

Структурно-функциональные основы протеомики

Первичная структура белка

Лекция 2



План лекции

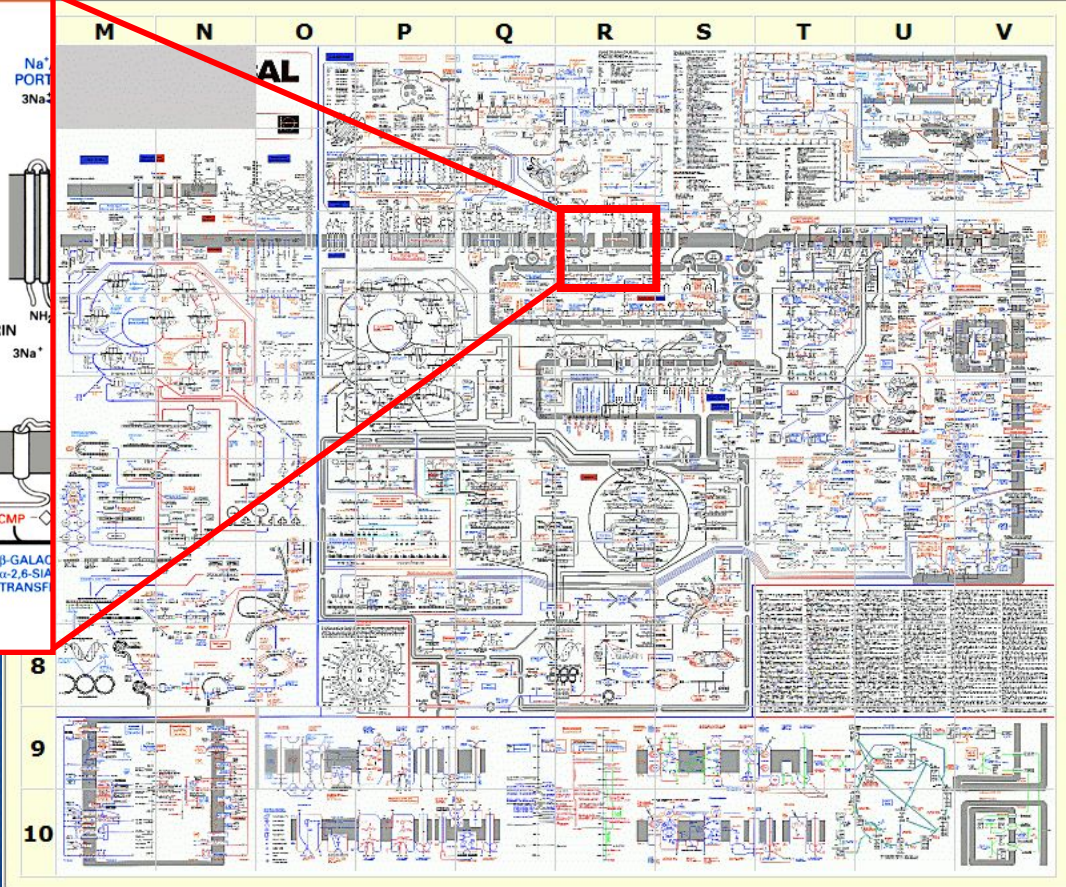
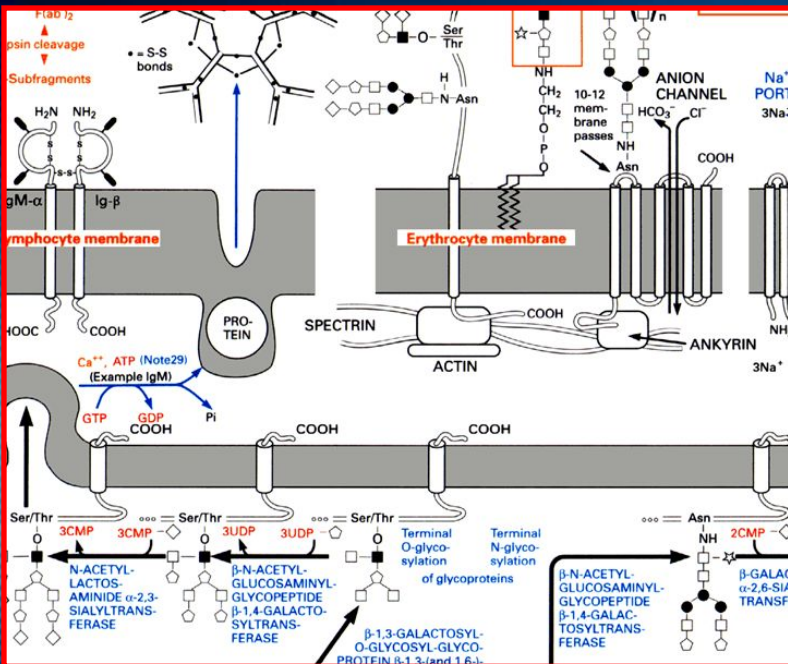


1. Свойства аминокислот
2. Химический состав белков
3. Первичная структура

A surreal landscape featuring a large green planet on the left, a real moon in the sky, a river flowing through a green field, a tree with orange leaves, and a building in the distance.

Свойства аминокислот

Жизнь – функционирование молекулярных сетей



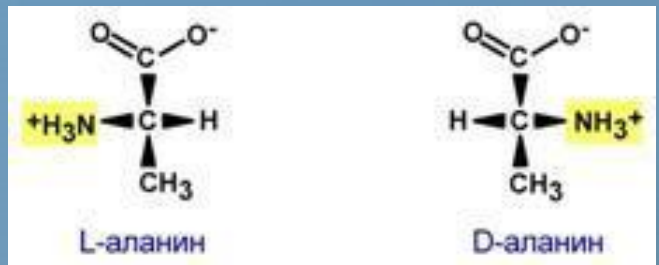
Молекулярная сеть в клетке

(Из ExPASy Biochemical Pathways; http://www.expasy.org/cgi-bin/show_thumbnails.pl?2)

Аминокислоты – структурные единицы белка



Боковые цепи, **R**, определяют свойства 20 аминокислот.



Аминокислот – 20

Оптически неактивных – 1

Содержащих хиральный α C – 19

Содержащих хиральный β C – 2

В рибосомальном синтезе используются только L-аминокислоты

20 аминокислот

Glycine (G)



Alanine (A)



Valine (V)



Isoleucine (I)



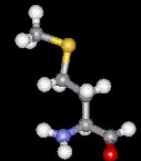
Leucine (L)



Proline (P)



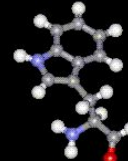
Methionine (M)



Phenylalanine (F)



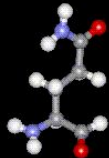
Tryptophan (W)



Asparagine (N)



Glutamine (Q)



Serine (S)



Threonine (T)



Tyrosine (Y)



Cysteine (C)



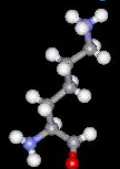
Asparatic acid (D)



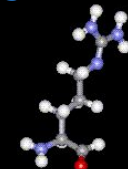
Glutamic acid (E)



Lysine (K)



Arginine (R)



Histidine (H)



White: Hydrophobic, Green: Hydrophilic, Red: Acidic, Blue: Basic

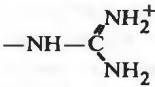
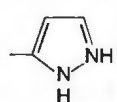
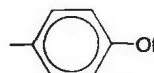
задача



- Сколько полипептидных последовательностей с длиной полипептидной цепи 5 аминокислотных остатков можно составить из оптически активных аминокислот, при условии, что все эти полипептиды содержат 3 аминокислотных остатка, несущих при pH 7.0 положительный заряд на боковой цепи, которые располагаются друг за другом?

Ионизационное равновесие в белках

ЗНАЧЕНИЯ pK_a ДЛЯ ИОНИЗУЕМЫХ ГРУПП В АМИНОКИСЛОТАХ¹⁾

Аминокислота	α -COOH	α -NH ₃ ⁺	Боковая группа	pK_a в аминокислоте	Ожидаемое значение pK_a в белке
Аланин	2,3	9,9	-	-	-
Аргинин	1,8	9,0		12,5	≥ 12
Аспарагин	2,0	8,8	-	-	-
Аспарагиновая кислота	2,0	10,0	-COOH	3,9	4,4-4,6
Цистеин	1,8	10,8	-SH	8,3	8,5-8,8
Глутаминовая кислота	2,2	9,7	-COOH	4,3	4,4-4,6
Глутамин	2,2	9,1	-	-	-
Глицин	2,4	9,8	-	-	-
Гистидин	1,8	9,2		6,0	6,5-7,0
Изолейцин	2,4	9,7	-	-	-
Лейцин	2,4	9,6	-	-	-
Лизин	2,2	9,2	-NH ₃ ⁺	10,8	10,0-10,2
Метионин	2,3	9,2	-	-	-
Фенилаланин	1,8	9,1	-	-	-
Пролин	2,0	10,6	-	-	-
Серин	2,1	9,2	-	-	-
Треонин	2,6	10,4	-	-	-
Триптофан	2,4	9,4	-	-	-
Тирозин	2,2	9,1		10,9	9,6-10,0
Валин	2,3	9,6	-	-	-

Методы исследования:

1. Потенциометрическое титрование
2. ЯМР
3. Спектроскопия поглощения

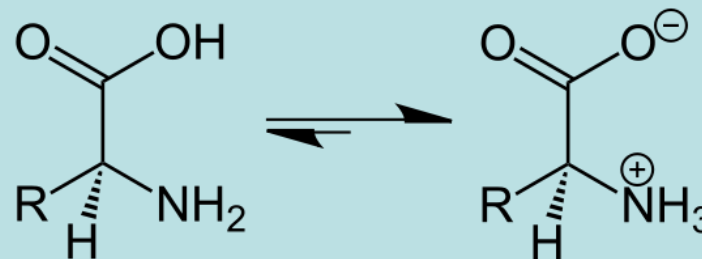
pK_a , НАБЛЮДАЕМЫЕ ДЛЯ ИОНИЗУЕМЫХ ГРУПП В НЕКОТОРЫХ БЕЛКАХ¹⁾

Аминокислота или группа	Белок	pK_a ²⁾
Аспарагиновая и глутаминовая кислоты	Лизоцим (3 из 16 групп)	Д
	β -Лактоглобулин (49 из 51 группы)	4,8
	(2 из 51 группы)	7,3
	Сывороточный альбумин	4,0
Гистидин	Инсулин	4,7
	Миоглобин (6 из 12 групп)	Д
	(6 из 12 групп)	6,6
	β -Лактоглобулин	7,4
Тирозин	Лизоцим	6,8
	Инсулин	6,4
	Сывороточный альбумин	6,9
	Химотрипсиноген (1 из 4 групп)	9,7
	(1 из 4 групп)	10,4
Лизин	(2 из 4 групп)	П
	Инсулин	9,6
	Сывороточный альбумин	10,4
	Рибонуклеаза (3 из 6 групп)	9,6
Аргинин	Сывороточный альбумин	9,8
	Лизоцим	10,4
	Химотрипсиноген (3 из 13 групп)	П
α -Карбоксил	Инсулин	11,9
	-	3,6

Ионизация амино- и карбоксильных групп

При pH 7.0:
α-аминогруппа протонирована (+)
α-карбоксильная группа депротонирована (-)

Аминокислоты существуют в виде цвиттериона



Ионизация α-аминогрупп и α-карбоксильных групп аминокислот отличается от тех же групп в составе полипептидов

Полярность боковых групп АК

Ala, Val, Leu, Ile

Phe, Trp, Met

Glu, Asp, Lys, Arg

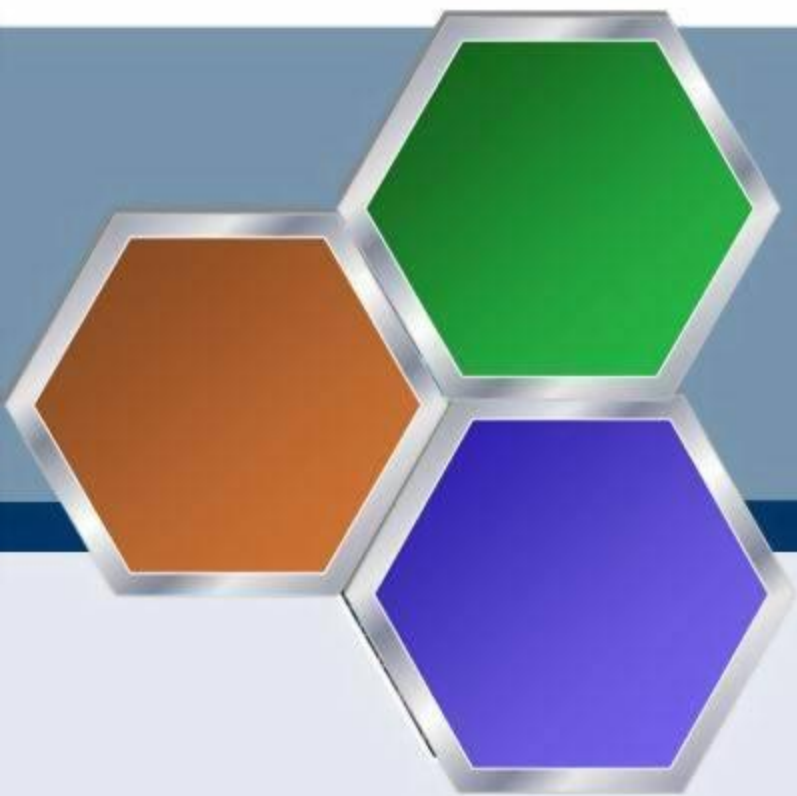
Ser, Thr

?Cys, His, Pro, Tyr, Gly

Сравнение растворимости аминокислот в полярных и неполярных растворителях поможет ответить на вопросы об их полярности. Свободная энергия переноса боковой группы в системе этанол-вода

Остаток	Тип аминокислоты	Растворимость цвиттерионной формы при 25°C, моль/кг	$\Delta G_{\text{пер}}$, ккал/моль EtOH \rightarrow H ₂ O
Trp	Неполярная	0,07	3,00
Ile	Неполярная	0,26	2,95
Tyr	Неполярная ³⁾	< 0,00	2,85
Phe	Неполярная	0,17	2,65
Leu	Неполярная	0,16	2,40
Val	Неполярная	0,50	1,70
Met	Неполярная	0,38	1,30
Cys ¹⁾	Неполярная	< 0,00	1,00
Ala	Неполярная	1,86	0,75
Gly	Неполярная ³⁾	3,33	0,00
His	Не определен	—	—
Pro	Полярная ³⁾	14,1	2,60
Ser	Полярная	4,02	—
Thr	Полярная	—	0,45
Asn	Полярная	0,19	—
Glu	Полярная	0,29	—
Asp	Заряженная	0,04 ²⁾	—
Glu	Заряженная	0,06 ²⁾	—
Lys	Заряженная	3,95 ⁴⁾	1,50
Arg	Заряженная	4,06 ⁴⁾	0,75

Химический состав белков



Аминокислотный состав

Автоматические методы анализа АК состава

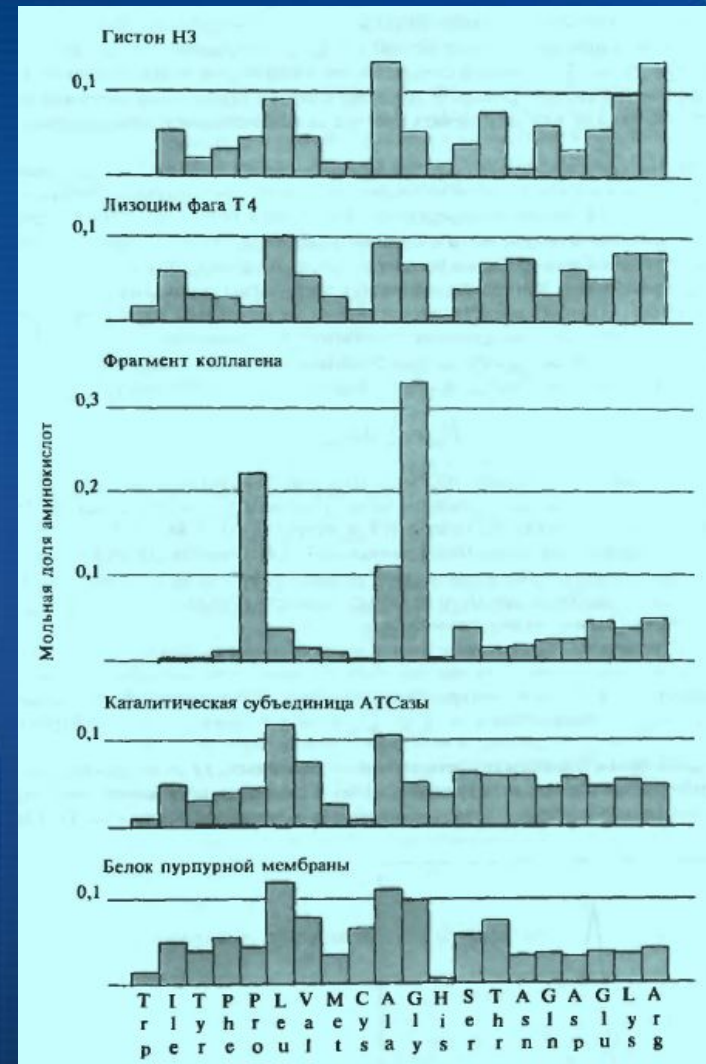
	АК
Редкие	Обычные
Met, Trp	Ala, Leu

Шкала средней гидрофобности белков

$$H_{\phi} = \sum_i \Delta G_{пер}^i \chi_i \text{ ал/моль}$$

Встречаемость боковых групп

$$R = \frac{\sum_k \chi_k}{\sum_j \chi_j}$$



Предсказание свойств белков по аминокислотному составу

k – Arg, Lys, His, Gly, Glu, Asp, Asn
j – Ile, Tyr, Phe, Leu, Val, Met

R_3 сильно различается для внутренних и внешних мембранных белков, H_ϕ - нет

СРАВНЕНИЕ R_3 и H_ϕ ДЛЯ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ¹⁾

Средняя переменная	205 немембранных белков	24 мембранных белка	
		считающиеся внутренними	считающиеся внешними
R_3	1,26 ± 0,42	0,59 ± 0,18	1,37 ± 0,35
H_ϕ	0,996 ± 0,098	1,197 ± 0,097	0,986 ± 0,075

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ¹⁾

Белок	H_ϕ , ккал	Z	Схематическое представление
Рецептор ацетилхолина	1,184	0,37	
Субъединица 1	1,182	0,38	
Субъединица 2	1,119	0,29	
Субъединица 3	1,140	0,31	
Субъединица 4	1,140	0,31	
Ацетилхолинэстераза	1,059	0,25	
Цитохромоксидаза	1,185	0,45	
Субъединица 1	1,185	0,51	
Субъединица 2	1,011	0,25	
Субъединица 4	1,033	0,16	
Субъединица 6	1,029	0,14	
Na ⁺ — K ⁺ -АТРаза	1,272	0,42	
Большая субъединица	1,248	0,42	
Малая субъединица	1,309	0,44	
Родопсин (бычий)	1,208	0,51	
Белок пурпурной мембраны	1,247	0,56	

Разграничение внутренних и внешних мембранных белков с помощью дискриминантной функции

$$Z = -0,345R_3 + 0,60H_\phi$$

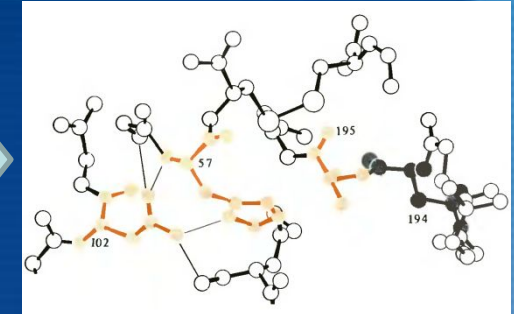
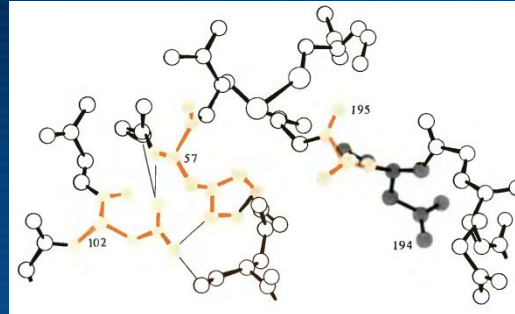
Локализация	Z
Немембранные	0,16
Внутренние мембранные	0,52±0,11
Внешние мембранные	0,12±0,16

Аминокислотный состав некоторых мембранных белков

Белок	\bar{N}_ϕ , ккал	Z	Схематическое представление
Рецептор ацетилхолина	1,184	0,37	
Субъединица 1	1,182	0,38	
Субъединица 2	1,119	0,29	
Субъединица 3	1,140	0,31	
Субъединица 4	1,140	0,31	
Ацетилхолинэстераза	1,059	0,25	
Цитохромоксидаза	1,185	0,45	
Субъединица 1	1,185	0,51	
Субъединица 2	1,011	0,25	
Субъединица 4	1,033	0,16	
Субъединица 6	1,029	0,14	
Na ⁺ — K ⁺ -АТРаза	1,272	0,42	
Большая субъединица	1,248	0,42	
Малая субъединица	1,309	0,44	
Родопсин (бычий)	1,208	0,51	
Белок пурпурной мембраны	1,247	0,56	

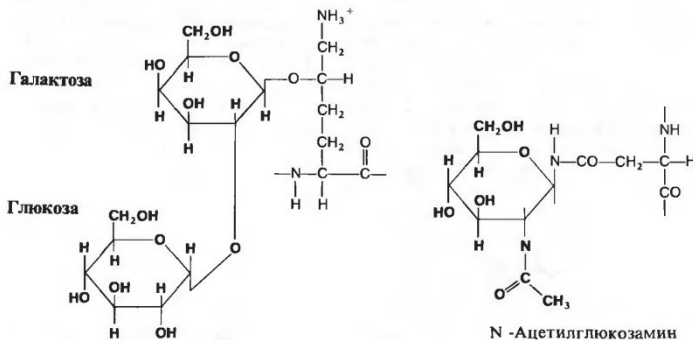
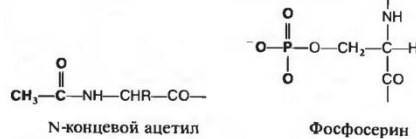
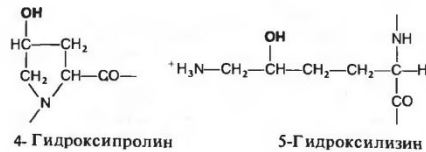
Необычные аминокислоты

- посттрансляционные модификации
- нерибосомный синтез



Трипсиноген Lys15-Ile16 Трипсин

Разрыв одной пептидной связи вызывает появление чрезвычайно высокой ферментативной активности – заряд на Ile16 вызывает значительные структурные перестройки, образование солевого мостика с Asp194 и изменении взаимной ориентации каталитически активных АК остатков.



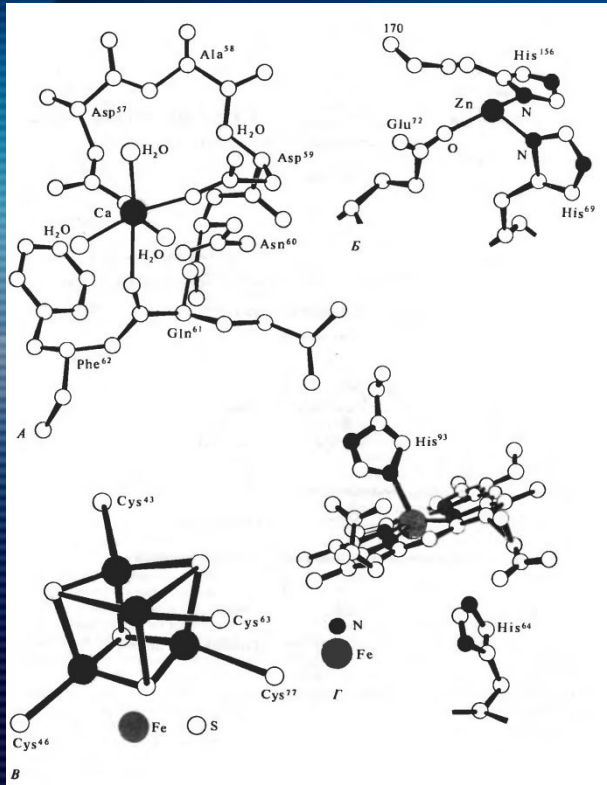
Фосфорилирование – существенно изменяет локальную структуру белка
Гликопротеиды обладают большой стабильностью и жесткостью структуры

Металлы и простетические группы

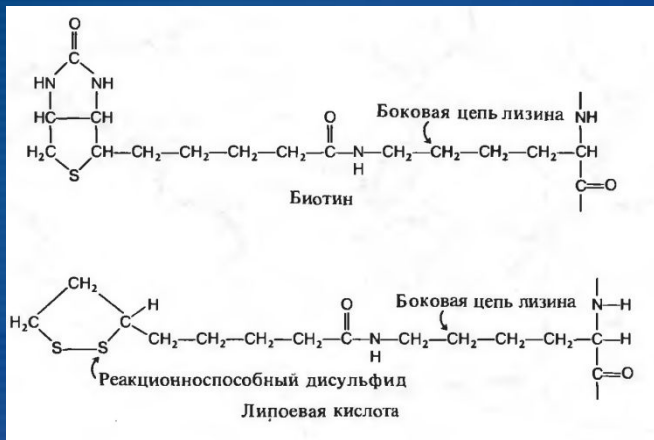
Функции кофакторов

1. Стабилизация структуры (щелочные и щелочно-земельные металлы);
2. Функциональные центры белков (переходные металлы):
 - в связывании участвуют только АК (Zn^{2+} , Cu^{2+})
 - в связывании участвует лиганд, ассоциированный с белком (Fe^{2+} , Mg^{2+})

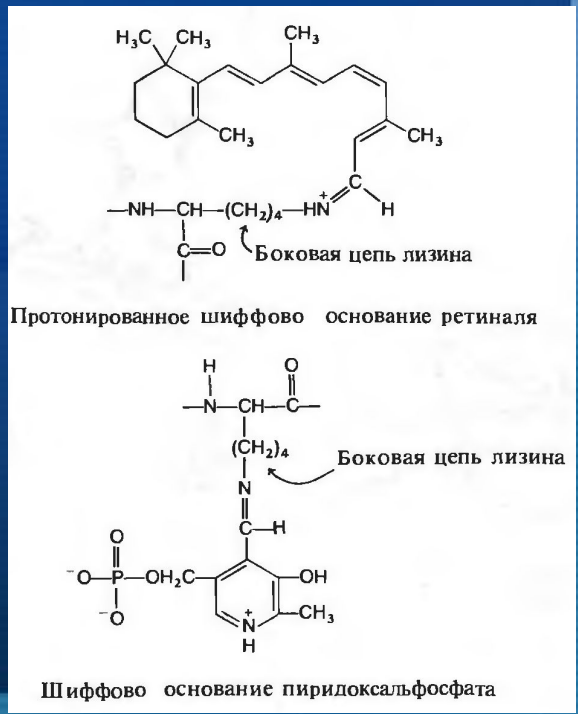
Различные способы связывания металлов белками



Простетические группы



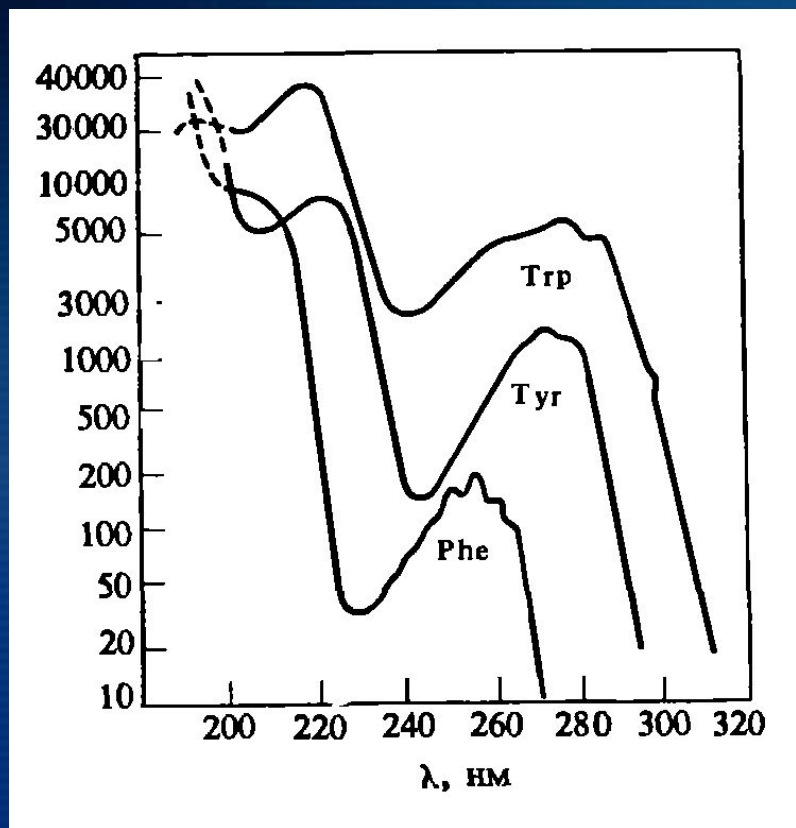
Кофакторы сообщают белкам химические и оптические свойства нехарактерные для отдельных АК



Шиффово основание пиридоксальфосфата

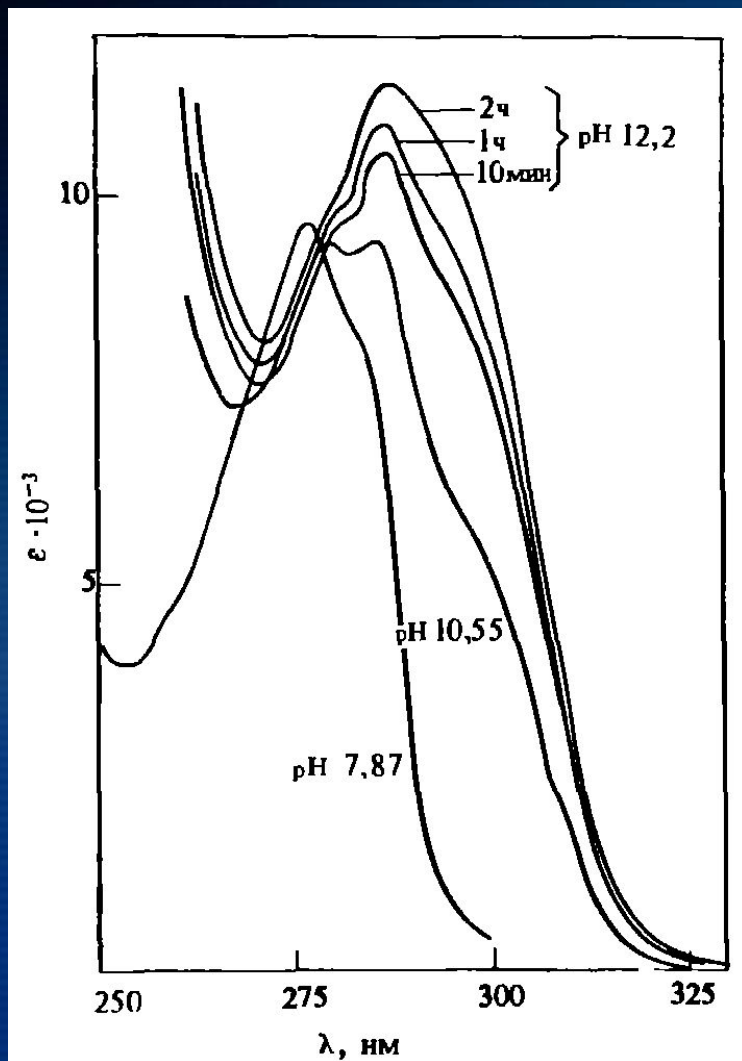
Оптические свойства белков

Поглощение белков в ближней УФ-области обусловлено ароматическими аминокислотами

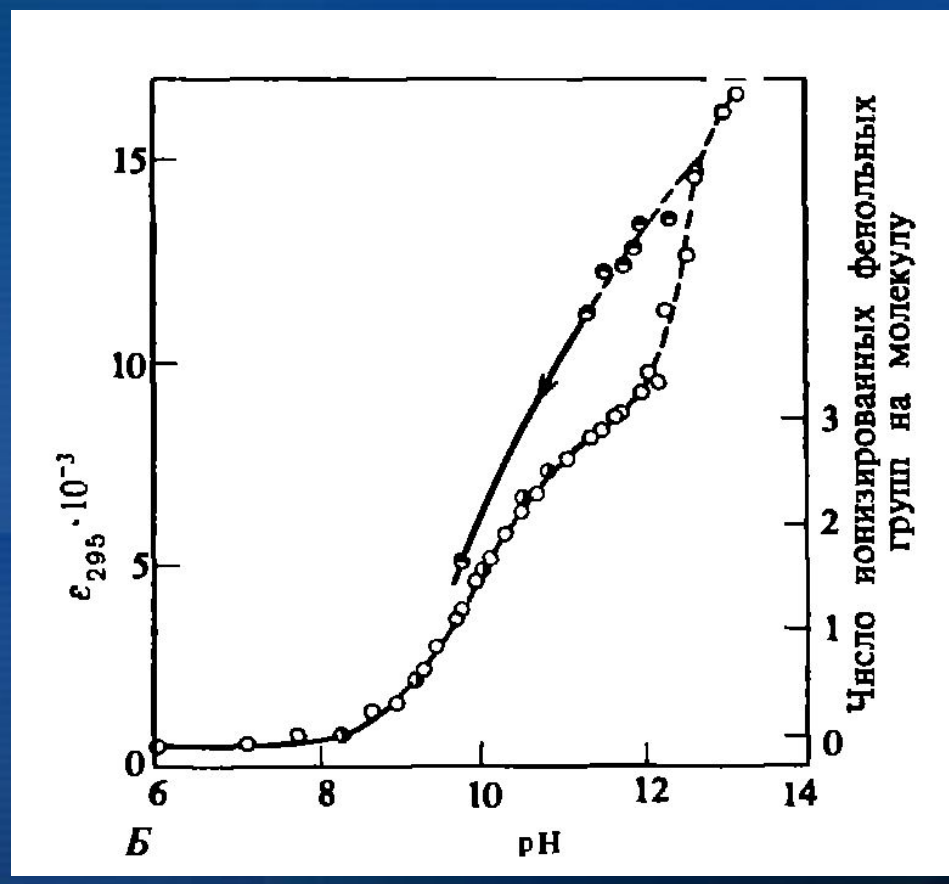


Остаток	$\epsilon_{280}, M^{-1}cm^{-1}$
Phe	-
Tyr	1300
Trp	5700

Поведение тирозиновых остатков



Спектрофотометрическое титрование панкреатической РНК-азы



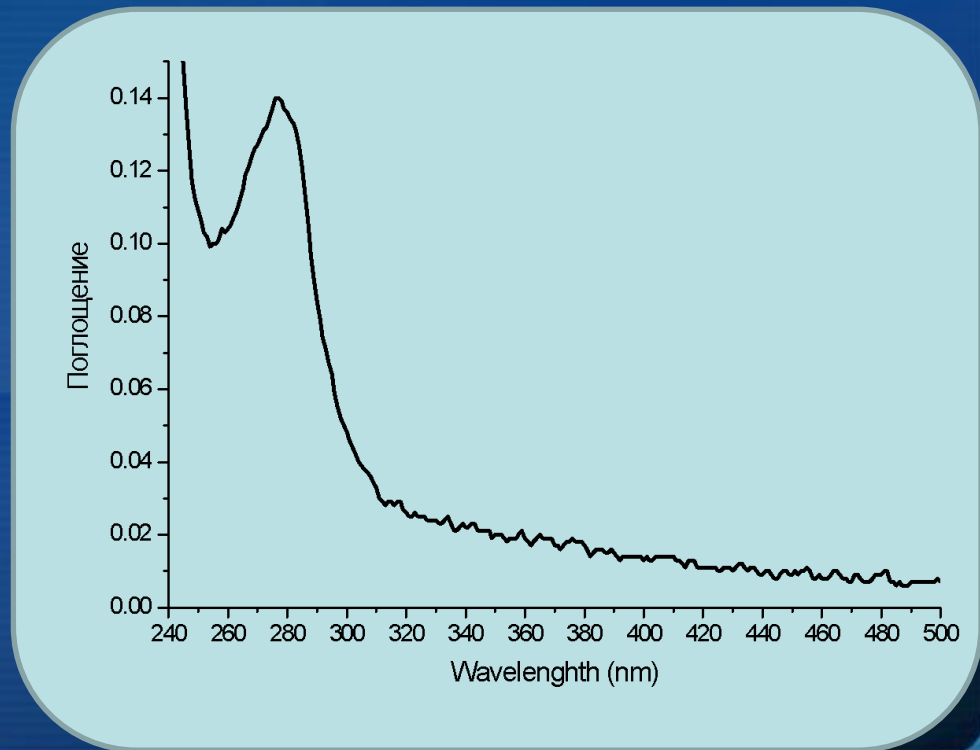
Оптические свойства белков, содержащих простетические группы

Белок	Простетическая группа	Первая и вторая наиболее длинноволновые полосы поглощения			
		λ_{max} , нм	$\epsilon_{\text{max}} \times$ 10^{-4}	λ_{max} , нм	$\epsilon_{\text{max}} \times$ 10^{-4}
Оксидаза аминокислот из почек крысы	Флавинмононуклеотид	455	1,27	358	1,07
Азурин из <i>P. fluorescens</i>	Cu (II)	781	0,32	625	0,35
Церулоплазмин человека	8Cu (3 различных типа)	794	2,2	610	1,13
Восстановленный цитохром c человека	Fe (II)-гем	550	2,77	—	—
Ферредоксин из <i>Scenedesmus</i>	[2Fe (III)-2S]-кластер	421	0,98	330	1,33
Флаводоксин из <i>C. pasteurianum</i>	Флавинмононуклеотид	443	0,91	372	0,79
Моноаминоксидаза из почек быка	Флавины + Cu	445	4,7	—	—
Пируватдегидрогеназа из <i>E. coli</i>	Флавинаденидинуклеотид	460	1,27	438	1,46
Родопсин быка	Ретиналь-Lys	498	4,2	350	1,1
Рубредоксин из <i>M. aerogenes</i>	[Fe (III)-4Cys]-тетраэдр	570	0,35	490	0,76
Треониндезаминаза из <i>E. coli</i>	4 пиридоксальфосфата	415	2,6	—	—
Ксантиноксидаза	Fe, Mo .	550	2,2	—	—

Задача

Был определен аминокислотный состав предшественника сывороточного альбумина крысы, состоящего из 608 аминокислотных остатков. Коэффициент молярной экстинкции триптофана при длине волны 280 нм составляет $5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, тирозина – $1300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Записан спектр поглощения водного раствора данного белка в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм (на рисунке). Определить концентрацию белка, выраженную в мг/мл.

Ala	44	Ile	30	Arg	15
Cys	8	Lys	35	Ser	34
Asp	15	Leu	45	Thr	28
Glu	31	Met	11	Val	31
Phe	22	Asn	31	Trp	2
Gly	37	Pro	21	Tyr	7
His	15	Gln	26		

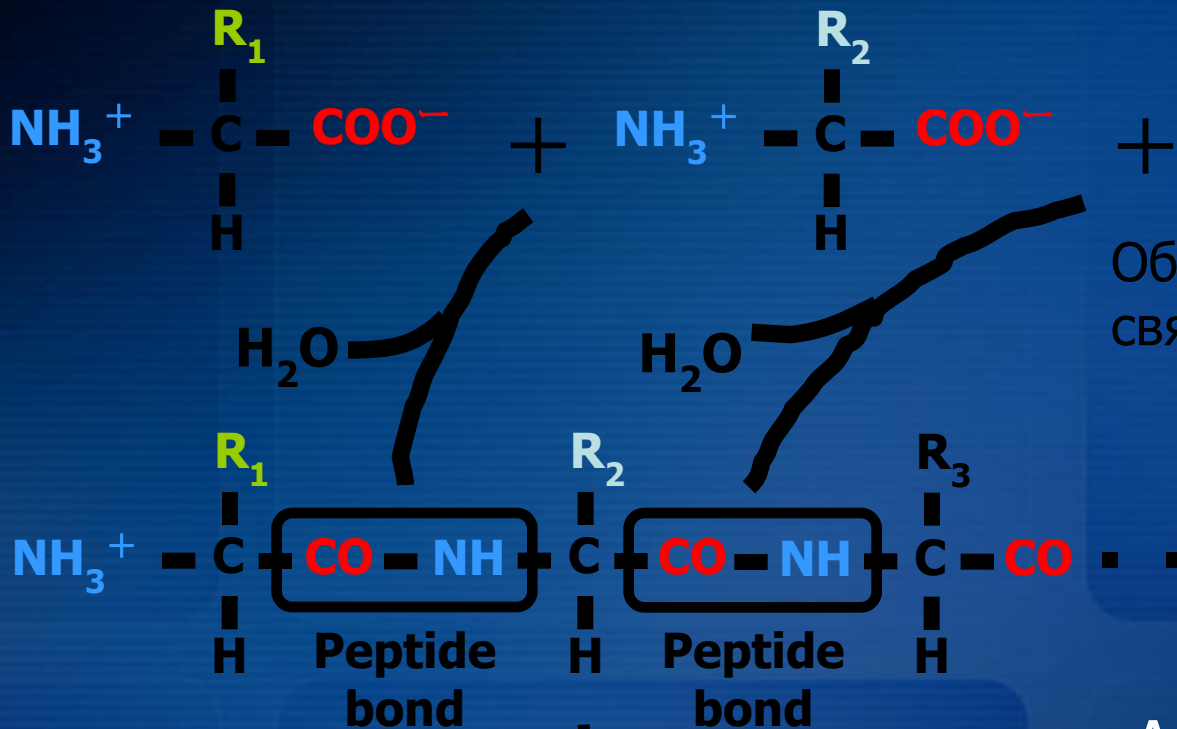




Первичная структура

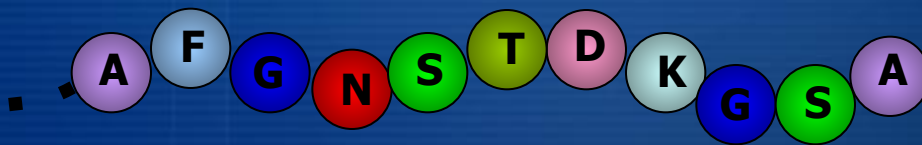


Белки – линейные полимеры



Образование пептидной
связи

Аминокислотная
последовательность –
первичная структура

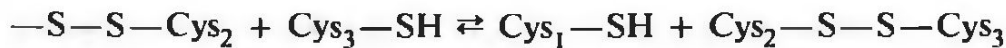


Дисульфидные и другие поперечные СВЯЗИ

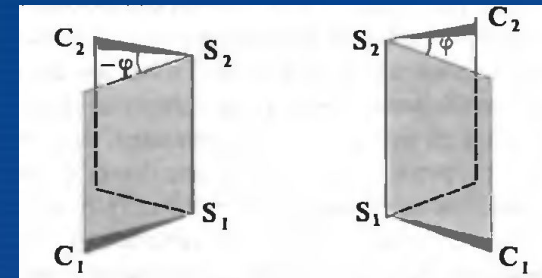
Белки:

1. Не содержат ни цистеина, ни цистина;
2. Содержат один или несколько цистеинов;
3. Один или несколько цистинов
4. Очень редко: и цистины и цистеины

Реакции тиол-дисульфидного обмена

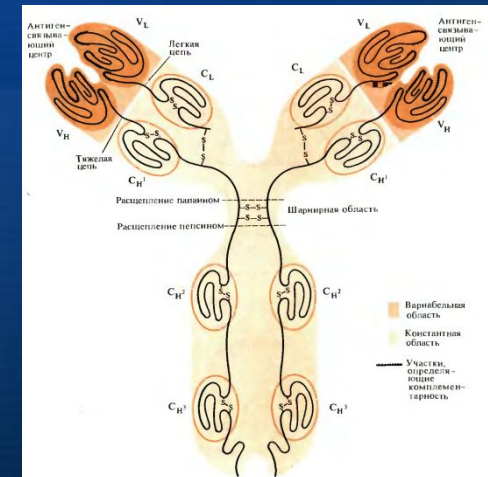
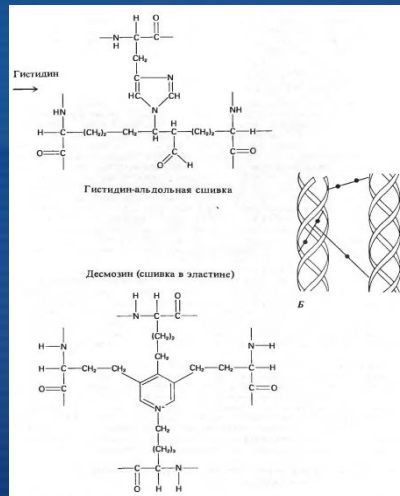
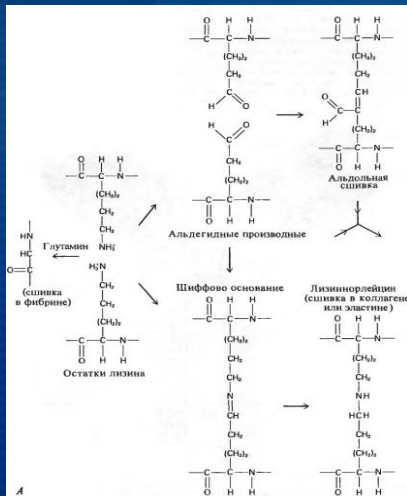


Система связей в цистине нелинейна и имеет неплоскую конформацию



Исключение - сывороточные альбумины: 17 цистинов, 1 цистеин

Лизиновые шивки в коллагене, эластине, фибрине Дисульфидные связи в ИГ G



Задача



- Молекулярная масса неизвестного белка, определенная с использованием метода масс-спектрометрии, составила 56 кДа. Аминокислотный анализ показал, что белок состоит из остатков аланина, валина, пролина, триптофана, аспарагиновой кислоты и глутамина. 100 мг белка растворили в 100 мл воды и зарегистрировали поглощение полученного раствора в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 280 нм, которое оказалось равным 0.407. Определить содержание остатков триптофана в молекуле белка.

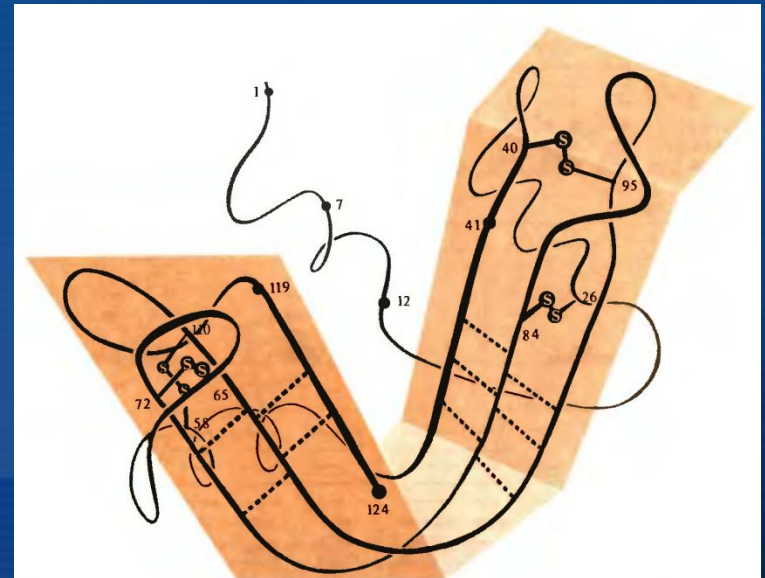
Первичная структура и анализ вторичной и третичной структур

РСА не обладает достаточным разрешением для определения
всей последовательности АК

Знание первичной структуры
необходимо:

1. Анализ структуры;
2. Химические модификации белков;
3. Мечение белков.

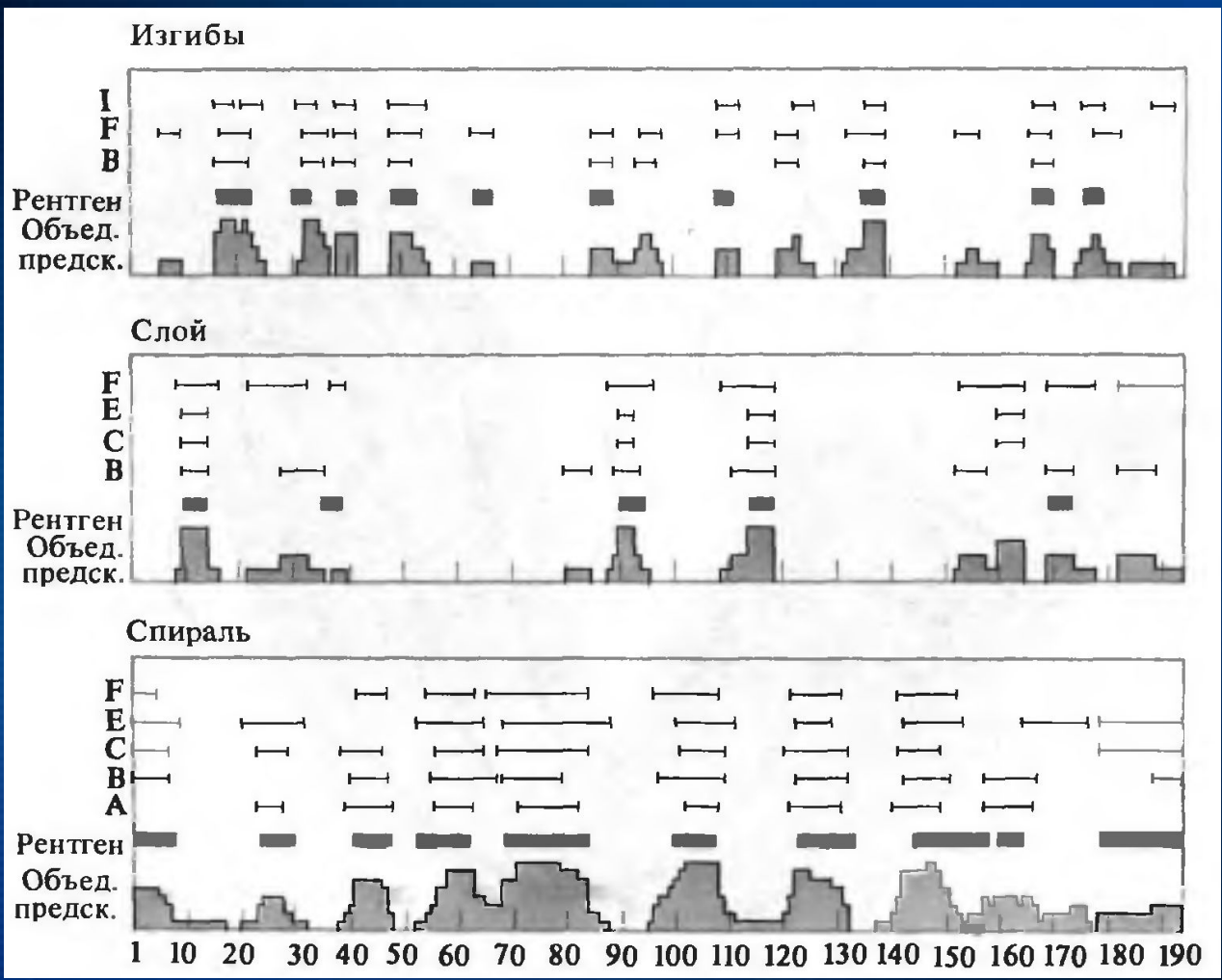
Рибонуклеаза из поджелудочной
железы белка



Lys7-Lys41 – поперечная сшивка
His12-His119 – модификация или-или

Первичная структура и предсказание вторичной и третичной структур

Распределение различных типов вторичной структуры в аденилаткиназе

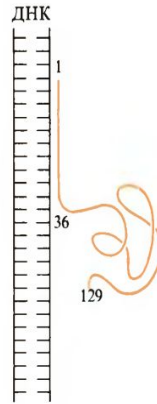
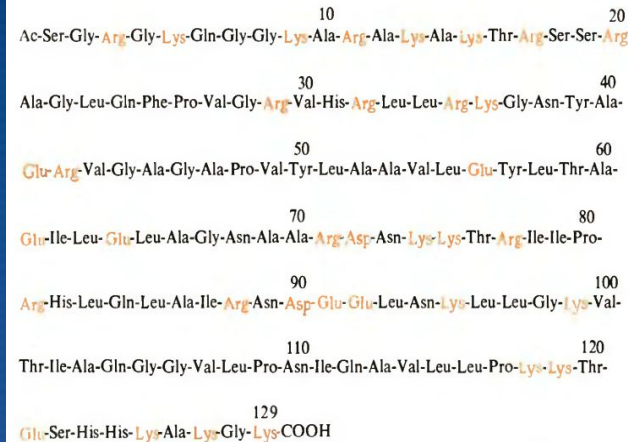


АК последовательность белка и анализ его функций

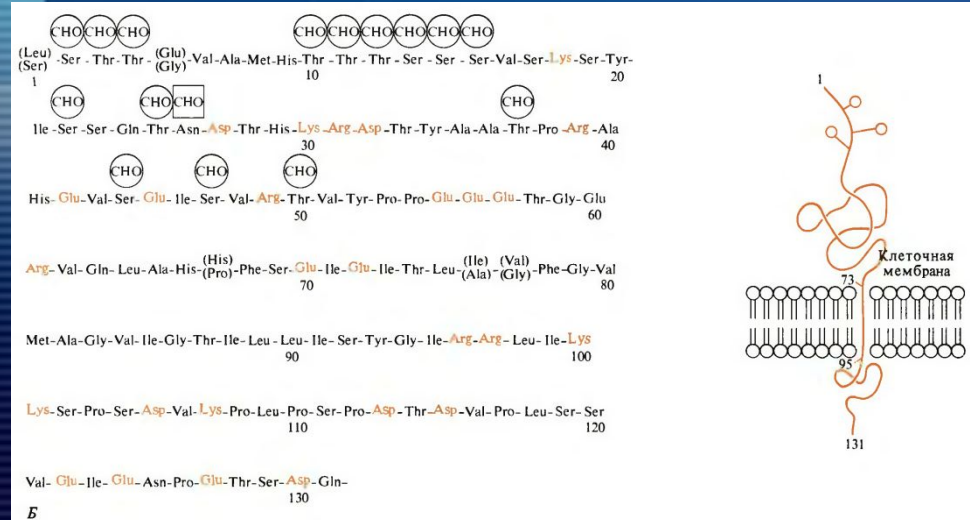
Гистон

Первые 36 АК остатков содержат 12 положительных зарядов и ни одного отрицательного – участок важен для связывания ДНК

Гистон 2а телянка



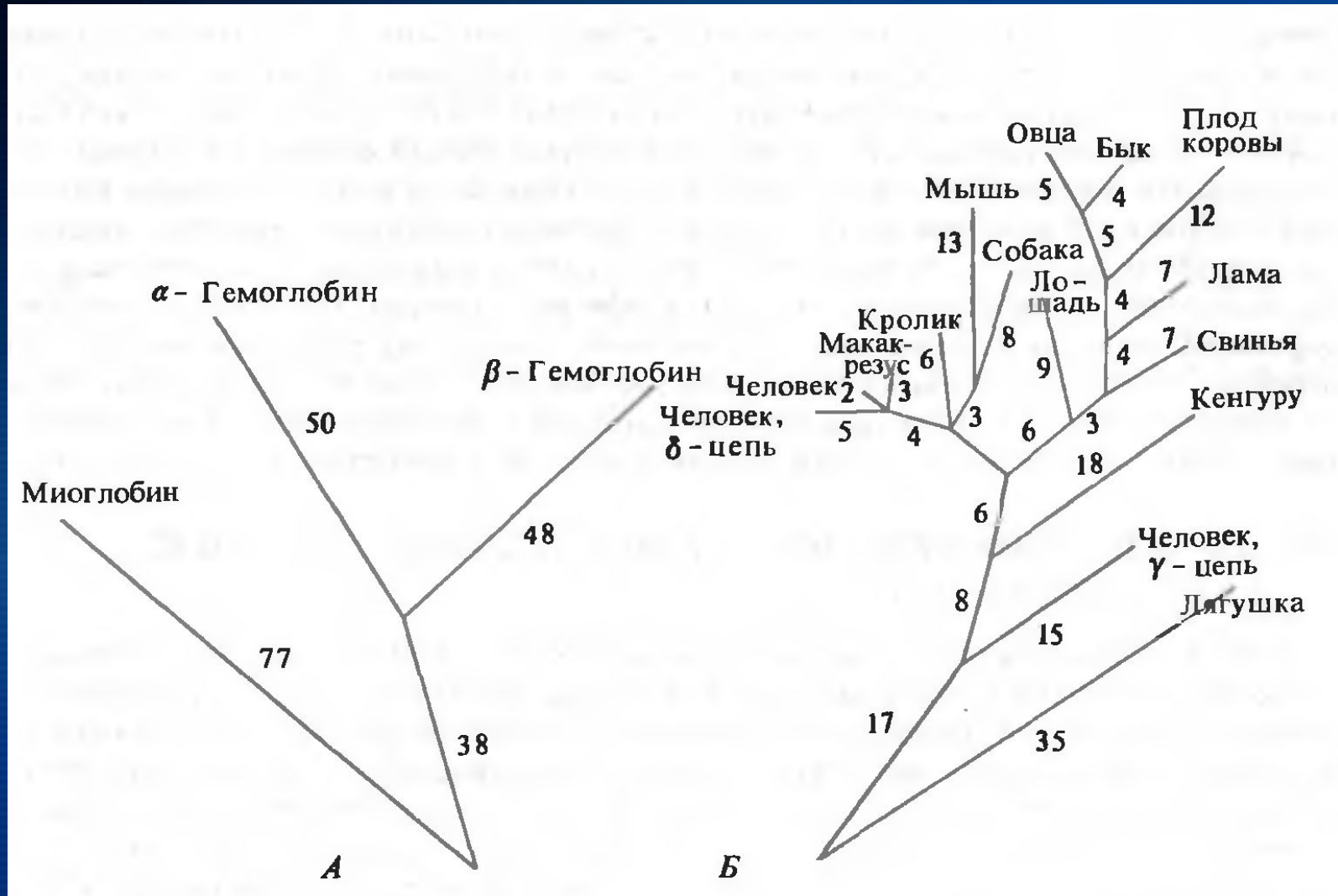
Гликофорин эритроцитов человека



Гликофорин

Трансмембранный белок
 Сахара располагаются с внешней стороны клетки (O, N гликозидная связь)
 Ile73-Ile95 – трансмембранная последовательность

АК последовательности родственных белков

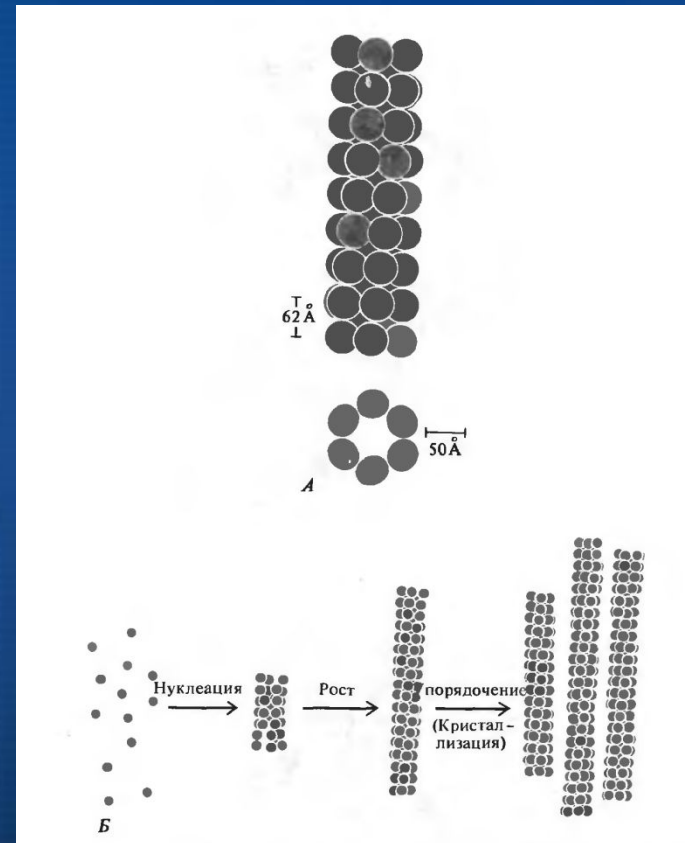
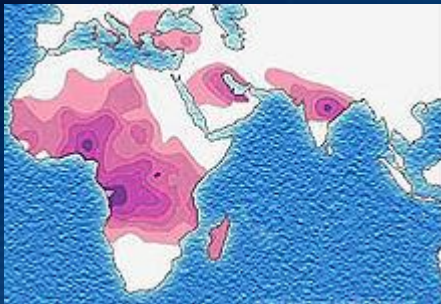


Гемоглобин

Существуют сотни мутантных форм гемоглобина

Серповидноклеточная анемия – гемоглобин S (β -цепь Glu6-Val6)

Агрегация дезоксигемоглобина S



Заключение



- Белки – АК, металлы, простетические группы, сахара.
- Существует корреляция между составом, структурой и функцией.
- В белках с большим содержанием пролина формируются спирали полипролинового типа.
- Третичные структуры организованы в плотно упакованные глобулы или несколько плотноупакованных доменов.
- Четвертичные структуры делят на 2 типа – с глобулярными и спиральным расположением субъединиц.