

АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ

- Молекулярный уровень организации живого основан на функционировании двух классов веществ:

нуклеиновых кислот и белков.

Первые – хранят и передают информацию о структуре белков, вторые – реализуют все процессы жизнедеятельности .

Белки – линейные биополимеры
нерегулярной структуры,
состоящие из аминокислот,
соединенных пептидной связью.

- Насыщены азотом (16 – 25%)
- Имеют большую молярную массу
- Амфотерны
- Обладают определенной пространственной конформацией
- Подвергаются денатурации

Функции белков (найдите соответствие)

- Пластическая
- Каталитическая
- Регуляторная
- Рецепторная
- Защитная
- Транспортная
- Механическая (опорная)
- Сократительная
- Депонирующая
- Энергетическая
- Трасферрин
- Миоглобин
- Глюкагон
- G – белковый комплекс
- Иммуноглобулин А
- Коллаген
- Актин
- Лизоцим
- Альбумин
- Транскортин
- Ферритин
- Липопропротеинлипаза
- Кальцитонин
- Кератин
- Фибриноген

Классификация белков

- По химическому строению (простые и сложные)
- По форме молекул (фибриллярные и глобулярные)
- По функциональному признаку

Аминокислоты – азбука белка

- Все физико – химические свойства белков определяются их аминокислотным составом.
- Аминокислоты – производные жирного и ароматического ряда, содержащие аминогруппу и карбоксильную группу.
- В составе клеток выделяют:
- 20 белковогенных, «кодируемых» аминокислот (альфа –аминокислоты)
- Редкие, минорные аминокислоты (образуются посттрансляционно): оксипролин, оксилизин.
- Цистин образуется из двух близко стоящих остатков цистеина
- Свободные, небелковогенные аминокислоты (орнитин, цитрулин, таурин). Более 150 аминокислот.

Классификация аминокислот

- **По радикалу** (алкильные, ароматические, имино-, амиды, серусодержащие, оксикислоты, дикарбоновые, диаминомонокарбоновые)
- **По полярности** (неполярные, полярные заряженные и незаряженные)
- **По биологическому значению** (заменимые, незаменимые, относительно- и условно-незаменимые)

Физико-химические свойства аминокислот

- **М. масса** - в среднем 100 Да
- **Оптически активны** (имеют ассиметричный атом С, кроме глицина): право (+) и лево (-) вращающие.
- Имеют **стереоизомеры L- и D.**
- **Амфотерны.** Степень ионизации amino- и карбоксильной групп зависит от pH среды. Значение pH среды, при котором аминокислоты электронейтральны – ИЭТ.
- Имеют **разную растворимость** в полярных (вода) и неполярных (спирты) растворителях.
- **Поглощают свет** в ультрафиолетовой области (260-280 нм).

Краткое обозначение аминокислот

- **Трехбуквенное обозначение:**
Гли (Gly), Ала (Ala).
- **Однобуквенные символы:**
Цистеин (C), аспартат (D), метионин (M),
тирозин (T). (В основном применяется в
США).

История открытия белков

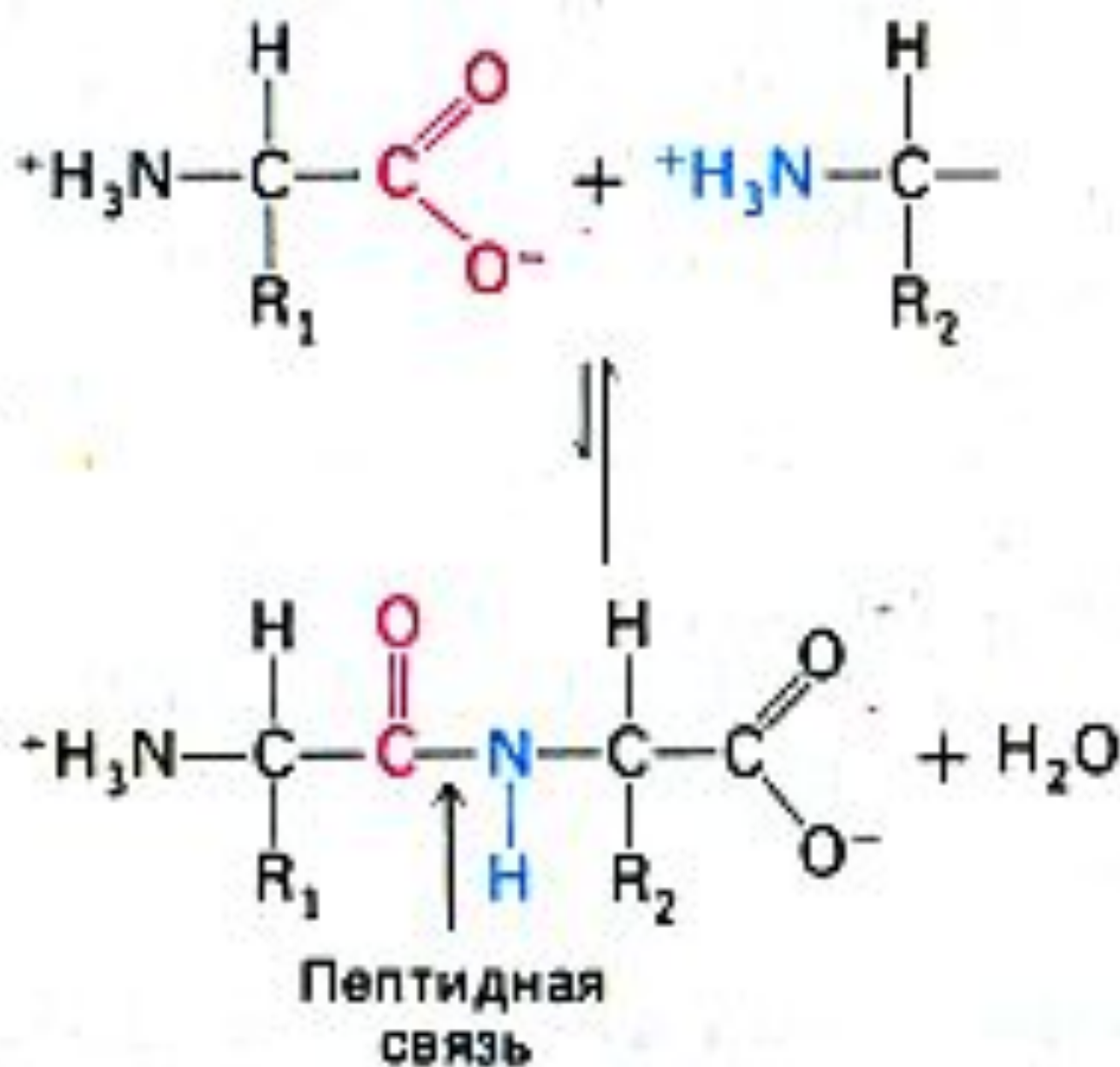
- 17 -18 вв. –выделение из различных растительных и животных источников вязких, клейких, свертывающихся при нагревании веществ.
- Выделение и кристаллизация из гидролизатов этих веществ различных аминокислот.
- 1838г. **Г.Я.Мульдер** - предположение о строении белков, термин «**протеины**».
- 1888г. – **А.Я.Данилевский** открывает **пептидную связь** в белках (реакция Пиотровского).
- 1902г. – **Э.Фишер, А. Гоффмейстер** – пептидная теория строения белков, **синтез первых пептидов ин витро**.
- 1925г. – **Сведберг** изобретает метод ультрацентрифугирования и определяет **молярную массу белков**
- 1951г. – **Л.Полинг** рассчитывает и экспериментально доказывает существование **альфа –спирали как вторичной структуры белка**
- 1953г. – **Сэнджер** расшифровывает **первичную структуру инсулина**, **Перутс и Кендрию** устанавливают **трехмерную пространственную структуру миоглобина**.
- **Мур, Стейн** изобретают **автоматический анализатор аминокислот** .
- **Последнее десятилетие – эра протеомики**

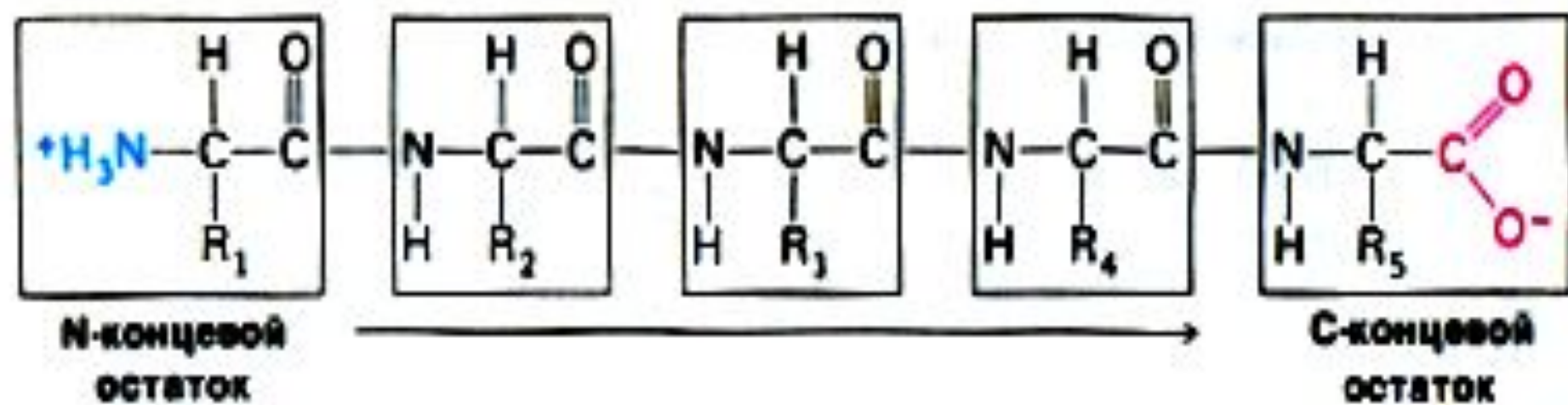
Уровни организации белковых молекул

- Структура белковой молекулы в первую очередь определяется последовательностью аминокислот в полипептидной цепи.
- Каждая полипептидная цепь имеет практически единственную энергетически выгодную и функционально активную конформацию.
- Четыре уровня организации белковых молекул отличаются природой связей, необходимых для их поддержания (сила, регулярность, количество связей).

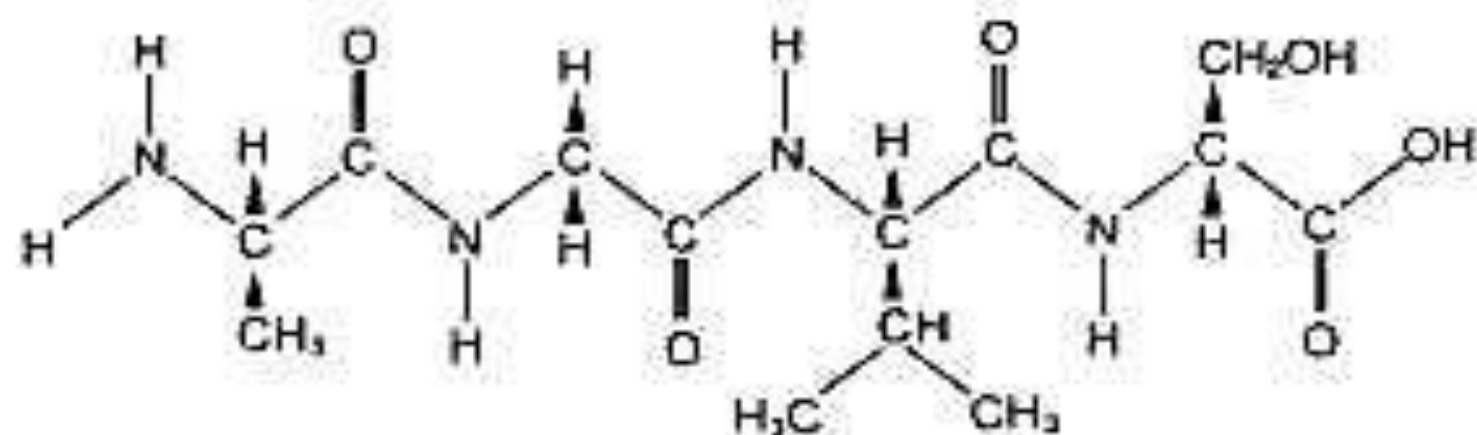
Первичная структура белка

- Основная связь – **пептидная**, прочная, ковалентная, образующая жесткий остов молекулы.
- Свойства пептидной связи:
- **Короткая** (длина **1,32 Å**), «почти двойная», нет вращения вокруг оси C – N.
- **Прочная**, гидролизуется в 6N HCl, при 100⁰C, в течение 6 часов.
- **Копланарная** структура трансположением атомов N и H.
- Способна к образованию 2 **водородных связей** (в случае пролина – 1).
- Может существовать в **кето-** и **энольной (в щелочной среде)** форме.
- Образуется при участии пептидил-трансферазы на рибосомах, при внерибосомальном синтезе ин виво и ин витро.



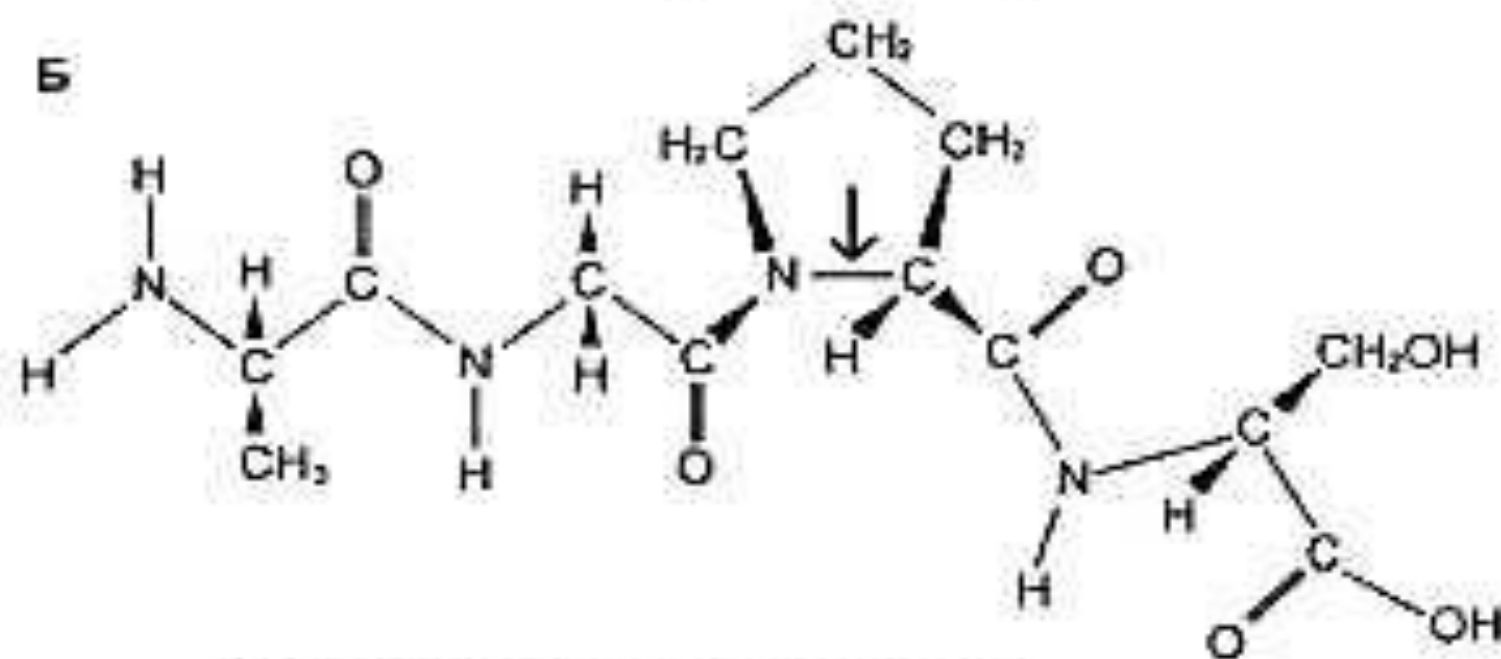


A

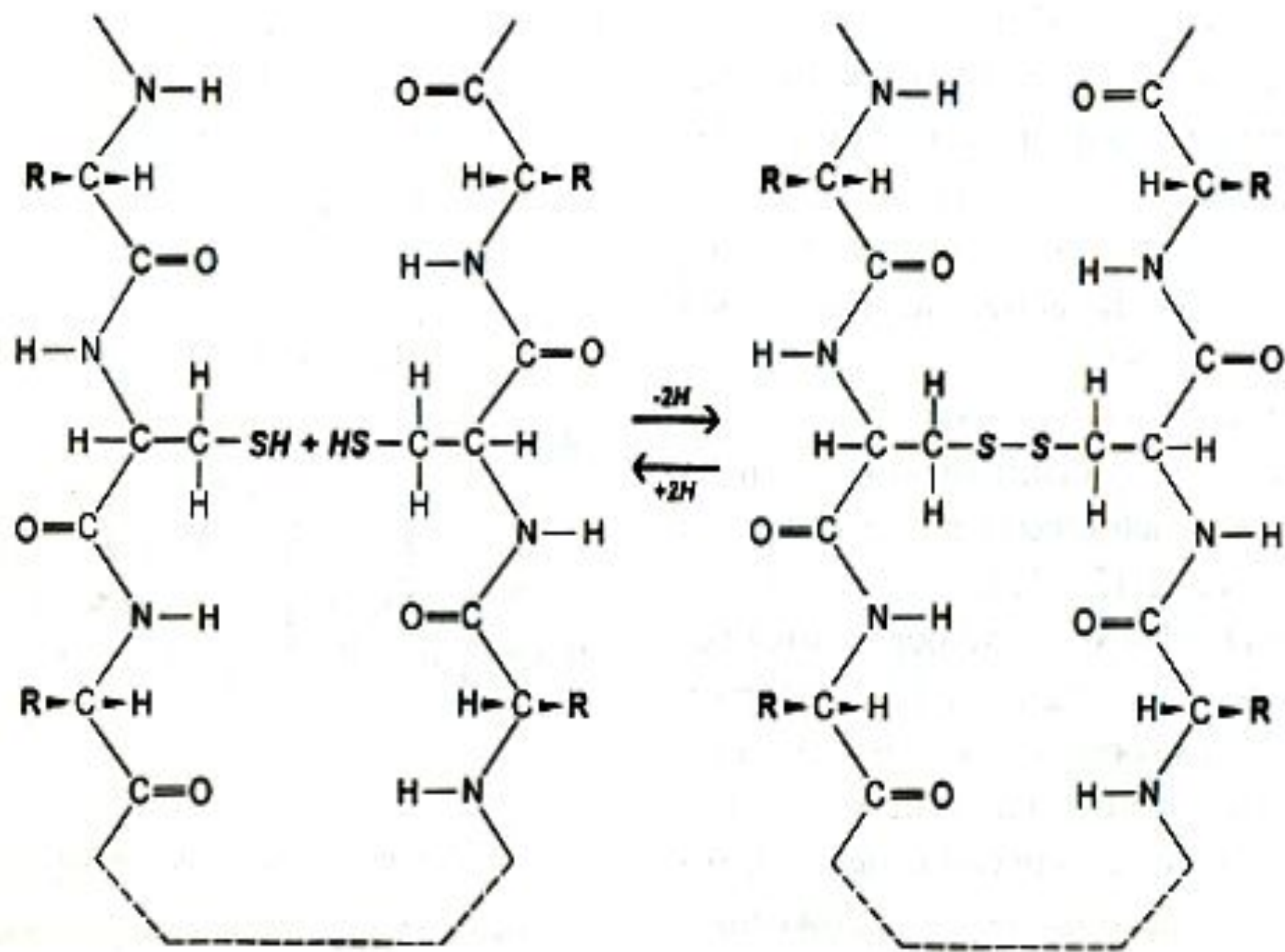


Аланил-глицин-валил-серин

Б



Аланил-глицил-пролил-серин



Первичная структура белка

- Дисульфидные связи (S – S)
- Образуется при спонтанном окислении SH –групп близкорасположенных остатков цистеина в первичной структуре.
- Разрушается при восстановлении или еще более сильном окислении.

Первичная структура белка

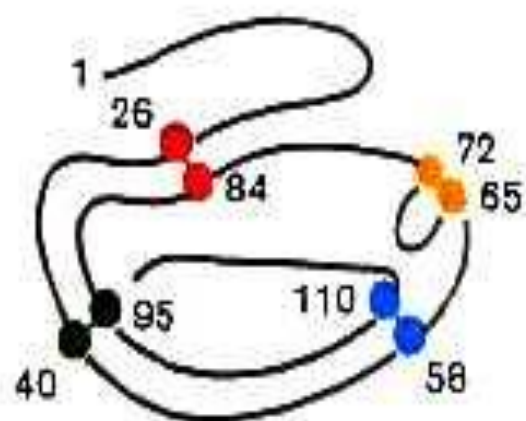
- Первичная последовательность аминокислот, кодируемая нуклеотидами ДНК, определяет дальнейшую укладку полипептида в пространстве.
- Зная расположение аминокислот, можно просчитать возможность образования и силу связей, а значит и пространственную структуру белка.

L. Pouling, R.Cory (1930-е годы)

- Рентгеноструктурный анализ кристаллов пептидов, определение длин и углов связей.
- Предсказали, а потом экспериментально доказали строение пептидных групп и α – спиральной структуры белков.

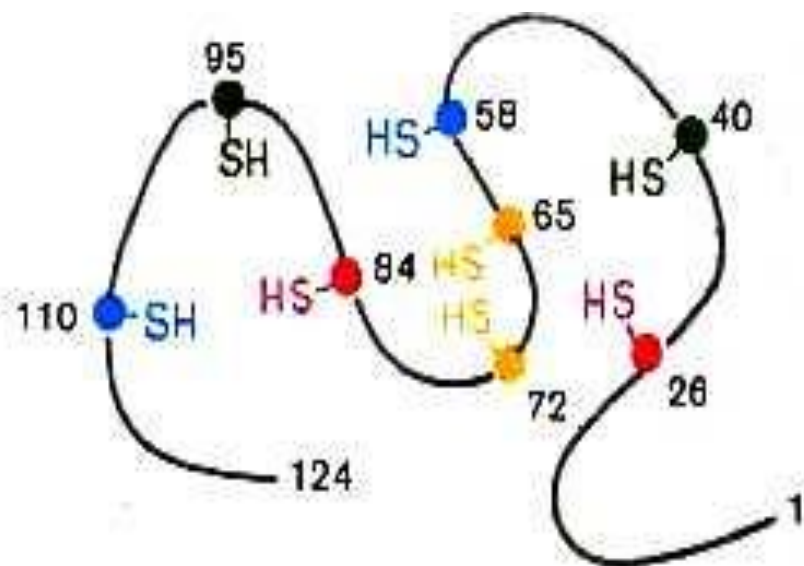
Опыты Anfinsen C.B.(1964 г.)
демонстрируют связь первичной
структуры белка, конформации и
функциональной активности

- Денатурированная, раскрученная спираль рибонуклеазы теряет ферментативную активность.
- Восстановление конформации при ренатурировании ведет к восстановлению функции фермента.
- См. рис.



Нативная рибонуклеаза

8 М Мочевина и
β-меркаптоэтанол



Денатурированная восстановленная
рибонуклеаза

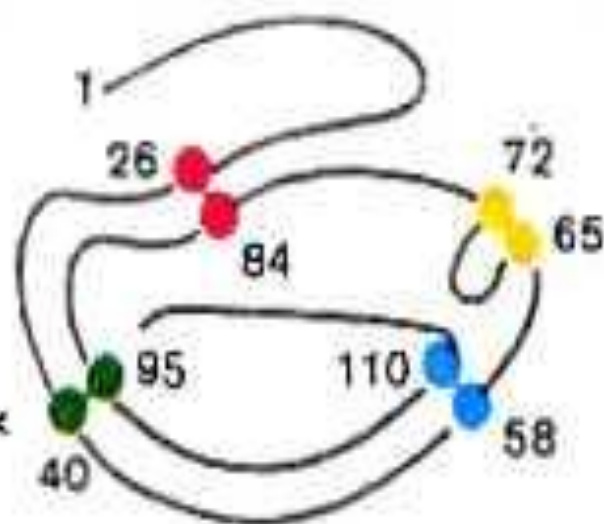
Денатурированная
восстановленная
рибонуклеаза



Диализ для
удаления
мочевины и
 β -меркапто-
этанола



Окисление
воздухом
сульфгидрильных
групп вос-
становленной
рибонуклеазы



Нативная рибонуклеаза

Этапы экспериментальной расшифровки первичной структуры белка

- Получить **чистую фракцию** белка
- Определить, сколько С- или N- концов, т.е. **сколько полипептидных цепей** в составе белка. Если – несколько, разделить их и выделить гомогенную фракцию. Если молекула кольцевая – разрезать.
- **«Нарезать» полипептид** на более короткие отрезки. (Метод перекрывающихся пептидов Сенджера).

Этапы экспериментальной расшифровки первичной структуры белка

- Специфический **химический гидролиз** пептидных связей (после реакции с бромцианом С –концевой аминокислотой оказывается метионин; гидроксилламин разрушает связь между аспартатом и глицином).
- **Ферментативный гидролиз** сайтспецифичными экзо- (лейцинамипептидаза, карбоксипептидаза) и эндопротеиназами (пепсин, трипсин, химотрипсин и т.д.).

Триптические пептиды

Химотриптический пептид

Ala—Ala—Trp—Gly—Lys

Val—Lys—Ala—Ala—Trp

Thr—Asn—Val—Lys

Триптический пептид

Триптический пептид

←————→

←————→

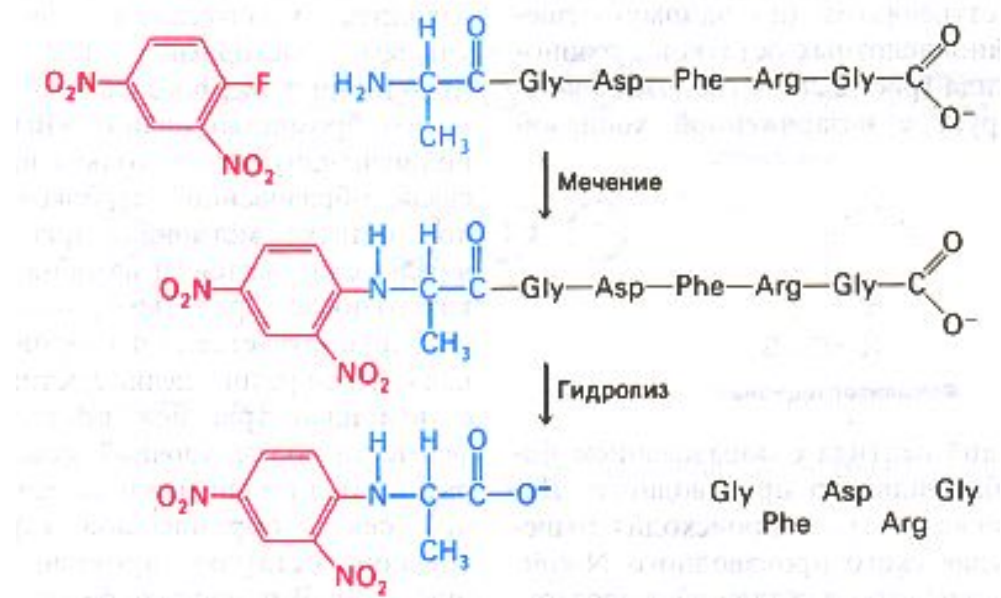
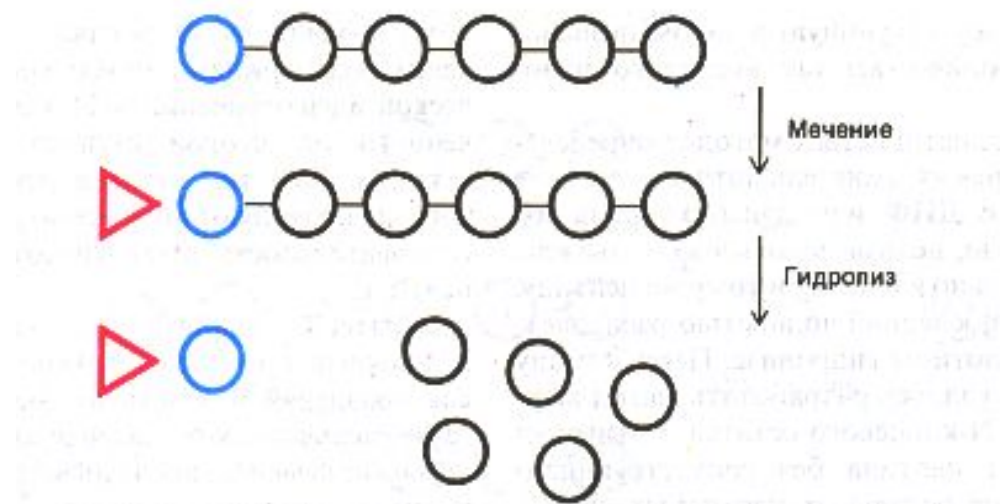
Thr—Asn—Val—Lys—Ala—Ala—Trp—Gly—Lys

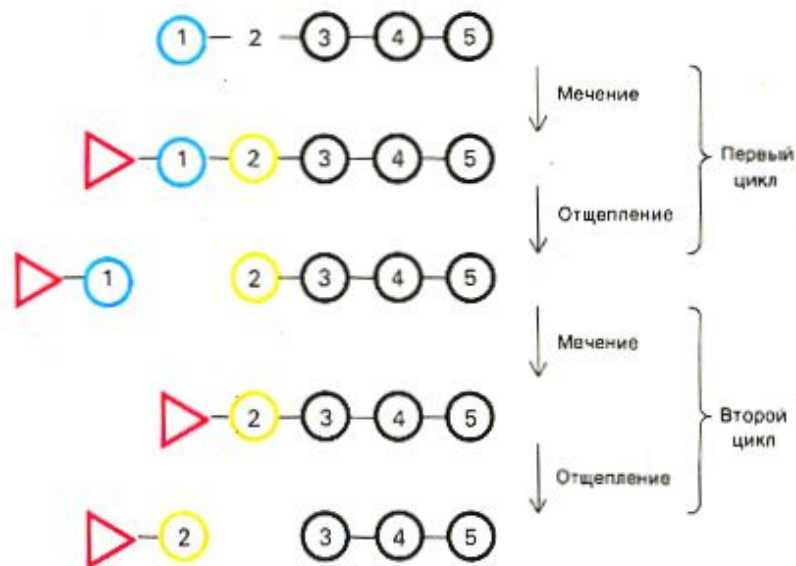
←————→

Перекрывающийся химотриптический пептид

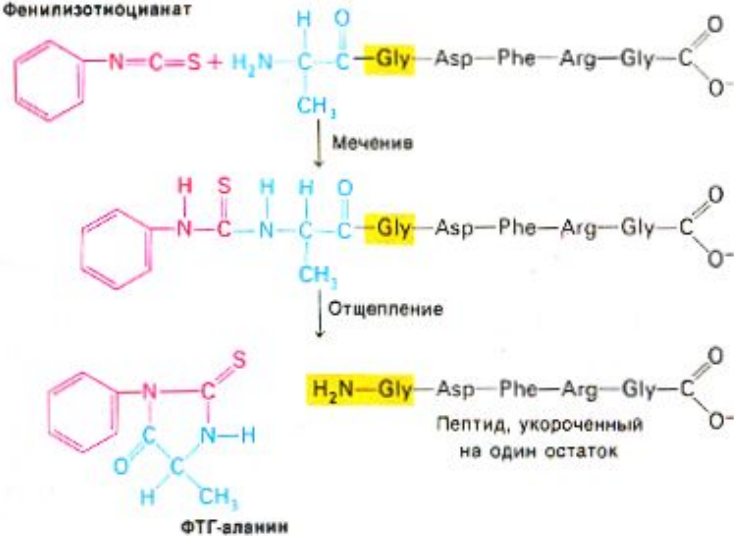
Этапы экспериментальной расшифровки первичной структуры белка

- Специфические реакции с N – или C-концевыми аминокислотами (реакции Сэнджера, Эдмана, дансилхлоридная ит.д.)
- Отделение «меченой» концевой аминокислоты от оставшейся последовательности
- Идентификация концевой аминокислоты (хроматография).

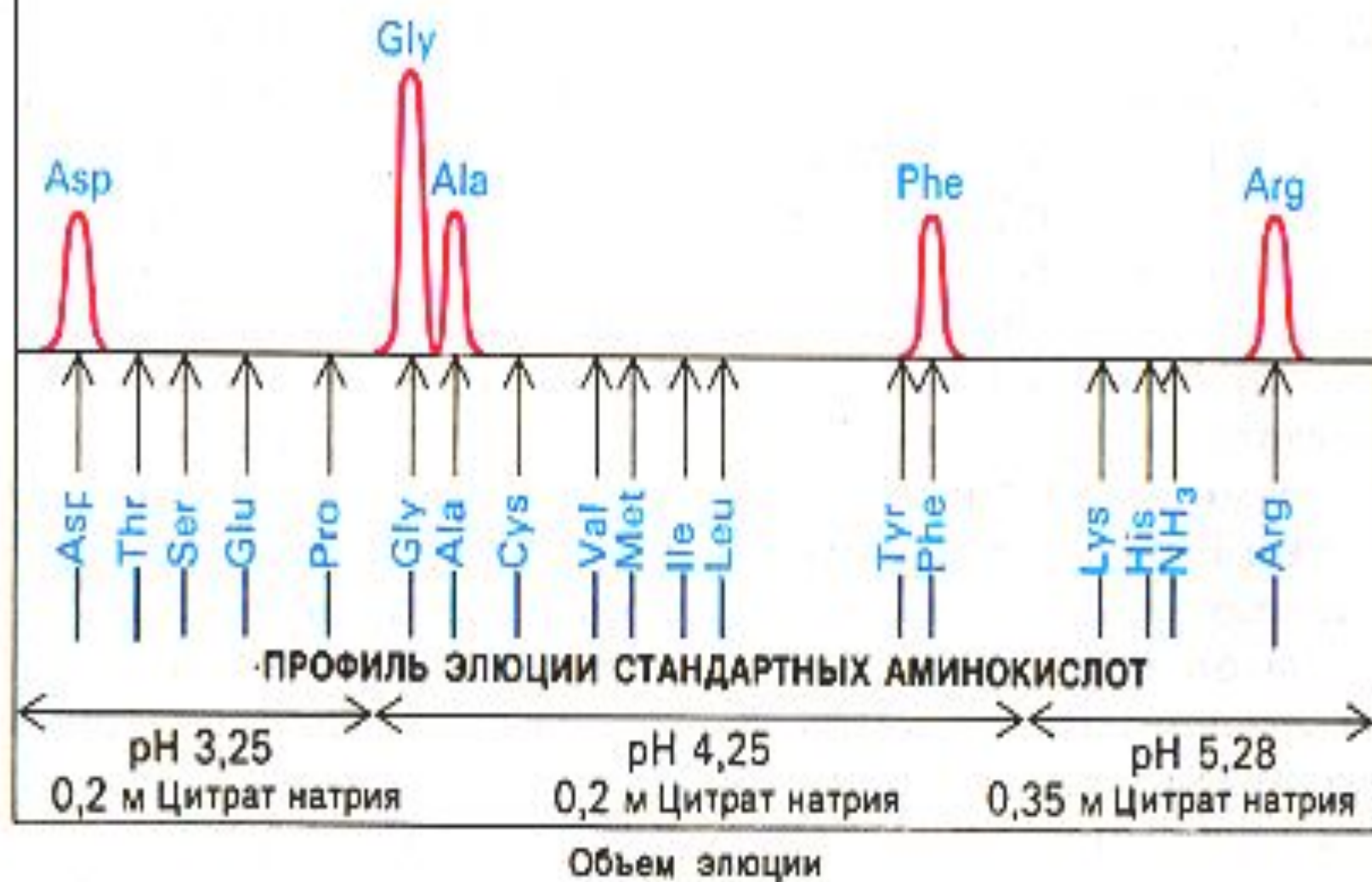




Фенилизотиоцианат



ПРОФИЛЬ ЭЛЮЦИИ ПЕПТИДНОГО ГИДРОЛИЗАТА



Вторичная структура белка

- **Регулярная, периодическая** структура создается вращением радикалов аминокислот вокруг $\alpha - C$ атома. **Белки имеют форму фибрилл, жгутов или образуют слои.**
- Стабилизируется в пространстве за счет **кооперативного эффекта множества водородных связей между пептидными группировками** (1 – 4 связь – виток спирали, 1 – 3 связь – поворот на 180^0).

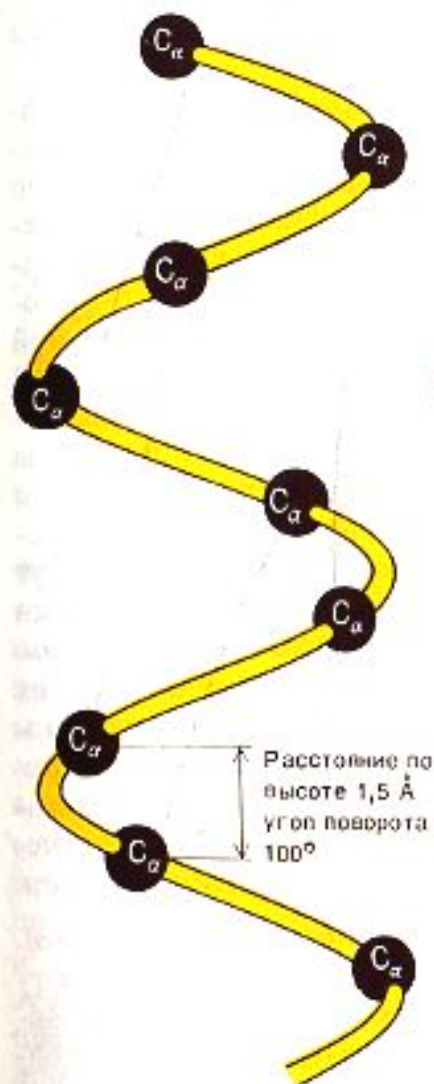
Вторичная структура белка

α -спираль, право – (чаще для L- аминокислот) или левозакрученная, полный виток спирали 5,4 Å (3,6 остатка аминокислот), угол подъема 26° .

Водородные связи расположены параллельно оси спирали.

β – складчатая структура, водородные связи расположены перпендикулярно оси полипептида или нескольких цепей (параллельных или антипараллельных). В пространстве образуются слоистые структуры.

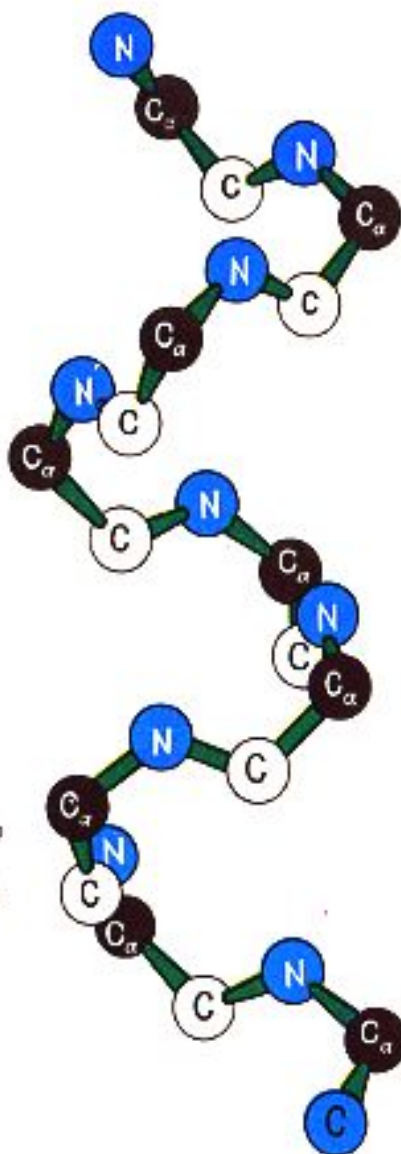
A



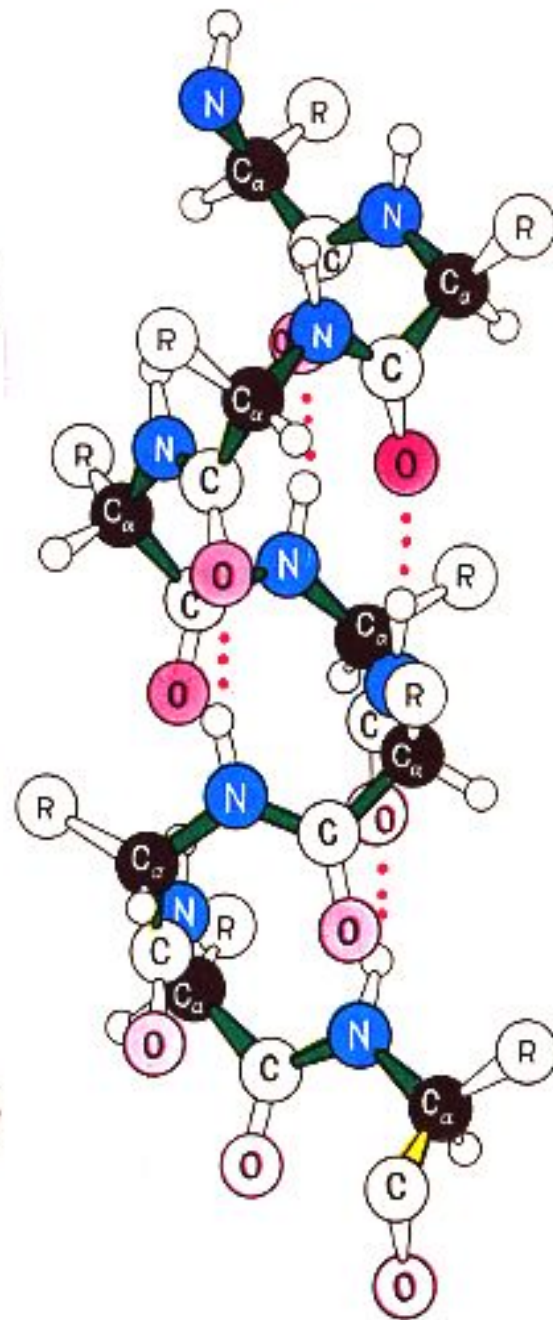
Расстояние по
высоте 1,5 Å
угол поворота
100°

5 Å

B



B



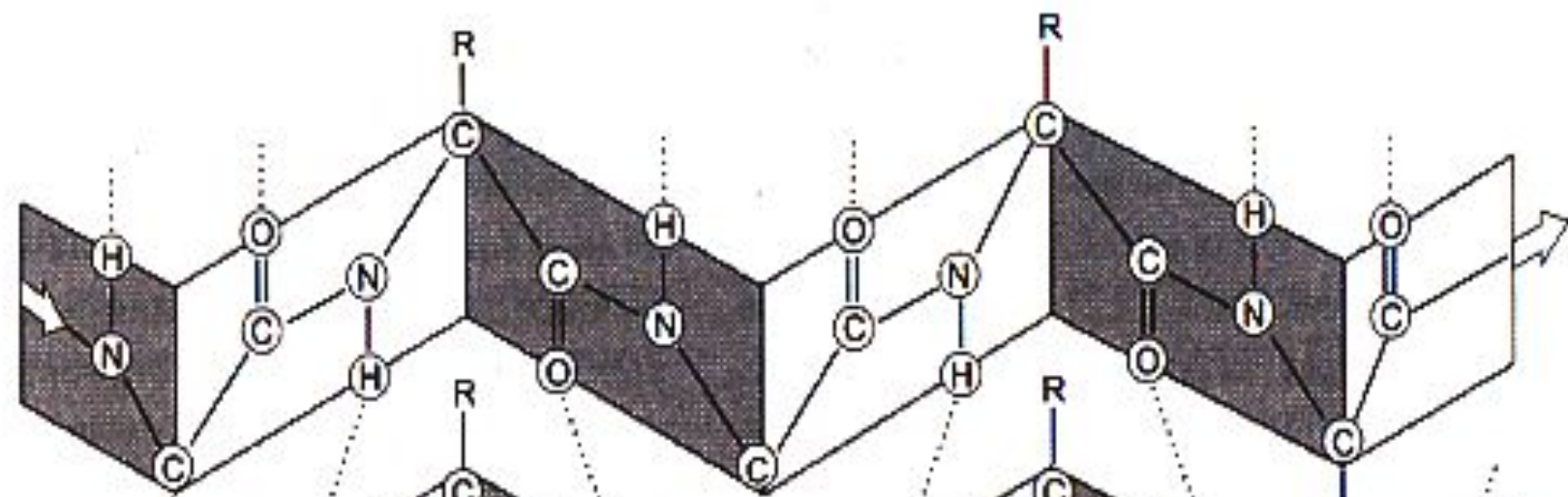
Вторичная структура белка

- **Степень спирализации в полипептидах м.б. от 0 до 80 – 90%.** Чем больше степень спирализации, тем больше форма молекулы приближается к фибриллярной.
- **Факторы, препятствующие α – спирализации** (наличие радикалов):
 - Про-, оксипро-
 - Рядом стоящих одинаково- или разно-заряженных радикалов
 - Асп-. сер-, тре-, лей- (если находятся рядом).
- **Высокая степень α – спирализации в миоглобине, миозине, фибрине.**
- **В химотрипсине практически нет α - спиральных участков.**

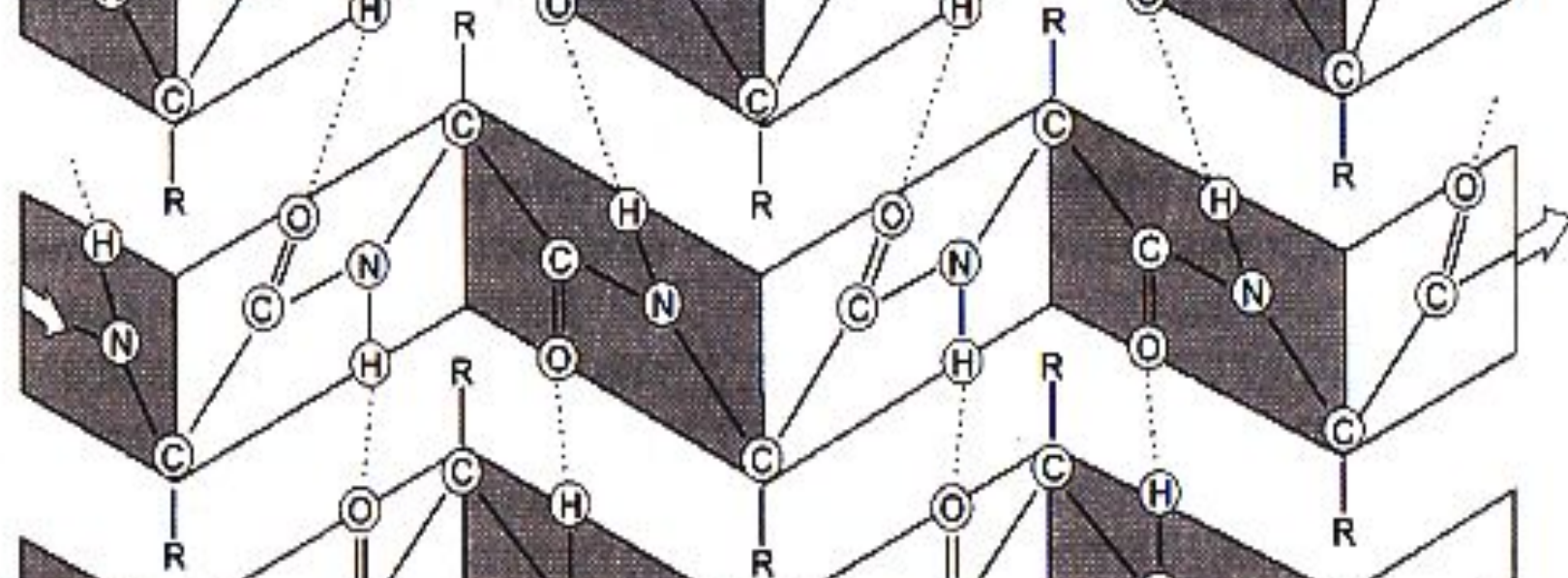
Вторичная структура белка

- В различных белках есть разные структурные мотивы (единицы скручивания): $\alpha\alpha$ – $\alpha\beta$ – $\beta\beta$ –.
- Радикалы **глу, мет, ала, лей** тяготеют к образованию α –спиралей; **вал, тир, изолей** – к β -складчатой структуре.
- Более того, **возможны взаимные переходы α – β - структур.**(В щелочной среде, при нагревании происходит разрыв водородных связей, восстановление дисульфидных мостов, растягивание спирали: α – кератин превращается в β . «Гладкие» волосы становятся «волнистыми».)

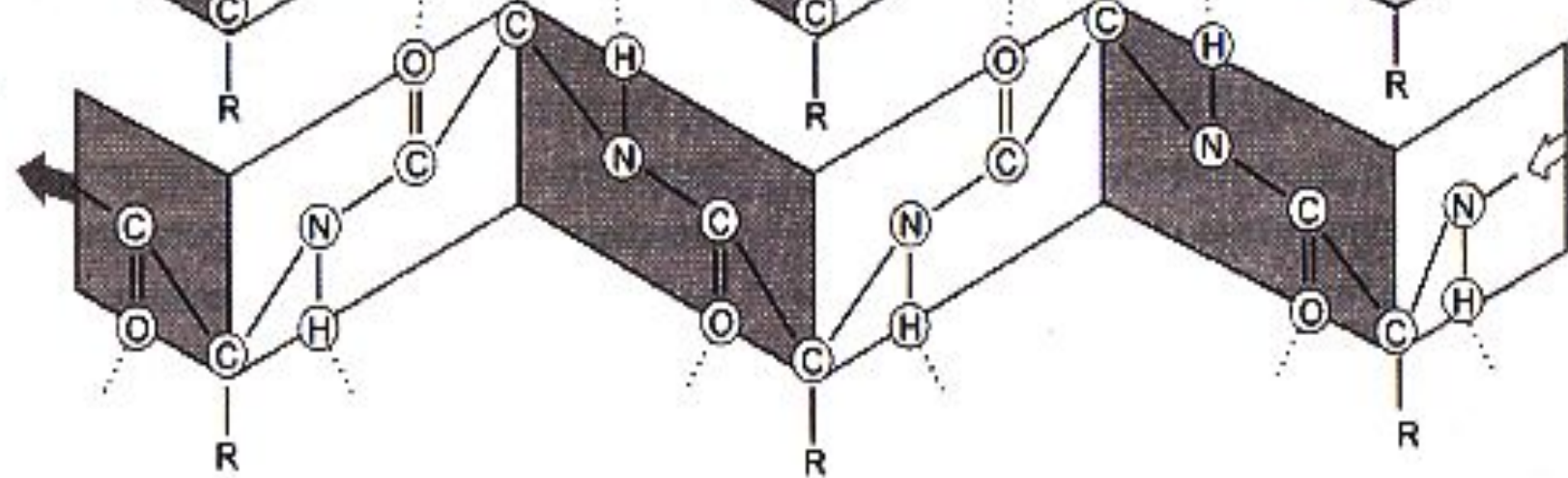
A.



Б.

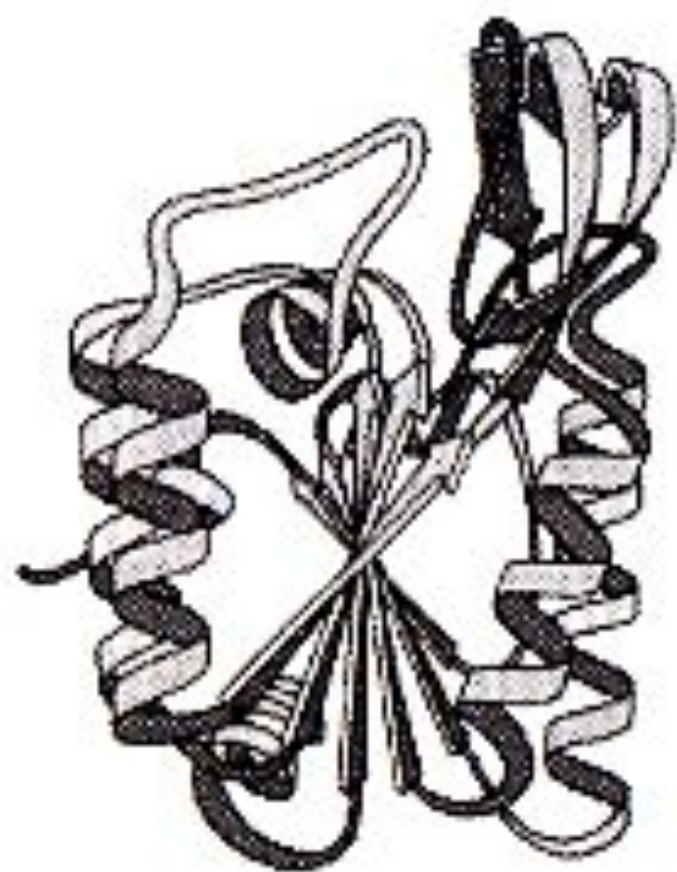


B.





A



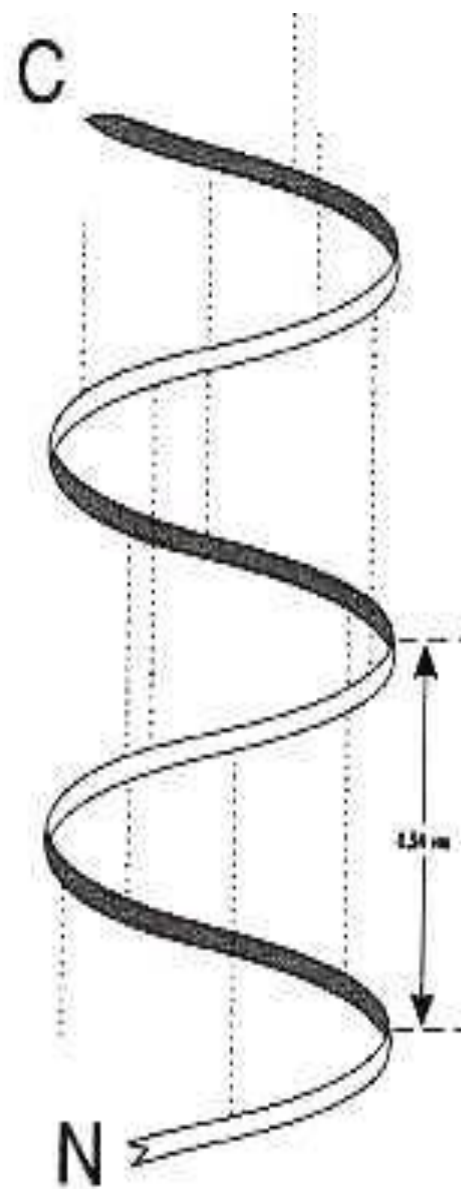
B

Вторичная структура белка

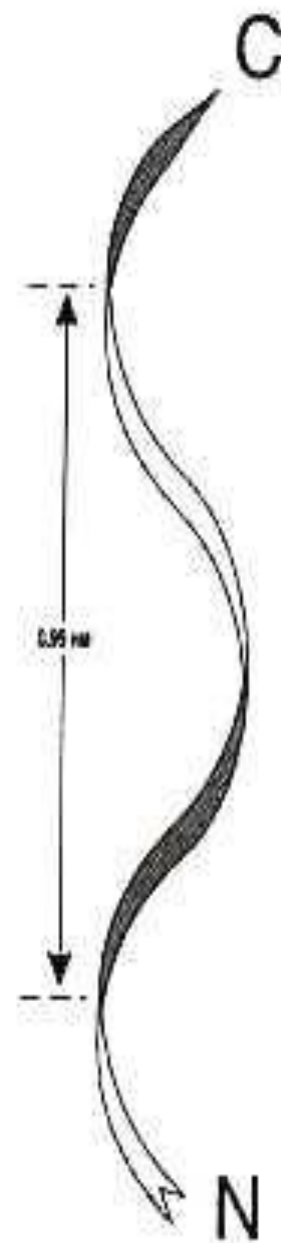
- **Коллагеновая суперспираль** – фибриллярный, нерастворимый белок соединительной ткани. Субъединицей является тропоколлаген – три полипептидных цепи, закрученных друг вокруг друга.
- **В первичной структуре много глицина, пролина, оксипролина и оксилизина.**
- Вытянутые спирали стабилизированы стерическим отталкиванием колец пролина и оксипролина и поперечно – расположенными водородными связями.

Вторичная структура белка

- **Коллаген** –сложный белок (гликопротеин), остатки глюкозы или галактозы ковалентно соединены с ОН- группами оксипролина и оксилизина.
- ОН- модификация про и лиз осуществляется Fe^{2+} - зависимой **пролил-лизил-гидроксилазой**. Восстановленная форма железа поддерживается аскорбиновой кислотой. (**механизм развития цинги**).



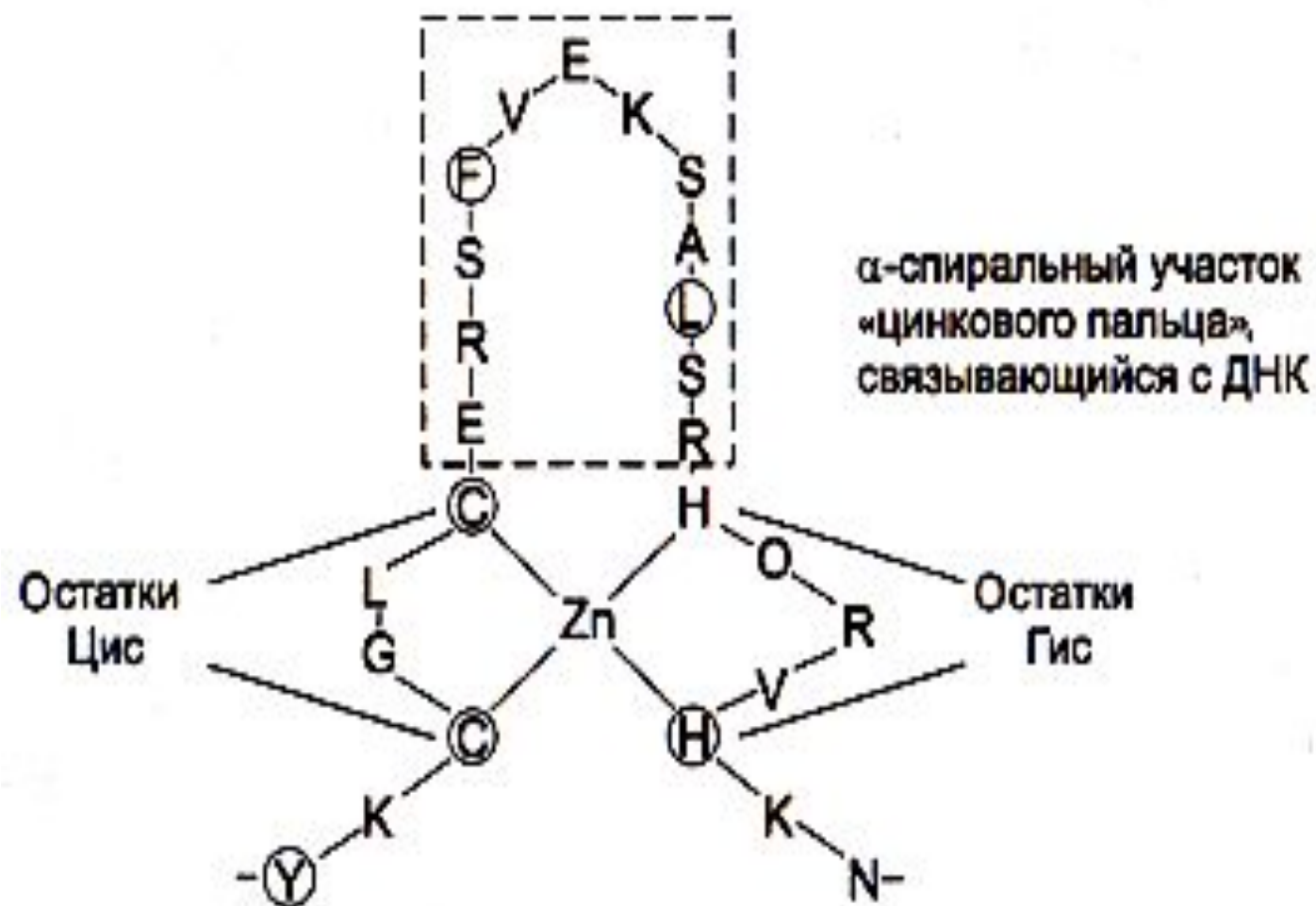
A)



Б)

Супервторичные структуры

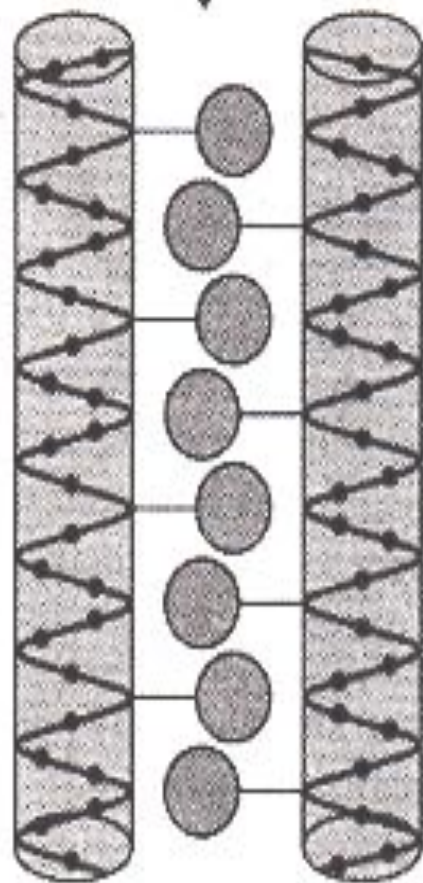
- Лейциновые застежки
- Цинковые пальцы
- В - бочонки

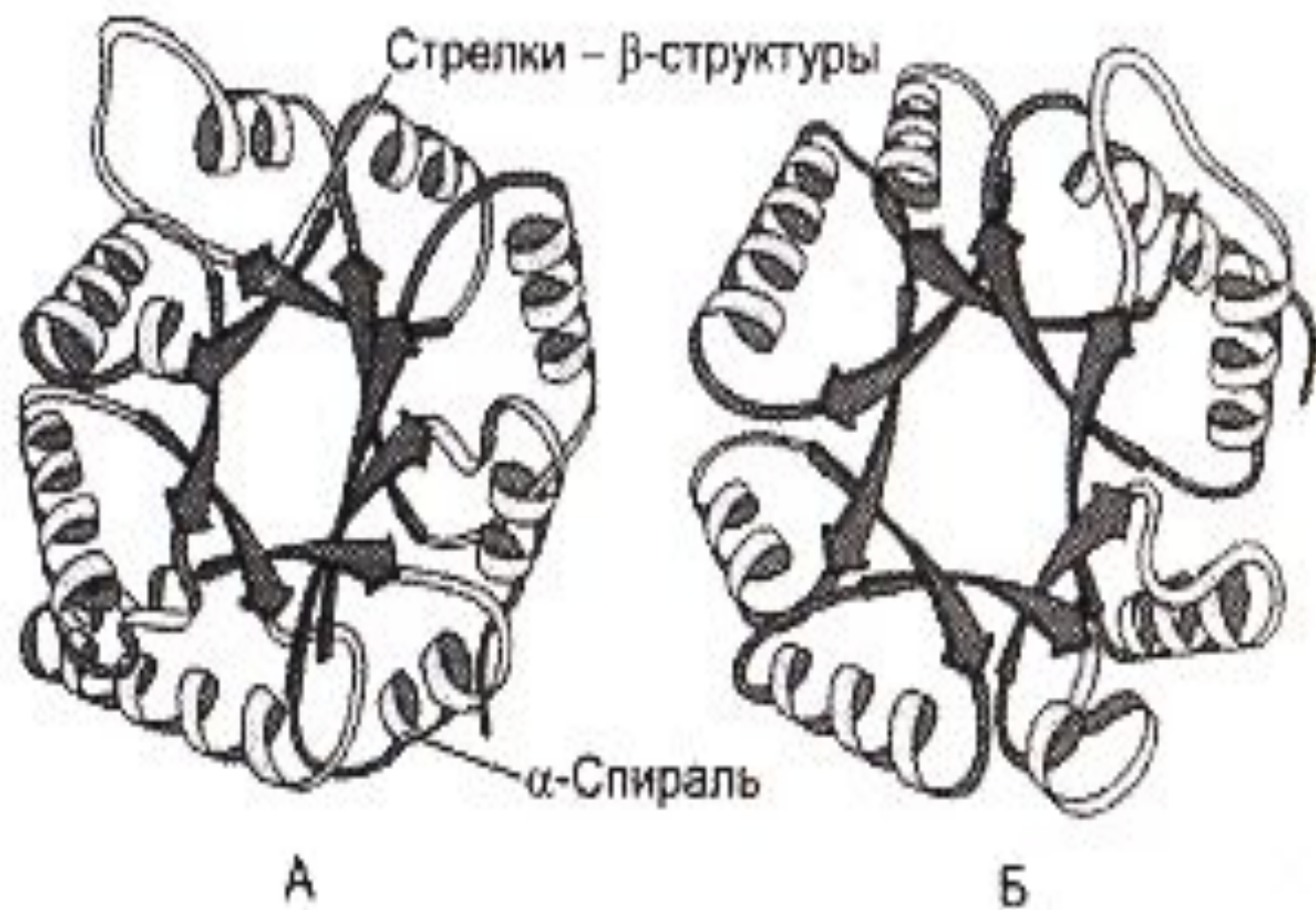


Гидрофобные радикалы
Лей

α -спиральный участок
другого белка

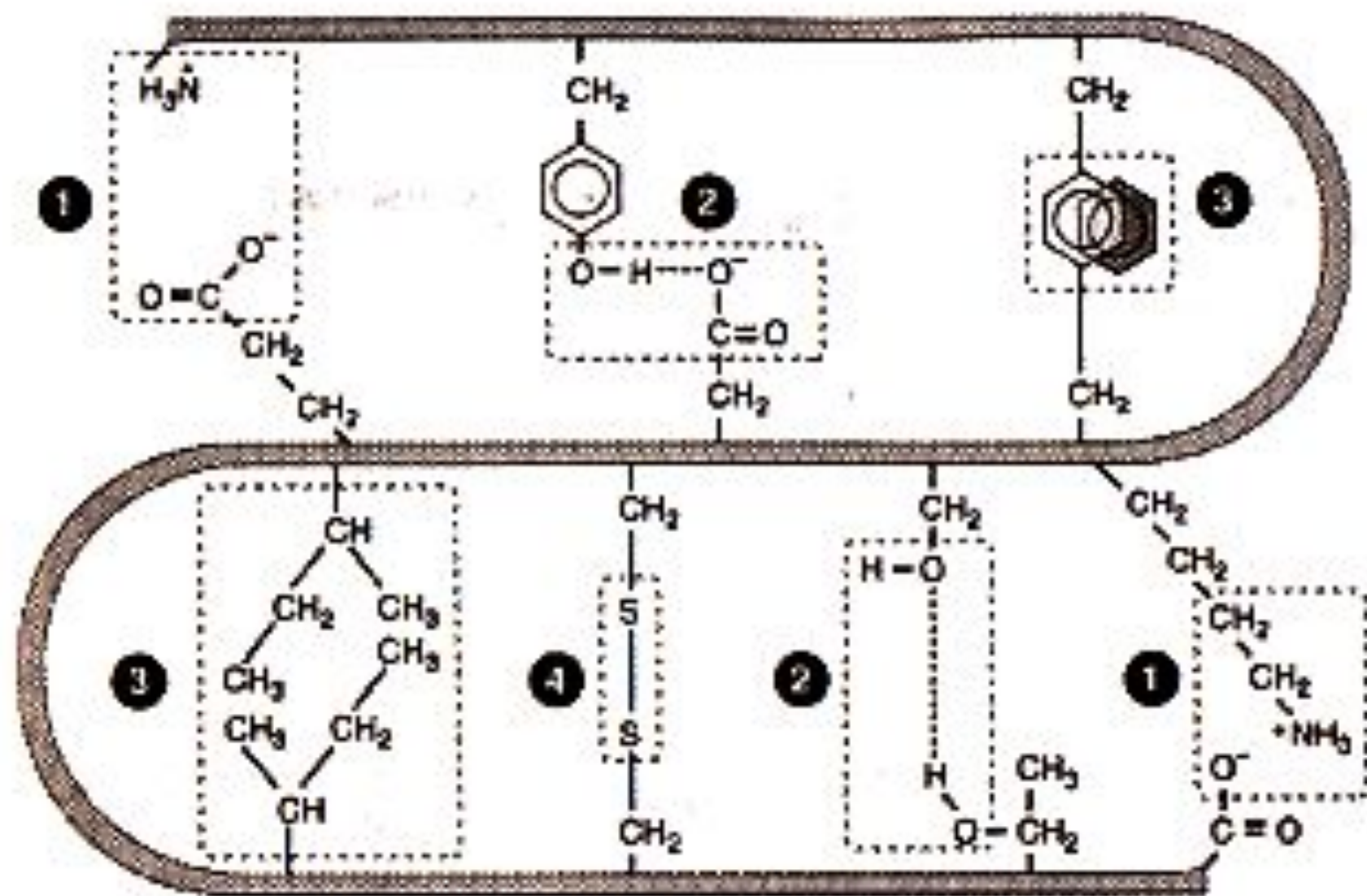
α -спиральный участок
одного белка





Третичная структура белка

- Дж. Кендрию (1956г., Кембридж) – рентгеноструктурный анализ миоглобина кашалота.
- Третичная структура отличается от вторичной разнообразием и нерегулярностью связей между далеко отстоящими друг от друга радикалами аминокислот.
Форма молекул - глобулы.
- Виды связей:
- Электростатического притяжения или отталкивания (**ион-ионные взаимодействия**)
- Водородные связи между пептидными группировками и между радикалами аминокислот
- Гидрофобные взаимодействия между неполярными радикалами
- Взаимодействия между ионами металлов (простетические группы) и радикалами аминокислот
- Возможны S – S связи (особенно в секретируемых белках).



Третичная структура белков

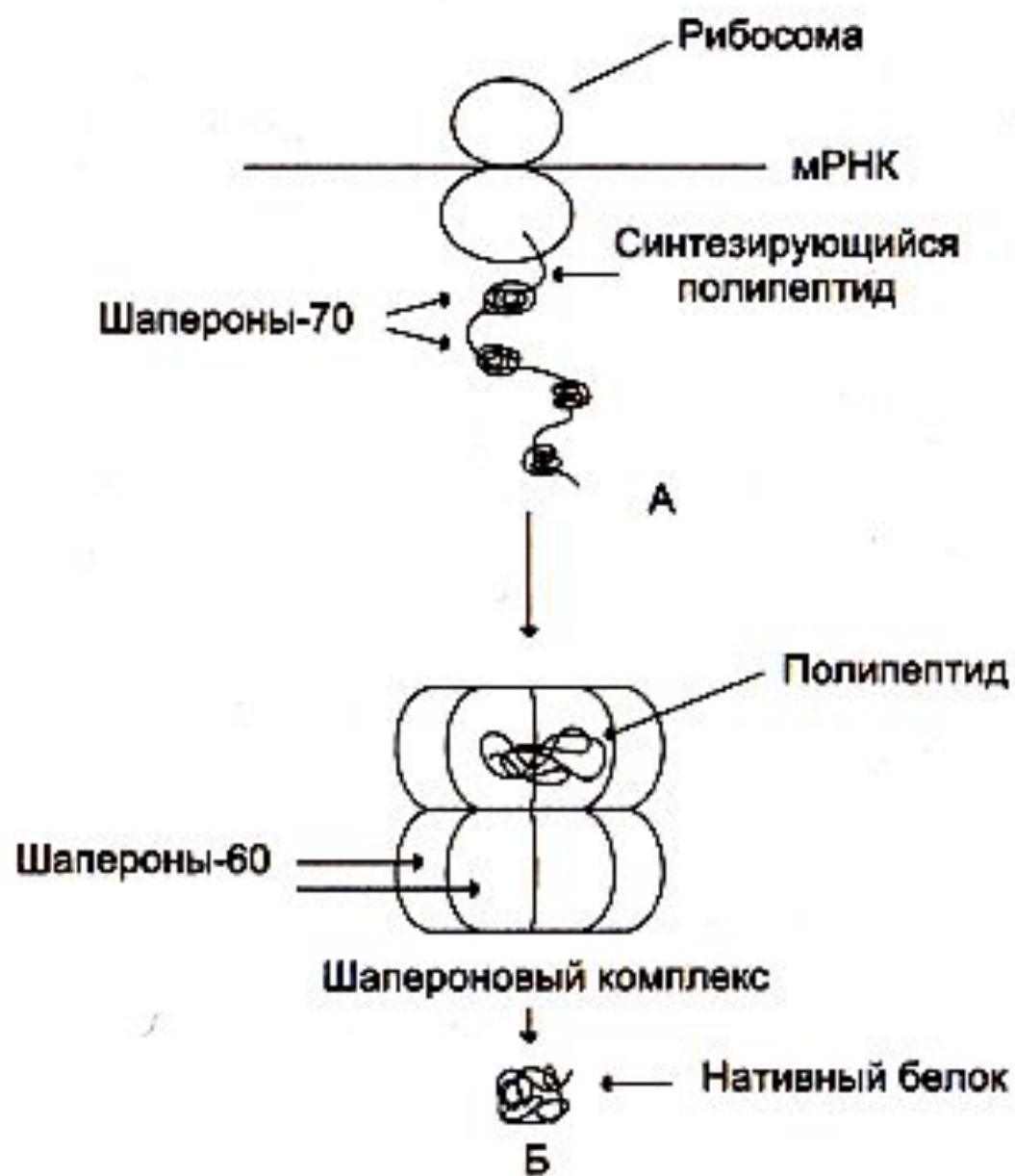
- Именно на уровне **третичной структуры** большинство белков становятся **функционально активными**.
- Процесс укладки полипептида в единственно правильную, функционально активную структуру –
 - **ФОЛДИНГ**

ФОЛДИНГ

- Условия для «правильной» укладки белковой цепи в пространстве создаются **ШАПЕРОНАМИ** – белками-»няньками», окружающими вновь синтезируемый белок, отграничивающими его от окружающего пространства , от контактов с другими молекулами.

Шапероны

- **Шапероны** – комплексы из нескольких белковых субъединиц, формирующих бочонок с внутренней полостью, где происходит «перебор» всех возможных конформаций созревающих белков до достижения наиболее выгодной.
- **Шапероны** разделяют на 6 классов (по молекулярной массе: от 110 до 15 кДа).
- **Фолдинг** – энергозатратный процесс, в составе шапероновых комплексов есть белки с АТФ – азной активностью.
- **Шапероны**, как и другие белки м.б. **конститутивными** и **адаптивными** (белки теплового шока).



Четвертичная структура белка

- **Олигомерные** (состоящие **из 2 –х и более субъединиц-протомеров**), соединенных слабыми, **нековалентными** связями. **М.м. более 50 кДа.**
- Эти связи легко разрушаются при температурных воздействиях, УЗ, механических воздействиях, в присутствии детергентов, больших концентраций солей.
- Субъединицы м.б. одинаковыми (фосфоорилаза) или различными (ЛДГ, КФК, Hb).
- **Кооперативный эффект.**
- **Явление самосборки.**

Пространственная структура белка

- Генетически заданная, единственно энергетически выгодная и функционально активная
- Пространственная конформация лабильна, подвижна в определенных пределах (происходят функциональные изменения или под влиянием условий среды).

Заметки о белках

- **Видовая специфичность** белков.
Филогенетически близкие организмы имеют сходные по строению белки. Белки, выполняющие одинаковые функции у организмов разных видов также очень похожи.
- **Индивидуальная специфичность** белков.
Организм опознает чужеродные белки.
- **Разные молекулярные формы белков.**
Значимые и незначимые замены аминокислот.

Физико-химические свойства белков. Методы белковой химии.

- Белковые молекулы очень **гетерогенны** по всем физико-химическим свойствам: **молярной массе, растворимости, суммарному заряду**. Эти различия используются для выделения, разделения и идентификации белковых фракций.

Свойства белковых растворов

- Белковые растворы обладают свойствами истинных растворов (гомогенны, устойчивы) и свойствами коллоидных систем (обусловленных в основном большой молярной массой частиц).

Свойства белковых растворов, как коллоидных систем

- 1. **Опалесценция** и способность рассеивать лучи видимого света (Эффект Тиндаля)
- 2. **Малая скорость диффузии**
- 3. Не способны проходить через полупроницаемую мембрану. **Высокое онкотическое давление.**
- 4. **Высокая вязкость растворов.**
Переходы золь $\rightleftharpoons$ гель.

Растворимость белков определяется главным образом двумя факторами:

- Зарядом молекул
- Способностью образовывать мицеллы, окруженные гидратной оболочкой
- Необходимо различать растворимость и гидратацию (способность связывать молекулы воды)!

Какие факторы влияют на растворимость белка? Как осадить белок из раствора?

- 1. **Изменение pH среды.** При pH, равном ИЭТ белки теряют заряд, агрегируют и осаждаются из раствора.
- 2. **Присутствие солей.** Малые концентрации электролитов увеличивают растворимость, большие – действуют как водоотнимающее средство (высаливание).
- 3. **Изменение температуры.** Нагревание увеличивает растворимость, высокие температуры денатурируют белок.
- 4. **Присутствие органических растворителей** (спирт, эфир, хлороформ), алкалоидов (кофеин, танин) и др. водоотнимающих средств.
- 5. **Присутствие ионов металлов.**
- 6. **Действие неорганических кислот, щелочей.**
- Денатурированные белки теряют растворимость.
- Осаждение – всегда ли признак денатурации?

Центрифугирование

- **Осадить белок** из раствора можно под действием **центробежной силы**.
- Каждая частица имеет свой **коэффициент седиментации**.
- Скорость осаждения зависит от величины центробежной силы, плотности и вязкости растворителя, **размера, формы частиц и их плавучей плотности**.
- **Ультрацентрифугирование** применяют в **аналитических и препаративных целях**:
- **Скоростное центрифугирование**
- **Седиментационное равновесие**
- **Центрифугирование в градиенте плотности**

Определение молярной массы вещества с помощью ультрацентрифугирования

$$M = \frac{R \times T \times S}{D \times (1 - v\rho)}$$

R – газовая постоянная

T – абсолютная температура

S – коэффициент седиментации

D – коэффициент диффузии

v – удельный объем, занимаемый 1 граммом вещества

ρ – плотность растворителя

Дифференциальное центрифугирование

- Применяется для разделения клеток, внутриклеточных структур с разной плавучей плотностью и соответственно, разным коэффициентом седиментации.
- Из гомогената тканей ядра и фрагменты мембран осаждаются при центробежном ускорении **1000 g** ($g = 9,8\text{м/сек}$); митохондрии и лизосомы –при **3300g**; фракция микросом – при **16 000 g**; конечный супернатант (растворимая фракция белков) – **100 тыс.g.**

Другие методы белковой химии

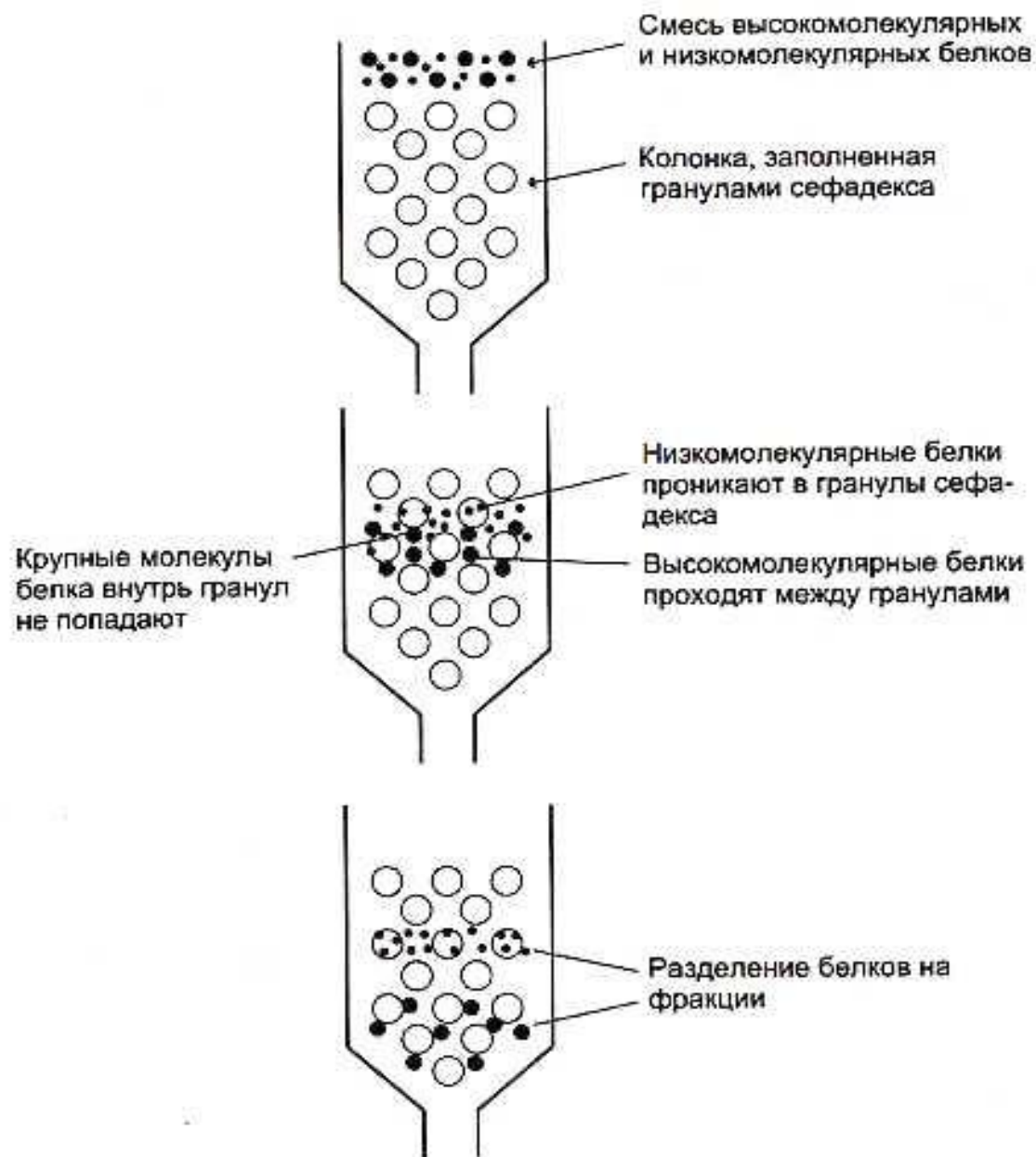
- Структуру молекулы можно определить по результатам рентгеноструктурного анализа (кристаллы); ядерно-магнитного резонанса (растворы белков).
- Форму молекул – по результатам вискозиметрии

Способы разделения, идентификации и определения чистоты белковых фракций

- **Электрофорез:**
- Тизелиус, 1937г. **Свободный э/ф** по методу движущейся границы;
- Э/ф в тонком слое буфера на **твердых носителях** (бумага, АЦ - пленка);
- **Диск-электрофорез** в полиакриламидном геле (разделение по заряду и размерам молекул)

Способы разделения, идентификации и определения чистоты белковых фракций

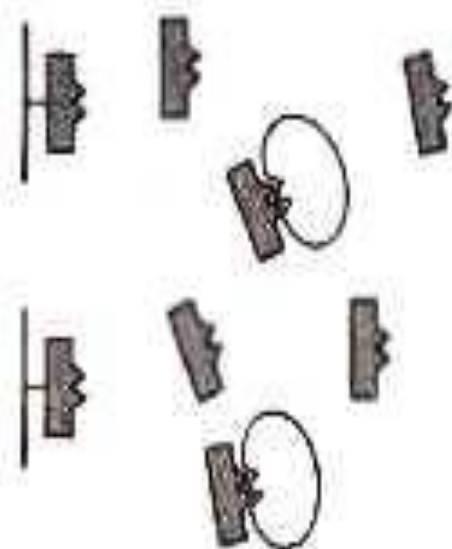
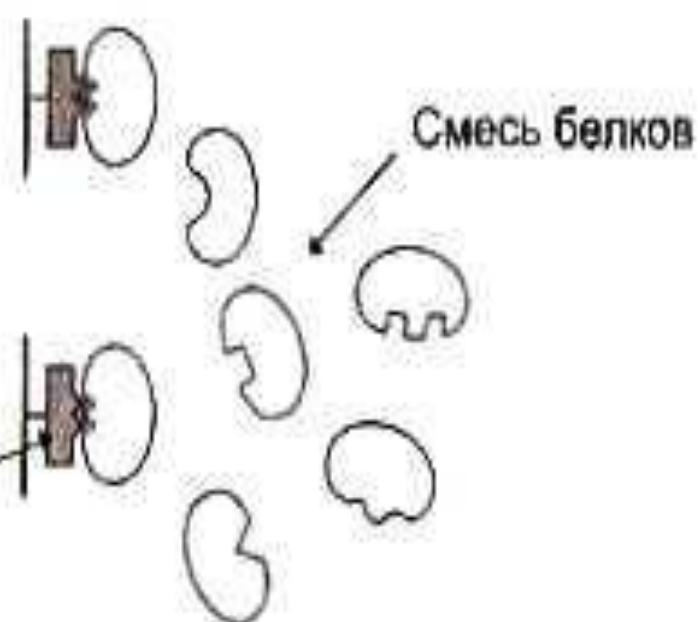
- **Хроматография:**
- **Ионо - обменная** (по заряду)
- **Распределительная** (по растворимости)
- **Гель-фильтрация** (по массе)
- **Адсорбционная** (по способности адсорбироваться на определенных веществах)
- **Аффинная** (по сродству)





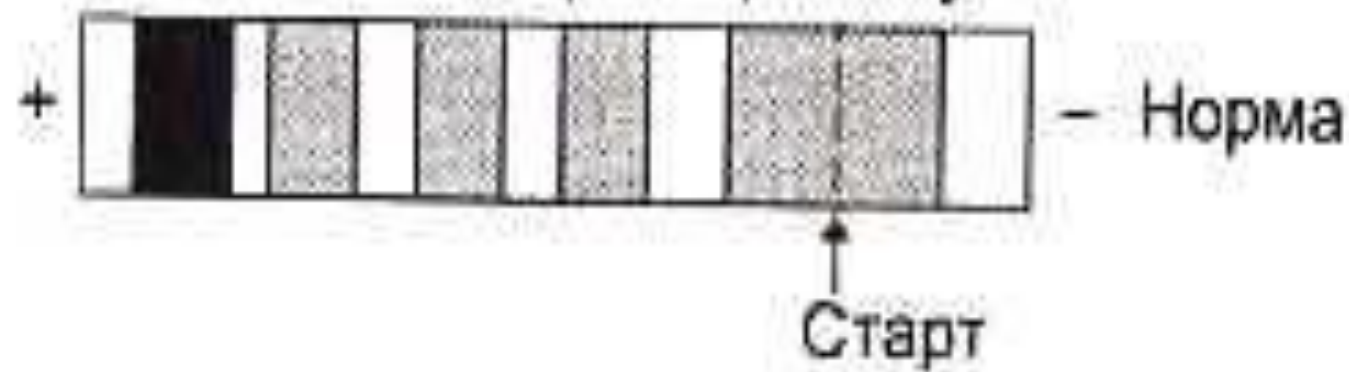
Белковые
фракции

Прикреплённый к инертному полимеру специфический лиганд



Все способы манипуляции с белками
(выделение, разделение и т.д.) - это
компромисс между возможностями
физико-химических методов и
необходимостью сохранить белок в
нативном состоянии

Альбумин α_1 α_2 β γ -Глобулины



Пептиды (условно до 5 тыс. Да)

- Образуются путем лимитированного протеолиза из крупных белков –предшественников или внеерибосомальным синтезом.
- **БАВ** (действуют в концентрации 10^{-8} - 10^{-12} М).
- **Естественные регуляторы, эндогенные «лекарства».**
- Распадаются путем гидролиза до аминокислот, т.е. без образования токсических веществ.
- **1953г., В.Де Винью.** Искусственный синтез окситоцина. Началась эра синтеза пептидов и белков, в частности для использования в качестве лекарств.

Пептиды

- Эндорфины, энкефалины
- Тафтсины
- Кейлоны
- Вазопрессин, окситоцин
- Ангиотензин
- Кинины
- Гастрин, секретин

Простые белки. **Альбумин.**

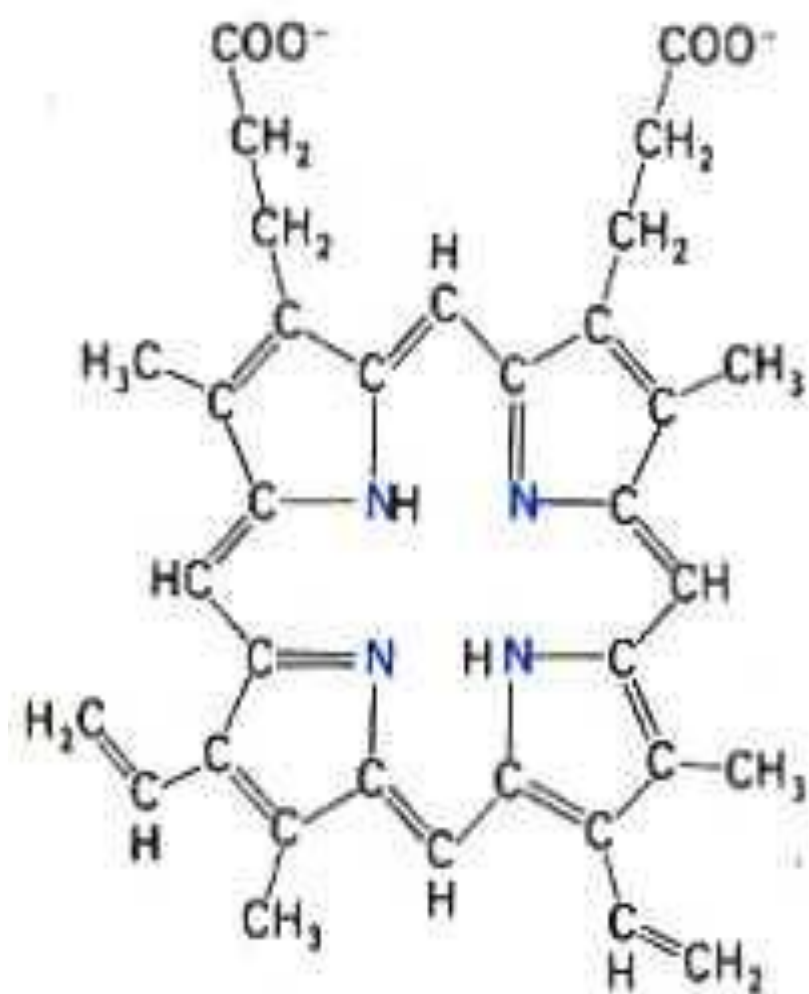
- Сывороточный белок (более половины всех белков плазмы), **неспецифическая транспортная** система плазмы, обеспечивает **онкотическое давление** плазмы крови.
- **Простой белок**, одна полипептидная цепь (584 аминокислот), 17 S –S мостов, 66700 Да.
- Ассиметричная **глобула** с тремя повторяющимися гомологичными областями.
- **Кислый, отрицательно** заряженный (насыщен остатками глутамата).
-

Сложные белки (имеют небелковые включения органической или неорганической природы. Типы связей между **апо-частью** и **простетической группой** различны.

- **Хромопротеины** (гемопroteины, хлорофиллы, флавопротеины)
- **Металлопротеины** (ферритин, трансферрин).
- **Фосфопротеины** (казеин, фосвитин)
- **Гликопротеины** (муцин, коллаген, фибриноген, церулоплазмин)
- **Нуклеопротеины** (ДНП, РНП)
- **Липопротеины** (ХМ, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП)

МИОГЛОБИН и ГЕМОГЛОБИН

- **Результат эволюции механизмов переноса и депонирования кислорода.**
- O_2 может растворяться в плазме, связываться со свободным гемом, с Hb, с Hb в составе эритроцитов (при этом эффективность связывания O_2 возрастает многократно).
- Миоглобин и гемоглобин – **сложные белки (апопротеин + гем)**.
- **Гем** – органическое вещество (протопорфирин = 4 пиррольных кольца + Fe^{2+} .)



Протопорфирин IX



Гем (Fe-протопорфирин IX)

Гем- содержащие белки

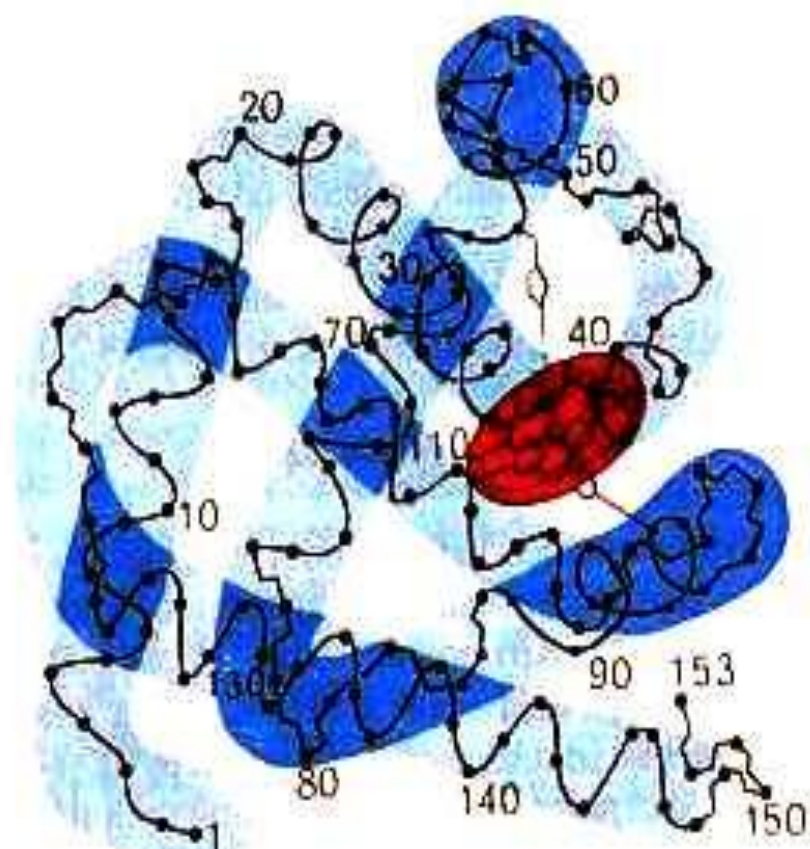
- Hb
- Миоглобин
- Цитохромы митохондрий и микросом
- Каталаза
- Пероксидаза
- **Функция гема различна. Зависит от его белкового окружения.**
- **Наличие гема влияет на пространственную структуру апочасти.**

Миоглобин

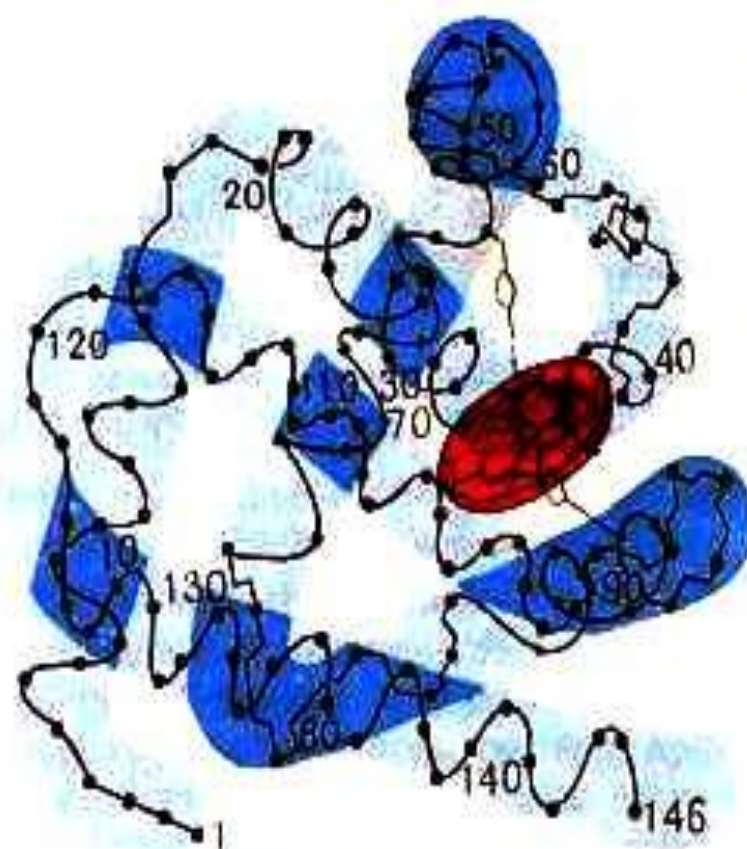
- Гем +апобелок (1 полипептидная цепь, 150 аминокислот). М.м.=17,8 кДа, 75% α – спирализации.
- Плотная глобула (45x35x25 Å), уложенная вокруг Fe^{2+} , связанного с 2-мя остатками гистидина. Снаружи – тир, тре; внутри - лей, вал, мет, фен.
- 1957 г., J. Kendrew, рентгеноструктурный анализ миоглобина.



Рис. 3.7. Рентгенограмма кристалла
миоглобина.



Миоглобин



β -Цепь гемоглобина

Гемоглобин

- **4 гема + 2 α - и 2 β - полипептидных цепи. М.м. 66 кДа. Белок четвертичной структуры. Субъединицы проявляют кооперативный эффект при связывании с кислородом.**
- α – и β - цепи пространственно схожи с полипептидной цепью миоглобина.
- **M. Perutz, кристаллография Hb.**
- **Функционально мио- и гемоглобин различаются! Насыщаются кислородом при разном давлении.**
- **Hb – аллостерический белок!** Сродство к O₂ зависит от pH среды, парциального давления кислорода и углекислого газа, присутствия 2,3 дифосфоглицерата.

