

Биохимия белков и пептидов. Ферменты

Лекция № 1

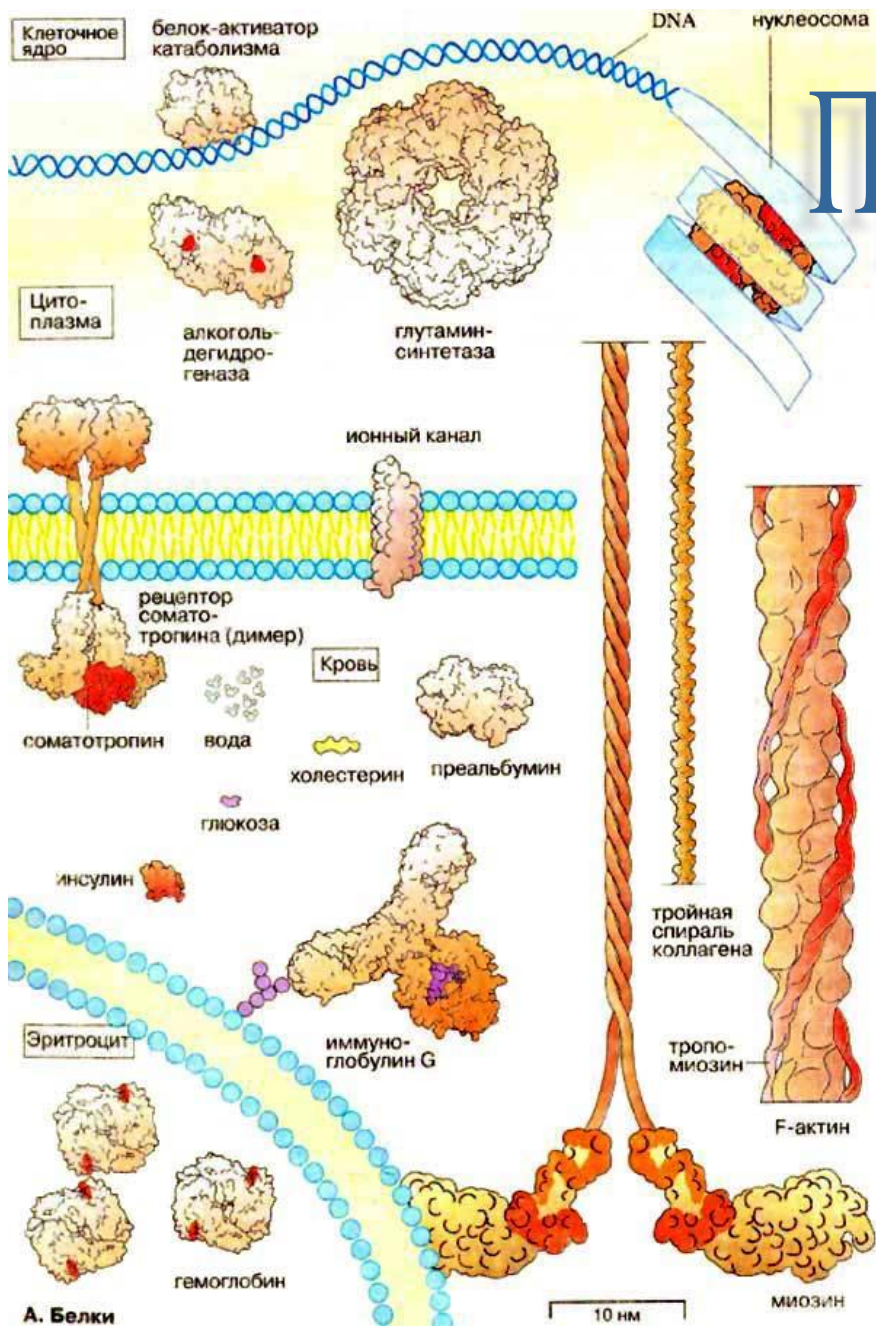
Лектор: проф. А. И. Грицук

Пептиды и белки: общие сведения

■ Белки

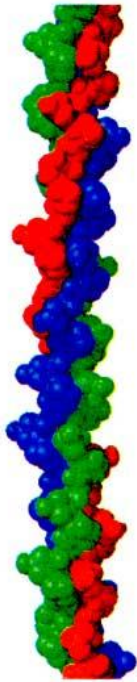
- При соединении аминокислот в цепочку образуется линейная макромолекула белка.
- В любом живом организме содержатся тысячи белков, выполняющих разнообразные функции.
 - Чтобы дать представление о многообразии белков, на схеме с увеличением примерно 1×1500000 приведен общий вид молекул (с соблюдением формы и размера) ряда вне- и внутриклеточных белков.

Примеры белков

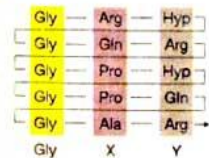


Химии, 2006

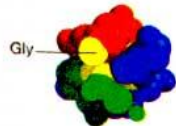
Структурообразующие функции



1. Тройная спираль (фрагмент)



2. Типовой триплет

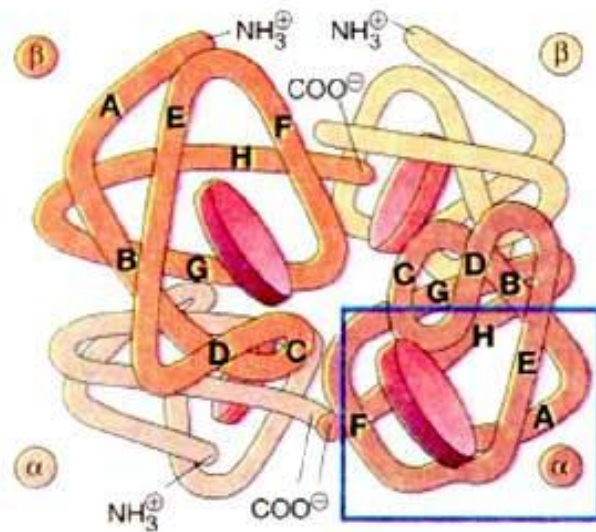


3. Тройная спираль (вид сверху)

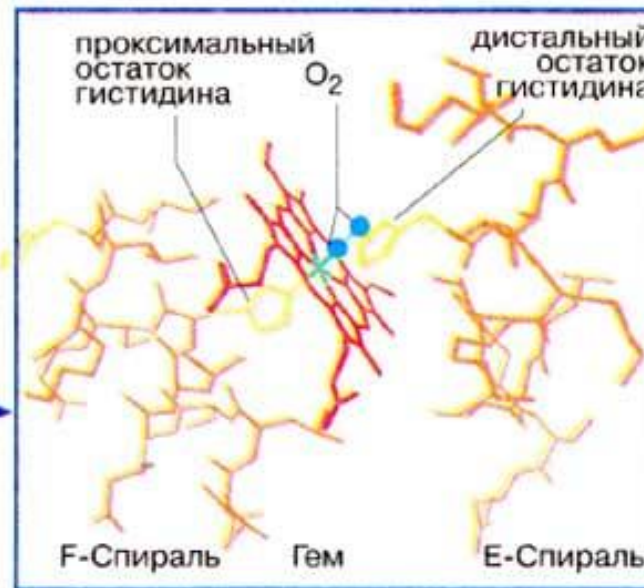
Б. Коллаген

- Структурные белки отвечают за поддержание формы и стабильности клеток и тканей.
 - В качестве примера структурного белка на схеме представлен фрагмент молекулы **коллагена**.
 - В заданном масштабе целая молекула коллагена размером $1500000 \cdot 300$ нм заняла бы три страницы.

Транспортные функции (гемоглобин)



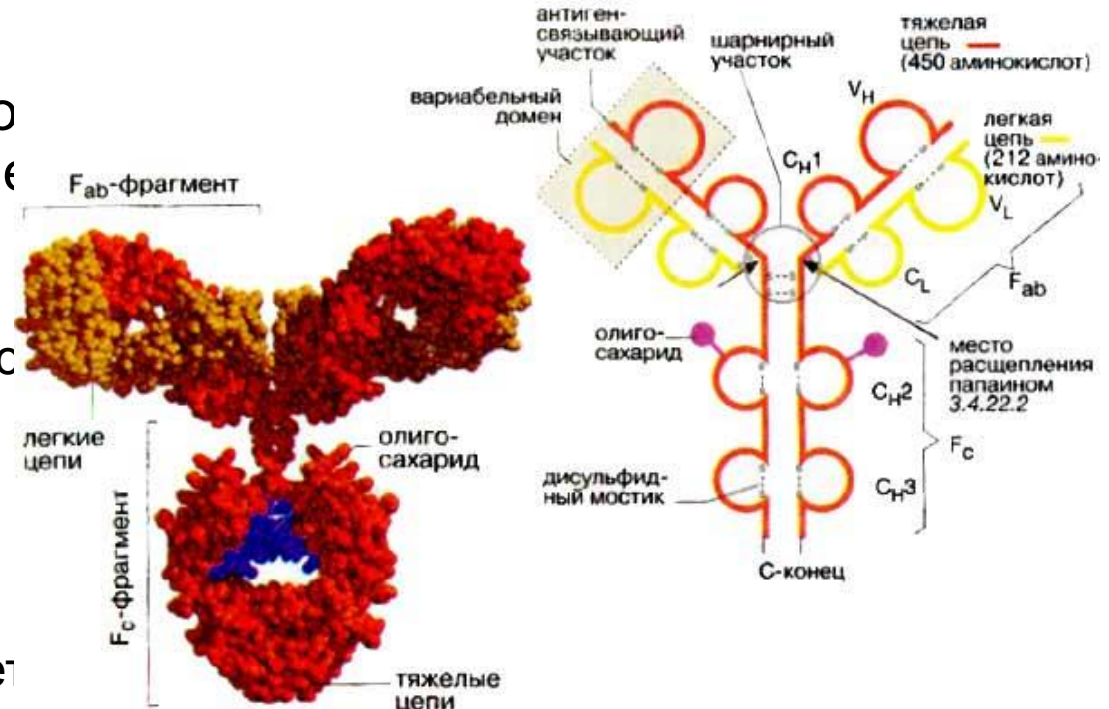
Гемоглобин А ($\alpha_2\beta_2$) М: 65 кДа
А. Структура гемоглобина



- Наиболее известным транспортным белком является **гемоглобин** эритроцитов, ответственный за перенос кислорода и диоксида углерода между легкими и тканями.

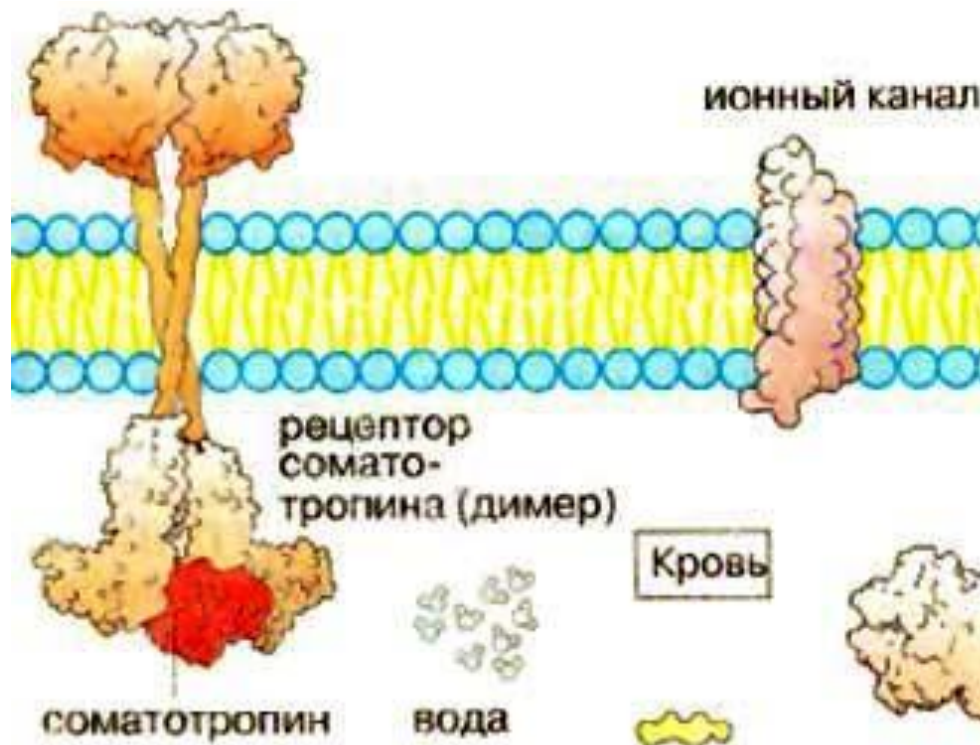
Защитные функции

- Иммунная система защищает организм от возбудителей болезни и чужеродных веществ.
 - В качестве ключевого компонента этой системы здесь представлен иммуноглобулин G, который на эритроцитах образует комплекс с мембранными гликолипидами.

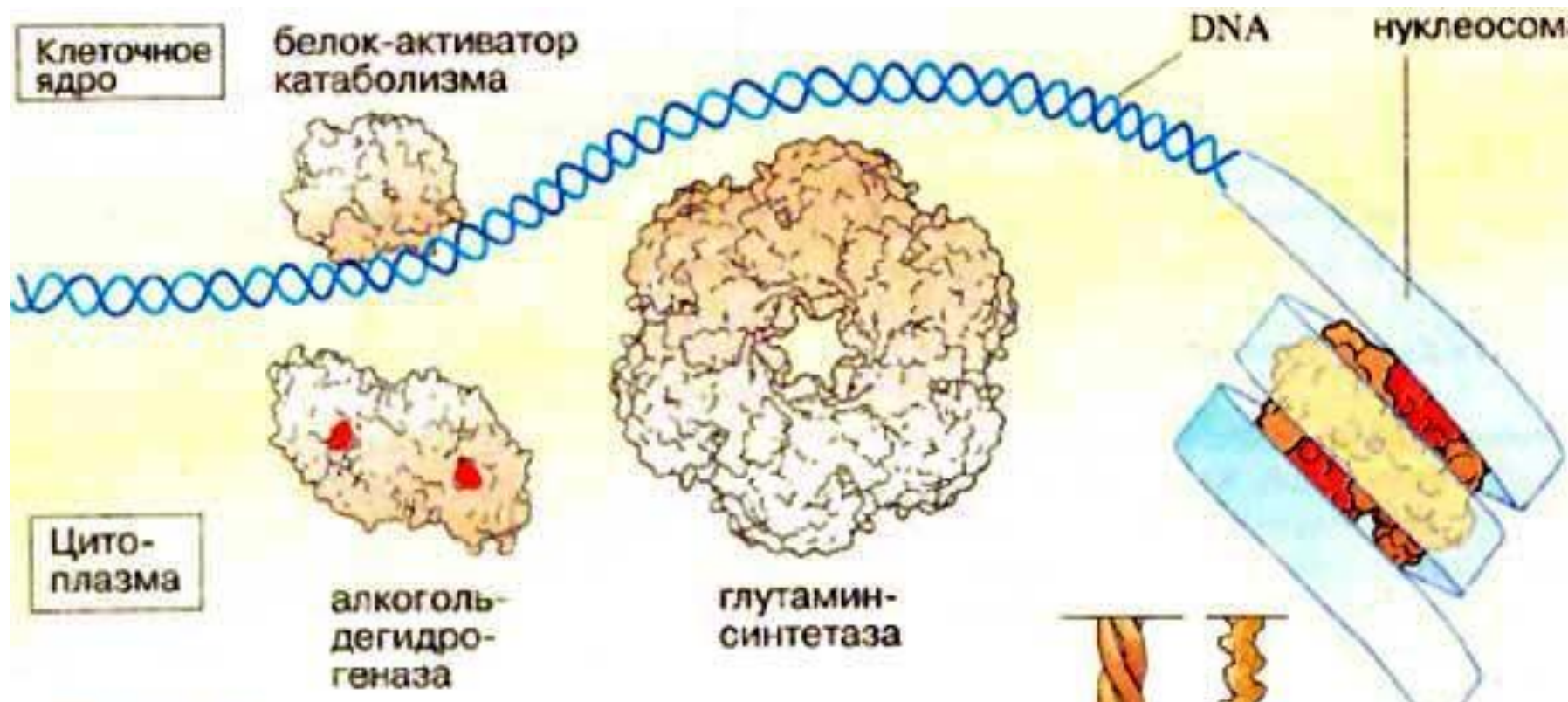


А. Доменная структура иммуноглобулина G

Регуляторные функции



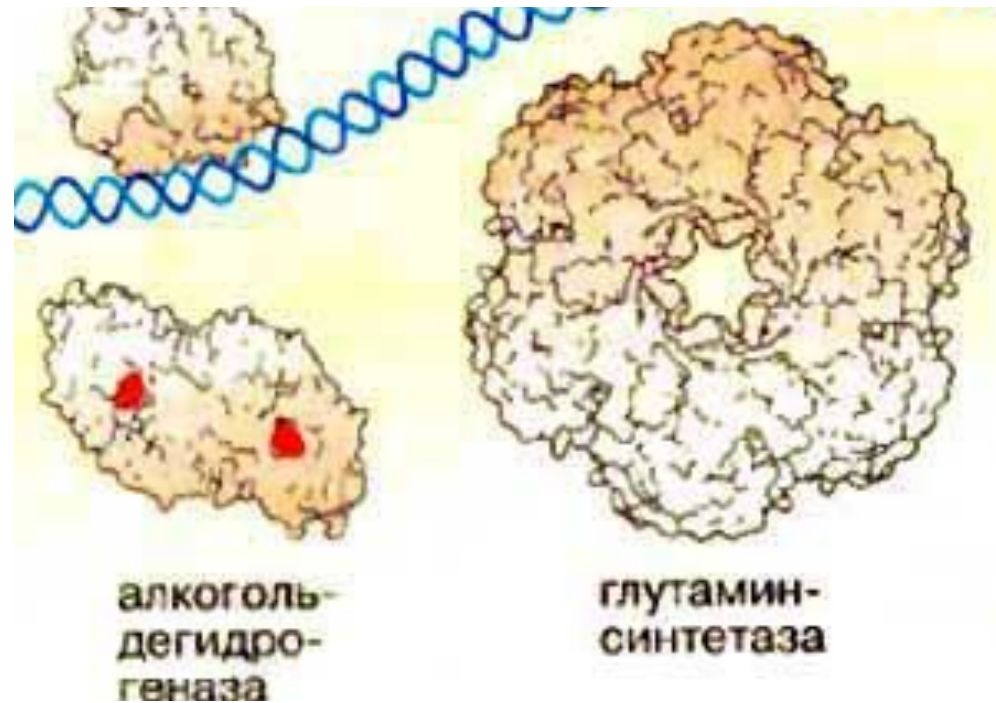
- В биохимических сигнальных цепях белки осуществляют функции сигнальных веществ (гормонов) и гормональных рецепторов.
 - В качестве примера здесь представлен комплекс гормона роста соматотропина с соответствующим рецептором. При этом экстрацеллюлярные домены двух молекул рецептора связывают одну молекулу гормона.
 - Связывание с рецептором активирует цитоплазматические домены комплекса и тем самым обеспечивает дальнейшую передачу сигнала.



- В регуляции обмена веществ и процессов дифференцировки принимают решающее участие ДНК-ассоциированные белки (факторы транскрипции).
 - Особенно детально изучено строение и функции белков-активаторов катаболизма и других бактериальных факторов транскрипции.

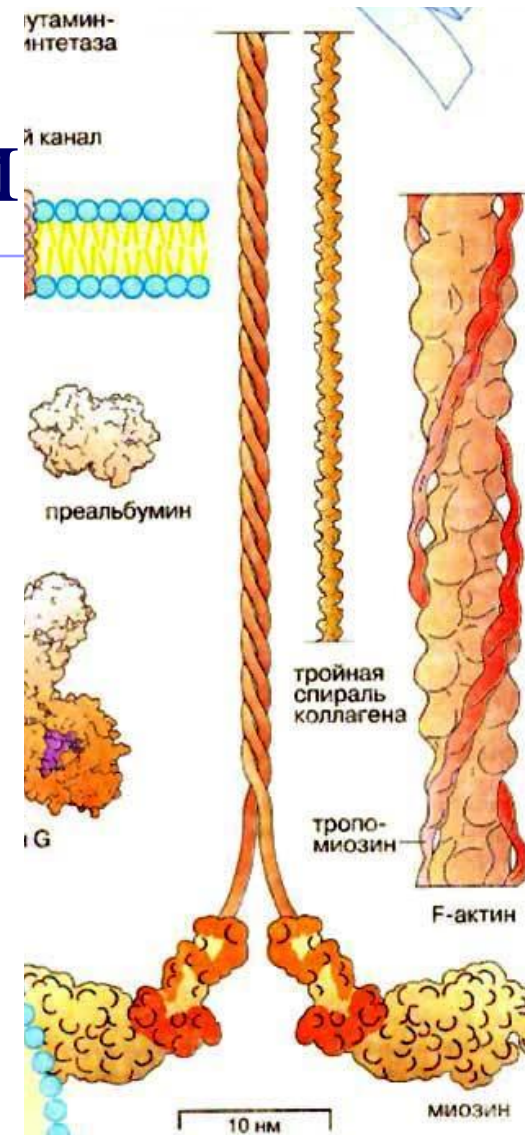
Ферменты

- Среди 2000 известных белков наиболее многочисленную группу составляют **ферменты**.
- Самые низкомолекулярные из них имеют мол. массу 10-15 кДа.
 - Белки среднего размера, как, например, приведенная на схеме алкогольдегидрогеназа, имеют мол.массу 100-200 кДа.
 - Молекулярная масса высокомолекулярных ферментов, к которым относится глутаминсинтетаза, построенная из 12 мономеров, могут достигать 500 кДа.



Двигательные функции

- Взаимодействие актина с миозином ответственно за мышечное сокращение и другие формы биологической подвижности.
- Гексамер миозина (справа) длиной 150 нм — один из наиболее крупных белков.
- Нитевидный актин (F-актин) образуется путем полимеризации относительно небольших молекул глобулярного актина (G-актин).
- Процессом сокращения управляют ассоциированный с F-актином тропомиозин и другие регуляторные белки.



Запасные функции

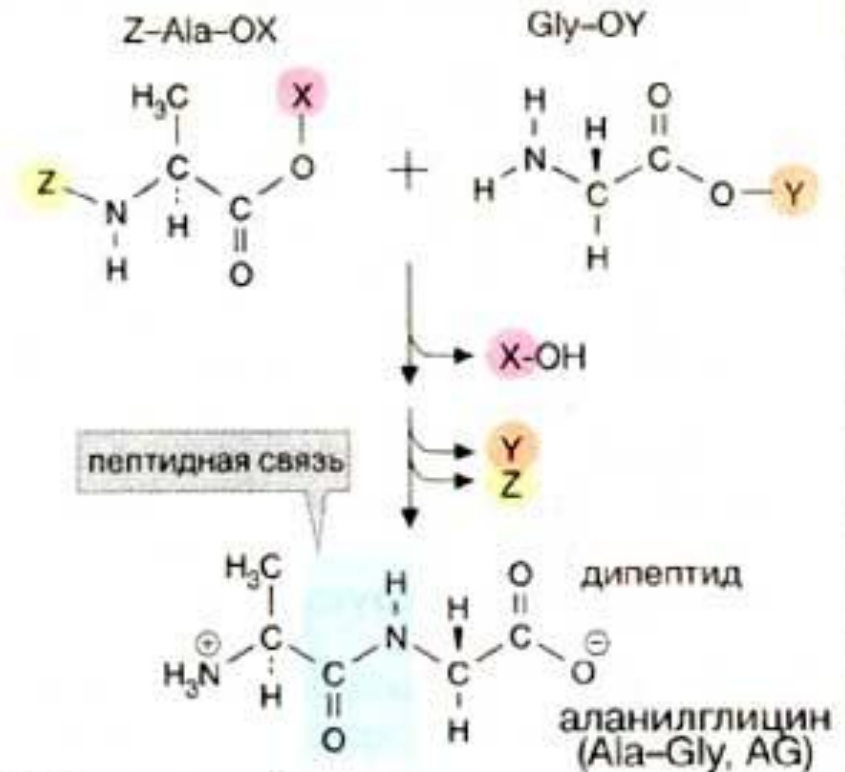
- В растениях содержатся запасные белки, являющиеся ценными пищевыми веществами.
- В организмах животных мышечные белки служат резервными питательными веществами, которые мобилизуются при крайней необходимости.

Пептидная связь

- Главными структурными единицами белкой и пептидов являются остатки **аминокислот**, связанные карбоксамидной **пептидной связью** между α -карбоксильной и α -аминогруппой.

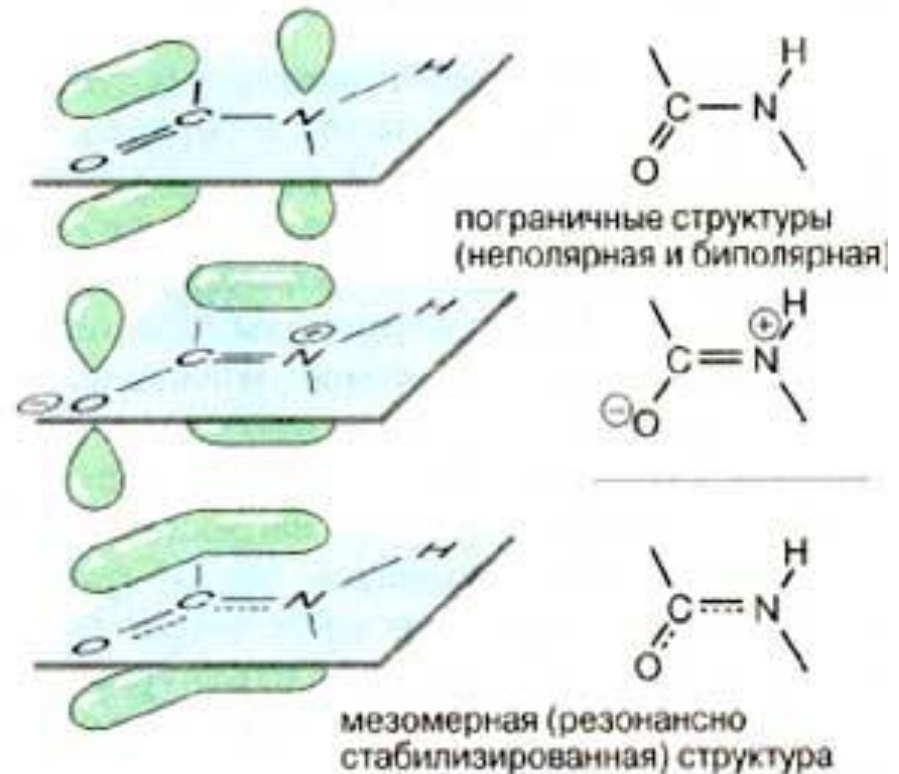
Пептидный синтез

- В клетках пептиды и белки синтезируются в процессе трансляции на рибосомах.
- При химическом синтезе пептидов функциональные группы, не участвующие в реакции, должны быть заблокированы защитными группировками (X,Y). Иначе наряду с целевым дипептидом Ala-Gly образуются Gly-Ala, Gly-Gly и Ala-Ala.
- Кроме того, необходимо активировать карбоксильную группу (Z), что облегчает нуклеофильное присоединение по аминогруппе.
- В настоящее время пептиды с определенной аминокислотной последовательностью получают с помощью автоматических пептидных синтезаторов.



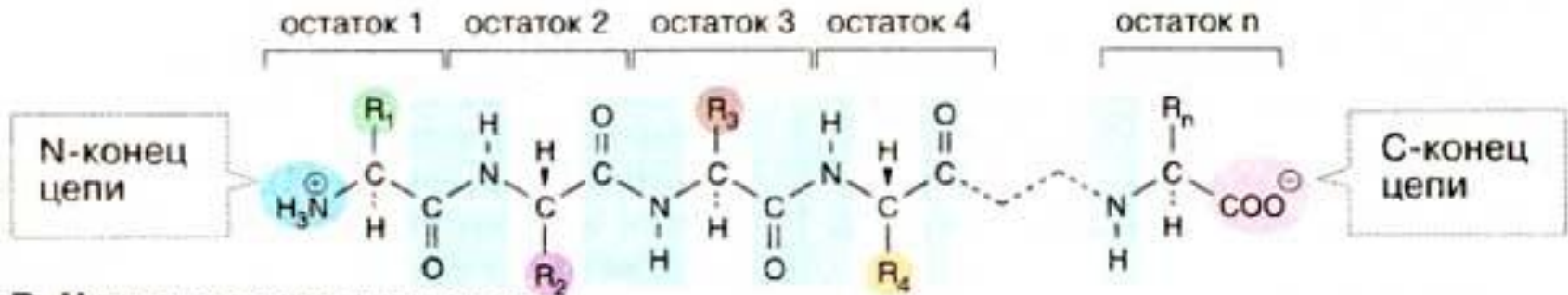
Мезомерия пептидной связи

- Как всякая карбоксамидная связь, пептидная связь стабилизирована за счет **мезомерии** (резонансно стабилизирована) и поэтому является практически плоской (планарной).
- Вращение вокруг связи C-N требует больших затрат энергии и, следовательно, затруднено.
- На схеме плоскость, в которой расположены 6 атомов пептидной группы, окрашена в светло-голубой цвет.



Б. Мезомерия пептидной связи

Номенклатура пептидов



В. Номенклатура пептидов

- Пептидная цепь имеет одно направление и два разных конца — N-конец, несущий свободную аминогруппу первой аминокислоты, и С-конец, несущий карбоксильную группу последней аминокислоты.
 - В белках и пептидах аминокислотные остатки связаны в цепочку последовательно.
 - Для того чтобы назвать конкретный пептид, достаточно перечислить (начиная с N-конца) последовательность входящих в его состав аминокислотных остатков в трехбуквенном или однобуквенном коде.
 - Например, аминокислотная последовательность пептидного гормона ангиотензина II читается следующим образом:
 - Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
 - или соответственно DRVYIHPF.

Конформация полипептидной цепи

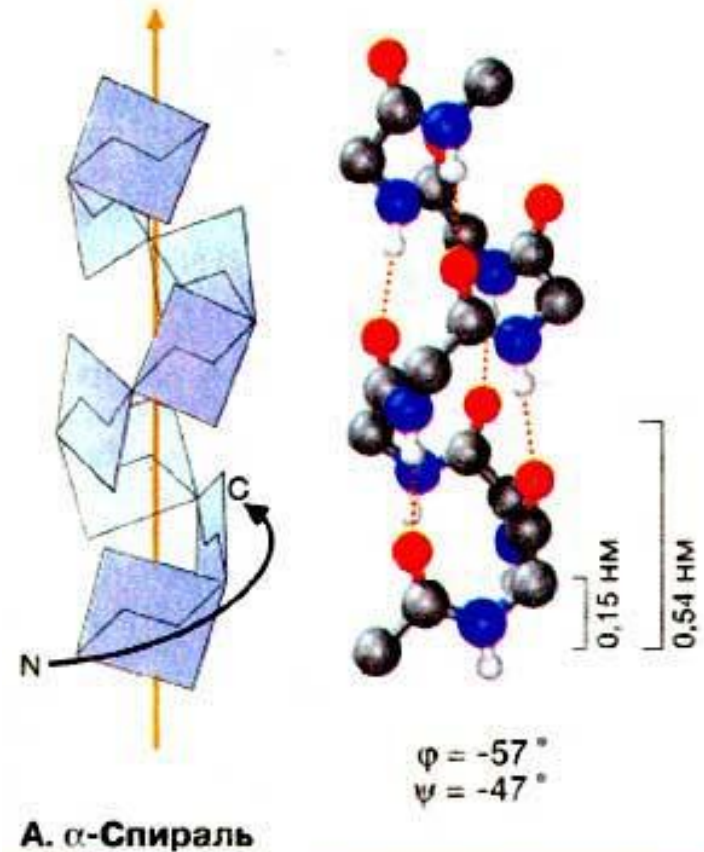
- Каждый аминокислотный остаток, за исключением концевых, принимает участие в образовании двух пептидных связей (с предыдущим и последующим фрагментами).
- Поскольку вращение вокруг связи C—N затруднено, повороты возможны только вокруг связей N—C α и C α —C (2).
 - Такие повороты измеряются двугранными углами ϕ и ψ .
 - Угол ϕ характеризует поворот вокруг связи N—C α , а следовательно, положение предшествующей пептидной связи;
 - угол ψ характеризует поворот вокруг связи C α —C, т. е. положение последующей связи.

Вторичные структуры белков

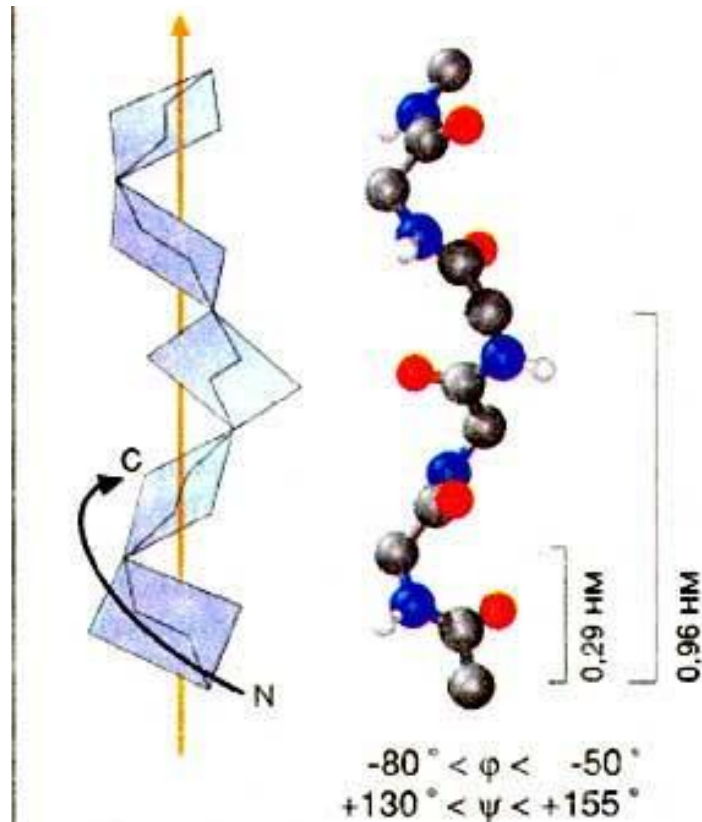
- Вторичные структуры стабилизированы водородными мостиками в пределах одной пептидной цепи или между соседними цепями.
 - Если такая регулярная структура распространяется на достаточно большой фрагмент молекулы белка, такой белок образует механически прочные нити или волокна.
 - Подобного рода структурные белки имеют характерный аминокислотный состав.

α -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 (красный пунктир) 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).
- Зеркально-симметричная относительно α_R -спирали левая α -спираль (α_L) встречается в природе крайне редко, хотя энергетически возможна.



Спираль коллагена



Б. Спираль коллагена

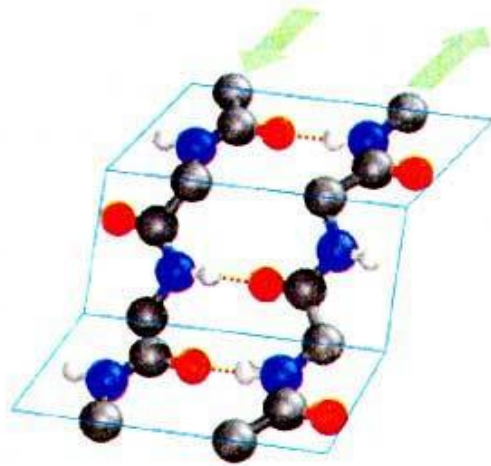
Другая форма спирали присутствует в коллагене, важнейшем компоненте соединительных тканей.

- Это левая спираль коллагена с шагом 0,96 нм и 3,3 остатка в каждом витке, более пологая по сравнению с α -спиралью.
 - В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь невозможно.
- Структура стабилизирована за счет скручивания трех пептидных цепей в правую тройную спираль.

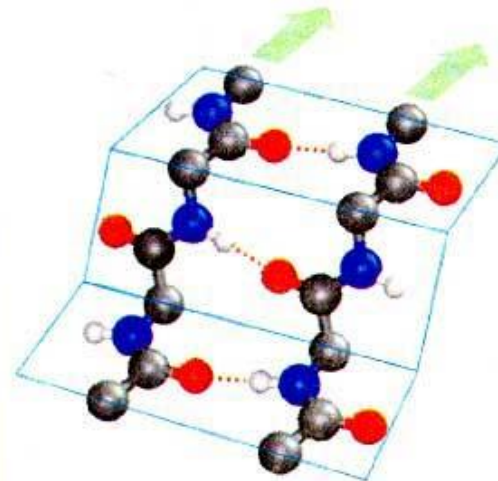
Складчатые структуры

- Две следующие почти вытянутые конформации пептидной цепи называются " β -складчатым листом", так как 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}).

Складчатые структуры (α и β)



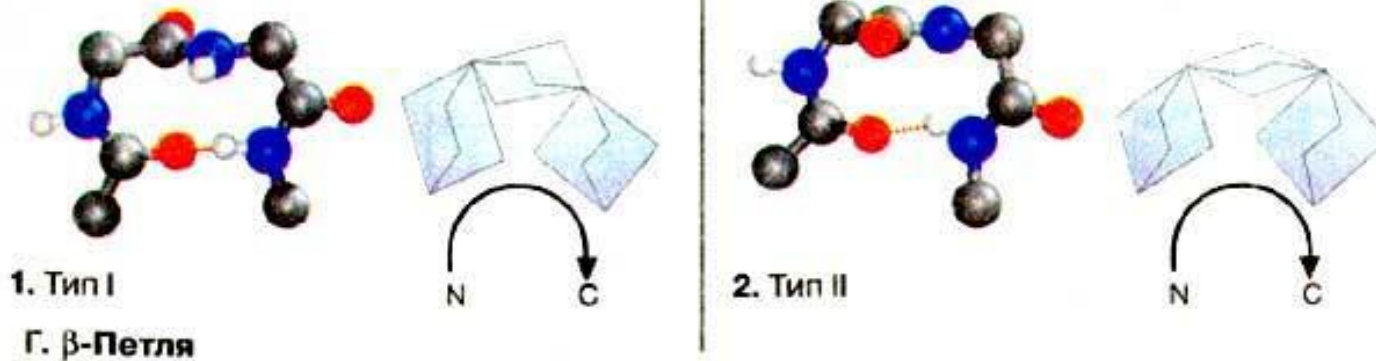
1. Антипараллельный складчатый лист
 $\varphi = -139^\circ$
 $\psi = +135^\circ$
В. Складчатые структуры



2. Параллельный складчатый лист
 $\varphi = -119^\circ$
 $\psi = +113^\circ$

- 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.

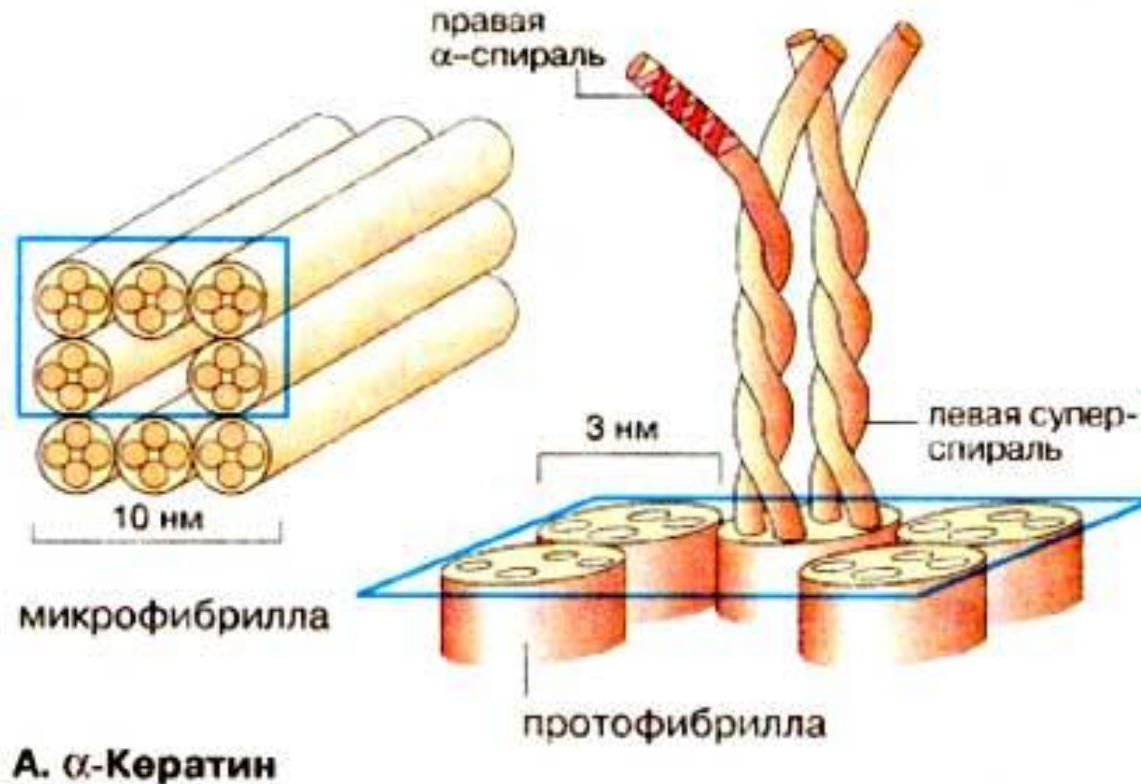
β-Петля



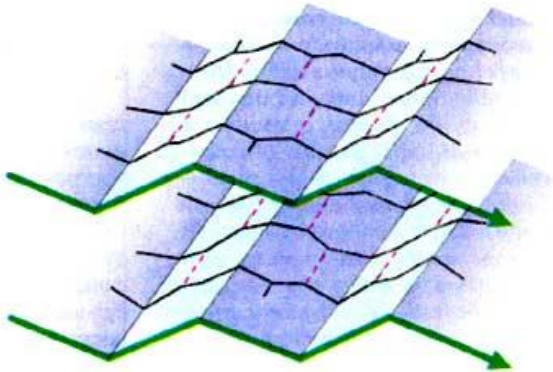
- В тех участках, где пептидная цепь изгибается достаточно круто, часто находится β-петля.
 - Это короткий фрагмент, в котором 4 аминокислотных остатка расположены таким образом, что цепь делает реверсивный поворот (на 180°).
 - Оба приведенных на схеме варианта петли (типы I и II) встречаются довольно часто.
 - Обе структуры стабилизированы водородным мостиком между 1 и 4 остатками.

Структурные белки

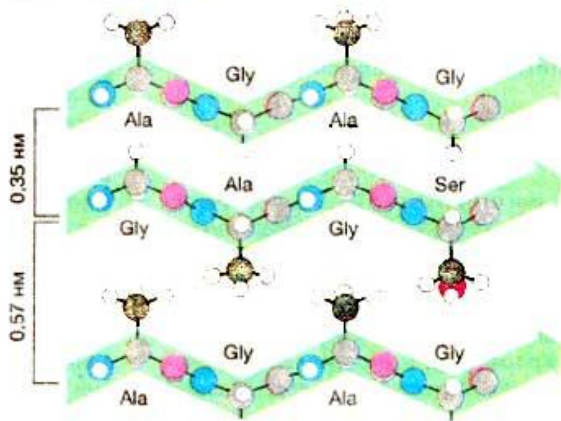
- Структурным белком, построенным преимущественно в виде α -спирали, является **α -кератин**.
 - Волосы (шерсть), перья, иглы, когти и копыта животных состоят главным образом из кератина.
 - В качестве компонента промежуточных филаментов кератин (цитокератин) является важнейшей составной частью цитоскелета.



Фиброин



1. Объемное изображение



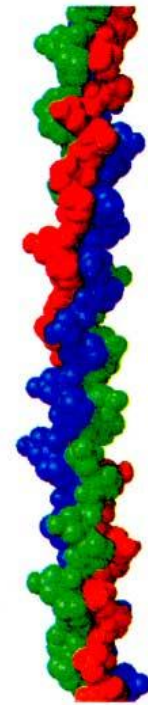
2. Схематическое изображение

В. Фиброин шелка

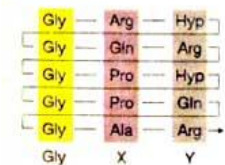
- Основной белок шелка, фиброин, обладает структурой антипараллельного складчатого листа, причем сами листы располагаются параллельно друг другу, образуя многочисленные пласты.
 - Так как в складчатых структурах боковые цепи аминокислотных остатков ориентированы вертикально вверх и вниз, в промежутках между отдельными слоями могут поместиться лишь компактные группировки.
 - Фактически фиброин состоит на 80% из глицина, аланина и серина, т.е. из трех аминокислот, характеризующихся минимальными размерами боковых цепей.

Коллаген

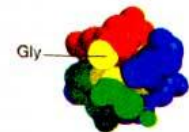
- В организме млекопитающих коллаген — преобладающий в количественном отношении белок: он составляет 25% общего белка.
 - Коллаген присутствует в различных формах прежде всего в соединительной ткани.
- Этот белок имеет необычный аминокислотный состав: 1/3 составляя глицин (Gly). примерно 10% пролин (Pro), а также гидроксипролин (Hyp) и гидроксизин (Hyl).
 - Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путем посттрансляционной модификации.
 - В структуре коллагена постоянно повторяется триплет Gly-X-Y (2), причем положение X часто занимает пролин, а Y — гидроксизин.
 - Имеются веские основания тому, что коллаген повсеместно присутствует в виде правой тройной спирали, скрученной из трех первичных левых спиралей.
 - В тройной спирали каждый третий остаток оказывается в центре, где по стерическим причинам помещается только глицин (остаток глицина окрашен в желтый цвет).
- Здесь представлен небольшой фрагмент тройной спирали.
- Вся молекула коллагена имеет длину около 300 нм.



1. Тройная спираль (фрагмент)



2. Типовой триплет



3. Тройная спираль (вид сверху)

Б. Коллаген

Глобулярные белки

- В отличие от нерастворимых фибриллярных белков растворимые белки имеют почти сферическую (глобулярную) форму.
- Глобулярным белкам свойственна высокоупорядоченная пространственная структура (конформация), которая способствует выполнению специфических биологических функций.
- Рассмотрим особенности строения глобулярных белков на примере небольшого белка инсулина.

Инсулин: первичная структура



- Под первичной структурой понимают аминокислотную последовательность полипептидной цепи.
 - Инсулин был первым белком, строение которого было установлено полностью еще в начале 50-х годов.
 - Молекула функционально активного инсулина состоит из двух полипептидных цепей (А- и В-цепи), соединенных дисульфидными мостиками (на схеме А-цепь окрашена в светло-коричневый цвет, В-цепь — в темно-коричневый, дисульфидные мостики — в желтый).
 - Дополнительный дисульфидный мостик локализован в пределах А-цепи.
 - В поджелудочной железе, где происходит биосинтез инсулина, вначале синтезируется белок-предшественник — проинсулин, в котором С-концевой аминокислотный остаток В-цепи связан с N-концевым остатком А-цепи 33-членным фрагментом (на схеме не окрашен).
 - После образования в проинсулине правильно замкнутых дисульфидных мостиков С-пептид отщепляется протеолитическими ферментами.

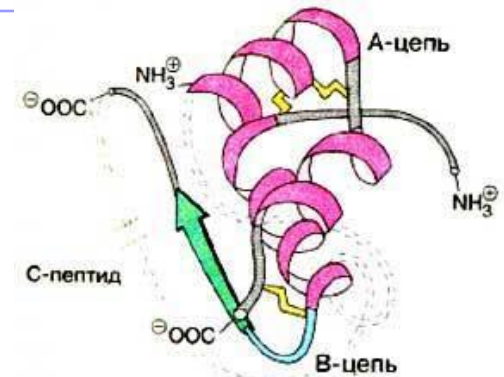
Инсулин: вторичная структура



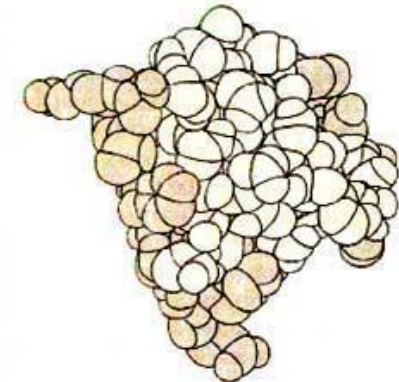
- Вторичными структурами называются участки полипептидной цепи с упорядоченной конформацией, стабилизированной водородными связями.
 - В большинстве глобулярных белков присутствуют одновременно как α -спирали, так и β -складчатые листы. Кроме того, имеются участки с неупорядоченной структурой.
 - Распространенным структурным элементом глобулярных белков является β -петля.
- В молекуле инсулина участки, имеющие форму α -спирали, составляют 57%, 6% приходится на β -складчатую структуру, 10% построено в виде β -петли, оставшиеся 27% не имеют упорядоченной структуры.

Инсулин. Третичная структура

- Трехмерные функционально активные конформации белков носят название третичной структуры.
 - Третичную структуру белков исследуют главным образом методом кристаллографии. Этот трудоемкий метод основан на дифракции рентгеновских лучей на хорошо сформированных белковых кристаллах
 - . На основании дифракционных картин рассчитывают распределение электронной плотности в кристалле, а по электронной плотности восстанавливают пространственную структуру молекул белка с атомным разрешением.
 - В настоящее время определены трехмерные структуры сотен белков. Однако многие белки пока нельзя изучить этим методом, поскольку их не удается получить и виде хорошо сформированных кристаллов достаточно крупных размеров.



1. Мономер: схема свортыывания



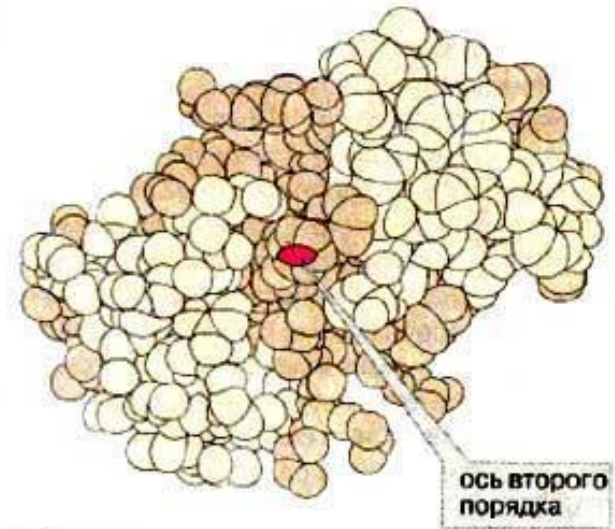
2. Мономер, ван-дерваальсова модель
В. Третичная структура

Инсулин: анализ третичной структуры

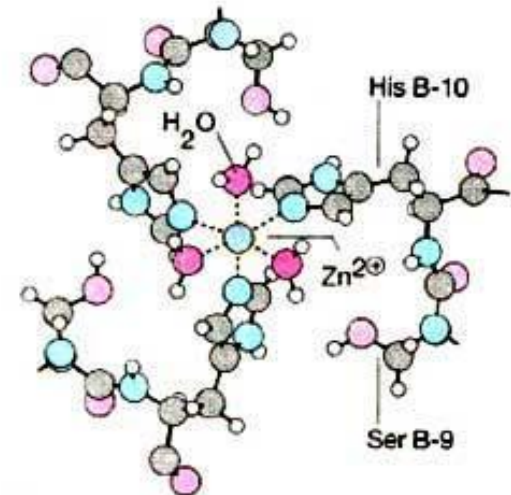
- Анализ третичной структуры инсулина показал, что в А-цепи имеются два коротких участка, а в В-цепи — один длинный участок, построенные в виде α -спирали.
 - При этом N-конец А-цепи и С-конец В-цепи располагаются в непосредственной близости друг от друга.
- Единственная структура типа складчатого листа образуется в **димере инсулина**.
- Третичная структура проинсулина еще не установлена.

Инсулин. Четвертичная структура

- Белковые молекулы часто образуют симметрично построенные комплексы, стабилизированные за счет нековалентных взаимодействий.
- Такие комплексы называются олигомерами, а составные единицы комплексов (от 2 до 12) - субъединицами или мономерами.
- Инсулин также образует четвертичные структуры.
 - В крови инсулин присутствует частично в виде димера. Димер имеет ось симметрии второго порядка.
 - Кроме того, в поджелудочной железе в качестве запасной формы содержится гексамер инсулина (из 6 мономеров), стабилизированный ионами Zn^{2+} .
 - В образовании двух комплексов с катионом Zn^{2+} принимают участие остатки гистидина в положении В-10 всех шести субъединиц.
- На схеме 2 показано, что каждый октаэдрический комплекс включает один катион Zn^{2+} , три остатка гистидина и три молекулы воды.



1. Димер



2. Zn^{2+} -комплекс в гексамере

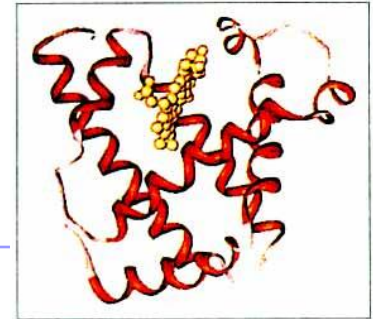
Г. Четвертичная структура

Свертывание белков

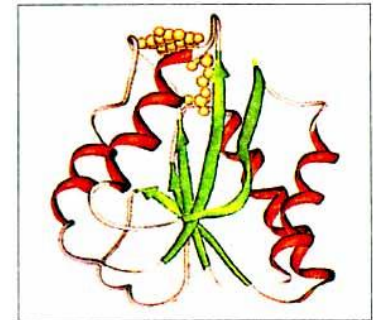
- При сравнении наиболее крупных глобулярных белков становится очевидным, что существует определенная схема свертывания полипептидной цепи, которая воспроизводится с незначительными вариациями.

Свертывание белков: примеры

- Рассмотрим ряд примеров (α -спирали выделены красным цветом, плоскости складчатого листа — зеленым), глобулярные белки, построенные из α -спиралей, как например, миоглобин, встречаются редко.
 - Обычно наблюдаются сочетания складчатых листов и спирализованных участков, как, например, во флаводоксине, небольшом флавопротеине (FMN выделен желтым цветом), где 5 расположенных веером складчатых листов из пяти параллельных тяжей формируют ядро молекулы; 4 α -спиральных участка окружают ядро снаружи.
- Иммуноглобулин построен из нескольких похожих доменов (независимых, компактно свернутых фрагментов полипептидной цепи), в которых два антипараллельных складчатых листа из трех или четырех тяжей образуют бочкообразную структуру.
- Приведенный на схеме С_H2-домен несет олисахарид (желтый).



1. Миоглобин



2. Флаводоксин



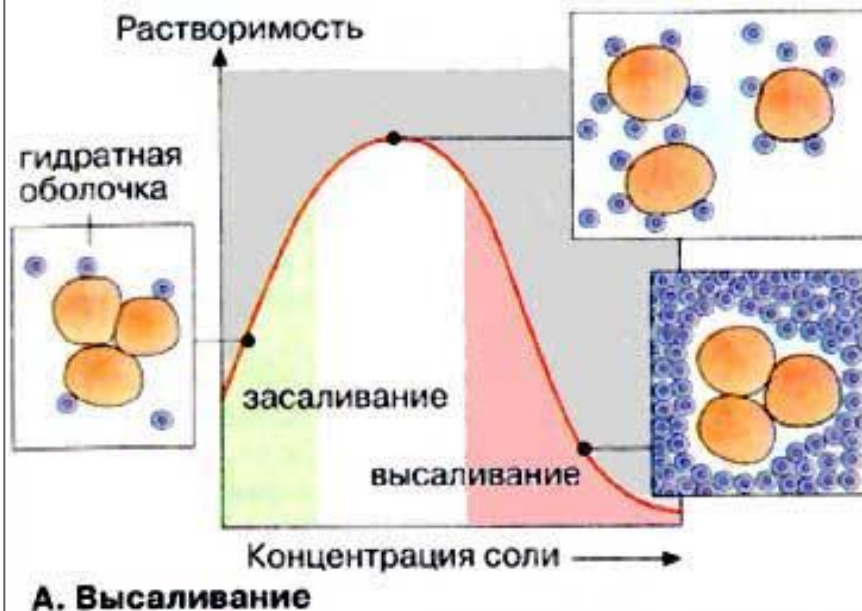
3. Иммуноглобулин G: С_H2-домен

Б. Свертывание белков: примеры

Методы выделения и анализа белков

- Препараты высокоочищенных белков находят разнообразное применение в научных исследованиях, медицине и биотехнологии.
 - Так как многие белки, и в особенности глобулярные, высоколабильны, выделение проводят с помощью предельно мягких методов и при пониженной температуре (0-5°C).
 - К таким методам относится **ионообменная хроматография**.
 - Существуют и другие методы выделения белков.

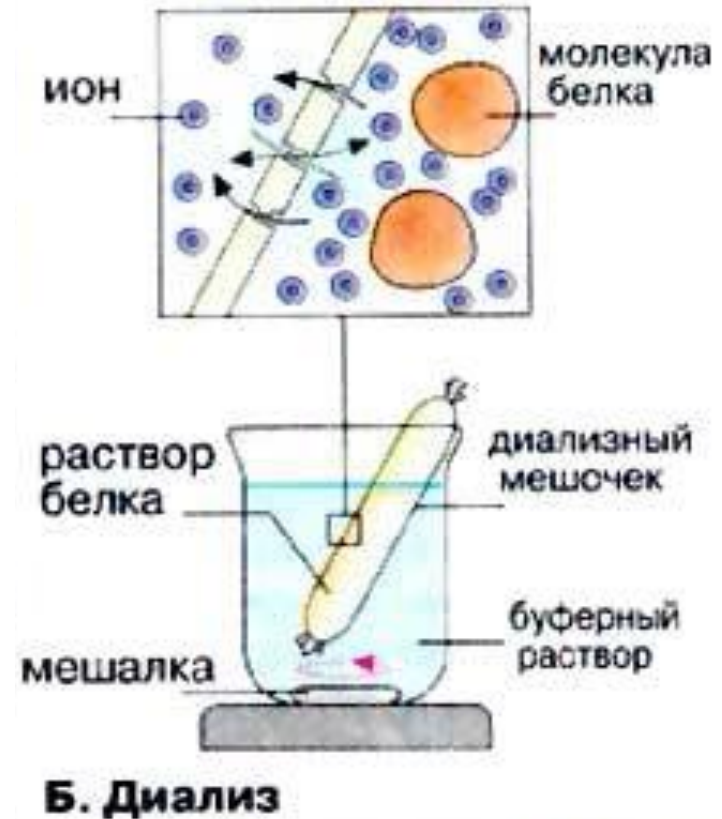
Высаливание



- Растворимость белков сильно зависит от концентрации солей (от ионной силы).
- В дистиллированной воде белки чаще всего растворяются плохо, однако их растворимость возрастает по мере увеличения ионной силы. При этом все большее количество гидратированных неорганических ионов (светло-синие кружочки) связывается с поверхностью белка и тем самым уменьшается степень его агрегации (засаливание).
- При высокой ионной силе молекулы белков лишаются гидратирующих оболочек, что приводит к агрегации и выпадению белка в осадок (высаливание).
- Используя различие в растворимости, можно с помощью обычных солей, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, разделить (фракционировать) смесь белков.

Диализ

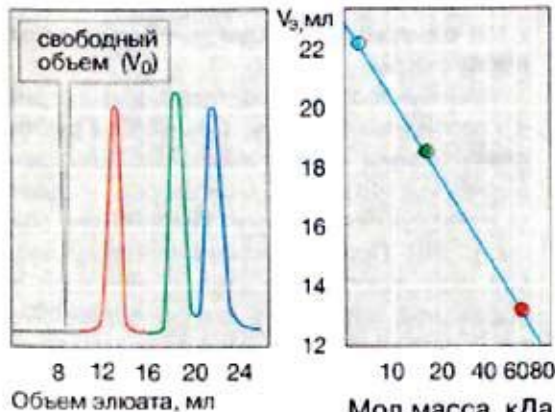
- Для отделения низкомолекулярных примесей или замены состава среды используют **диализ**.
 - Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через **полупроницаемые мембраны**, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной, и окружающим раствором.
 - После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина pH и др.) будет тот же, что и в окружающем растворе.



Гель-фильтрация



1. Основы метода



2. График элюирования

В. Гель-фильтрация

Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация) позволяет разделять белки **по величине и форме молекул**.

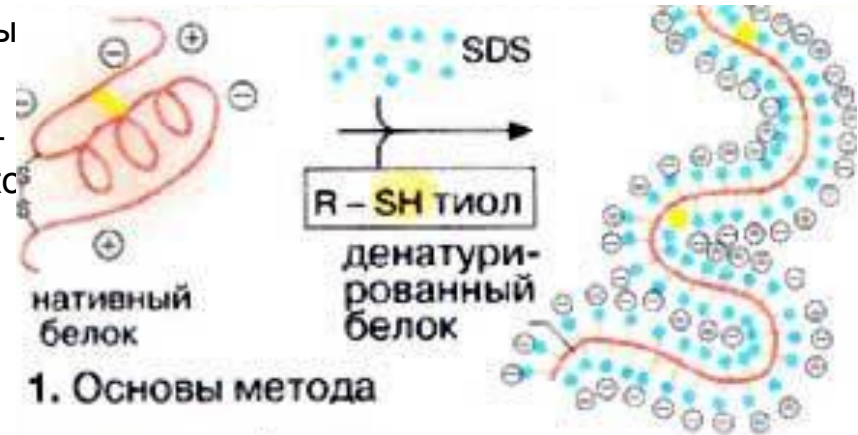
Разделение проводят в хроматографических колонках, заполненных сферическими частицами набухшего полимерного геля (10-500 мкм).

- Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром.
- Смесь белков вносят в колонку с гелем и элюируют буферным раствором.
- Белковые молекулы, не способные проникать в гранулы геля (помечены красным цветом), будут перемещаться с высокой скоростью.
- Средние (зеленого цвета) и небольшие белки (синего цвета) будут в той или иной степени удерживаться гранулами геля. На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций (2).
- Объем выхода того или иного белка зависит в основном от его молекулярной массы (3).

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

■ В настоящее время электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) [ДСН-ПААГ-электрофорез (SDS-PAGE)] является общепринятым методом определения гомогенности белковых препаратов.

- Метод основан на свойстве заряженных частиц (молекул) перемещаться под действием электрического поля.
- Обычно скорость миграции зависит от трех параметров анализируемых белков: величины молекул, формы молекул и суммарного заряда.
- Поэтому предварительно белки денатурируют с тем, чтобы скорость миграции зависела только от молекулярной массы.
- Для этого анализируемую смесь обрабатывают додецилсульфатом натрия [ДСН (SDS)] ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$), который представляет собой детергент с сильно выраженными амфифильными свойствами.

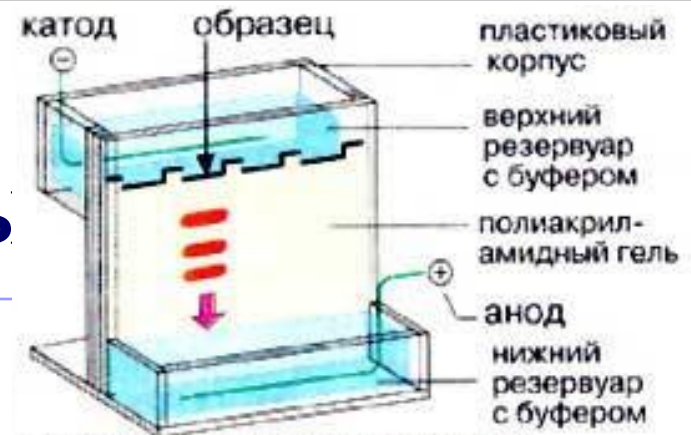


Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

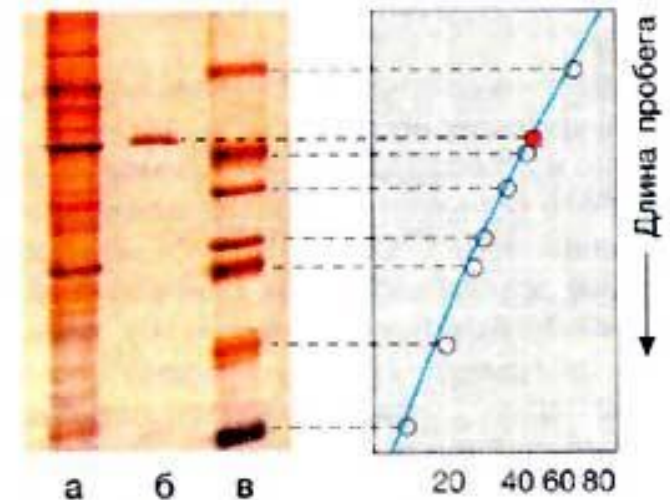
- Под действием ДСН олигомерные белки диссоциируют на субъединицы и денатурируют.
- Развернутые полипептидные цепи связывают ДСН (примерно 0,4 г/г белка) и приобретают отрицательный заряд.
- Для полной денатурации в среду добавляют тиолы, которые расщепляют дисульфидные мостики (1).

Электрофореграмма

- Электрофорез проводят в тонком слое **полиакриламида** (2).
- После завершения электрофореза, зоны белков выявляют с помощью красителя.
 - В качестве примера на схеме 3 приведена электрофореграмма трех препаратов:
 - клеточного экстракта, содержащего сотни белков (а);
 - выделенного из экстракта гомогенного белка (б);
 - контрольной смеси белков с известными молекулярными массами (в).



2. Камера для электрофореза



3. Окрашенный гель

4. Определение мол. массы

Г. Электрофорез в ДСН-ПААГ



















