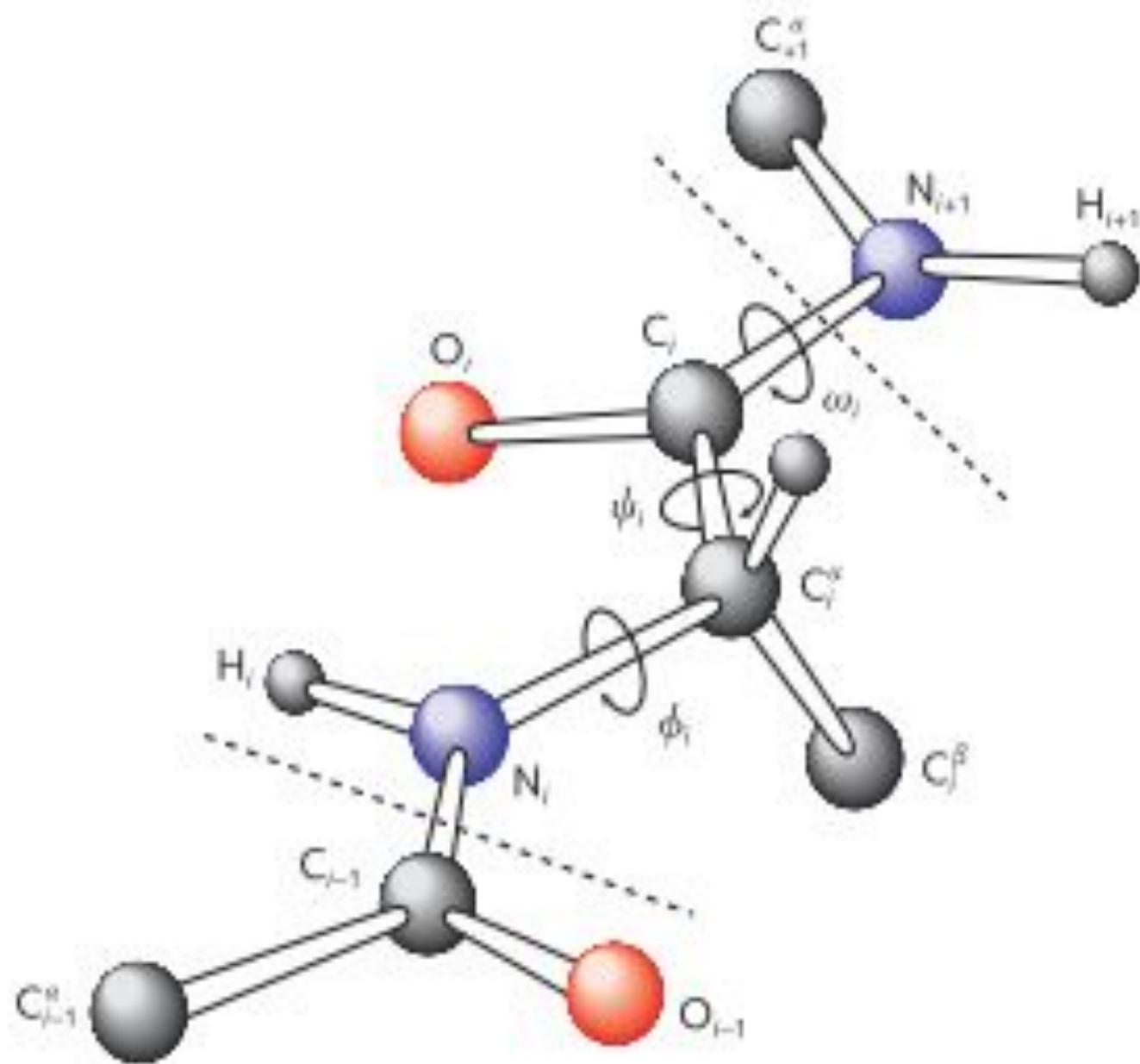
2. Параллельный складчатый лист

Общие свойства белков

- Большое значение для поддержания структуры имеют водородные связи между полярными атомами (O-H, N-H, S-H). Также аминокислоты участвуют в гидрофобных взаимодействиях и образуют дисульфидные связи.
- Замена аминокислот приводит к тому, что одни связи пропадают и появляются новые, что в свою очередь меняет пространственную конформацию белка. Основными пространственными структурами являются альфа-спираль и бета-складчатость.

Общие свойства белков

- Конформация белковой цепи характеризуется тремя углами, внутреннего вращения вокруг связей основной цепи.
- Связи между N и C α и между C α и C одиночные, внутреннее вращение вокруг этих связей не ограничено электронной структурой, ограничение вносят только возможные стерические эффекты функциональных групп.
- Угол N-C α получил обозначение φ , C α -C: ψ , C-N (пептидная связь): ω . Вся конформация белка может быть описана при помощи этих 3 углов.



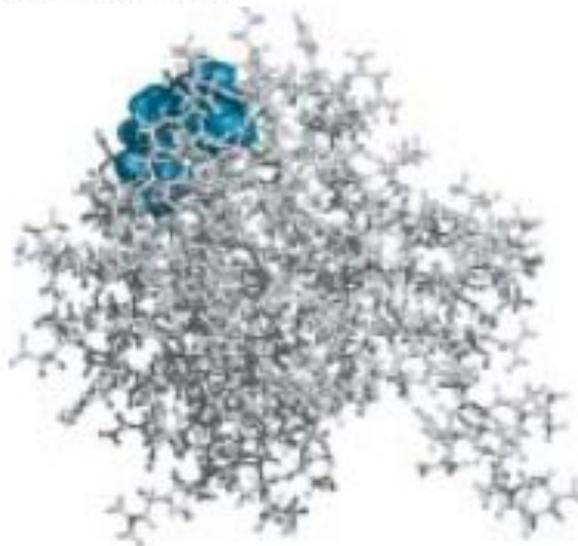
Пептидная связь

- Пептидная связь является частично двойной и угол вращения C-N связи может принимать 2 значения: транс-конформация ($\omega=180^\circ$) и цис-конформация ($\omega=0^\circ$).
- Основной является транс-конформация, а цис- встречается крайне редко. Исключение составляет пролин, его боковая цепь связана с атомом азота, образуя пирролидиновое кольцо. Это ограничивает возможность атома азота основной цепи выступать в качестве донора электрона, что приводит к более частому проявлению цис-конформации перед пролином.

(a) C_α backbone trace



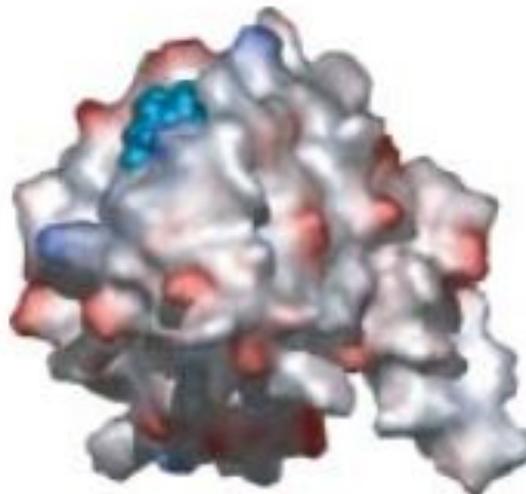
(b) Ball and stick



(c) Ribbons

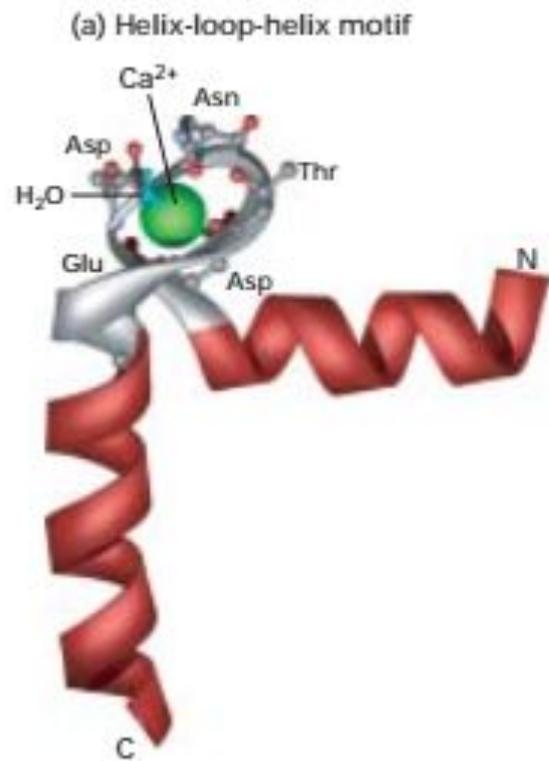


(d) Solvent-accessible surface

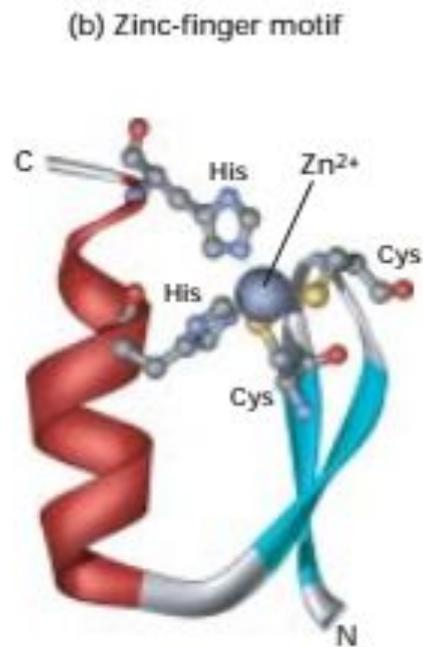


Повторяющиеся комбинации вторичных структур

- Называются «мотивами» или фолдами, они формируют третичную структуру белка. В некоторых случаях они отвечают за специфические функции.
- Например, спираль-петля-спираль в участке связывания кальция, отмеченного определенными гидрофильными остатками в инвариантных положениях цепи.
- Атом кислорода в инвариантном положении связывает кальций с помощью ионной связи. Этот мотив обнаружен более чем в 100 кальций-связывающих белках.
- Другой распространенный мотив «цинковые пальцы» три вторичных структуры - спираль и две антипараллельные нити удерживают атом цинка. Этот фрагмент встречается во многих белках, связывающих ДНК и РНК.

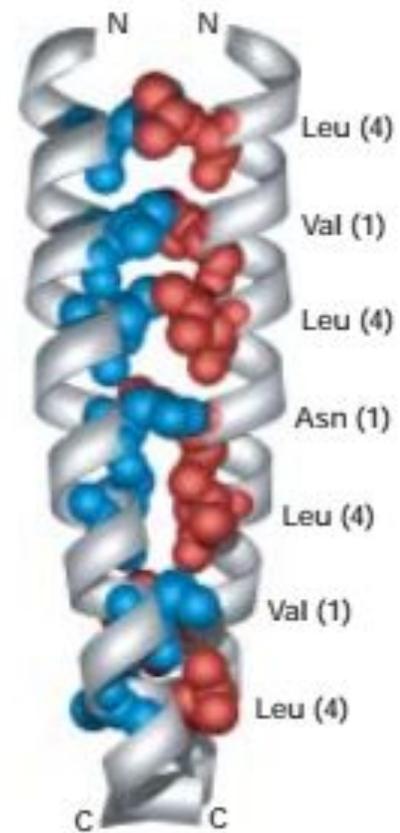


Consensus sequence:
D/N - D/N - D/N/S - [backbone O] - - - - E/D



Consensus sequence:
F/Y - C - - C - - - - F/Y - - - - - H - - - H -

(c) Coiled coil motif



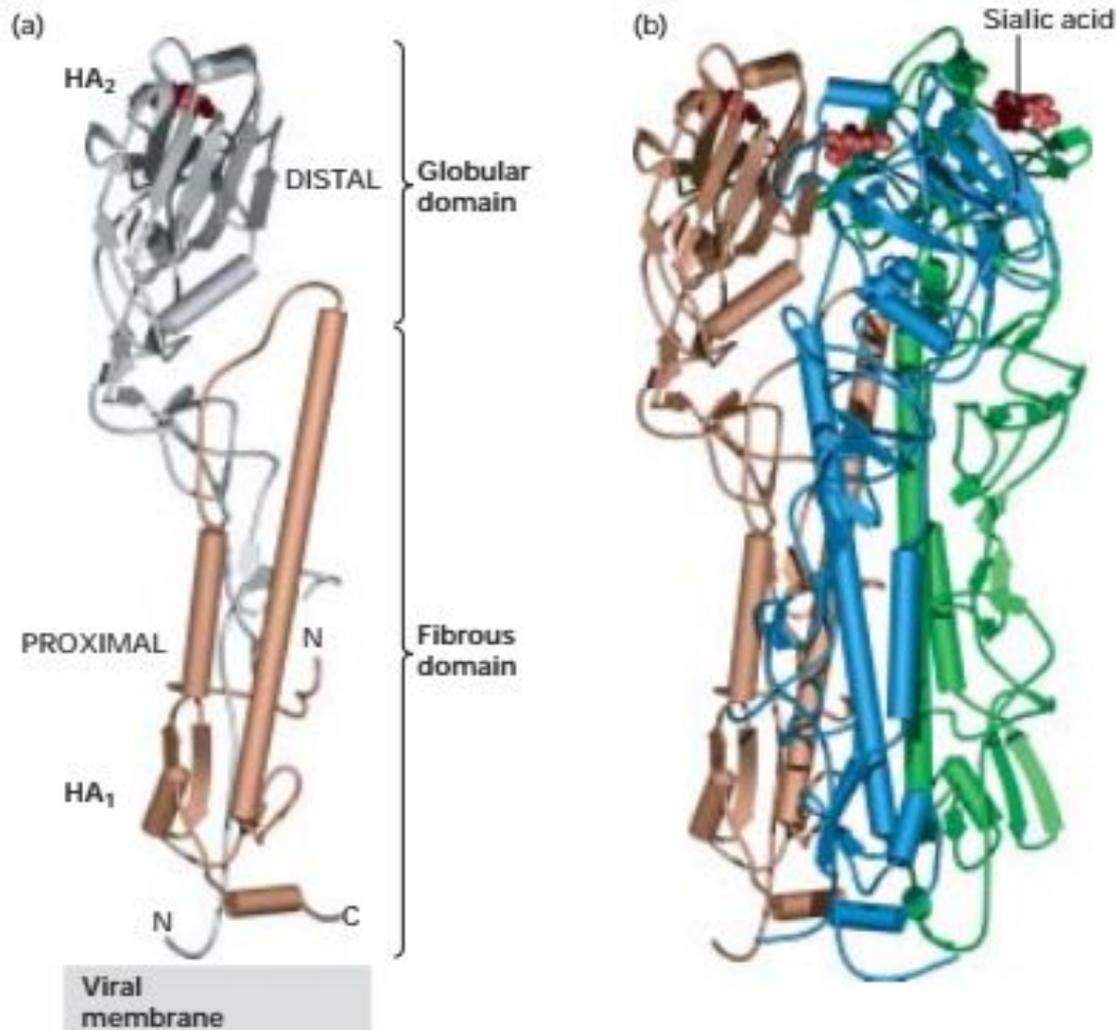
Heptad repeat:
[V/N/M] - - L - - -

Спиральную спираль

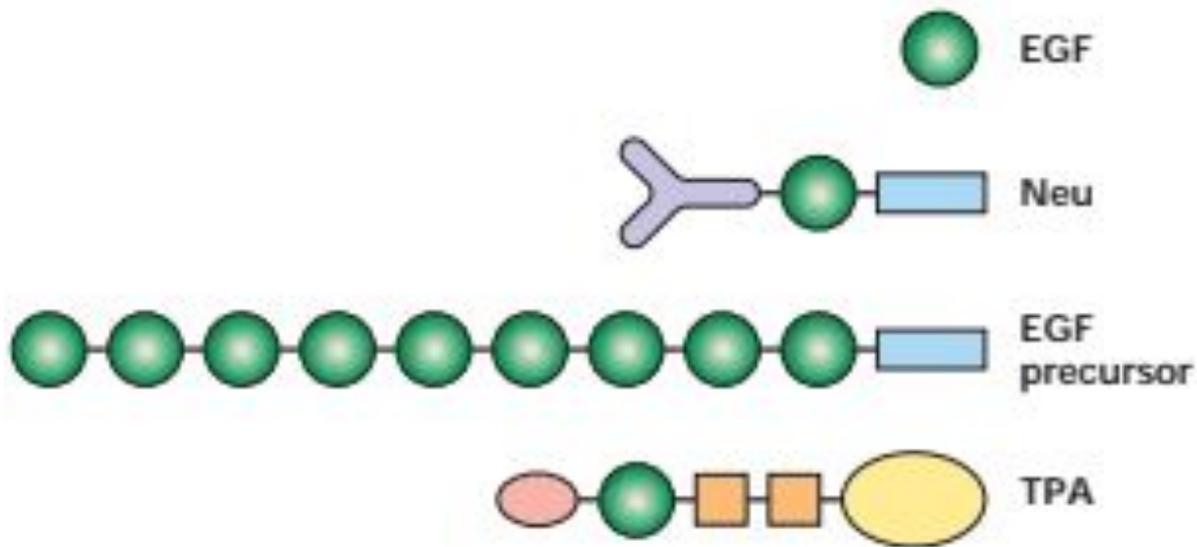
- Многие белки, особенно волокнистые белки, самоассоциируются в олигомеры, используя третий мотив - спиральную спираль. В этих белках каждая полипептидная цепь содержит - спиральные сегменты, в которых гидрофобные остатки имеют регулярную структуру - повторяющаяся гептадная последовательность.
- В гептаде гидрофобный остаток - иногда валин, аланин или метионин - находится в положении 1, а остаток лейцина - в положении 4. Поскольку гидрофильные боковые цепи простираются с одной стороны спирали, а гидрофобные боковые цепи простираются с противоположной стороны, общая спиральная структура амфипатическая.
- Амфипатический характер этих спиралей позволяет двум, трем или четырем спиральям наматываться друг на друга, образуя спиральную катушку; отсюда и название этого мотива.

Структурные и функциональные домены образуют третичную структуру

- Третичная структура белков размером более 15000 Да обычно подразделяется на отдельные области, называемые доменами. Структурно домен представляет собой компактно сложенную область полипептида. Для больших белков домены можно распознать в структурах, определенных с помощью рентгеновской кристаллографии или на изображениях, полученных с помощью электронной микроскопии.
- Хотя эти отдельные области хорошо различаются или физически отделены друг от друга, они связаны промежуточными сегментами полипептидной цепи. Каждая из субъединиц в гемагглютинине, например, содержит глобулярный домен и фиброзный домен.



- Третичная и четвертичная структуры гемагглютинаина, поверхностного белка вируса гриппа.



- Принципиальные схемы различных белков, иллюстрирующие их модульную природу. Эпидермальный фактор роста (EGF) генерируется протеолитическим расщеплением белка-предшественника, содержащего несколько доменов EGF (зеленый) и мембранный домен (синий).
- Домен EGF также присутствует в белке Neu и в активаторе тканевого плазминогена (TPA). Эти белки также содержат другие широко распространенные домены, обозначенные формой и цветом.

Машина	Компоненты	Локализация в клетке	Функция
Реплисома	Хеликаза, праймаза, ДНК-полимераза	Ядро	Репликация ДНК
Комплекс инициации транскрипции	Промотор-связывающий белок, хеликаза, общие факторы транскрипции, РНК-полимераза	Ядро	Синтез РНК
Сплайсосома	Пре-мРНК, малые ядерные РНК, белковые факторы	Ядро	Сплайсинг мРНК
Комплекс ядерной поры	Нуклеопорины (50-100)	Ядерная мембрана	Транспорт в ядре
Рибосома	Рибосомные белки (>50) и 4 рРНК молекулы	Цитоплазма/ЭПС мембрана	Синтез белков
Шаперонин	GroEL, GroES	Цитоплазма, митохондрии, ЭПС	Фолдинг белков
Фотосистема	Светособирающий комплекс, реакционный центр	Цитоплазма	Фотосинтез
Саркомер	Толстые филаменты (миозин), тонкие филаменты (актин) титин/небулин	Цитоплазма мышечных клеток	Сокращение

В некоторых случаях в ходе эволюции четвертичная структура может трансформироваться в третичную

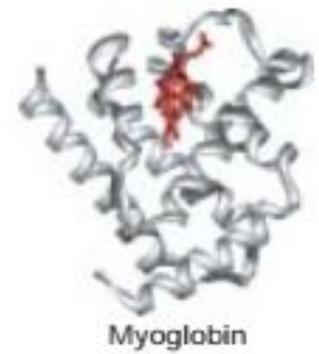
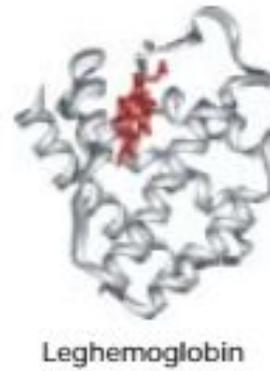
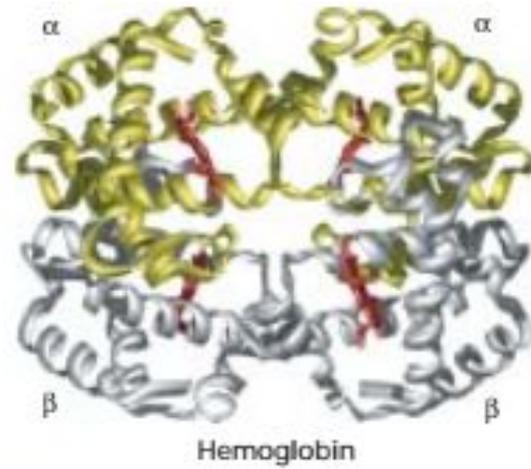
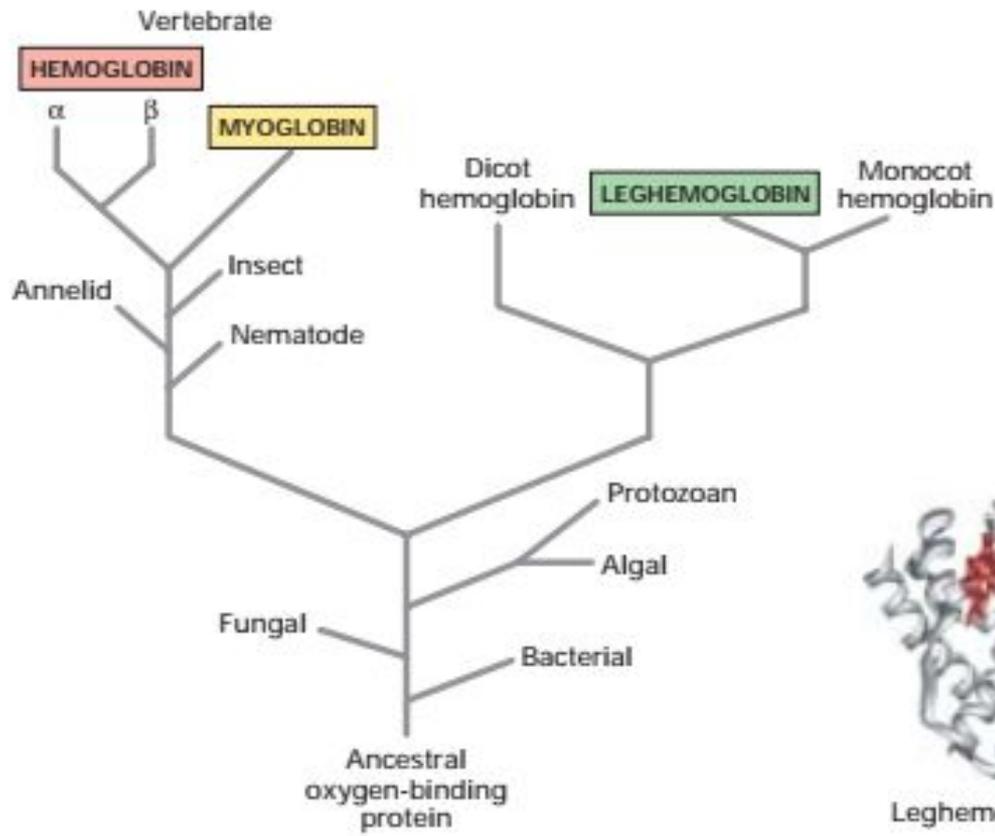
- Например, 5 отдельных ферментов *E. coli* которые катализируют последовательные этапы биосинтеза ароматических аминокислот, преобразованы в 5 регионов одного фермента у гриба *Aspergillus nidulans*.
- Отдельные функциональные единицы в общей цепи получили название «домены».
- Фибронектин – внеклеточный белок, отвечающий за клеточную адгезию и миграцию, содержит 29 доменов трёх типов (F1, F2, и F3), расположенных в виде тандемных повторов $(F1)_6(F2)_2(F1)_3(F3)_{15}(F1)_3$. «Изобретение» новых доменов нехарактерно для процессов эволюции, как правило, новые белки включают более сложные комбинации уже существующих доменов.

База данных SCOP

- База данных SCOP организует структуры белков в иерархическую систему в соответствии с их эволюционным происхождением и сходством структур. На первом уровне иерархии находятся отдельные домены.
- Домены сгруппированы в семейства гомологов. Семейства, включающие белки схожих функций и структур объединяются в суперсемейства.
- Суперсемейства, объединяющие белки с общей топологией группируются в фолды. Фолды объединены в один из классов белков (α , β , $\alpha + \beta$, α/β и малые белки). На сегодняшний день действует версия SCOPe 2.05.

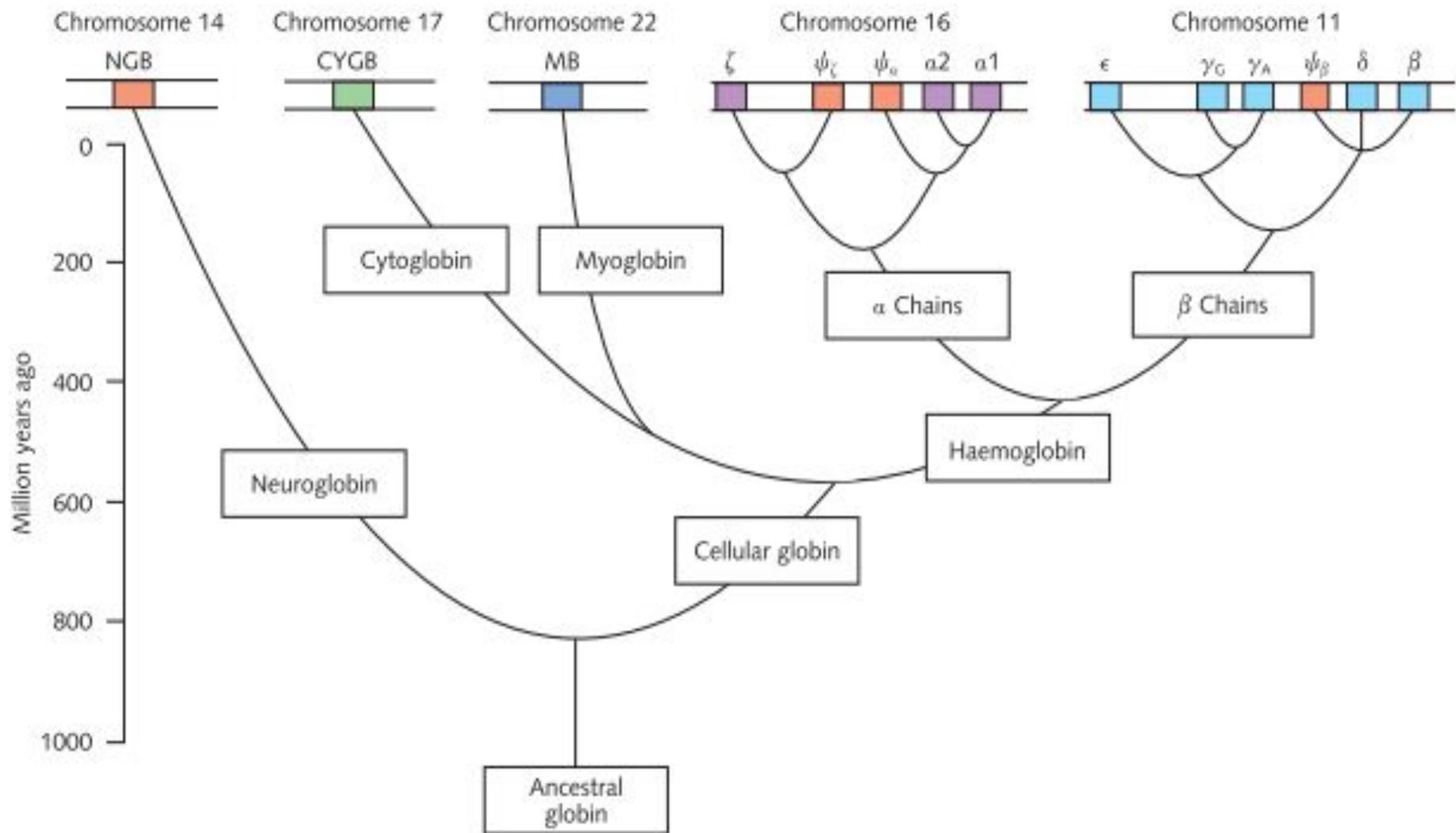
В некоторых случаях в ходе эволюции четвертичная структура может трансформироваться в третичную

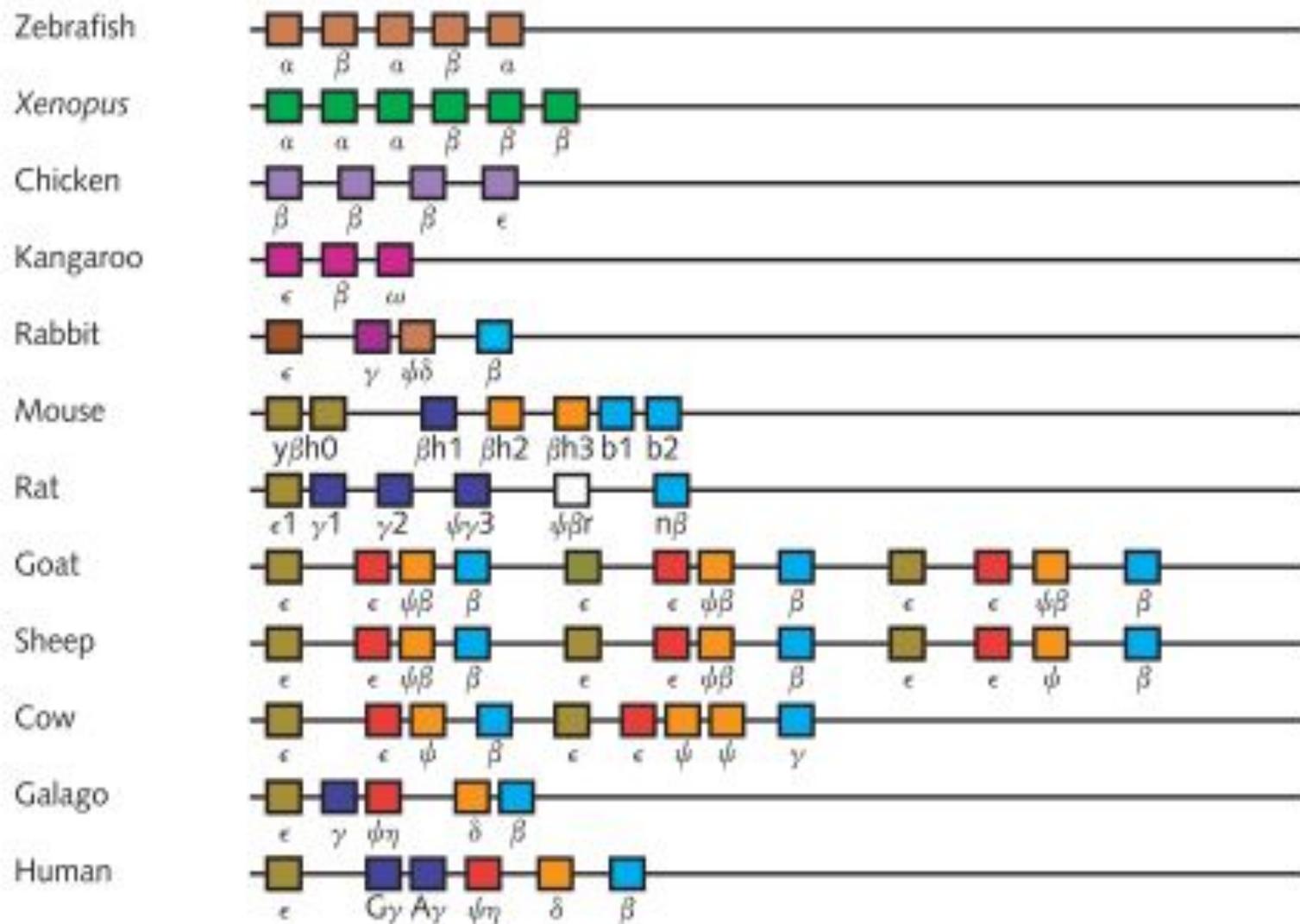
- Например, 5 отдельных ферментов *E. coli* которые катализируют последовательные этапы биосинтеза ароматических аминокислот, преобразованы в 5 регионов одного фермента у гриба *Aspergillus nidulans*.
- Отдельные функциональные единицы в общей цепи получили название «домены».
- Фибронектин – внеклеточный белок, отвечающий за клеточную адгезию и миграцию, содержит 29 доменов трёх типов (F1, F2, и F3), расположенных в виде тандемных повторов $(F1)_6(F2)_2(F1)_3(F3)_{15}(F1)_3$. «Изобретение» новых доменов нехарактерно для процессов эволюции, как правило, новые белки включают более сложные комбинации уже существующих доменов.



Глобины

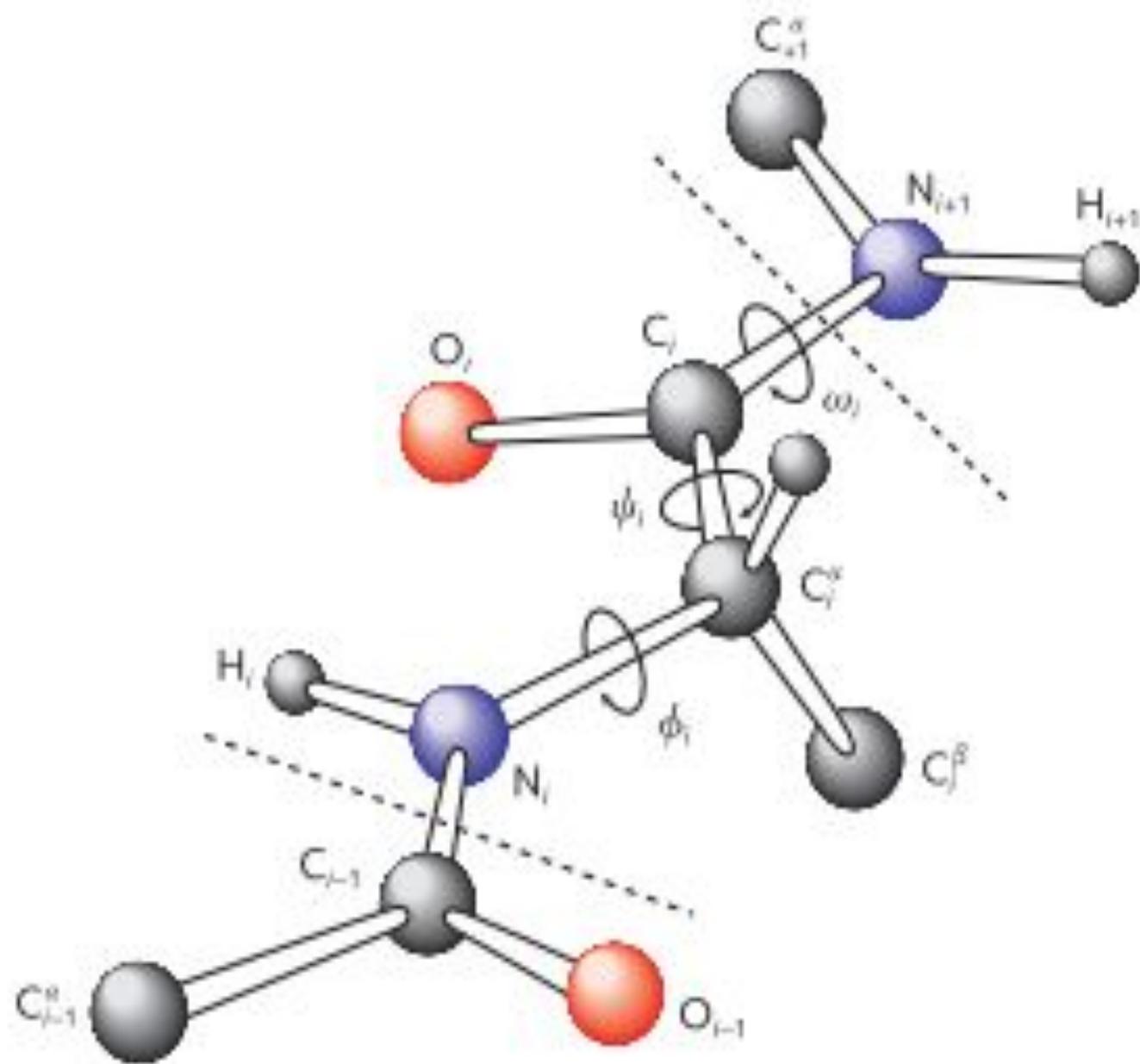
- Считается, что примитивный мономерный связывающий кислород глобин является прародителем современных гемоглобинов крови, мышечных миоглобинов и растительных леггемоглобинов. Сравнение последовательностей показало, что эволюция глобиновых белков параллельна эволюции животных и растений.
- Позднее дупликация генов породила и субъединицы гемоглобина. Гемоглобин - это тетрамер из двух и двух субъединиц. Структурное сходство этих субъединиц с леггемоглобином и миоглобином, оба из которых являются мономерами, очевидно. Молекула гема, нековалентно связанная с каждым полипептидом глобина, представляет собой фактическую кислородсвязывающую часть в этих белках.

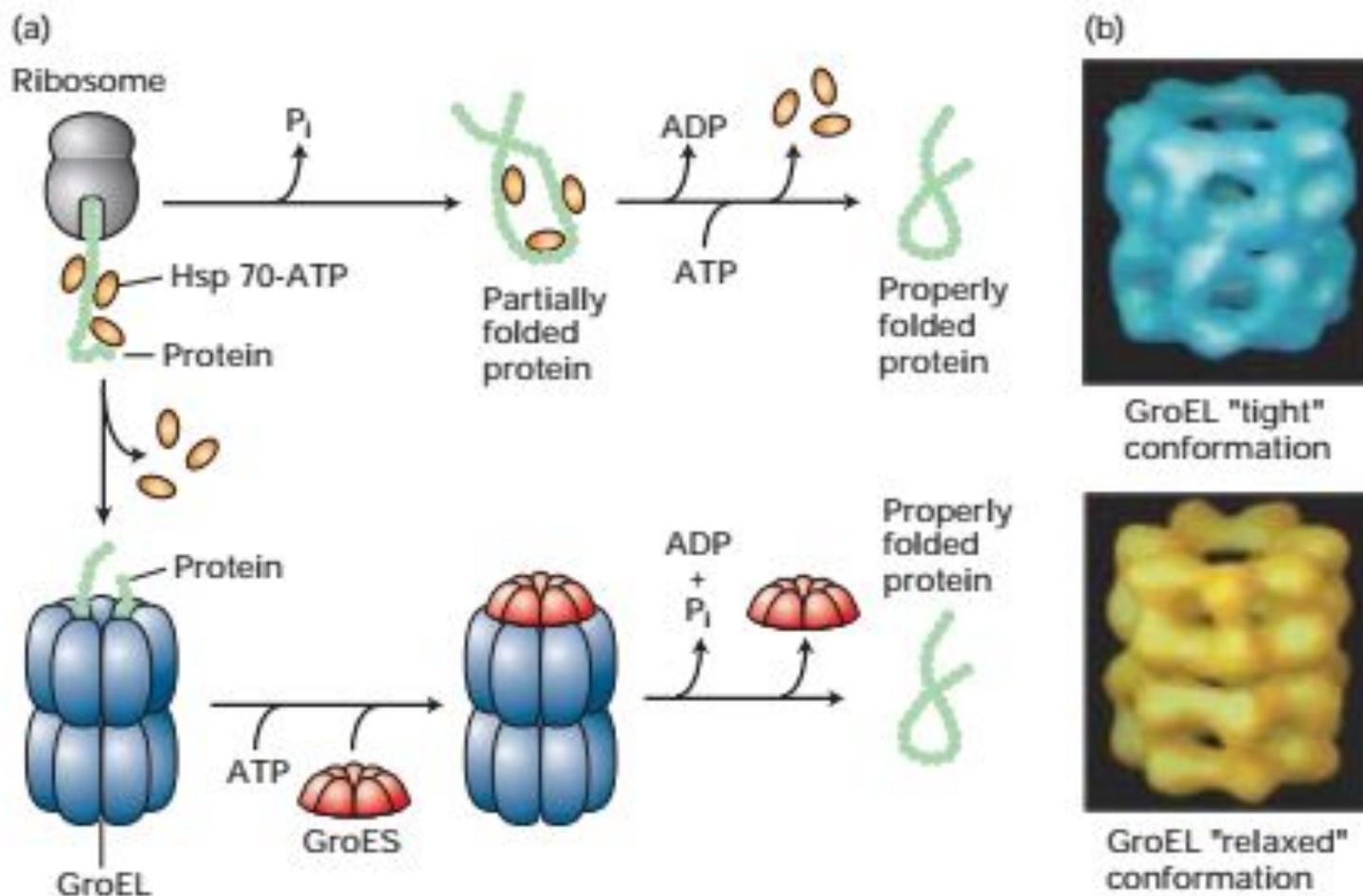




Информация – в первичной последовательности белка

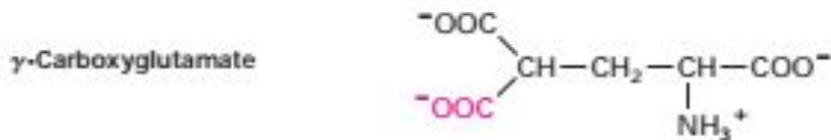
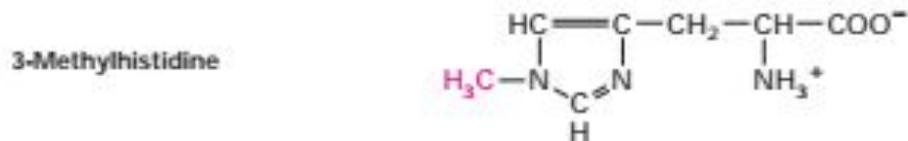
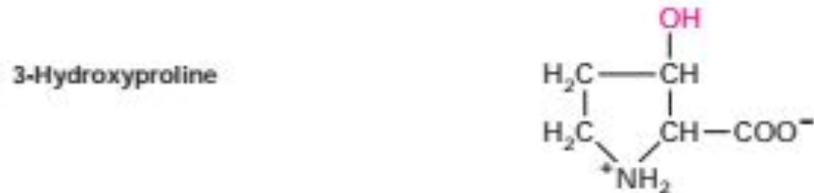
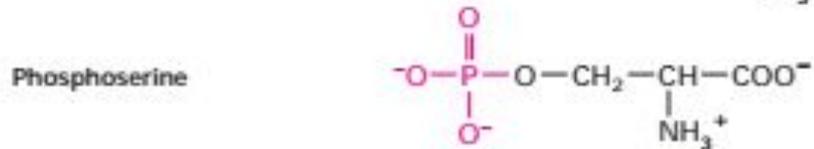
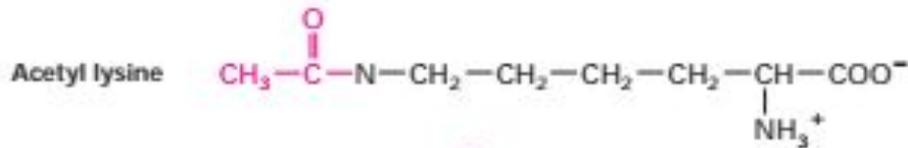
- Любая полипептидная цепь, содержащая n АК может складываться в $8n$ конформаций. Это значение основано на том факте, что в полипептидном каркасе допускается только восемь углов связи. В реальности белки принимают единую конформацию, называемую нативным состоянием; для подавляющего большинства белков нативное состояние является наиболее стабильно свернутой формой молекулы.
- Хотя фолдинг белка происходит *in vitro*, лишь небольшая часть молекул полностью складывается в нативную конформацию в течение нескольких минут. В клетке требуются более быстрый и более эффективный механизм, в противном случае клетки будут тратить много энергии на синтез нефункциональных белков и деградацию неправильно свернутых или развернутых белков. Более 95 процентов белков, присутствующих в клетках, имеют свою нативную конформацию, несмотря на высокие концентрации белка (200-300 мг/л), которые способствуют осаждению белков *in vitro*.





- Шаперон- и шаперонин-опосредованный фолдинг белков. а) Многие белки складываются в свои правильные трехмерные структуры с помощью Hsp70-подобных белков. Эти молекулярные шапероны временно связываются с зарождающимся полипептидом, когда он выходит из рибосомы. Правильное сворачивание других белков зависит от шаперонинов, таких как прокариотический GroEL, полый бочкообразный комплекс из 14 идентичных субъединиц по 60 000 Да, расположенных в двух сложенных кольцах.

Модификации аминокислот



•Ацетильные и другие группы могут быть добавлены к внутренним остаткам в белках. Важной модификацией является фосфорилирование остатков серина, треонина, тирозина и гистидина. Боковые цепи аспарагина, серина и треонина имеют сайты для гликозилирования, прикрепления линейных и разветвленные углеводные цепи.

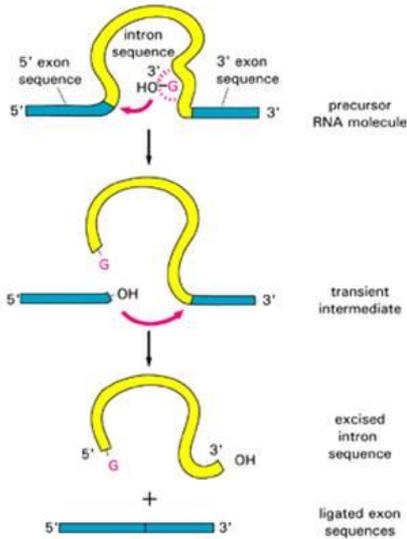
•Многие секретируемые и мембранные белки содержат гликозилированные остатки.

•Другие посттрансляционные модификации: гидроксиглирование остатков пролина и лизина в коллагене.

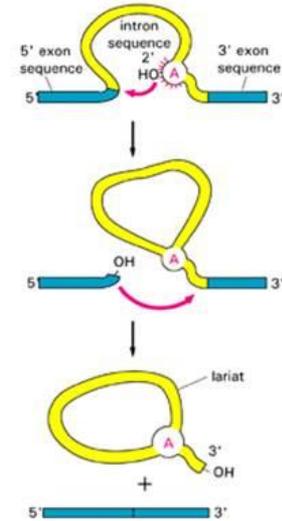
•Метилирование остатков гистидина в мембранных рецепторах и карбоксилирование глутамата в протромбине, факторе свертывания крови.

Автосплайсинг

Group I self-splicing intron sequences



Group II self-splicing intron sequences



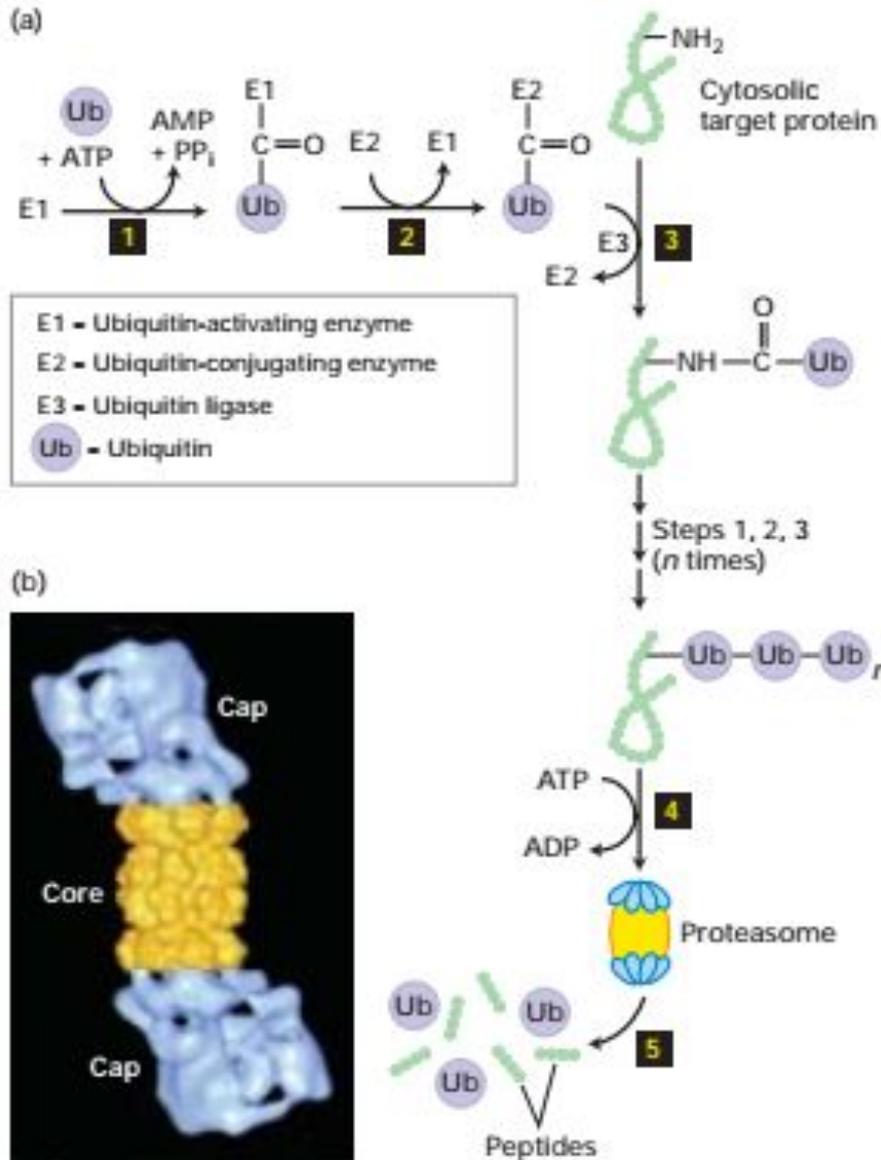
- У бактерий и некоторых эукариот происходит автосплайсинг. Процесс аналогичен монтажу пленки: внутренний сегмент полипептида удаляется, а концы полипептида воссоединяются.

Автосплайсинг – автокаталитический процесс. У позвоночных процессинг некоторых белков включает собственное расщепление, но последующий этап лигирования отсутствует.

Убиквитирование

- Один из главных механизмов – деградация под действием ферментов в лизосомах, мембранно-ограниченных органеллах, чье кислотное внутреннее пространство заполнено гидролитическими ферментами. Лизосомная деградация направлена, прежде всего, на внеклеточные белки, поглощенные клеткой, и на старые или дефектные органеллы клетки.
- Альтернатива – цитозольные механизмы расщепления белков. Главным среди этих механизмов является путь, который включает химическую модификацию боковой цепи лизина путем добавления убиквитина, полипептида из 76 остатков, с последующей деградацией меченного убиквитином белка с помощью специализированной протеолитической машины. Убиквитинирование - это трехступенчатый процесс.

Убиквитиновый протеолитический путь

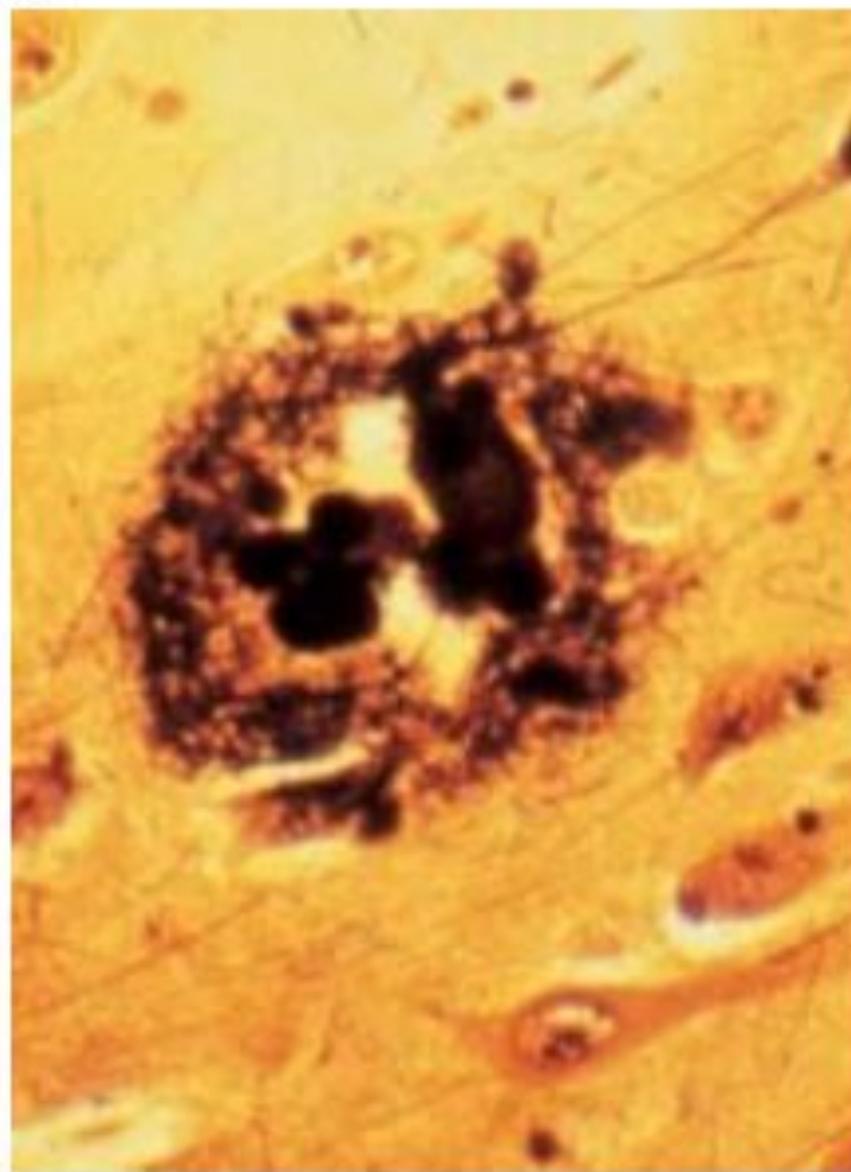


- а) Фермент E1 активируется присоединением убиквитина, затем переносит эту молекулу Ub в E2. Убиквитинлигаза (E3) переносит связанную молекулу Ub с E2 в боковую цепь - NH₂ остатка лизина в целевом белке.
- Дополнительные молекулы Ub добавляются путем повторения этапов - с образованием полиубиквитиновой цепи, которая направляет меченый белок в протеасому.
- (б) Протеасома имеет цилиндрическую структуру. Протеолиз меченных убиквитином белков происходит вдоль внутренней стенки ядра.

Альтернативный фолдинг как причина заболеваний

- Некоторые нейродегенеративные заболевания, в том числе болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона у людей и трансмиссивная губчатая энцефалопатия (болезнь «тяжелой коровы») у коров и овец, характеризуются образованием спутанных нитевидных бляшек в ухудшающемся мозге.
- Амилоидные филаменты, составляющие эти структуры, происходят из обильных природных белков, таких как белок-предшественник амилоида, который встроен в плазматическую мембрану, Таu, белок, связывающий микротрубочки, и прионный белок, «инфекционный» белок, наследование которого соответствует генетике Менделя.
- Под влиянием неизвестных причин эти спирали - содержащие белки или их протеолитические фрагменты складываются в альтернативный лист - содержащие структуры, которые полимеризуются в очень стабильные нити. Неясно, являются ли внеклеточные отложения этих нитей или растворимых альтернативно свернутых белков токсичными для клетки, неясно.

(a)



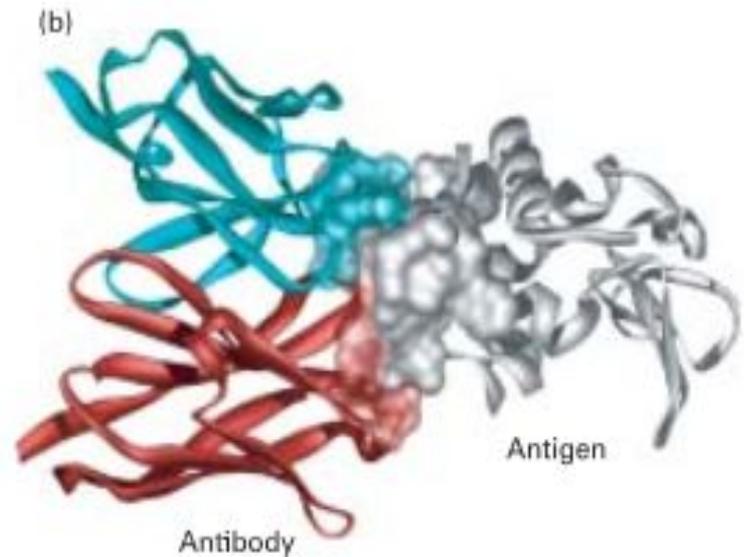
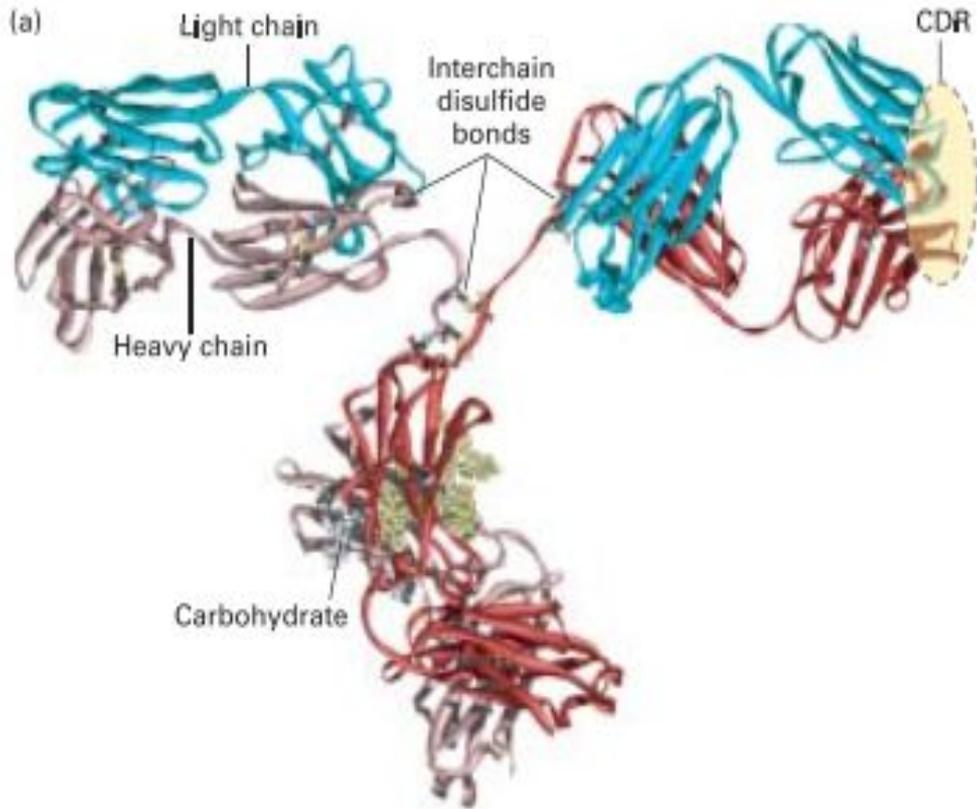
20 μm

(b)



100 nm

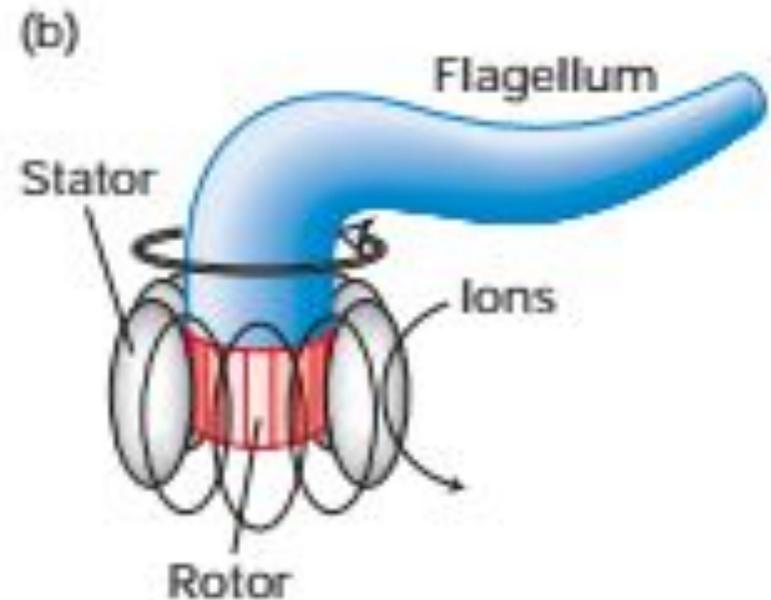
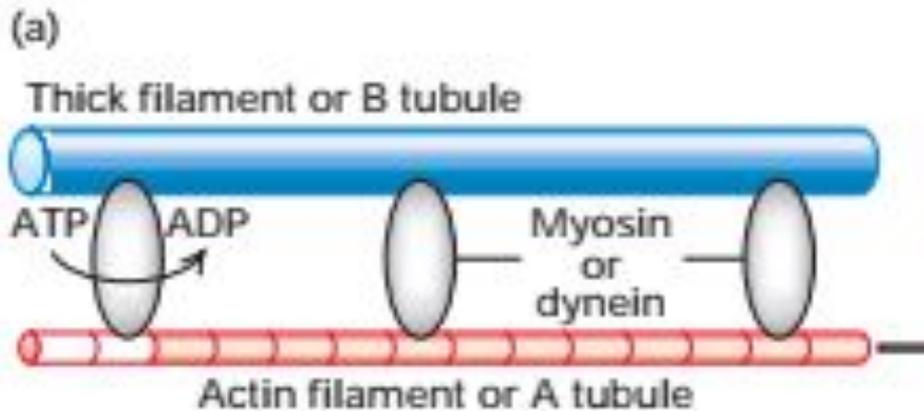
Специфичность и аффинность основаны на комплементарных взаимодействиях



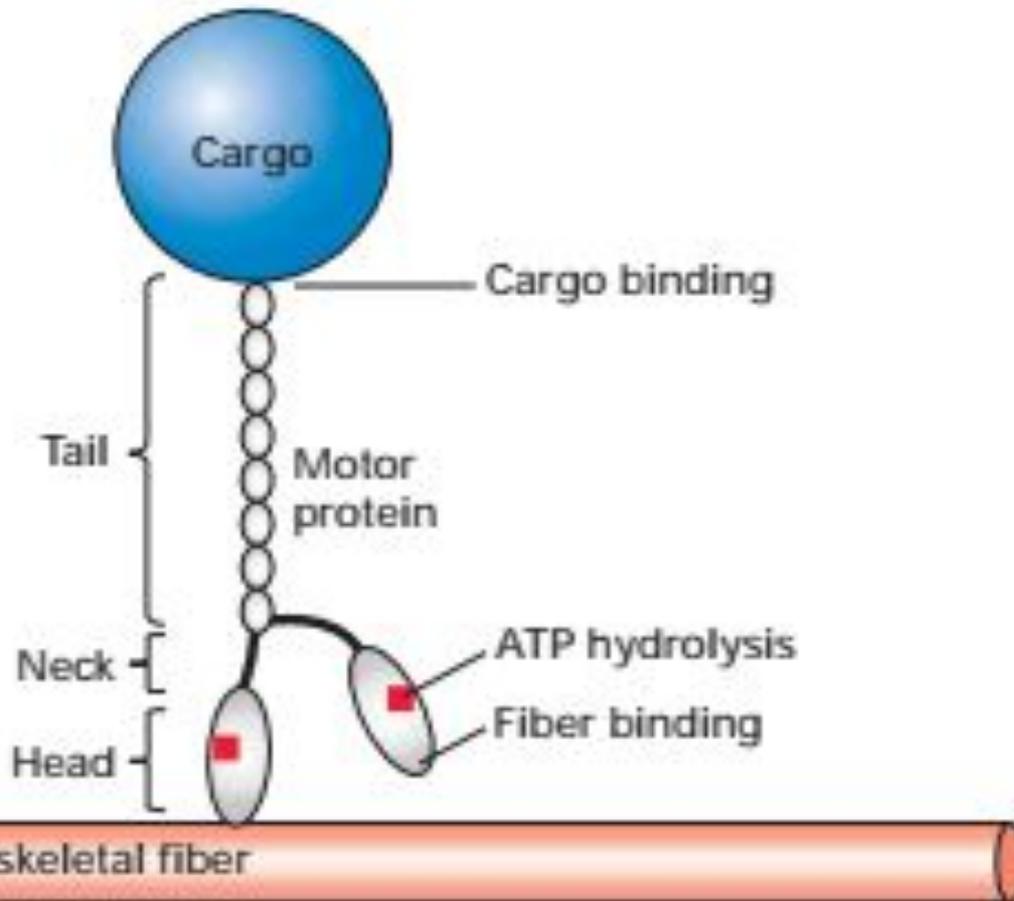
Молекулярные моторы и механическая работа в клетке

- Механохимические ферменты преобразуют энергию, выделяемую при гидролизе АТФ или из ионных градиентов, в линейное или вращательное движение.
- Существует группа включающая миозины, кинезины и динеины - линейные двигательные белки, которые несут прикрепленный «груз» с ними, когда они протекают либо по микрофиламентам, либо по микротрубочкам.
- ДНК- и РНК-полимеразы также являются линейными моторными белками, поскольку они транслоцируются вдоль ДНК во время репликации и транскрипции. Напротив, роторные двигатели вращаются, чтобы вызвать биение бактериальных жгутиков, упаковывать ДНК в капсид вируса и синтезировать АТФ.

Линейный и вращающийся молекулярный мотор

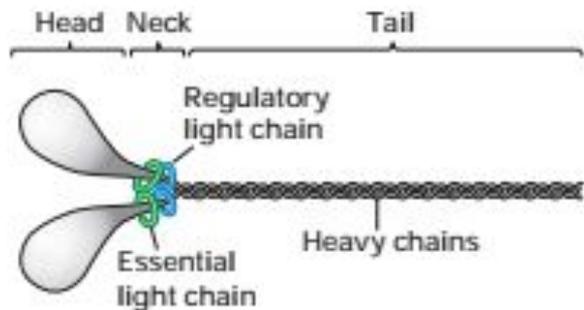


Перемещение груза с помощью моторного белка

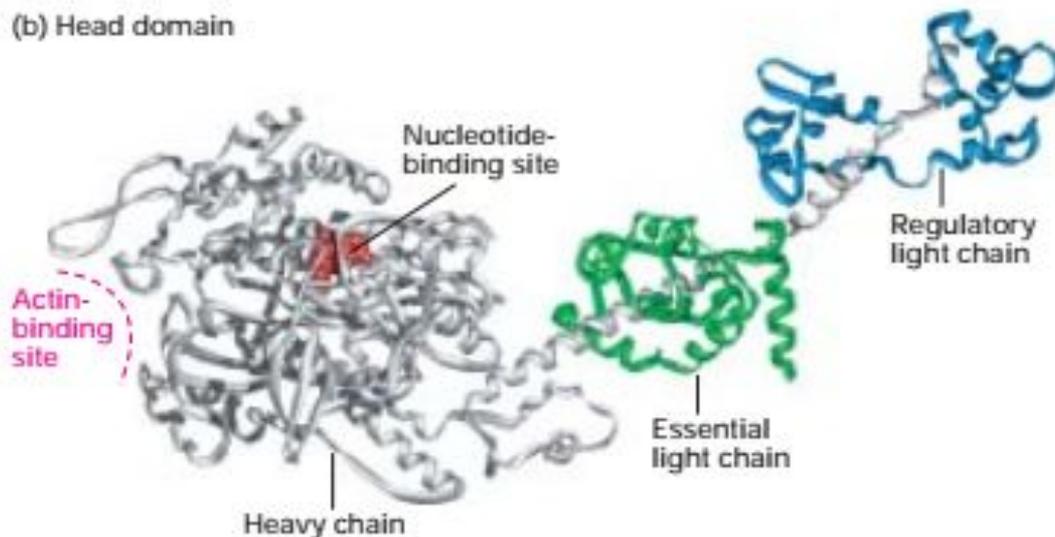


- Головные домены моторных белков миозина, динеина и кинезина связываются с волокном цитоскелета (микрофиламентами или микротрубочками), а хвостовой домен прикрепляется к одному из различных типов груза - в данном случае - везикуле с ограниченной мембраной.
- Гидролиз АТФ в головном домене заставляет головной домен «ходить» по дорожке в одном направлении посредством повторяющегося цикла конформационных изменений.

(a) Myosin II



(b) Head domain



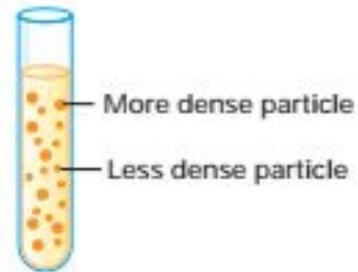
- Структура миозина II. (а) Миозин II димерный белок, из двух идентичных тяжелых цепей (белый) и четырех легких цепей (синий и зеленый). Каждый из головных доменов преобразует энергию от гидролиза АТФ в движение. Две легкие цепи связаны с доменом шеи каждой тяжелой цепи.
- (б) Трехмерная модель домена с одной головкой показывает, что он имеет изогнутую, вытянутую форму и разделен пополам большой расщелиной. Нуклеотидсвязывающий карман лежит на одной стороне этой расщелины, а актинсвязывающий сайт лежит на другой стороне около кончика головы.

Очистка и анализ белков

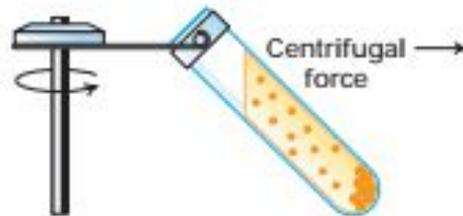
- Центрифугирование подвергает частицы действию центробежных сил в 1000000 раз превышающим силу тяжести g , которая может осадить частицы размером до 10 кДа. Ультрацентрифуги достигают скорости 150 000 оборотов в минуту (об/мин) или выше.
- Однако мелкие частицы с массой 5 кДа или менее не будут оседать равномерно даже при таких высоких скоростях вращения ротора. Центрифугирование используется для двух основных целей: (1) в качестве подготовительного метода для отделения одного типа материала от других и (2) в качестве аналитического метода для измерения физических свойств (например, молекулярной массы, плотности, формы и констант равновесного связывания) макромолекул.
- Константа седиментации белка s является мерой скорости его седиментации. Константа седиментации обычно выражается в svedbergs (S): $1 S = 10^{-13}$ секунд.

(a) Differential centrifugation

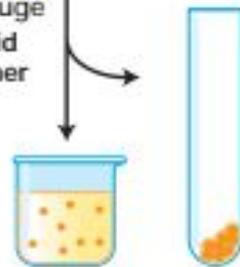
1 Sample is poured into tube



2 Centrifuge
Particles settle according to mass

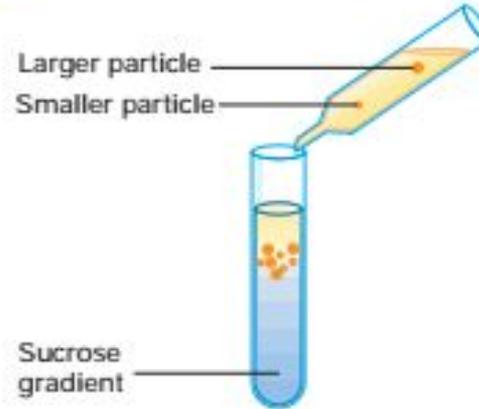


3 Stop centrifuge
Decant liquid into container

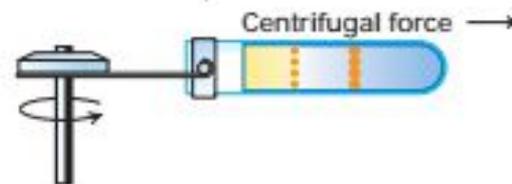


(b) Rate-zonal centrifugation

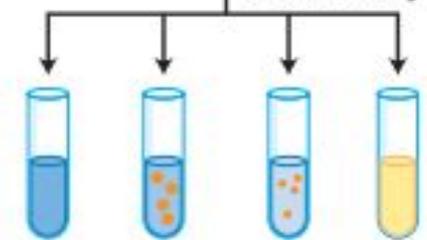
1 Sample is layered on top of gradient



2 Centrifuge
Particles settle according to mass



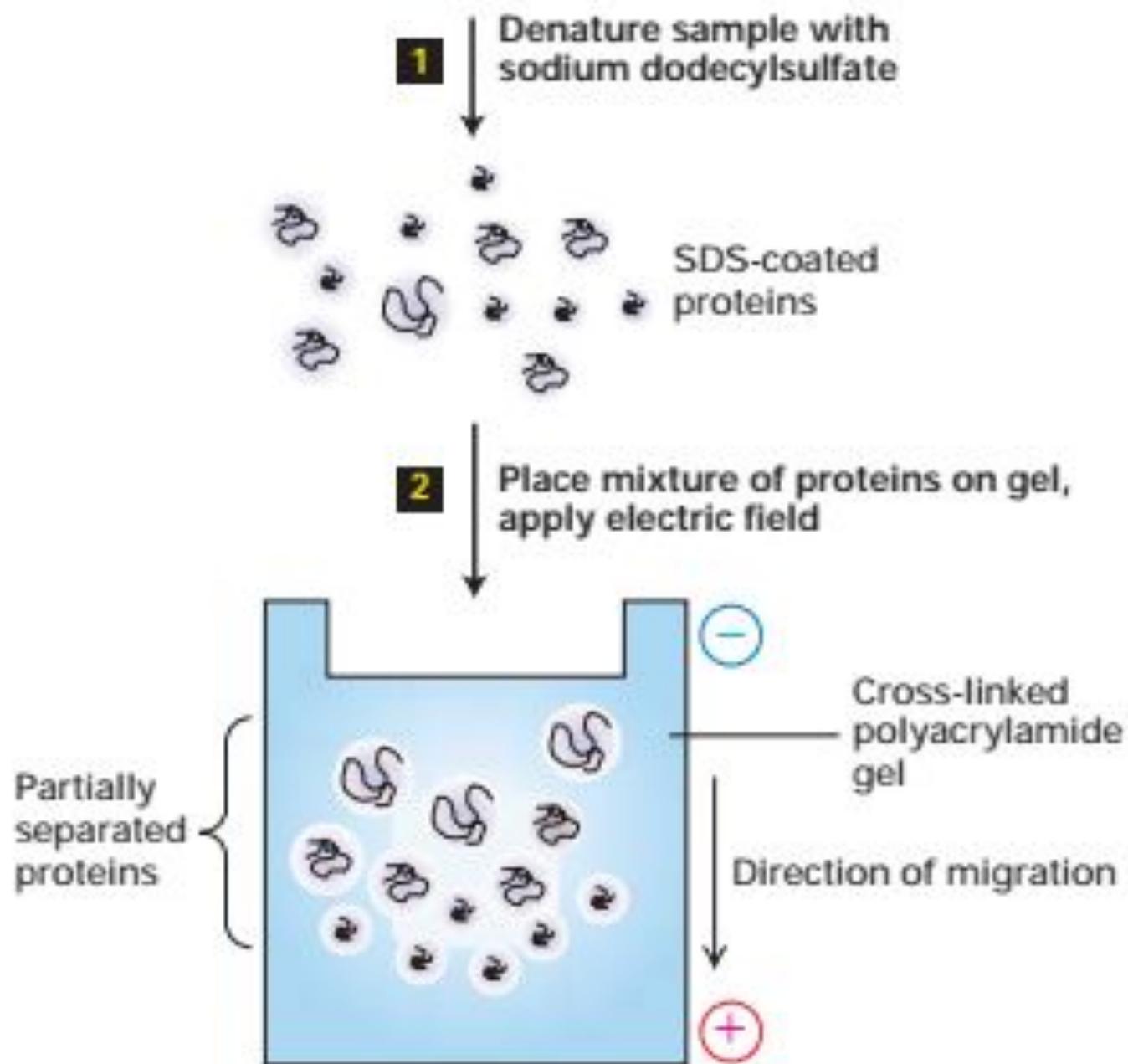
3 Stop centrifuge
Collect fractions and do assay



Decreasing mass of particles

Электрофорез

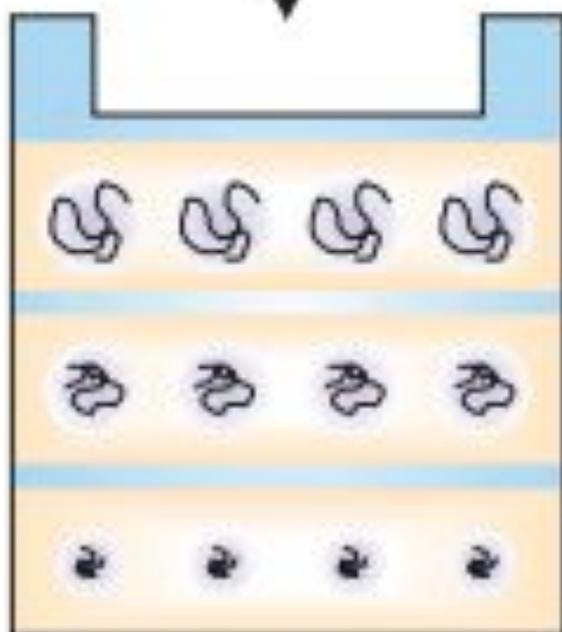
- Электрофорез - это метод разделения молекул в смеси под воздействием приложенного электрического поля. Растворенные молекулы в электрическом поле движутся или мигрируют со скоростью, определяемой соотношением их заряда: массы.
- Электрофорез в SDS-полиакриламидном геле. Поскольку многие белки или нуклеиновые кислоты, которые различаются по размеру и форме, имеют почти одинаковые соотношения заряд: масса, электрофорез этих макромолекул в растворе приводит к незначительному разделению молекул разной длины или его отсутствию.
- Электрофоретическое разделение белков чаще всего выполняется в полиакриламидных гелях. Когда смесь белков наносится на гель и подается электрический ток, меньшие белки мигрируют быстрее.



3

Stain to visualize separated bands

Decreasing size



(a)

Separate
in first
dimension
by charge

Protein
mixture

1

pH 4.0

Isoelectric
focusing (IEF)

pH 10.0

Apply first gel
to top of second

2

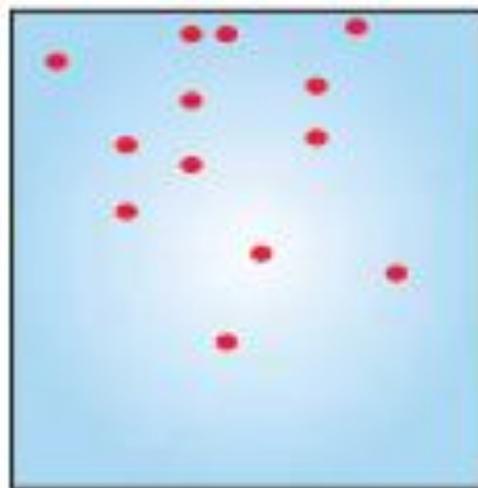
pH 4.0

pH 10.0

Separate
in second
dimension
by size

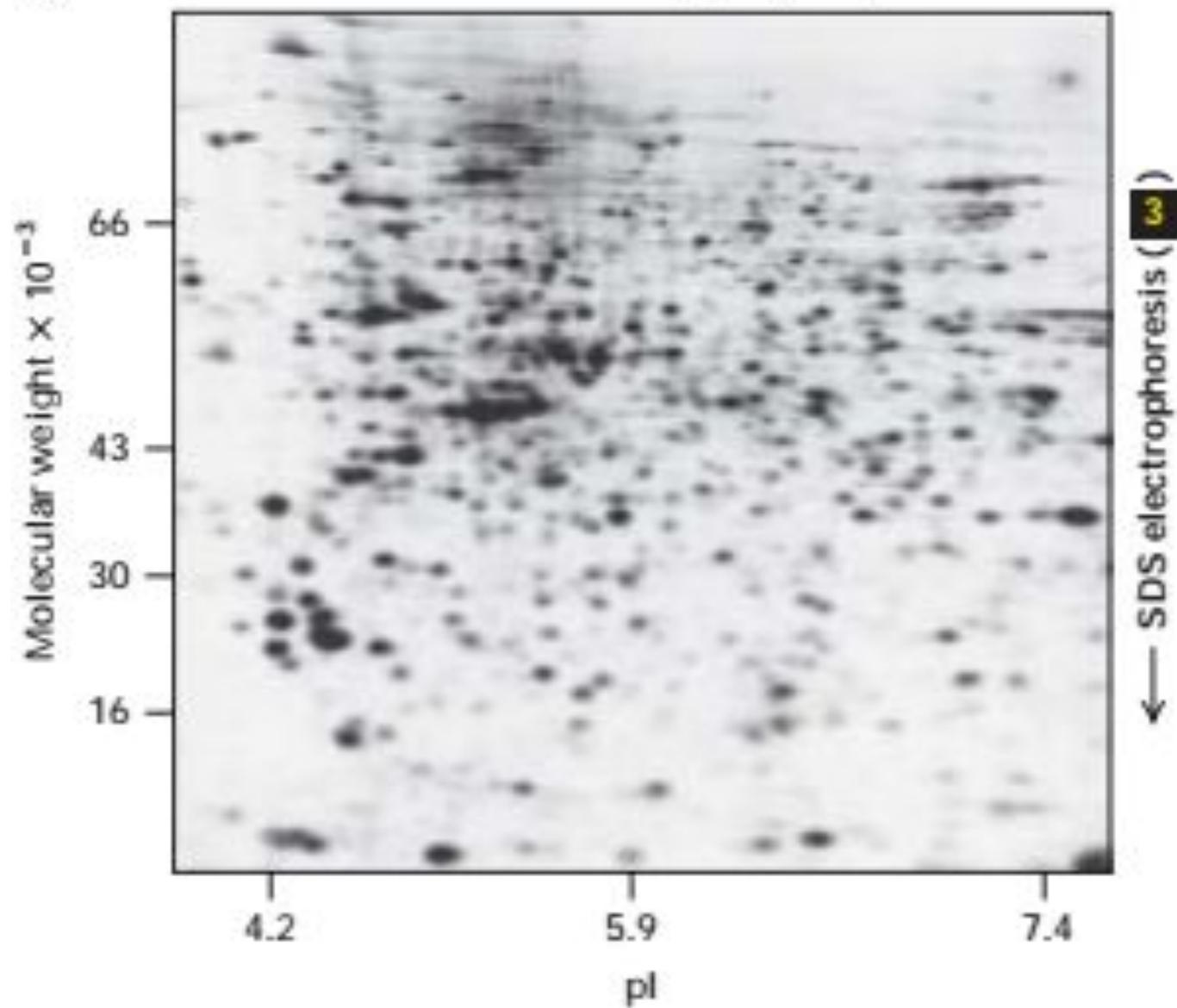
3

SDS
electrophoresis

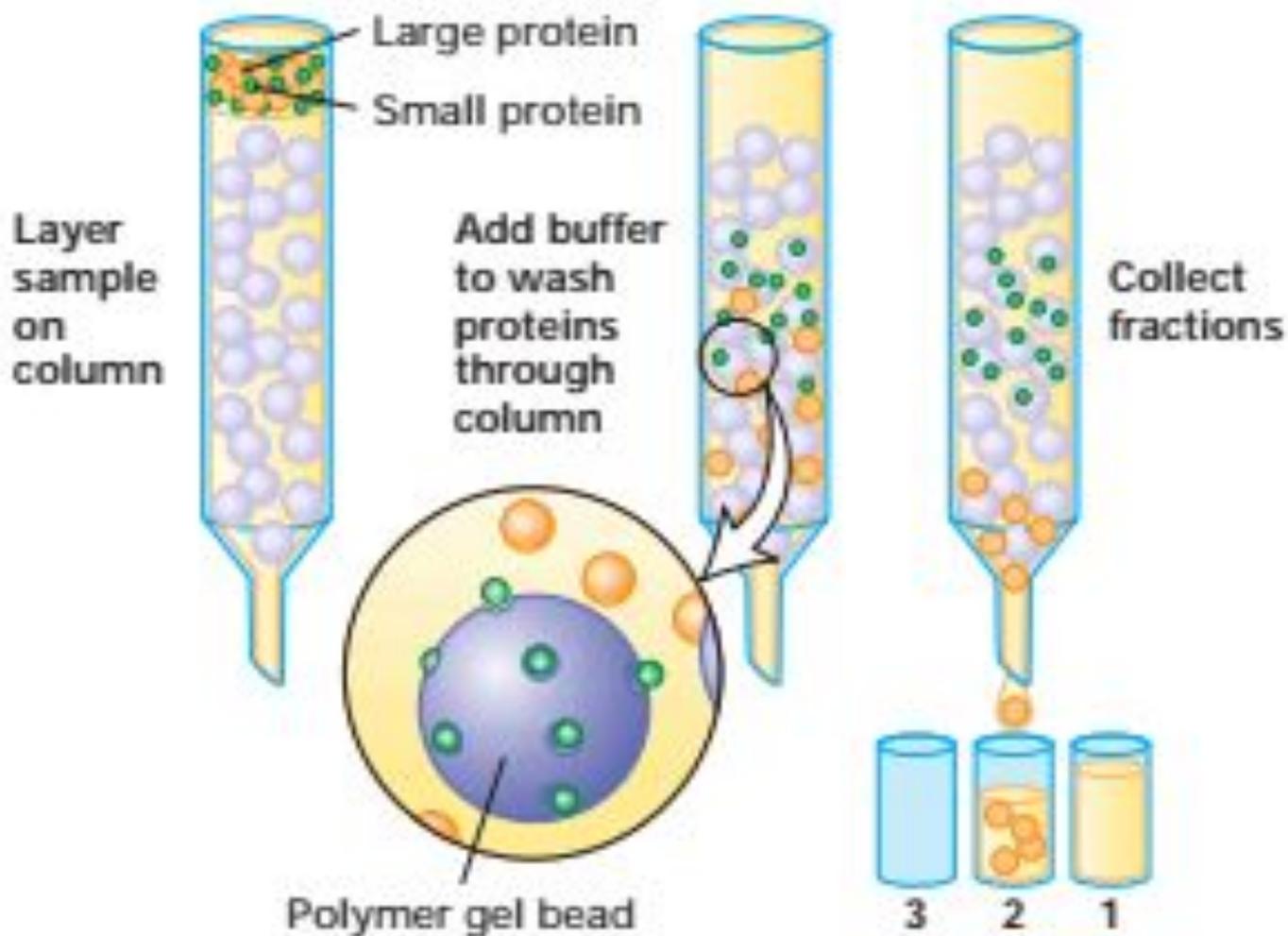


(b)

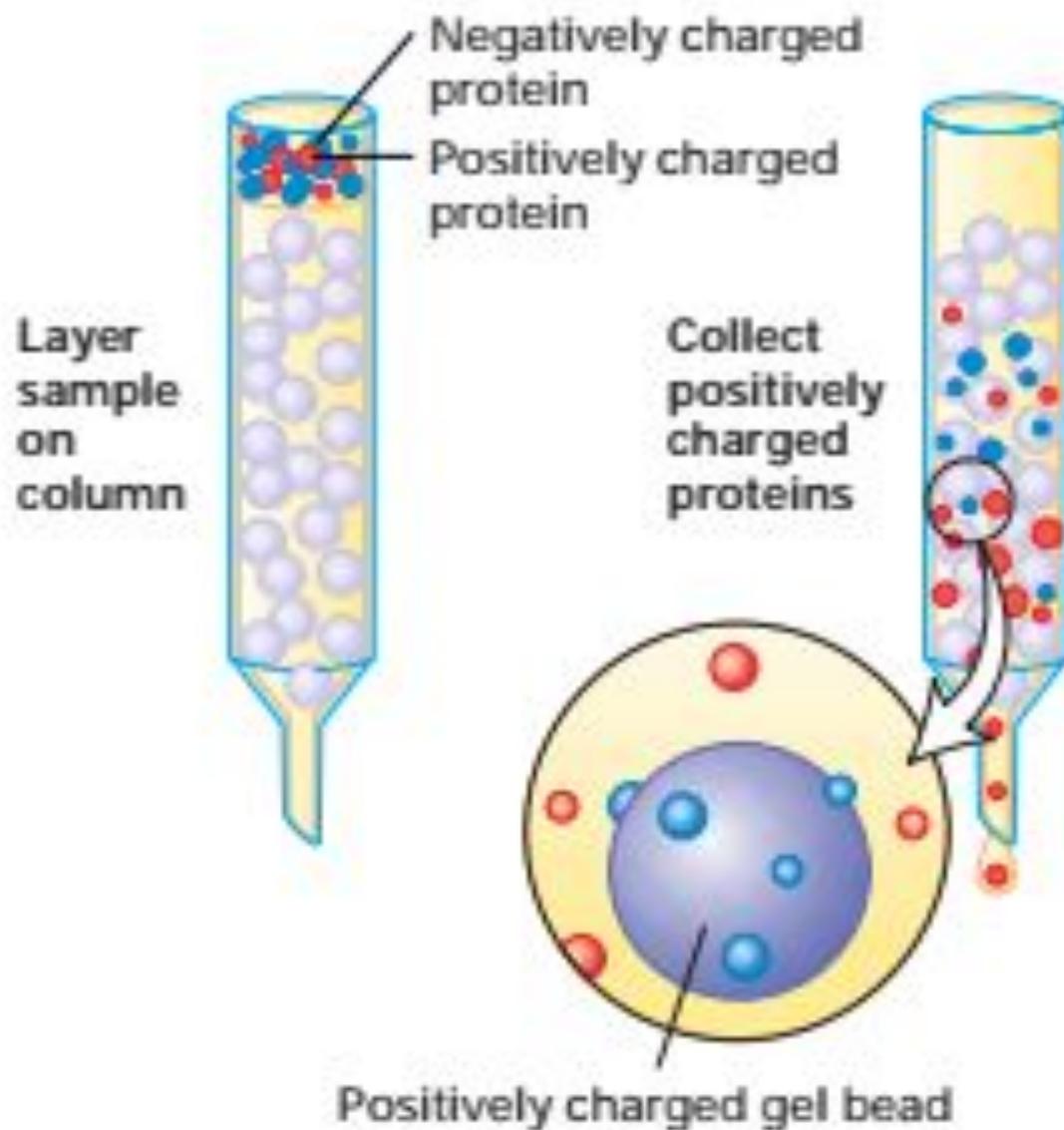
Isoelectric focusing (1) →



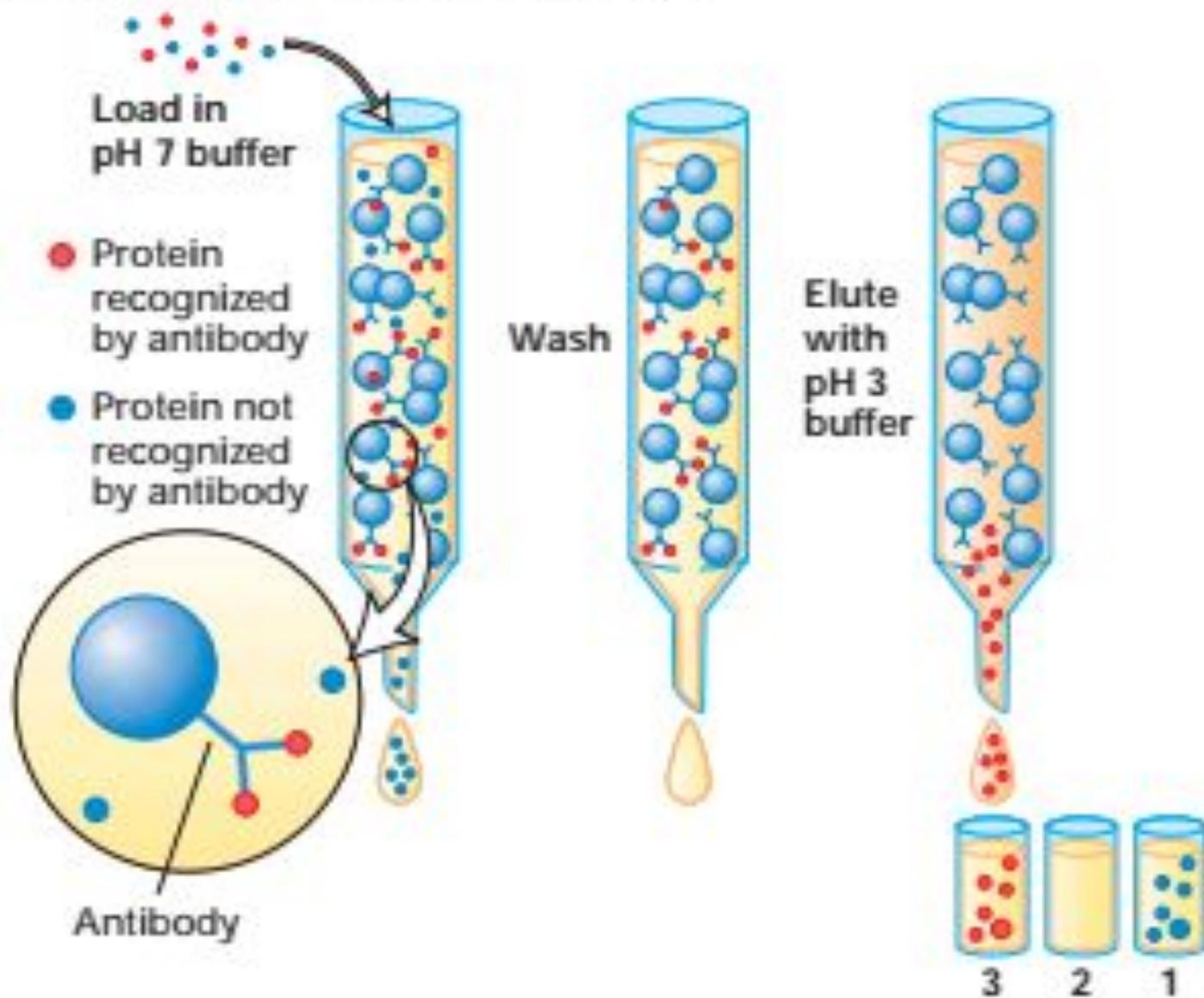
(a) Gel filtration chromatography



(b) Ion-exchange chromatography

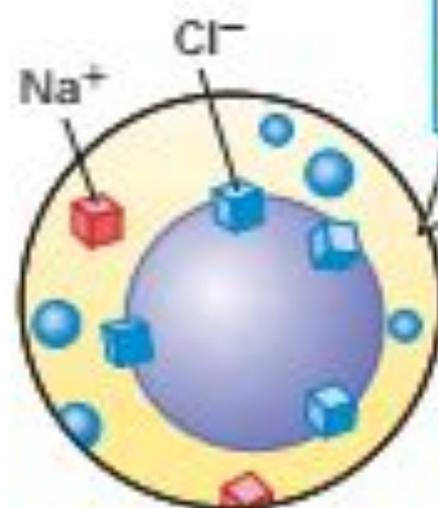


(c) Antibody-affinity chromatography

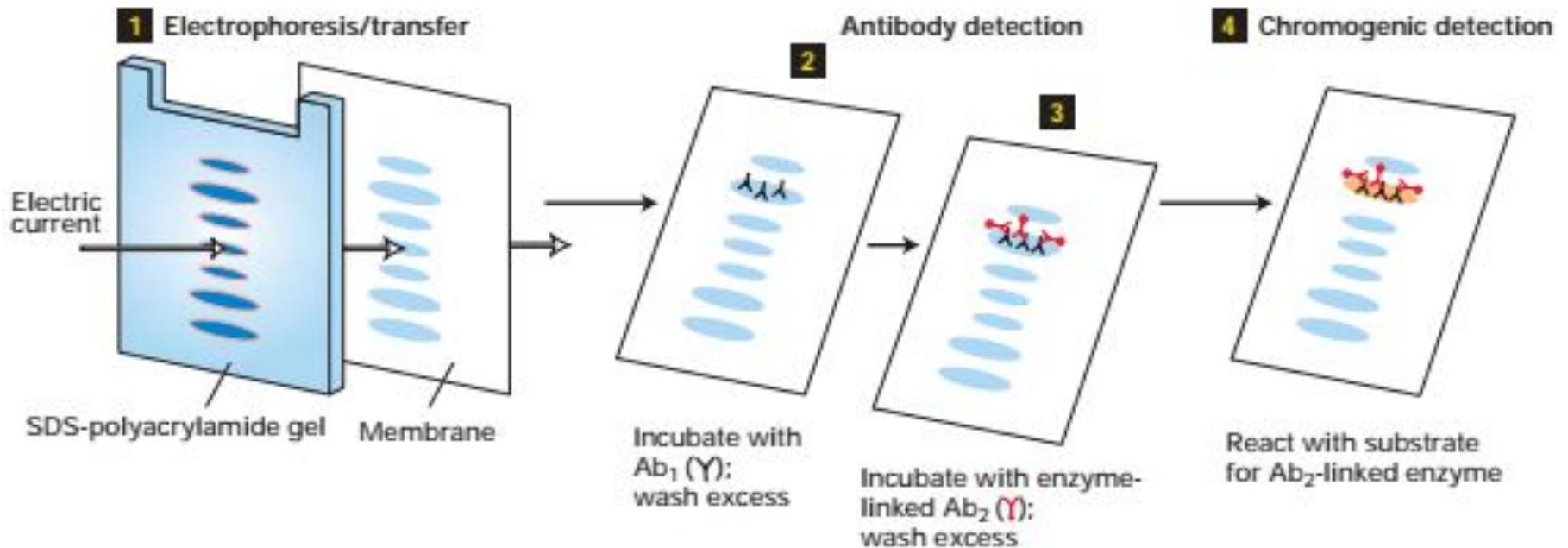




Elute negatively charged protein with salt solution (NaCl)  

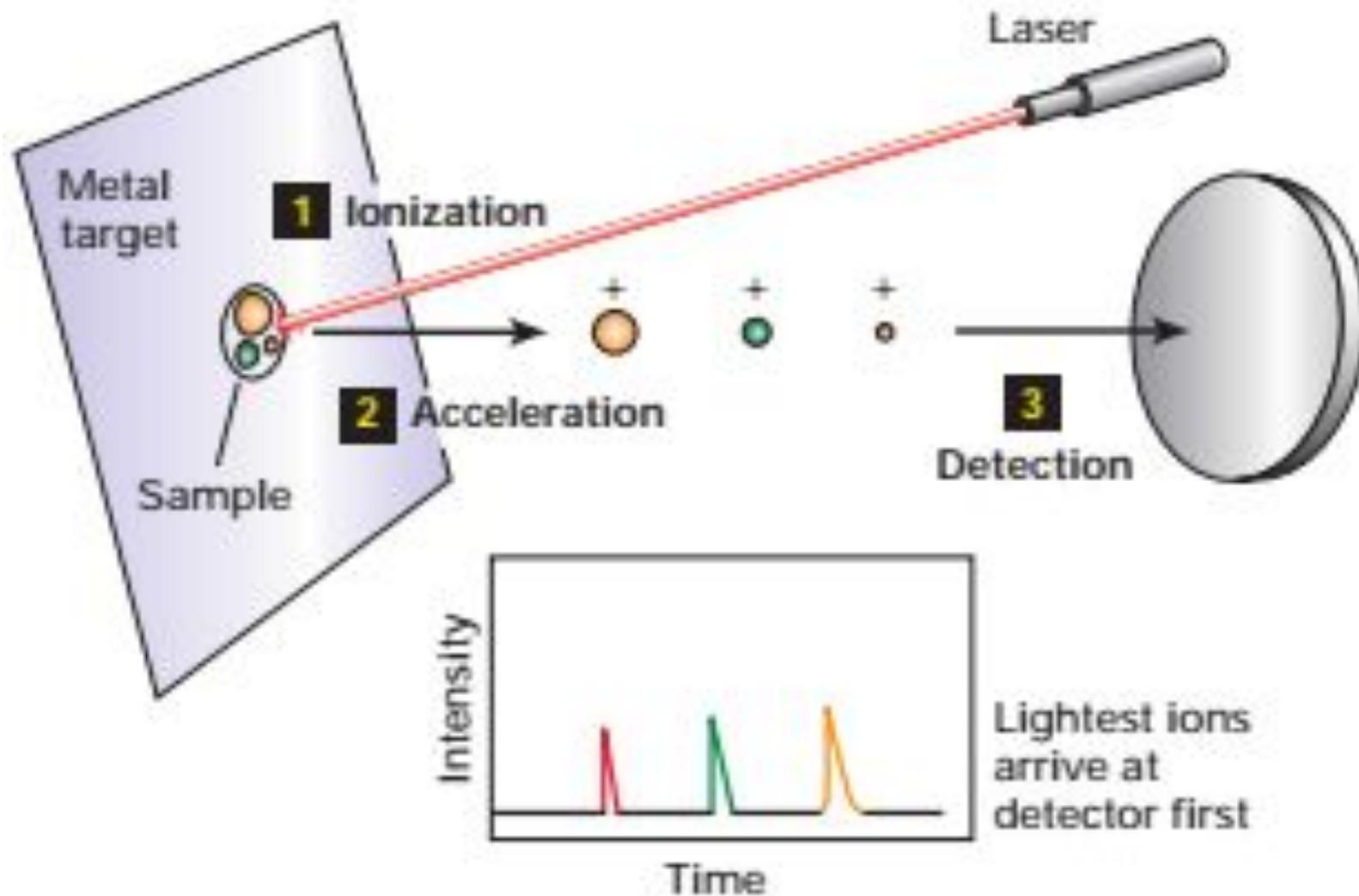


ИммуноблотТИНГ

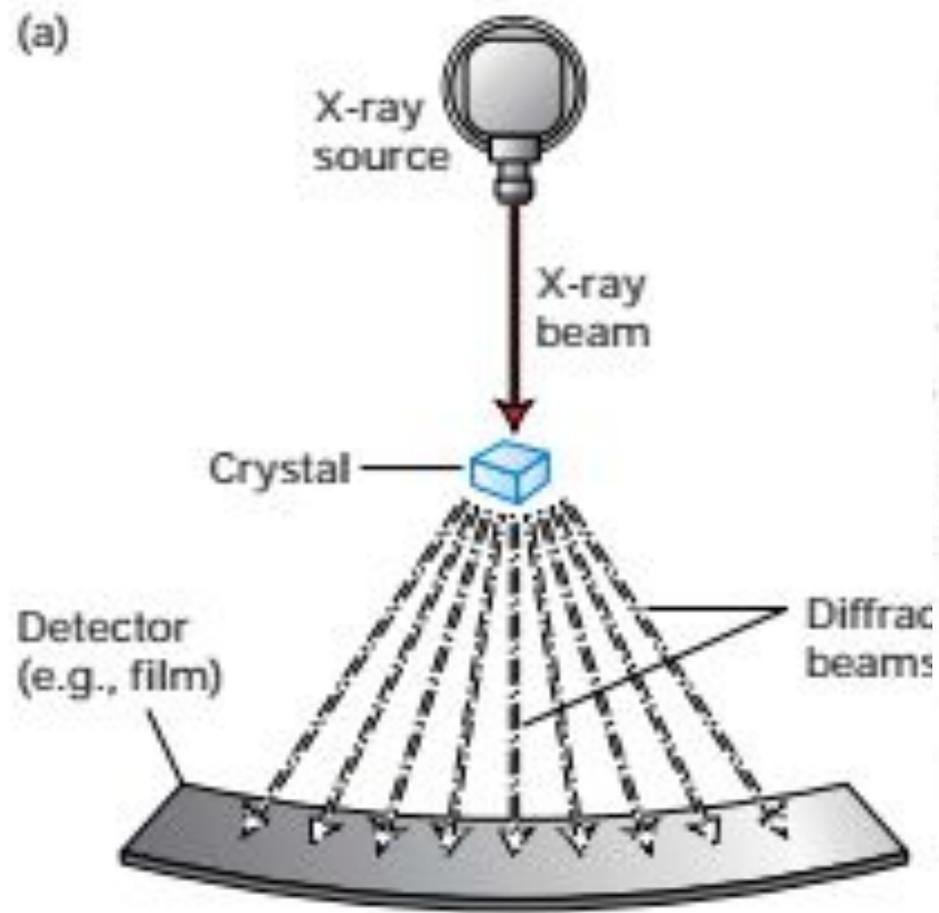


Изотоп	Период полураспада
Фосфор-32	14,3 дня
Иод-125	60,4 дня
Сера-35	87,5 дней
Тритий	12,4 лет
Углерод-14	5730,4 лет

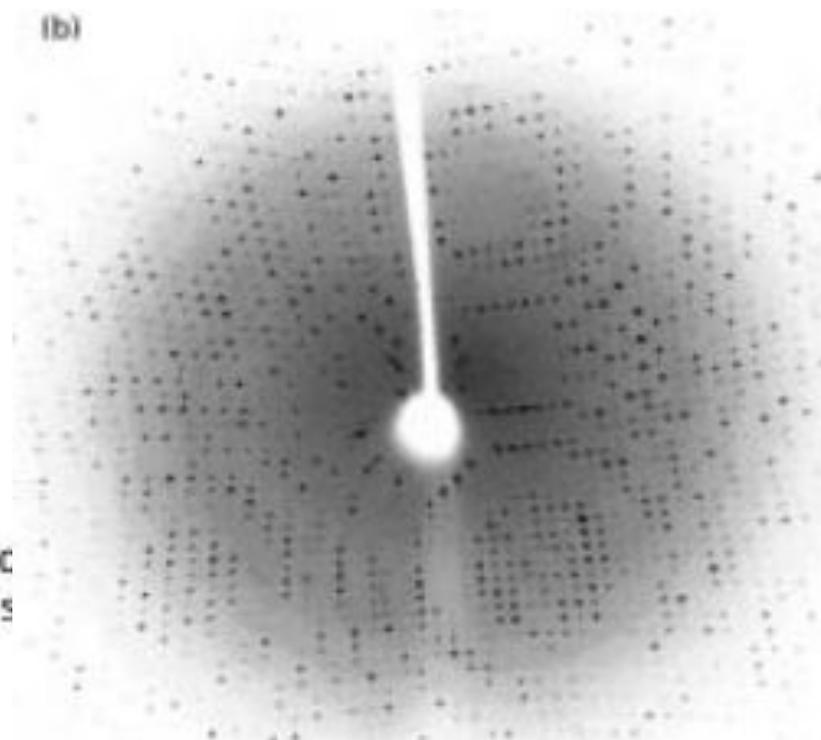
Молекулярный вес пептидов можно измерить с помощью масс-спектрометрии



(a)



(b)



Рентгеновская кристаллография

- Рентгеновская кристаллография для определения трехмерных структур белков была впервые использована Максом Перуцем и Джоном Кендрю в 1950-х годах. В этой технике пучки рентгеновских лучей пропускаются через кристалл белка, в котором миллионы молекул белка точно выровнены друг с другом в жестком массиве, характерном для белка.
- Длина волны рентгеновского излучения составляет около 0,1 - 0,2 нм, достаточно разрешения для того, чтобы зафиксировать положение атомов в кристалле белка, рассеивающих рентгеновские лучи, которые создают дифракционную картину дискретных пятен, когда они перехватываются фотопленкой.

Спасибо за внимание!

