

Дисциплина «Биохимия»

Тема занятия: «Структура белка. Уровни макромолекулярной организации белковых молекул»

**Преподаватель: к.б.н., доцент Рязанцева Лариса
Тихоновна**

Биохимия изучает:

- **строение и функции молекул живой клетки**
- **структуру и функции надмолекулярных образований**
- **механизмы поступления во внутреннюю среду пластических и биологически активных материалов (в том числе их утилизацию и детоксикацию)**
- **механизмы высвобождения, накопления и использования энергии**
- **механизмы воспроизведения**

Основные разделы биохимии

- Статическая биохимия
- Динамическая биохимия
- Функциональная биохимия
- Клиническая биохимия

Структурная иерархия в молекулярной организации клеток



**Последовательность изучения
биохимических процессов
(функции и метаболизм биомолекул):**

- на уровне целого организма
- изолированные перфузируемые органы
- тканевые срезы
- целые клетки
- гомогенат
- изолированные клеточные органеллы
- выделение и характеристика метаболитов и ферментов
- клонирование генов, кодирующих ферменты и другие белки

- 1) разработка методов **разрушения клеток** в сравнительно мягких условиях, позволяющих сохранить функции их компонентов;
- 2) распространение **высокоскоростных ультрацентрифуг** с охлаждением для разделения компонентов разрушенных клеток;
- 3) распространение **электронных микроскопов**.

Основные методы разделения и очистки биомолекул

методы разделения

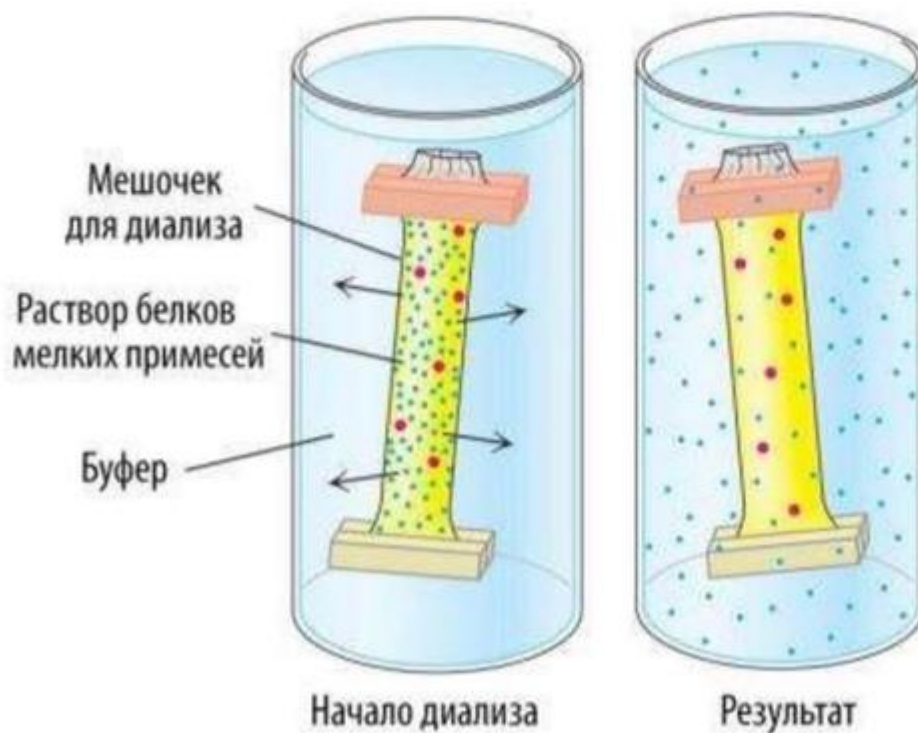
- **Фракционирование солями** (обратимое осаждение)
- **Электрофорез:**
На бумаге, в крахмальном геле, в ацетатцеллюлозе, в агарозе, в полиакриламиде, в полиакриламиде с додецилсульфатом натрия
- **Хроматография:**
Бумажная, Ионообменная (анионо- и катионообменная), Аффинная, Тонкослойная, Газо-жидкостная, Жидкостная под высоким давлением
- **Гель-фильтрация**
- **Ультрацентрифугирование**

Белки, липиды разделяют с учётом физико-химических свойств, используя одну или ряд методик

После разделения биомолекулы очищают от
низкомолекулярных и иных примесей

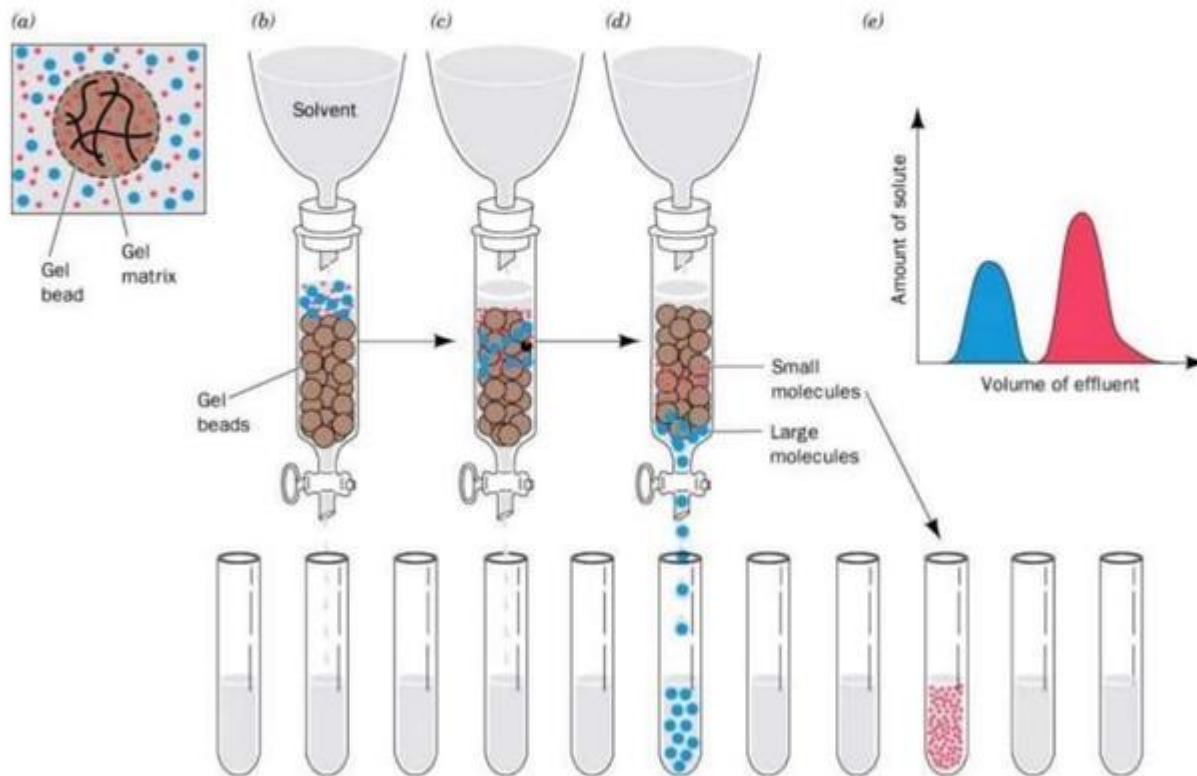
Методы очистки белков

Диализ



После разделения биомолекулы очищают от
низкомолекулярных и иных примесей
Методы очистки белков

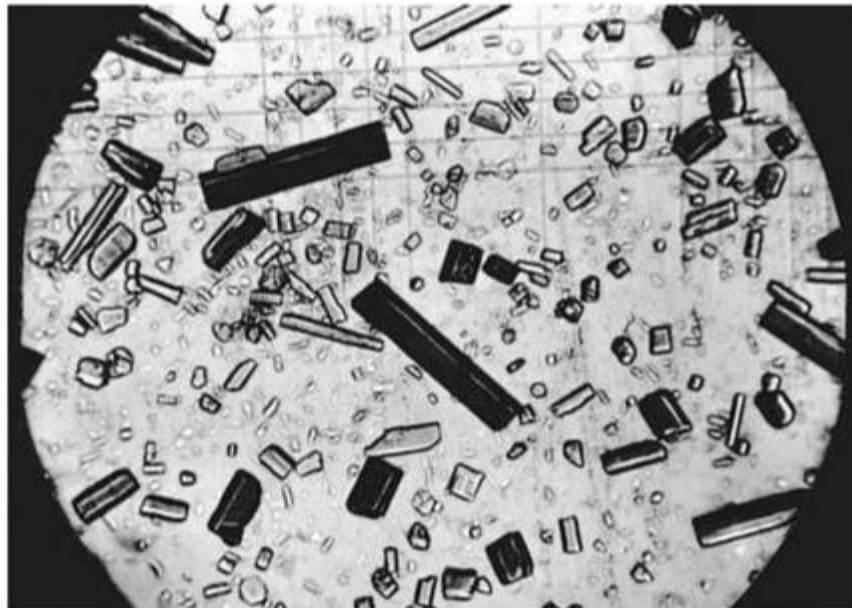
- Гель-хроматография



После разделения биомолекулы очищают от
низкомолекулярных и иных примесей

Методы очистки белков

- Кристаллизация

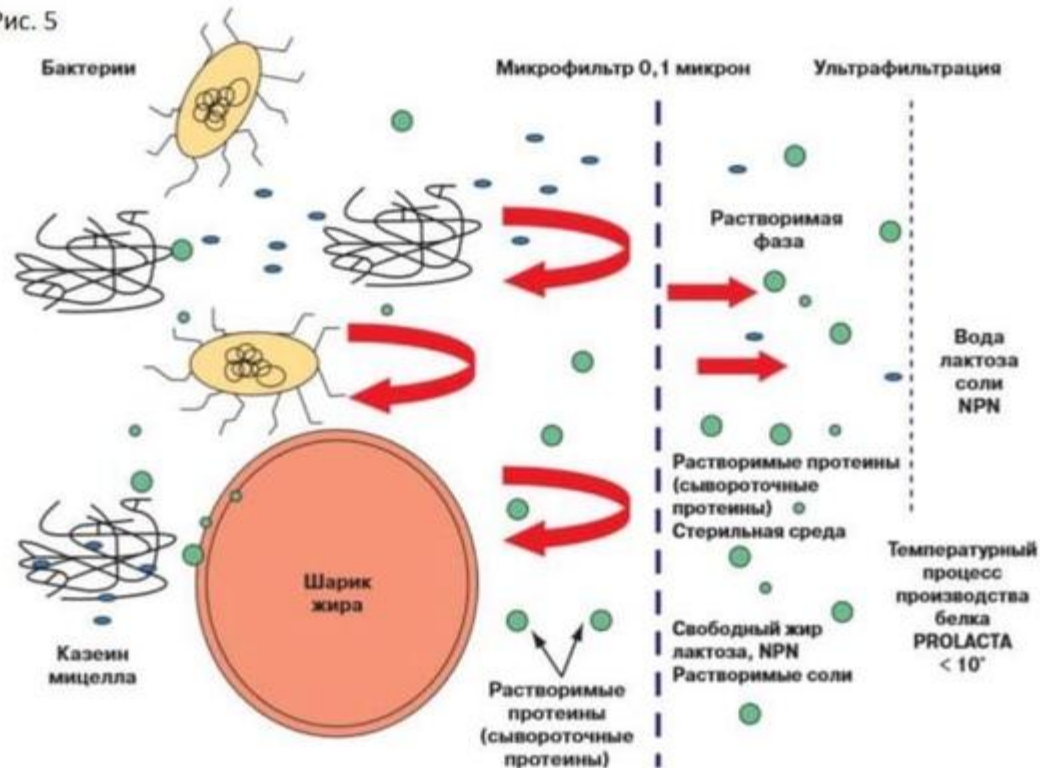


После разделения биомолекулы очищают от
низкомолекулярных и иных примесей

Методы очистки белков

- Ультрафильтрация

Рис. 5



После очистки биомолекул определяют их структуру

Основные методы:

- Элементный анализ
- Спектроскопия в УФ-, видимой, ИК- областях, ЯМР-спектроскопия
- Кислотный или щелочной гидролиз
- Использование ферментов с известной специфичностью (протеаз, нуклеаз, гликозидаз) для расщепления изучаемых молекул
- Масс-спектрометрия (основой для измерения служит ионизация компонентов)
- Специфические методы секвенирования (белков или нуклеиновых кислот)
- Рентгеновская кристаллография (дифракция рентгеновских лучей)

- **В апреле 2000 года
было закончено непосредственное
секвенирование генома человека**
- **В июле 2000 года
на 18 международном конгрессе по
биохимии и молекулярной биологии
директор фирмы «Celera Genomics»
J. Craig Venter сообщил
о более или менее окончательном варианте
непрерывного сиквенса генома человека**



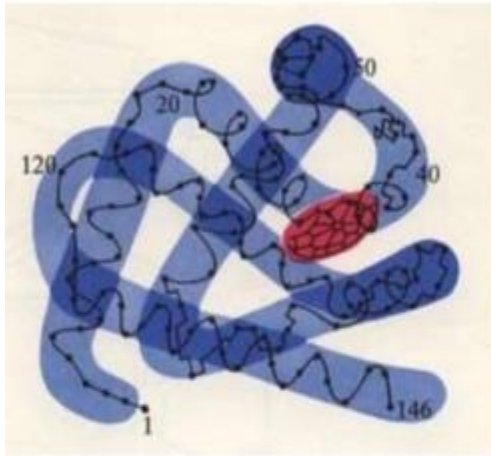
Протеомика

это изучение белков и их взаимодействия в живых организмах

БЕЛКИ

- Белки называют протеинами (от греческого **protos** - первый, важнейший)
- Белки - высокомолекулярные азотсодержащие соединения, состоящие из аминокислот, соединенных пептидной связью (-CO-NH-)

Белки в организме



- По количеству белки занимают 1 место среди макромолекул клетки: 25% от её сырого веса, не менее 45-50% – от сухого
- Чем активнее в тканях обменные процессы, тем выше содержание белка. В мышцах, лёгких, почках – белка в 3 раза больше, чем в костях, зубах)
- В организме человека более 5 млн. различных белков
- На функционировании белков основаны все важнейшие процессы жизнедеятельности организма

ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

- В 1728 г. БЕККАРИ выделил **первое белковое вещество из пшеничной муки**, названное «клейковиной».
- 1820 г. БРАКОННО **открыл** в продуктах гидролиза белков **аминокислоту глицин**.
- В 1838 г. После систематического изучения элементарного состава разных белков МУЛЬДЕР **предложил теорию протеина**.
- В 1888 г. А.Я.ДАНИЛЕВСКИЙ выдвинул **гипотезу строения белка**, получившую название «теории элементарных рядов». Он первым **предположил существование в белках связей – NH – CO -**.
- В 1890 ГОФМЕЙСТЕР впервые получил **кристаллический белок – яичный альбумин**.
- В 1902 г. ФИШЕР и ГОФМЕЙСТЕР предложили **пептидную теорию строения белка**. В это же время ФИШЕР с сотрудниками синтезировал в лаборатории первые пептиды.
- В 1925-1930 гг. Сведберг **сконструировал ультрацентрифугу** и использовал ее для определения молекулярной массы выделяемых белков.
- В 1951 г. ПОЛИНГ и КОРИ разработали модель вторичной структуры белка, названной **альфа-спиралью**.
- В 1952 г. ЛИНДЕРСТРЕМ-ЛАНГ предположил существование **трех уровней организации белковой молекулы**: первичный, вторичный, третичный.
- В 1953 г. СЕНГЕР впервые расшифровал **последовательность аминокислот в инсулине**.
- В 1958 г. КЕНДРЬЮ и в 1959 г. ПЕРУТЦ расшифровали **трехмерные структуры белков – миоглобина и гемоглобина**.
- В 1963 г. ЦАН **синтезировал природный белок инсулин**.

Функциональная классификация белков

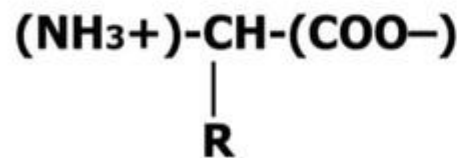
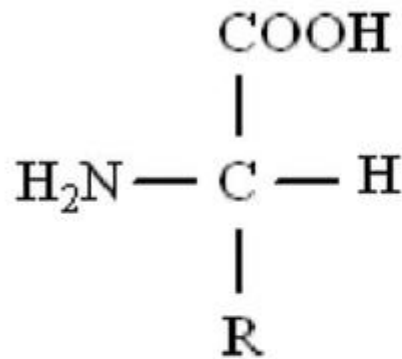
- Каталически активные белки (или ферменты)
- Белки-гормоны
- Регуляторные белки
- Транспортные белки
- Структурные белки
- Белки-ингибиторы ферментов
- Сократительные белки
- Токсичные белки
- Защитные белки – антитела

Роль белков в организме

Белки играют ведущую роль в жизни клетки
Их классифицируют по функциональной роли:

- **Структурные** - формируют остов костной и соединительной тканей, клеточных органелл
- **Ферменты** - катализируют химические реакции
- **Сократительные** - определяют работу мышц, расхождение хромосом при делении клетки, движение клетки во время хемотаксиса
- **Регуляторные** - контролируют биосинтез белка и нуклеиновых кислот, являются гормонами
- **Рецепторные** - передают гормональные сигналы, нервное возбуждение, инициируют хемотаксис
- **Транспортные** - активно переносят кислород, ионы, липиды, сахара и аминокислоты
- **Защитные** - являются основой гуморального иммунитета, участвуют в свертывании крови, защите от микробов
- **Специальные** - преобразуют и утилизируют энергию, поступающую в организм
- **Белки** - важный фактор питания. Собственные белки организма - это **питательный резерв** (в первую очередь используются белки плазмы крови)

Аминокислоты – структурные мономеры полимерных молекул белка



- Аминокислоты - производные карбоновых кислот, содержат одну или несколько аминогрупп
- В растворе аминокислоты находятся в виде биполярных ионов (цвиттер-ионы – внутренние соли)
- Белки также ионизированы

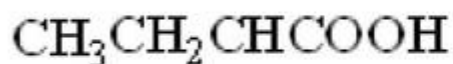
Белок-катион $\rightleftharpoons$ белок-цвиттер-ион $\rightleftharpoons$ белок-анион

- Заряд зависит от pH среды

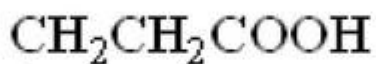
Классификации аминокислот

- в зависимости от положения amino-группы по отношению к карбоксилу

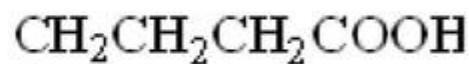
(α , β и γ -аминокислоты)



α -аминомасляная



β -аминопропионовая



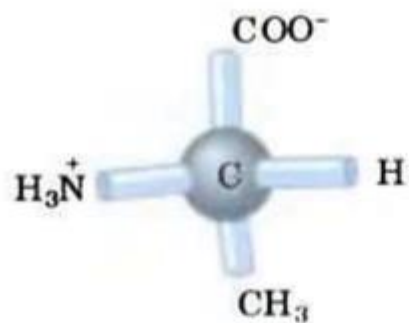
γ -аминомасляная

Белки состоят из 20 α -аминокислот

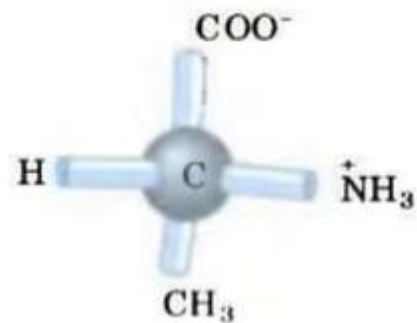
- по участию в синтезе белков

- ПРОТЕИНОГЕННЫЕ (20)

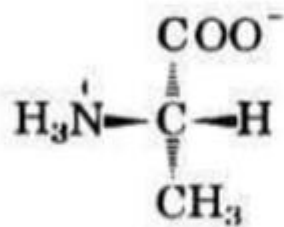
- НЕПРОТЕИНОГЕННЫЕ (≈ 40) – важные участники метаболизма (орнитин, цитруллин, ГАМК, β -аланин)



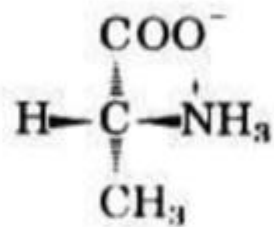
a L-Аланин



D-Аланин



L-Аланин



D-Аланин

б

В белки млекопитающих включаются только L-изомеры аминокислот.

Постепенно оптические изомеры подвергаются самопроизвольной неферментативной рацемизации: L-форма переходит в D-форму

По строению бокового радикала (R):

- ациклические и циклические (ароматические - ФЕН, ТИР, ТРИ; неароматические – ПРО, ГИС)
- моноаминодикарбоновые - в состав R дополнительно входит карбокси-группа (-COOH)
- диаминомонокарбоновые - в состав R входит дополнительная аминная группа (-NH₂)
- оксиаминокислоты - в состав R входит гидроксильная группа (OH)
- серосодержащие - в состав R входит группа: сульфгидрильная (SH), S-метильная (-S-CH₃)

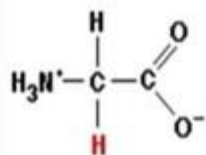
по кислотно-основным свойствам (электрохимическая)

- нейтральные
- кислые
- основные

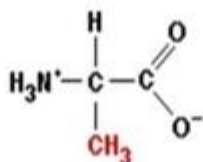
по полярности радикалов при обычных физиологических условиях очень важная классификация

- 1. Неполярные (гидрофобные) –**
алифатические, часть ароматических
- 2. Полярные (гидрофильные):**
 - а) незаряженные**
 - б) заряженные (+) или (-)**

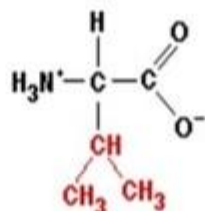
1. Аминокислоты с неполярными или гидрофобными R-группами. Характеризуются низкой (по сравнению с другими типами аминокислот) растворимостью в воде



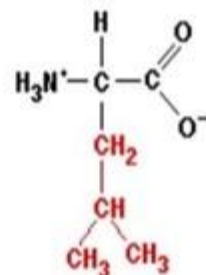
Glycine (Gly)



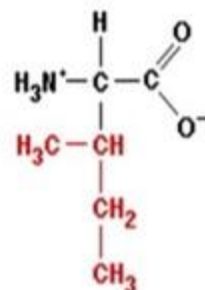
Alanine (Ala)



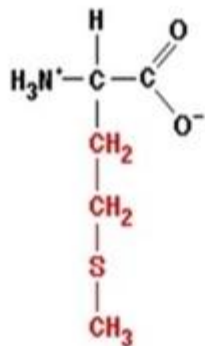
Valine (Val)



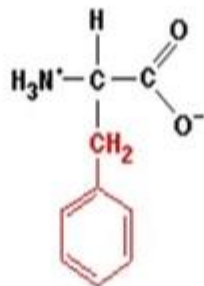
Leucine (Leu)



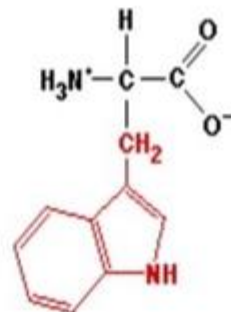
Isoleucine (Ile)



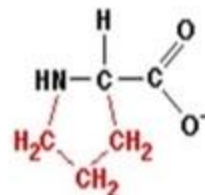
Methionine (Met)



Phenylalanine (Phe)



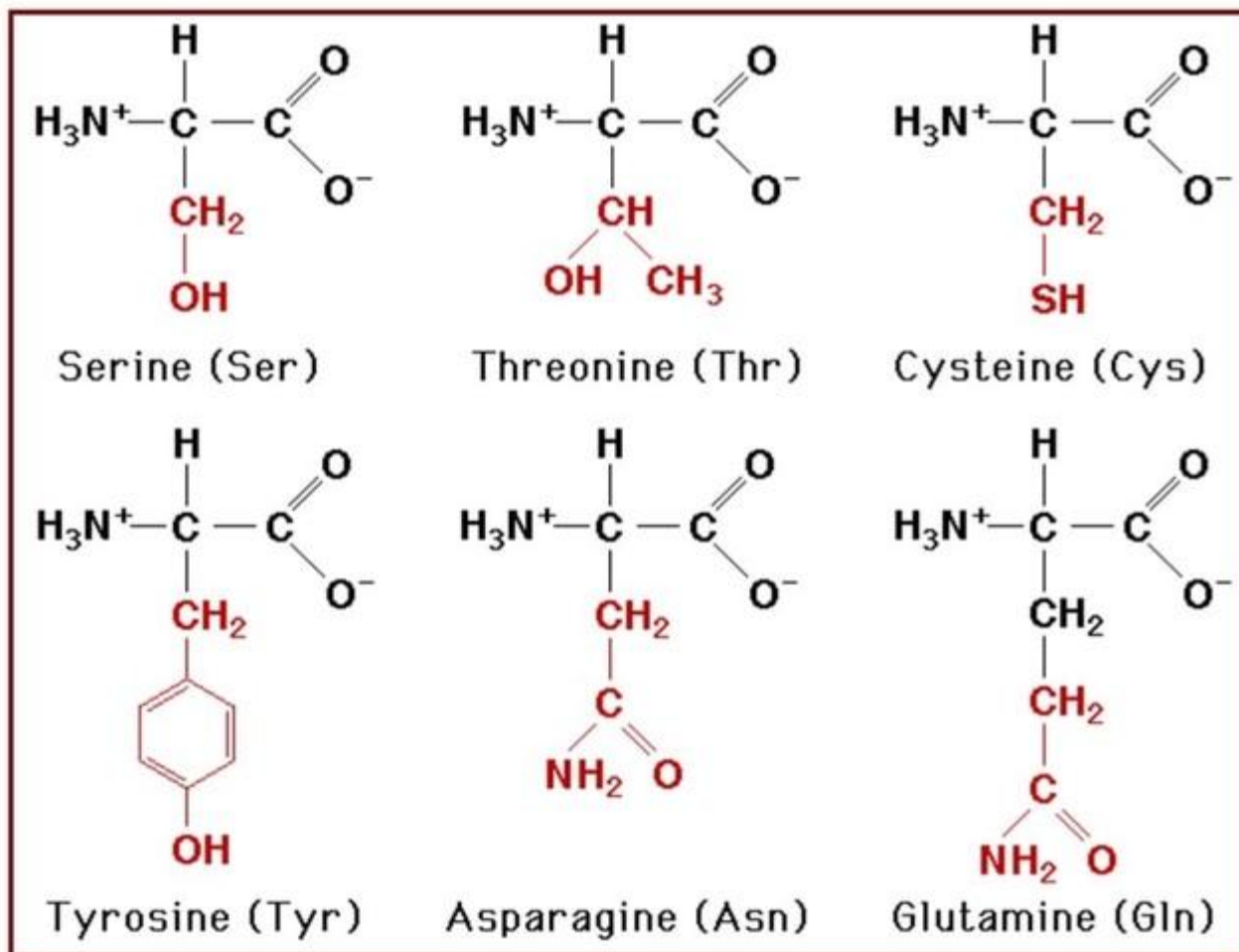
Tryptophan (Trp)

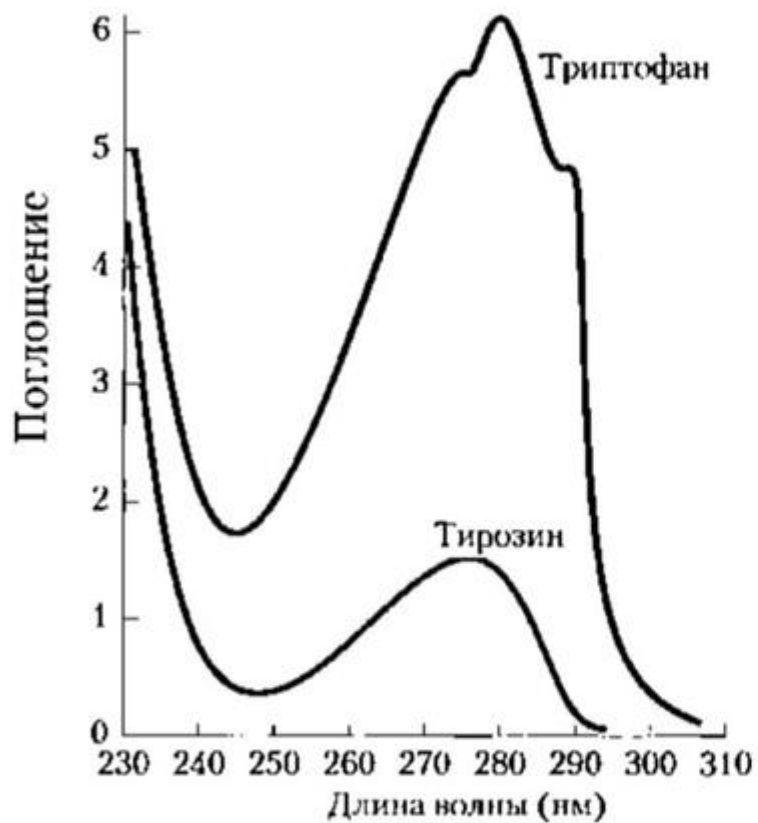


Proline (Pro)

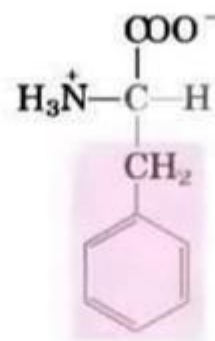
2а. Аминокислоты с полярными незаряженными R-группами: Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln

Характеризуются относительно высокой растворимостью в воде

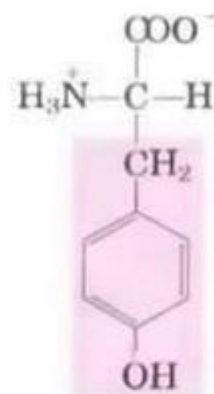




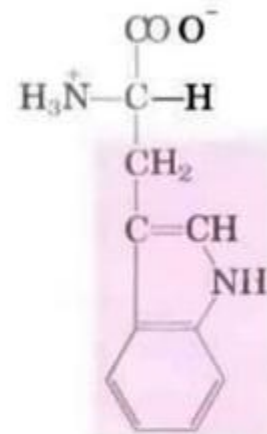
Ароматические R-группы



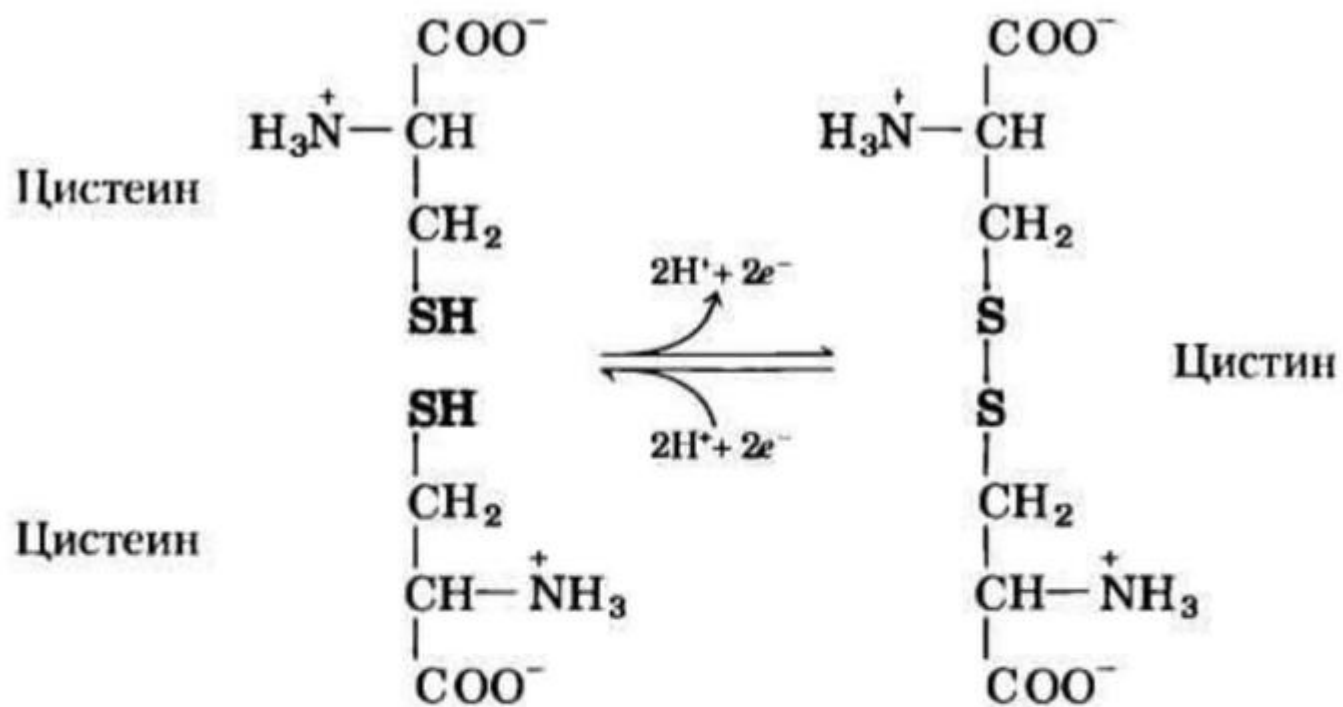
Фенилаланин



Тирозин



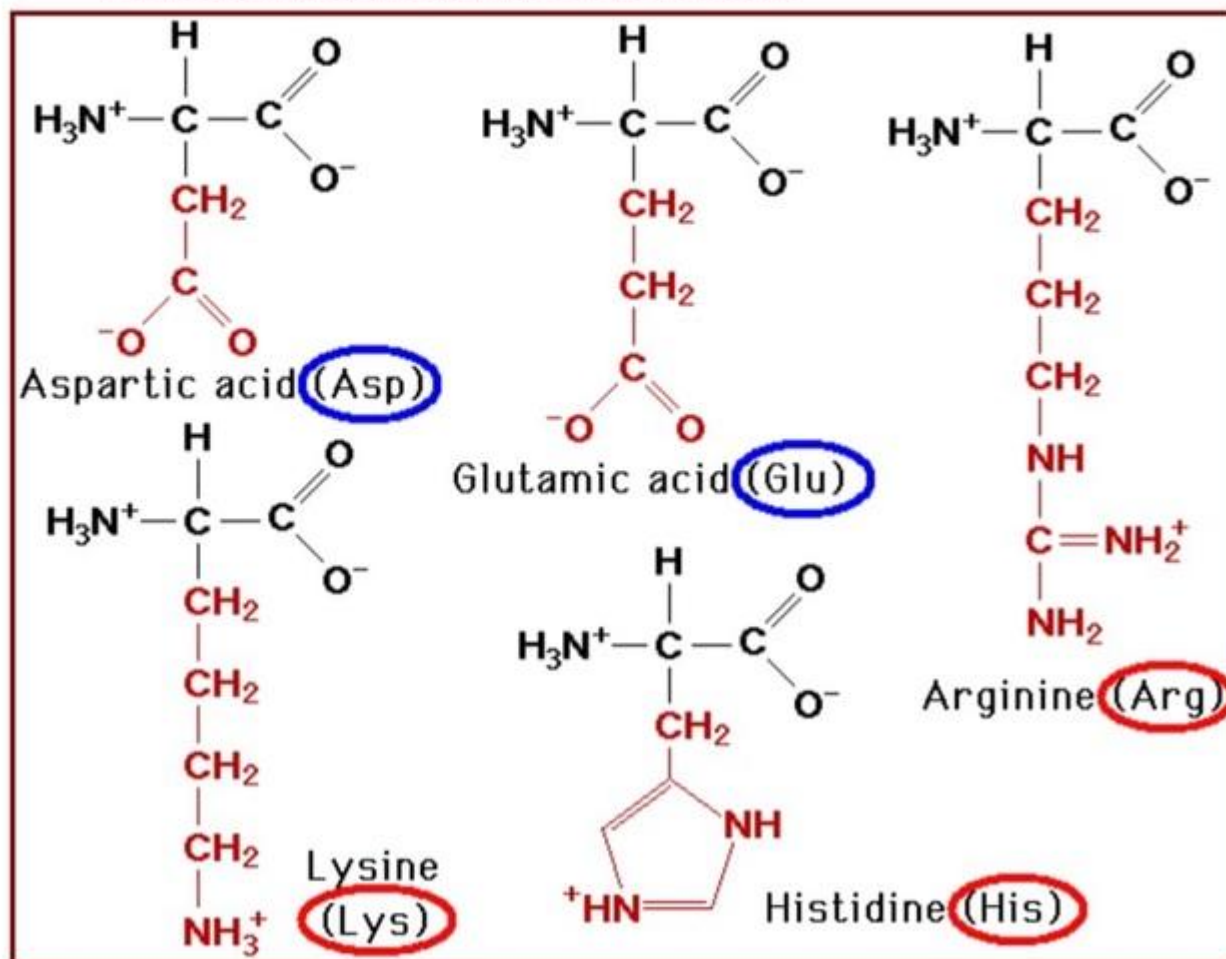
Триптофан

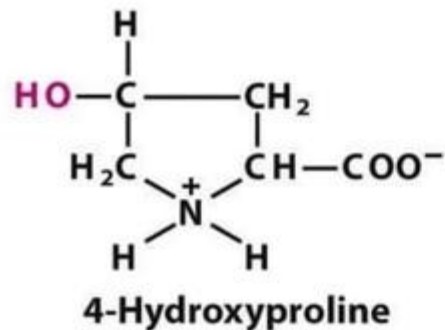


26. Аминокислоты с полярными заряженными

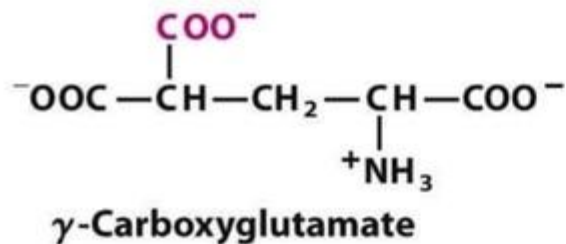
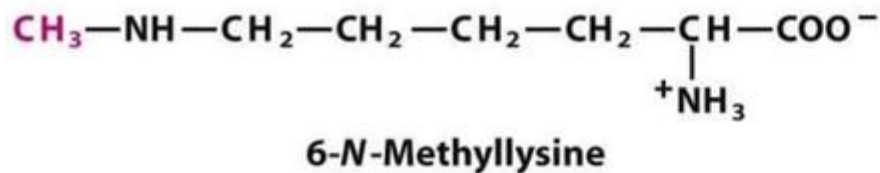
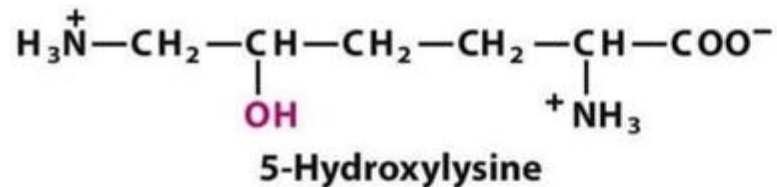
R-группами: (-) заряд Asp, Glu; (+) заряд Arg, Lys, His

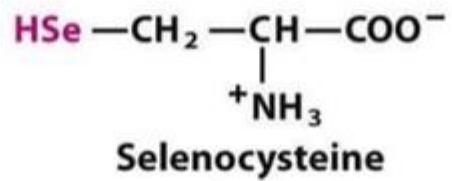
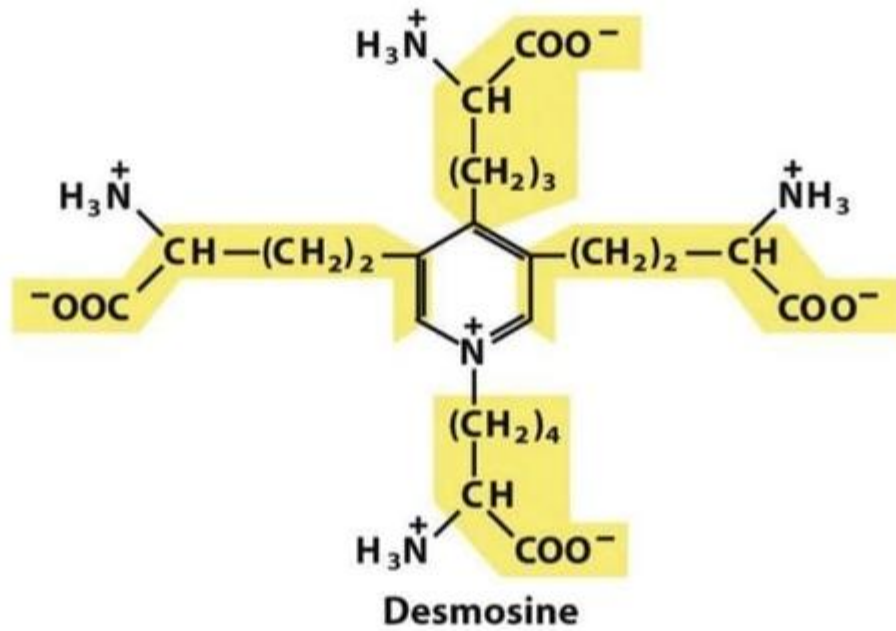
Характеризуются наличием заряда при физиологических значениях pH и высокой растворимостью в воде

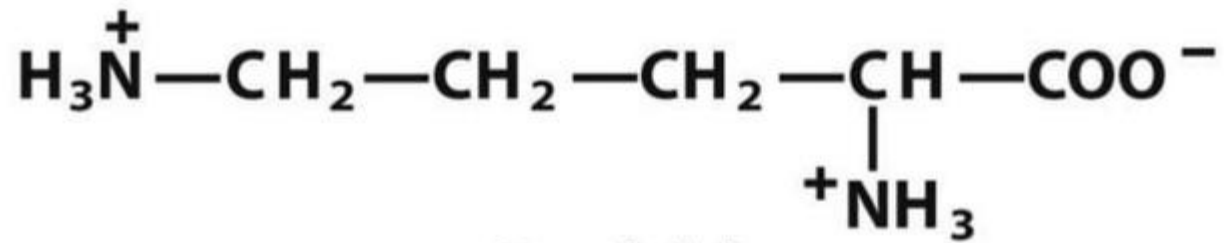




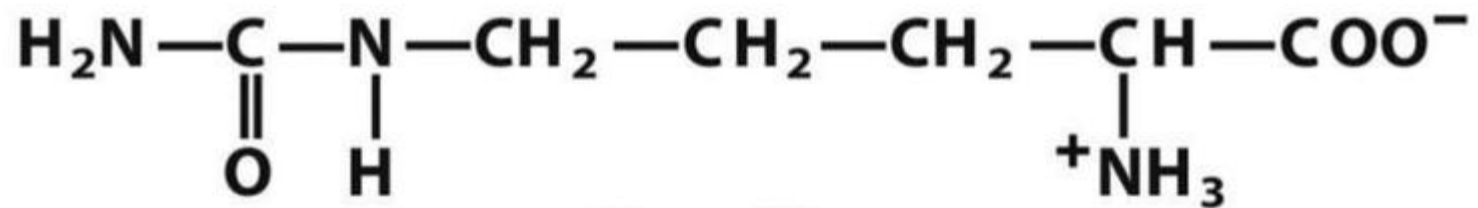
«Нестандартные»
аминокислоты также
выполняют важные
функции







Ornithine



Citrulline

Трехбуквенные и однобуквенные обозначения аминокислот (англоязычные)

Amino acid	3L code	1L code	Amino acid	3L code	1L code
Alanine	Ala	A	Methionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phenylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Aspartic acid	Asp	D	Serine	Ser	S
Cysteine	Cys	C	Threonine	Thr	T
Glutamine	Gln	Q	Tryptophan	Trp	W
Glutamic acid	Glu	E	Tyrosine	Tyr	Y
Glycine	Gly	G	Valine	Val	V
Histidine	His	H			
Isoleucine	Ile	I	Any amino acid		X
Leucine	Leu	L	Asn/Asp	Asx	B
Lysine	Lis	K	Gln/Glu	Glx	Z

Биологическая классификация аминокислот

По необходимости для организма

- **заменимые** – поступают с пищей или синтезируются в организме из аминокислот, поступающих в избытке
- **незаменимые** – не могут синтезироваться в организме и должны поступать с пищей

Абсолютно незаменимы для человека:

Met, Phe, Leu, Ile, Val, Thr, Trp, Lys

метионин, фенилаланин, лейцин, изолейцин, валин, треонин, триптофан, лизин

His и Arg незаменимы лишь у детей (т.е. для детей незаменимых АК на две больше: +гистидин и +аргинин)

Cys и Tyr условно заменимые – зависят от незаменимых АК (т.е. образуются только из Met и Phe, соответственно).

Недостаток незаменимых АК (полноценного белка) – болезнь квashiоркор



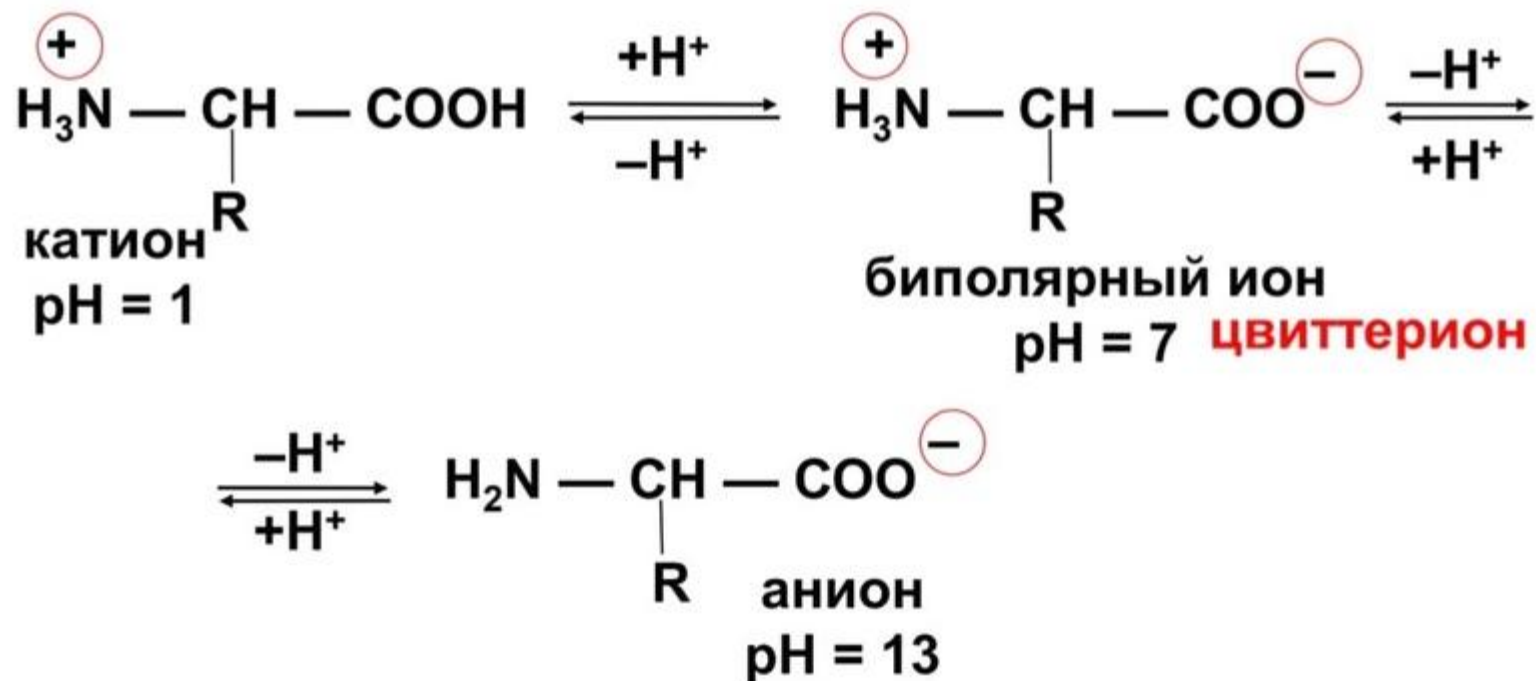
Роль отдельных аминокислот

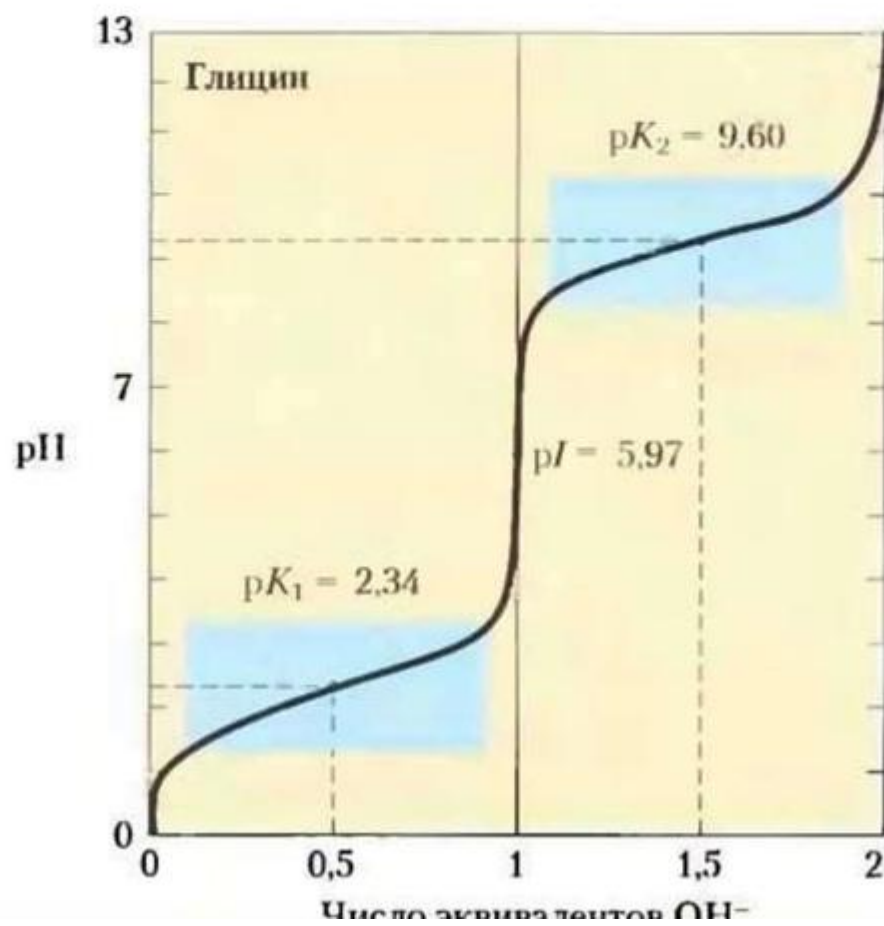
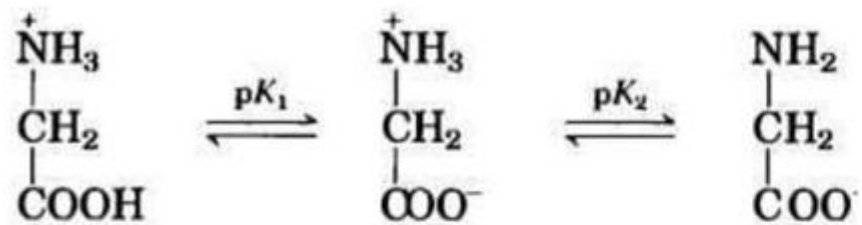
- **Глутаминовая кислота** – активирующий медиатор мозга, преобразуется в тормозной медиатор ГАМК.
- **Аспарагиновая кислота** переносит аммиак, участвует в синтезах (пиримидины, мочевины).
- **Метионин** – иницирующий кодон синтеза белка.
- **Глицин** – тормозной медиатор ЦНС.
- **Лизин** – «стоматологическая» аминокислота

Основные физико-химические свойства аминокислот

- 1) **Оптически активны** (право- и левовращающие, меняют направление вращения плоскости поляризации проходящего через раствор поляризованного света).
- 2) **Заряд.** АК – амфотерные электролиты, сочетают свойства и кислот и оснований. Если общий заряд АК = 0, она находится в изoeлектрическом состоянии.
ИЭТ (pI) – величина pH, когда заряд АК = 0.
- 3) Растворимость АК в воде зависит от полярности бокового радикала (гидрофилен/гидрофобен),
pH среды, электролитов среды (ионной силы p-ра).

Амфотерность аминокислот



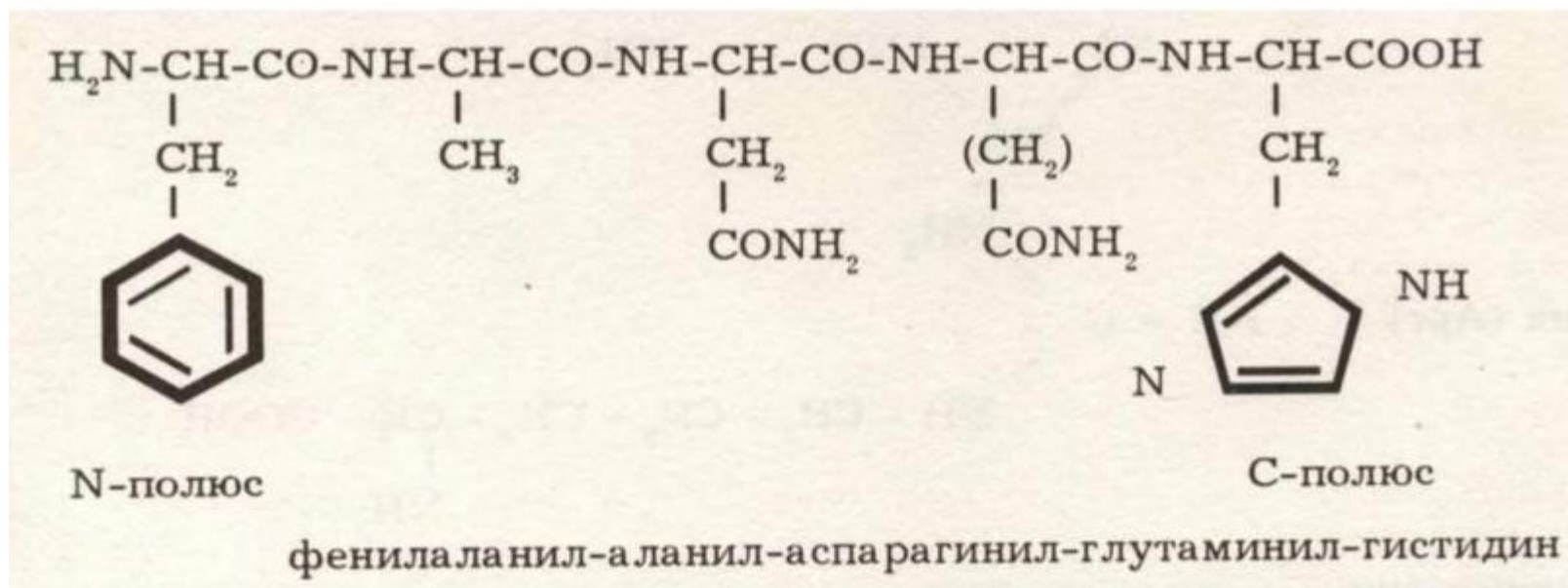


Пространственная организация белковой молекулы

- С одной стороны: полипептид – понятие химическое, а белок – биологическое.
- С другой стороны: белки – полипептиды, способные формировать и поддерживать в пространстве определённую структуру, которая и обуславливает функцию белка.
- **Номенклатура** зависит от размера:
 - Пептиды: олигопептид – «несколько» АК (до 10 АК)
полипептид – «много» АК (до 50 АК)
 - Белки: минимальная длина – около 50 АК;
средняя длина – 100-400 АК;
максимальная длина – более 1000 АК.

**В 1913 году Эмиль Фишер синтезировал
первые пептиды**

Как называть пептид ?



УРОВНИ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛ БЕЛКА



Уровни организации молекул белка

- Каждая полипептидная цепь имеет единственную энергетически выгодную и функционально активную конформацию.
- В то же время пространственная конформация лабильна, в определенных пределах подвижна (происходят функциональные изменения или под влиянием условий среды).
- Четыре уровня организации белковых молекул отличаются природой поддерживающих их связей (виды, сила, регулярность, количество связей).

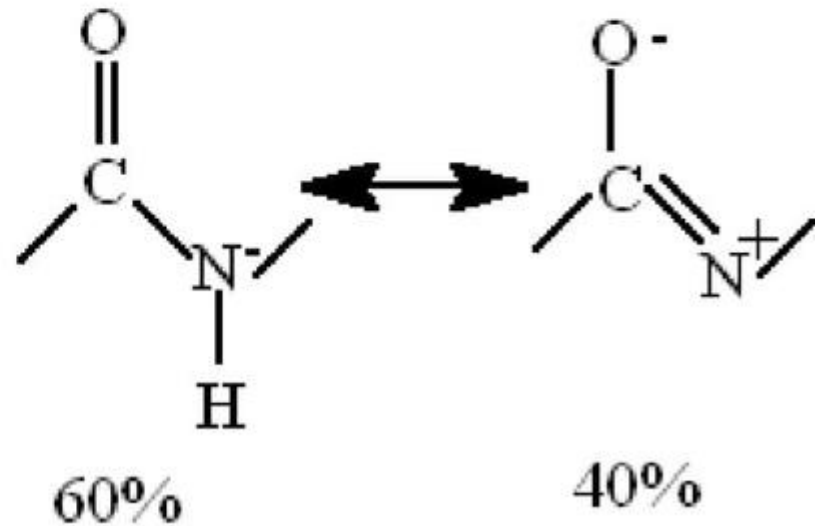
Первичная структура белка -

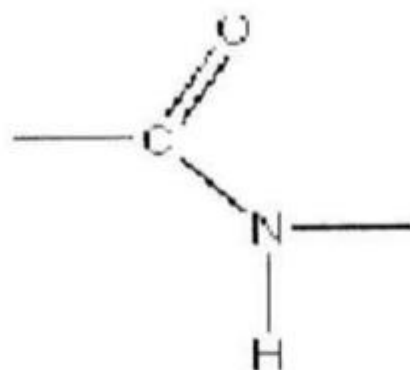
открыта в **1898** году профессором казанского университета **А.Я.Данилевским**

- **это кодируемая нуклеотидами ДНК последовательность аминокислот, соединённых пептидными связями.**

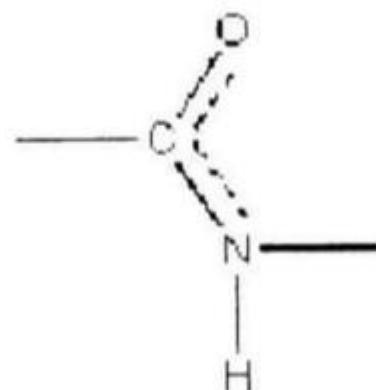
Свойства пептидной связи

- **Пептидная связь** между углеродом и азотом - **жёсткая, ковалентная, копланарная**: все атомы пептидной группы находятся в одной плоскости, причём атомы **Н и О** – в **транс-положении** (по разные стороны от пептидной C-N связи), боковые радикалы аминокислот также в транс-положении.
- **Прочная** – гидролиз в 6N HCl, при 100°C за 6 часов
- Имеет **кето-форму и енольную** (в щелочной среде) **форму**





Пептидная связь



Резонанс придает обеим связям
частично двойной характер



Образуется:

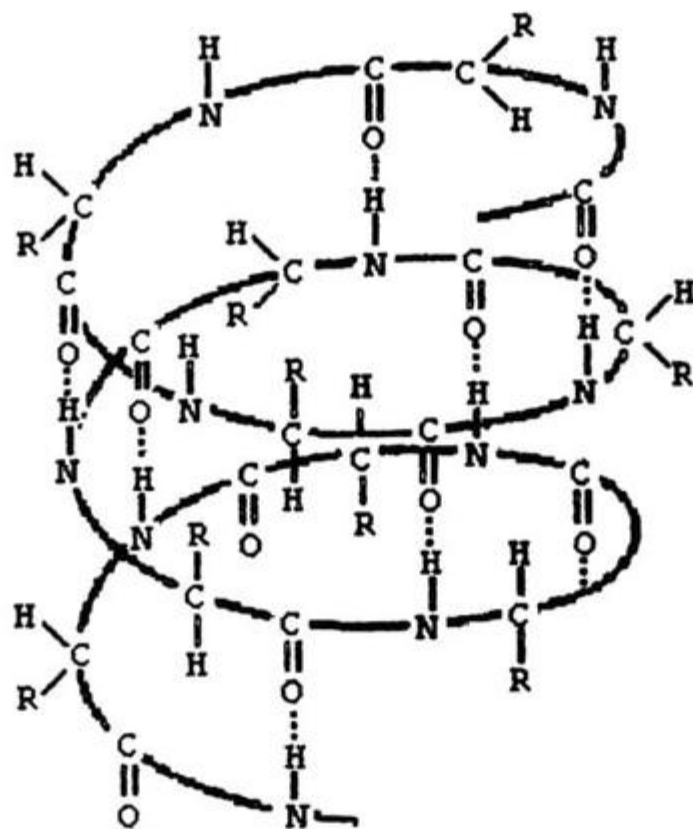
- 1) при участии пептидил-трансферазы на рибосомах,
- 2) при внеклеточной синтезе *in vivo* и *in vitro*.

Проведение анализа первичной структуры белковых молекул

- Определение аминокислотного состава белка:
 - гидролиз белка в жестких условиях,
 - хроматографическое разделение АК,
 - идентификация и количественный анализ АК.
- Определение последовательности аминокислот в белках (пептидах) **методом Эдмана**:
 - расщепление крупного белка на пептиды;
 - мечение N-концевой АК фенилизотиоцианатом;
 - отделение N-концевой АК в виде циклического производного;
 - выделение и идентификация N-концевой АК.

Инсулин – первый «расшифрованный» белок
Фредерик Сенгер
(Нобелевская премия по химии 1958г.)

Вторичная структура белка

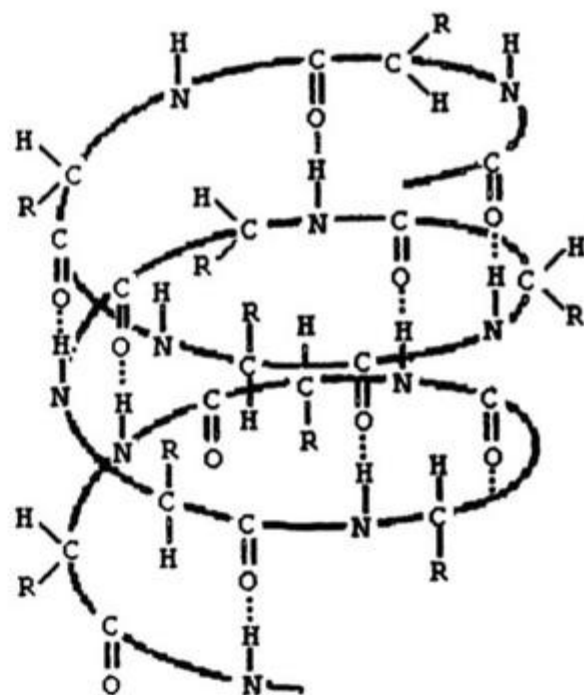


Вторичная структура белка —

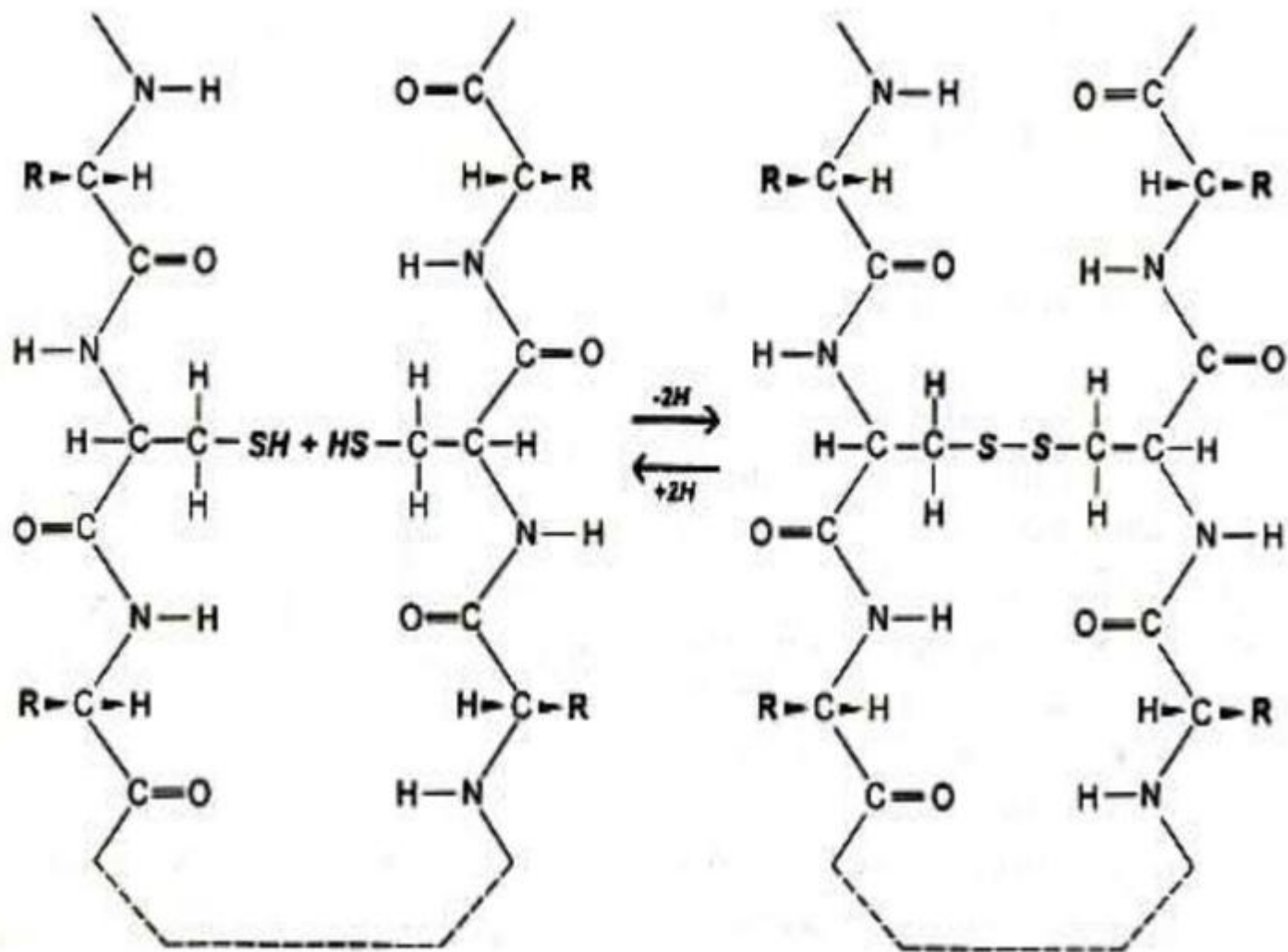
- это пространственное расположение полипептидной цепи (спирали, складчатости и другие формы) безотносительно к типам боковых радикалов, их конформации
- Регулярная, периодическая структура, создается вращением радикалов аминокислот вокруг α -C атома.

Стабилизирована:

1) водородными связями (в большинстве белков, не всегда) между атомами пептидных связей — амидными ($-N-H$) и карбонидными ($-C=O$) группами (1–4 связь — виток спирали, 1–3 связь — поворот на 180°)



2) дисульфидными мостиками между остатками цистеина



- связь образуется при **спонтанном окислении SH-групп** сближающихся остатков **цистеина** первичной структуры.
- Связь разрушается при восстановлении или еще более сильном окислении

Цис-Цис-Ала-Сер-Вал-



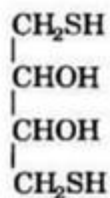
Лей-Цис-Гли-Сер-Гис-Лей-

фрагменты двуцепочной
молекулы бычьего
инсулина

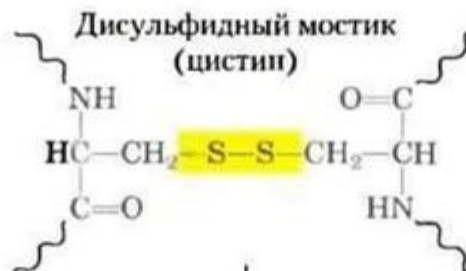


Глу-Глн-Цис-Цис-Ала-Сер-Вал-Цис-Сер-Лей

Особенно много SS-связей в секретируемых белках

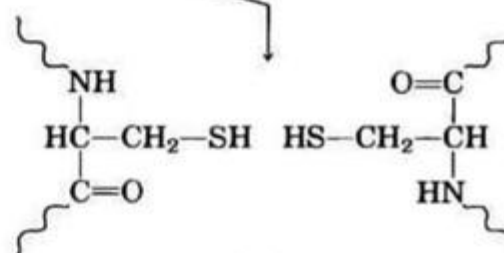


Дитиотрейтол (ДТТ)

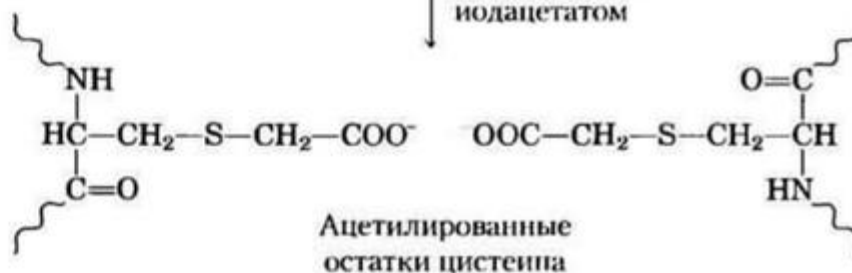


Окисление
надмуравьиной кислотой

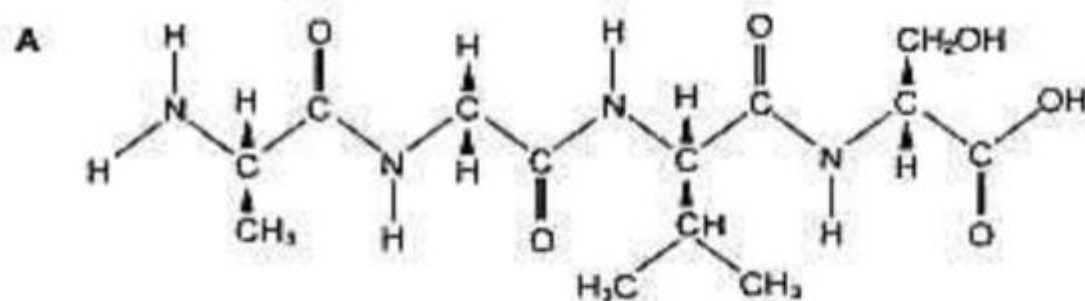
Восстановление
дитиотрейтолом



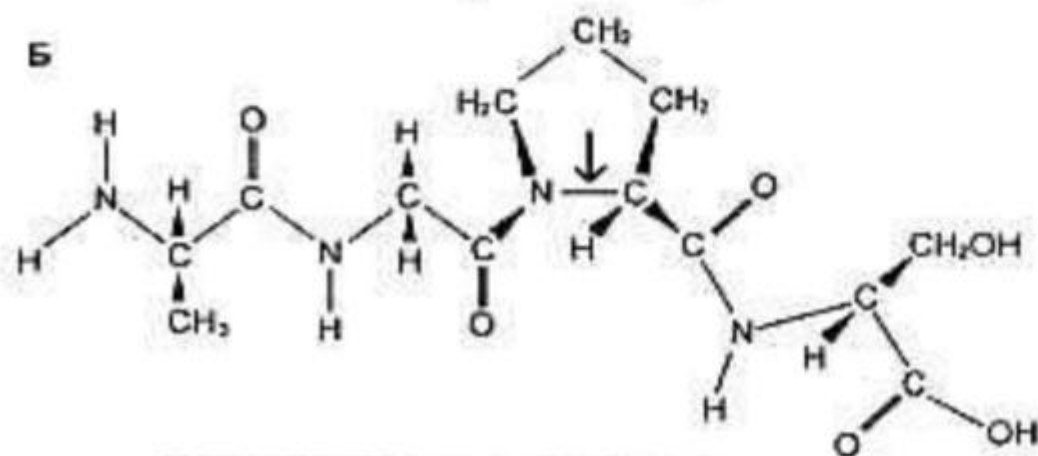
Ацетилирование
иодацетатом



3) Стерическим взаимодействием множества колец пролина и ОН-пролина (коллаген)



Аланил-глицин-валил-серин

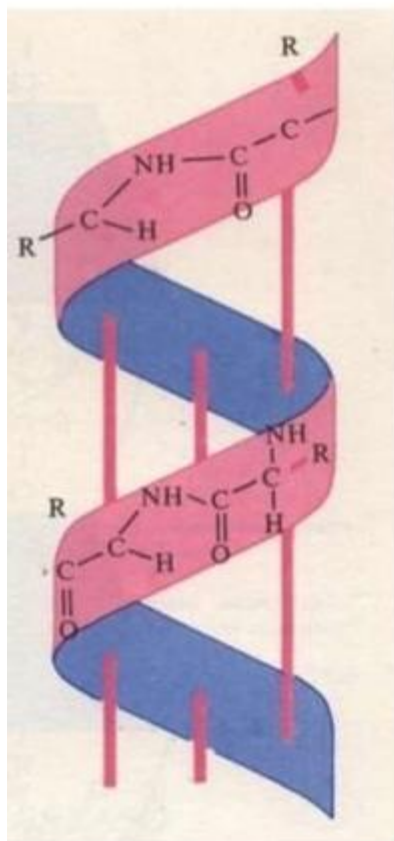


Аланил-глицин-пролил-серин

Стерическое
напряжение
гидрофобных
колец Pro

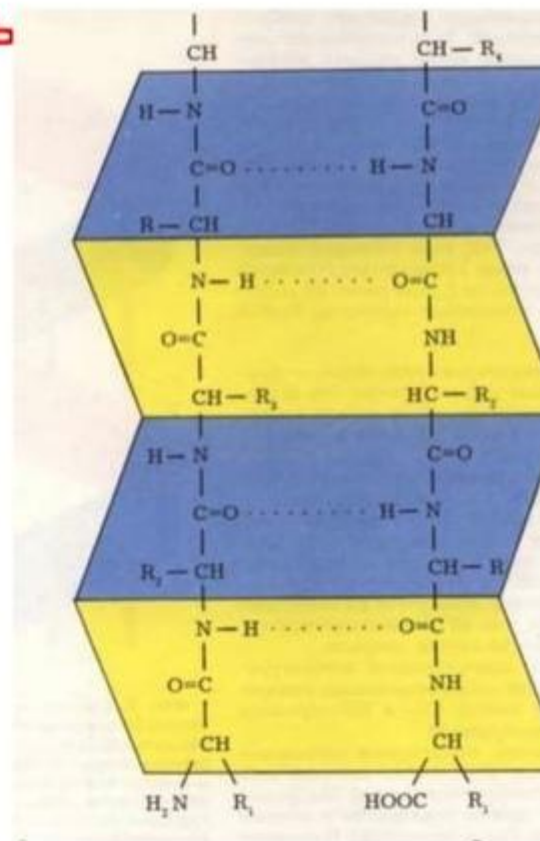
Первые модели вторичной структуры белка предложили **Л.Полинг и П.Кори**

расчёт и экспериментальные доказательства **α -спирали**



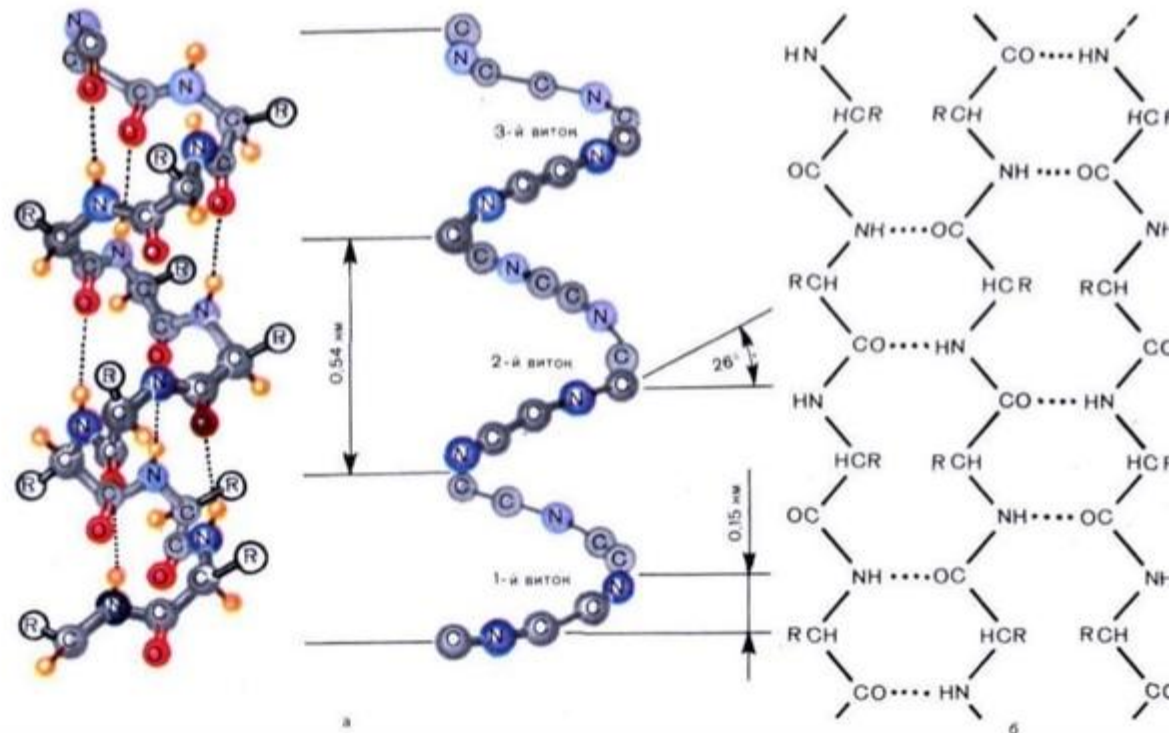
правозакрученная **α -спираль**

складчатый **β -слой**



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

β -складчатость: водородные связи расположены перпендикулярно оси полипептида или нескольких цепей (параллельных или антипараллельных). В пространстве образуются слоистые структуры.



Левосторонняя
спираль



Правосторонняя
спираль



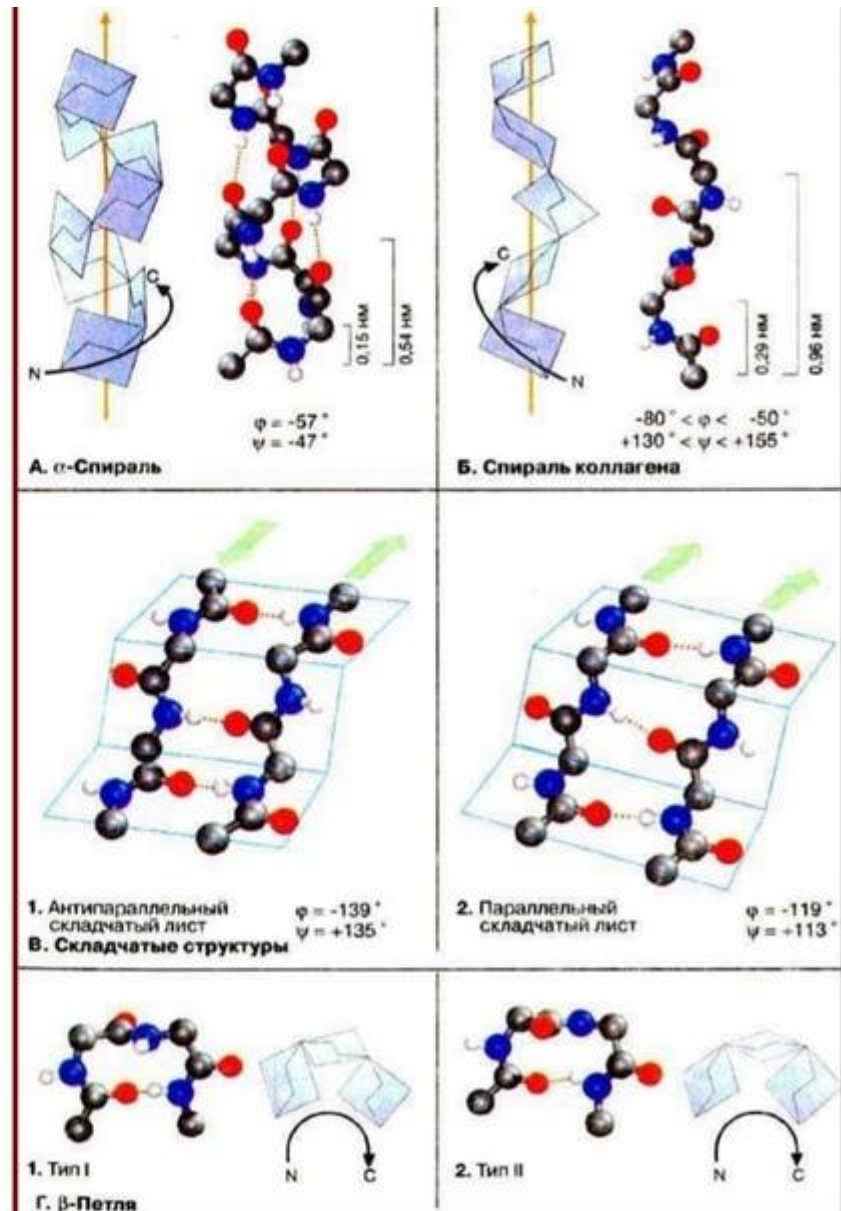
Типы вторичной структуры белка

Регулярные структуры:

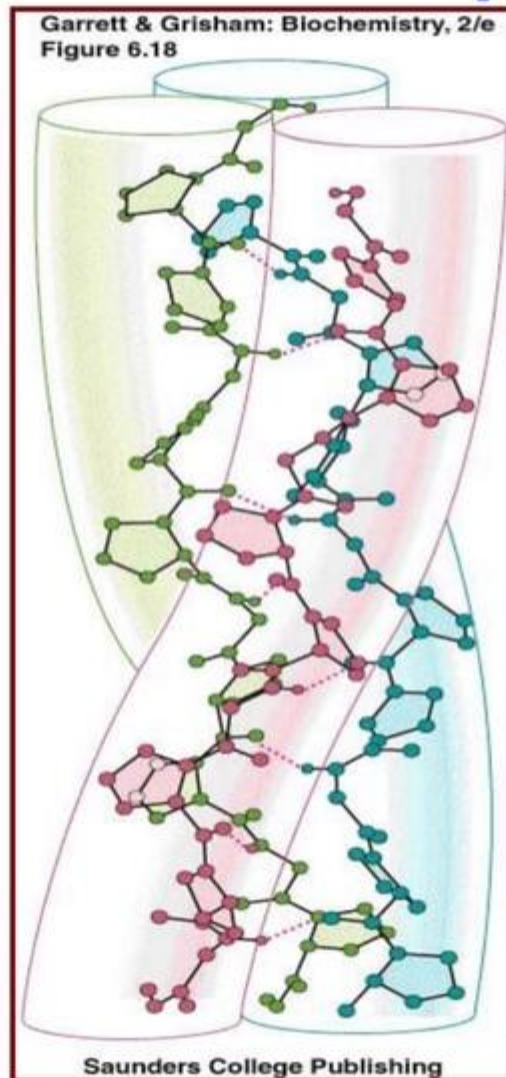
- **Спирали**
 - α -спираль;
 - коллагеновая спираль (похожа на L-полипролиновую);
 - спираль 3/10;
 - π -спираль.
- **β -слои**
 - параллельный
 - антипараллельный

Нерегулярные структуры:

- **Изгибы** – элементы из 3 АК (часто Pro и Gly); изгиб поворачивает цепь на 180° ; стабилизируется одной водородной связью; практически всегда оказывается на поверхности глобулы.
- **β -петли** – из 3 АК (типы I и II)



Коллагеновая спираль



Вторичная структура белка

- Радикалы глу, мет, ала, лей тяготеют к образованию α -спиралей; вал, тир, иле – к β -складчатой структуре.
- Более того, **возможны взаимные переходы α - и β - структур.**

В щелочной среде, при нагревании происходит разрыв водородных связей, восстановление дисульфидных мостов, растягивание спирали: α -кератин превращается в β -кератин и «гладкие» волосы становятся «волнистыми».

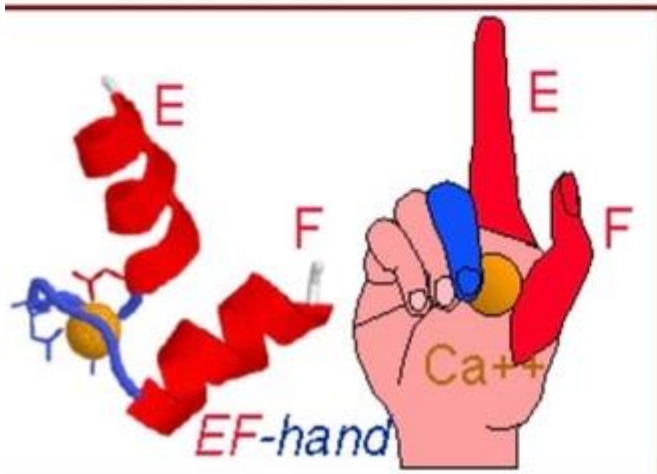
- В различных белках есть разные структурные мотивы (единицы скручивания): $\alpha\alpha$ – $\alpha\beta$ – $\beta\beta$ –.

Супервторичная структура (мотив)

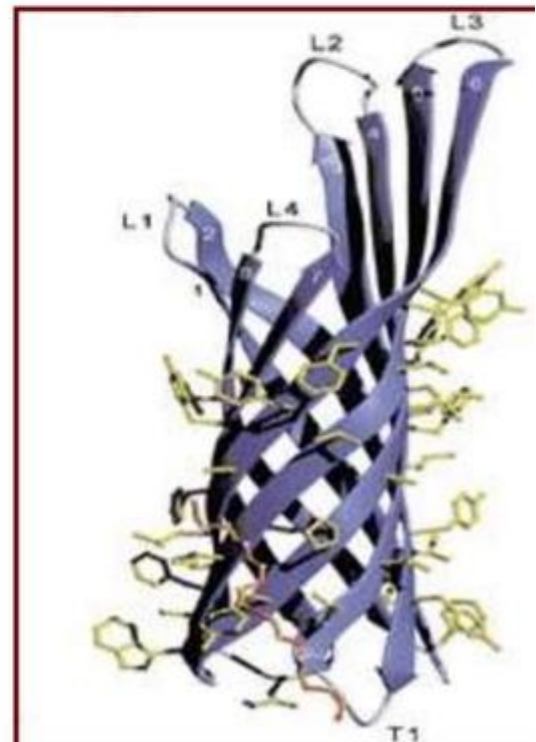
- Виды: $\alpha\alpha$ -, $\alpha\beta$ -, $\beta\beta$ -

$\alpha\alpha$ -мотив

Са-связывающих
белков (кальмодулин ...)



$\beta\beta$ -мотив –
 β -бочонок
некоторых
трансмем-
бранных
белков
(порин ...)





a

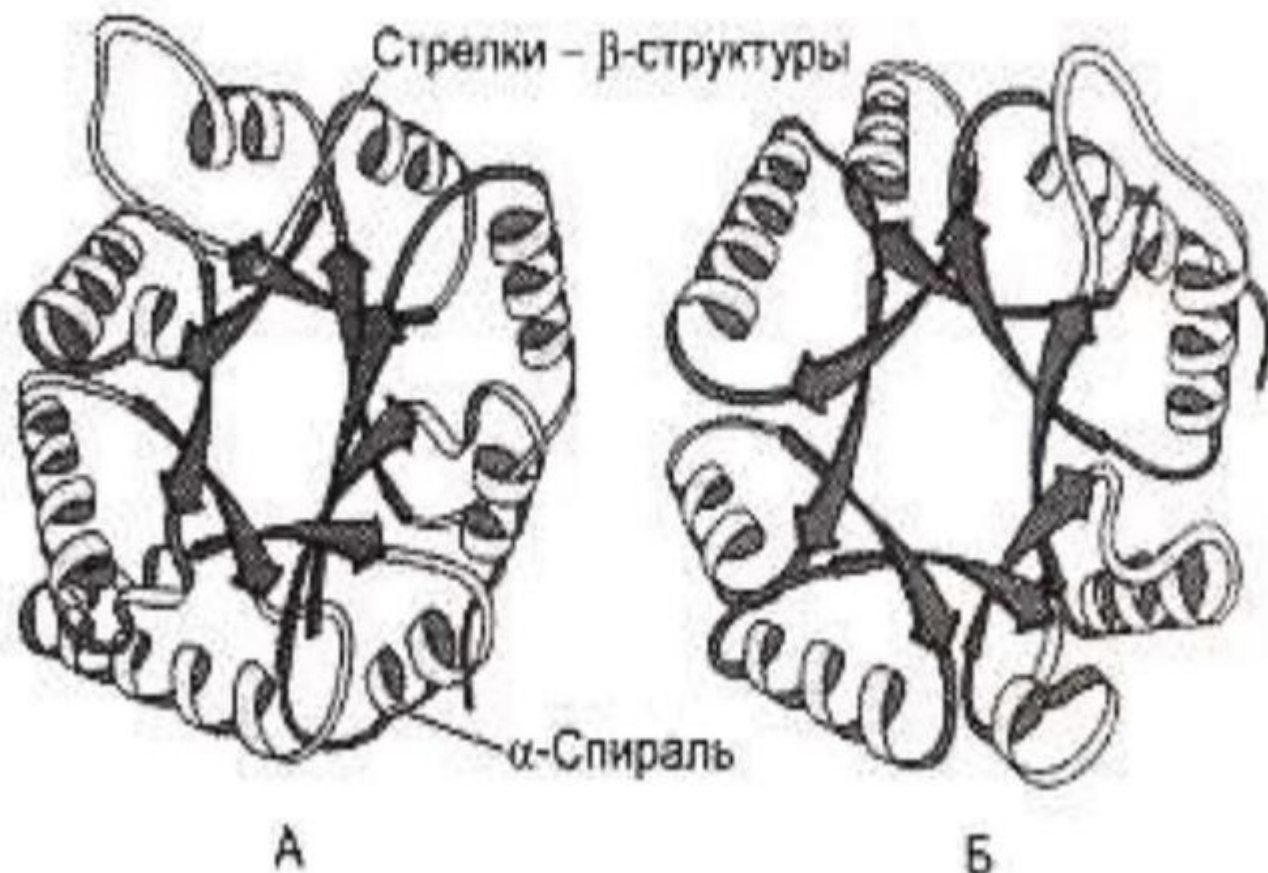
β - α - β -Петля



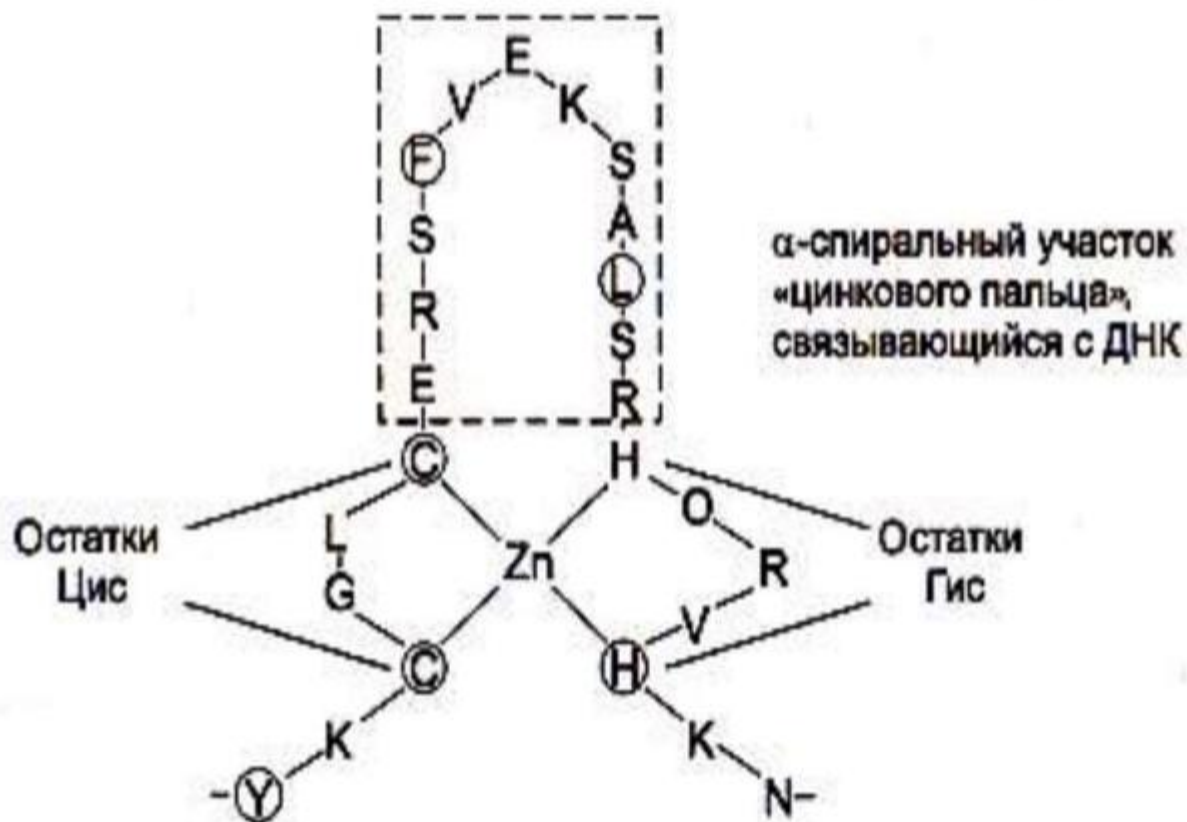
б

β -Бочонок

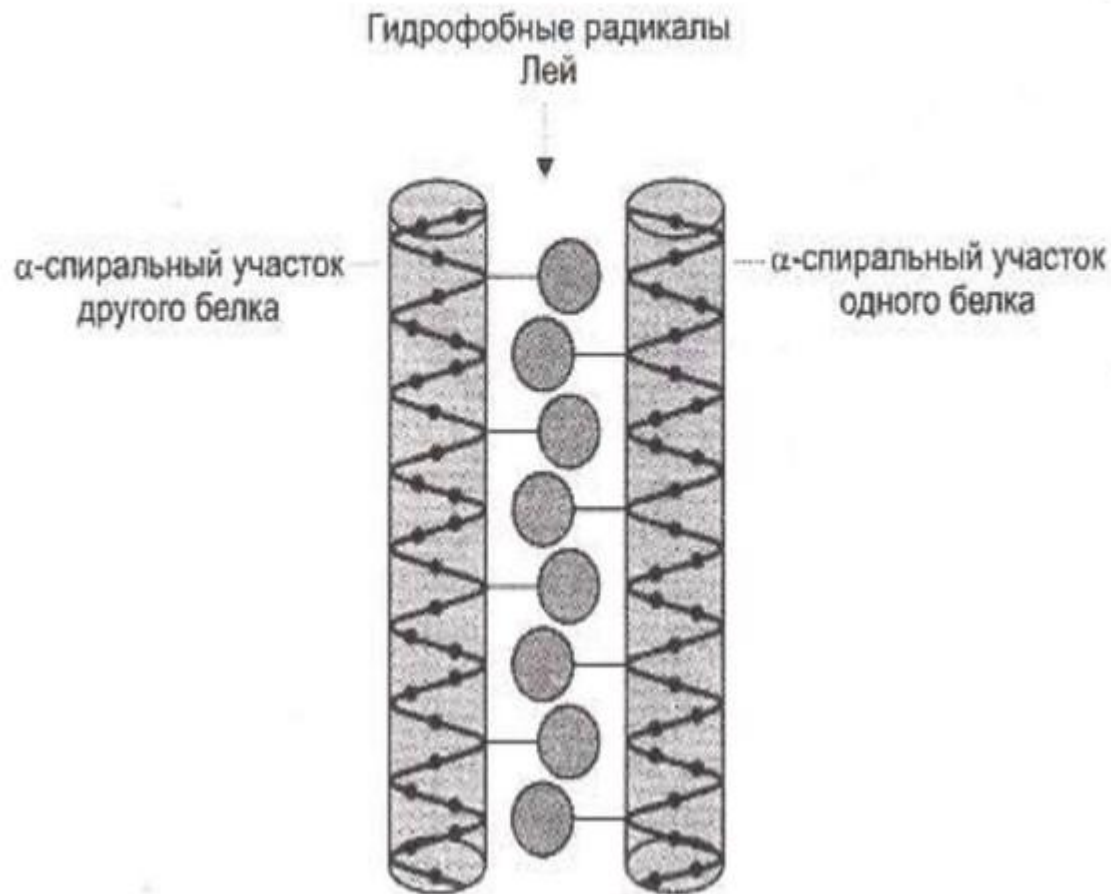
β -бочонки – вид сверху



Супервторичные структуры - цинковые пальцы



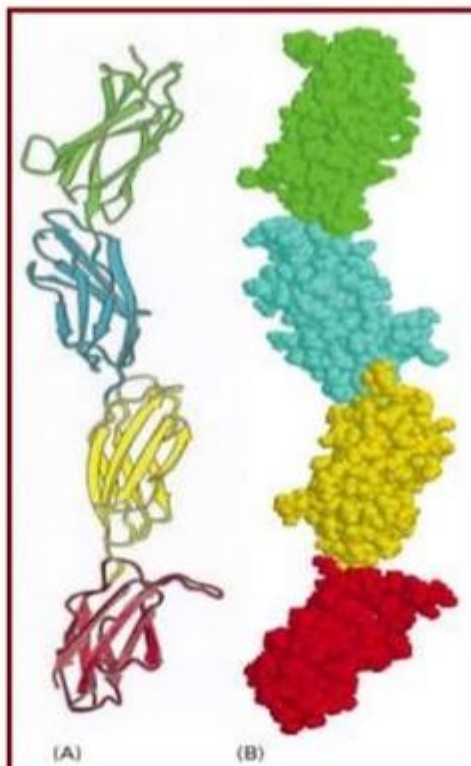
Супервторичные структуры – лейциновые застёжки



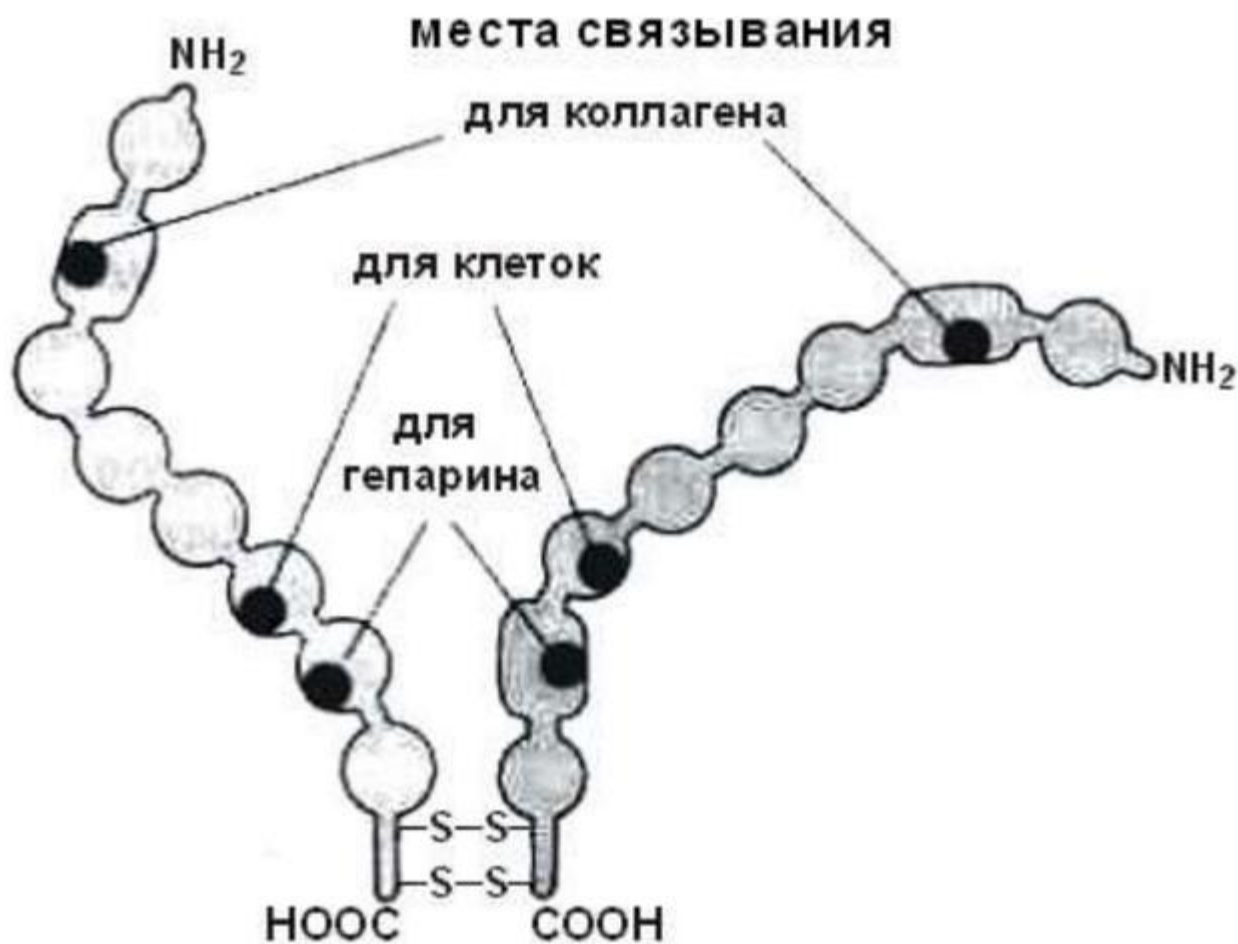


Третичная структура белка -

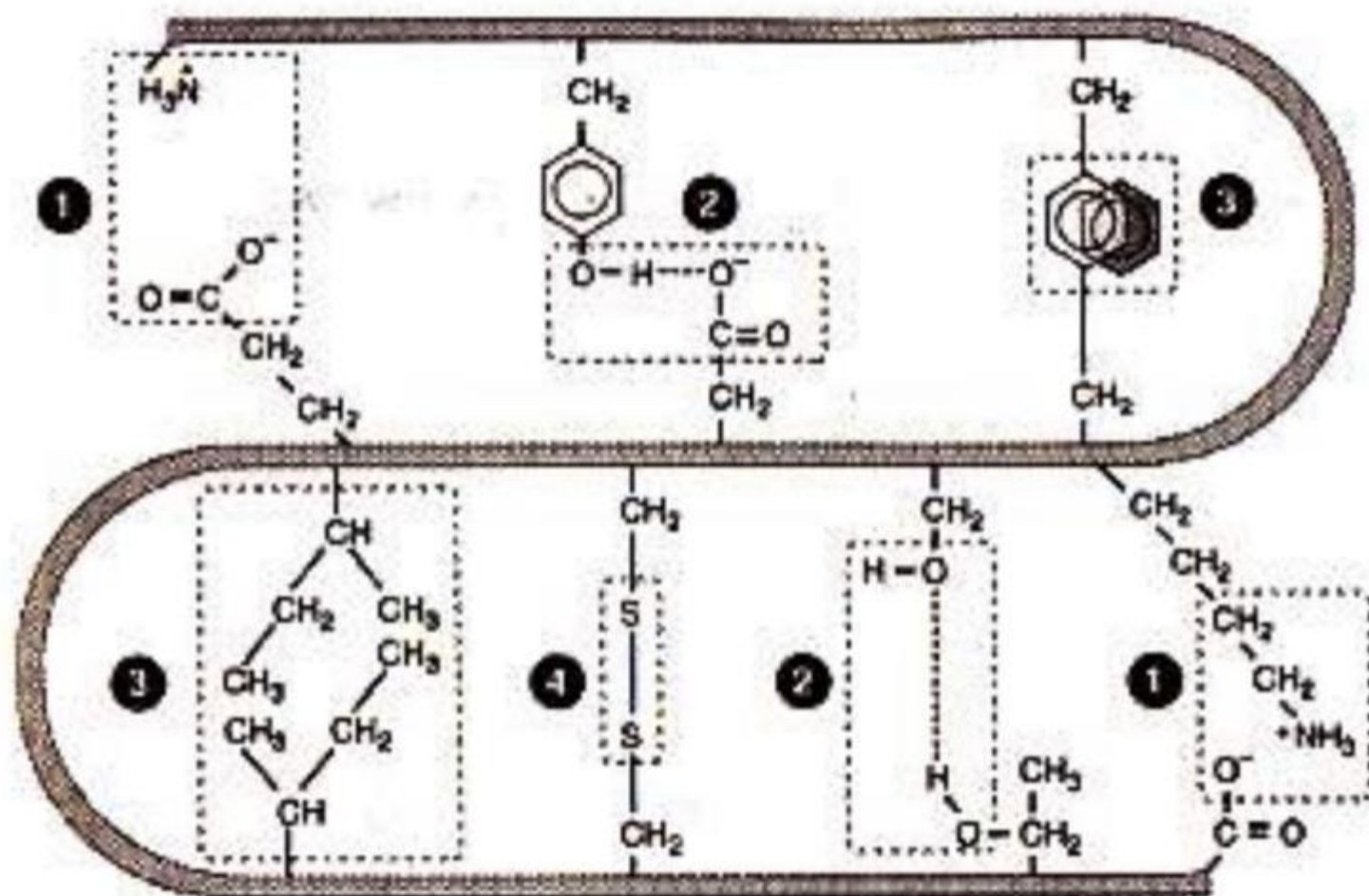
это пространственное расположение спиралей и складчатостей в виде глобулы



Димер молекулы фибронектина



- **Функциональное значение третичной структуры:** с её появлением у белка **появляются новые свойства – биологические**
например, у ферментов – каталитические
- **Третичная структура стабилизирована разными связями**
 - 1) **ионные,**
 - 2) **водородные,**
 - 3) **гидрофобные,**
 - 4) **дисульфидные**
 - 5) **Ван-дер-ваальсовы****между аминокислотными остатками, далеко отстоящими друг от друга**



Связи третичной структуры белка

- 1) водородные – основа вторичной, есть в третичной, четвертичной структуре белка.
Как более электроотрицательные, атомы **O** и **N** стремятся притянуть электроны атома **H**, поэтому на **H** образуется частично положительный заряд. Водородные связи могут образовывать группы: полярные -OH , -SH , -NH и заряженные -COO^- , -NH_2^+ ...



2) Ван-дер-ваальсовы взаимодействия

- **Ван-дер-ваальсовы силы** – понятие собирательное.
- **Это силы, которые возникают при взаимодействии полярных молекул (как правило, они с ароматическими кольцами).**

3) ионная связь

- Во многих молекулах притяжение электронов атомами неодинаково. В этих случаях один или несколько электронов может **перейти** от одного атома к другому, и атомы удерживаются в молекуле за счет **электростатических сил**.

Такие связи называются ионными.

Например: молекула NaCl, взаимодействие amino- и карбоксильных групп (в растворе группы находятся в заряженном состоянии **-NH₃⁺** и **-COO⁻**, что зависит от pH)

4) Гидрофобные взаимодействия

- длинные углеводородные цепочки (в белках и жирах) не могут образовывать с водой водородные связи и нерастворимы в воде.
- Около таких гидрофобных участков между молекулами воды усиливается образование Н-связей. Вода приобретает льдоподобную структуру и выталкивает гидрофобные участки.
- Если в белке подобных участков несколько, то они ориентируются внутрь молекулы и там объединяются в гидрофобное ядро, а гидрофильные аминокислоты остаются снаружи.

Белки с четвертичной структурой

- надмолекулярные образования

Макромолекула (Мм более 50 kDa) состоит из 2-х и более белков с третичной структурой, способна к самосборке, у неё появляются **НОВЫЕ** биологические свойства, не характерные для третичной структуры.

- Каждый белок-участник с третичной структурой при его включении в четвертичную называют **СУБЪЕДИНИЦЕЙ** или **ПРОТОМЕРОМ**.

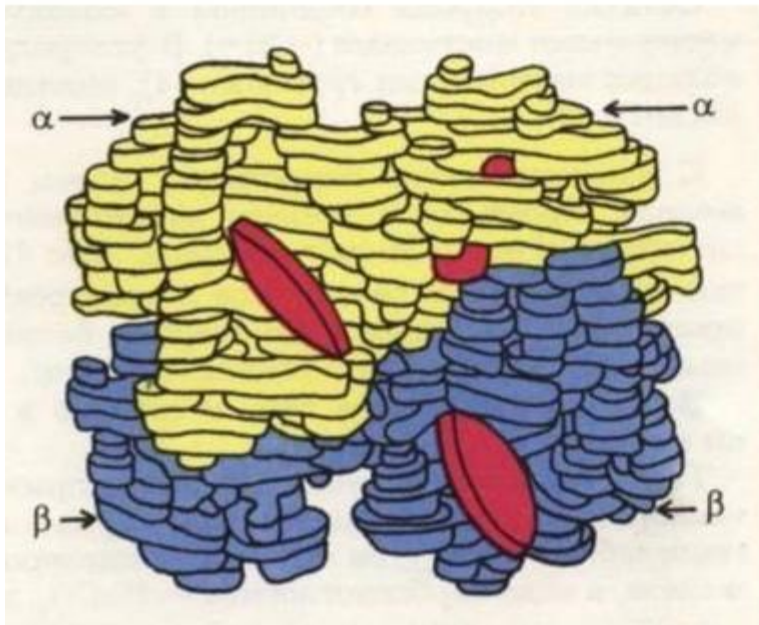
Функциональное значение четвертичной структуры белка

- 1. Объединение нескольких взаимосвязанных функций в одной структуре**
(РНК-полимераза, полиферментные комплексы)
- 2. Архитектурная функция**
(24 субъединицы ферритина формируют полость для хранения оксида железа)
- 3. Обеспечение множественных взаимодействий белка с протяженными структурами**
(антитела (Ig), некоторые ДНК-связывающие белки)
- 4. Регуляторная функция**
(В основе лежит способность передавать конформационные перестройки одной субъединицы на другие – глобины в гемоглобине, G-белки)

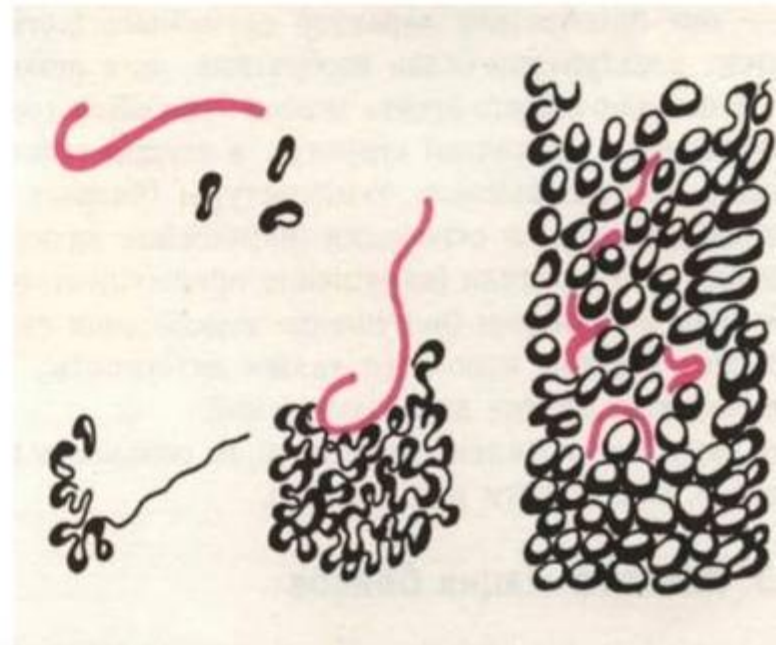
- В образовании и стабилизации четвертичной структуры участвуют те же **слабые нековалентные связи**, что и при образовании третичной, но в основном водородные и электростатические. Дисульфидных ковалентных связей нет.

Примеры четвертичной структуры отдельных белков

- Расположение α и β цепей белка и гема в четвертичной структуре гемоглобина (4 субъединицы)

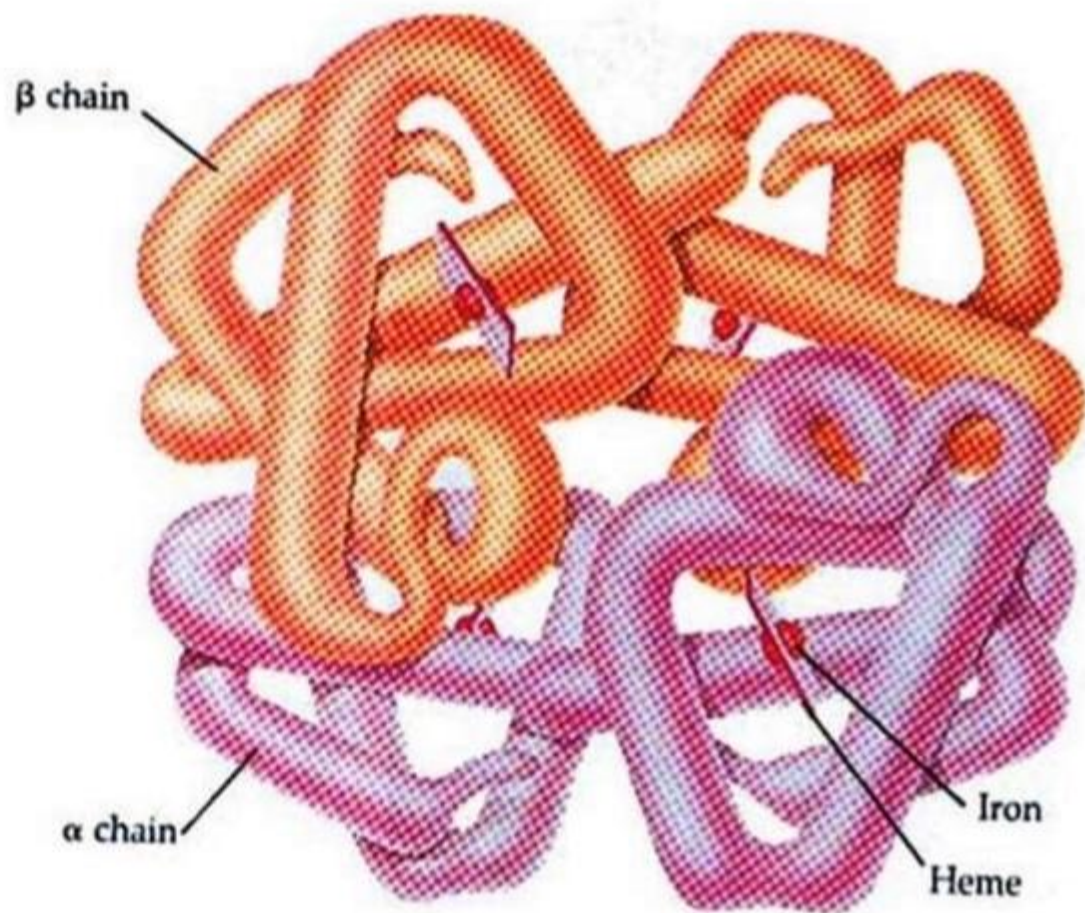


- Четвертичная стр-ра белка вируса табачной мозаики (2130 субъединиц)





Collagen



Hemoglobin

Важные характеристики белков

- Белки бывают **конституциональными и индуцибельными**,
кроме того у них присутствует:
- **Видовая специфичность.**
- **Индивидуальная специфичность.**
Разные молекулярные формы белков.

КЛАССИФИКАЦИИ БЕЛКОВ

- **I По физико-химическим свойствам**
 - а) **основные** (содержат много АРГ, ЛИЗ протонируются)
 - **кислые** (преобладают карбоксильные группы АСП, ГЛУ)
 - **нейтральные**
 - б) **полярные** (гидрофильные)
неполярные (гидрофобные)
- **II По форме молекул**
 - **глобулярные**
 - **фибриллярные**
- **III Структурная классификация**
 - **простые** (состоят только из аминокислотных остатков)
 - **сложные** (белок и небелковая простетическая группа)

IV Функциональная классификация (по биологическим функциям)

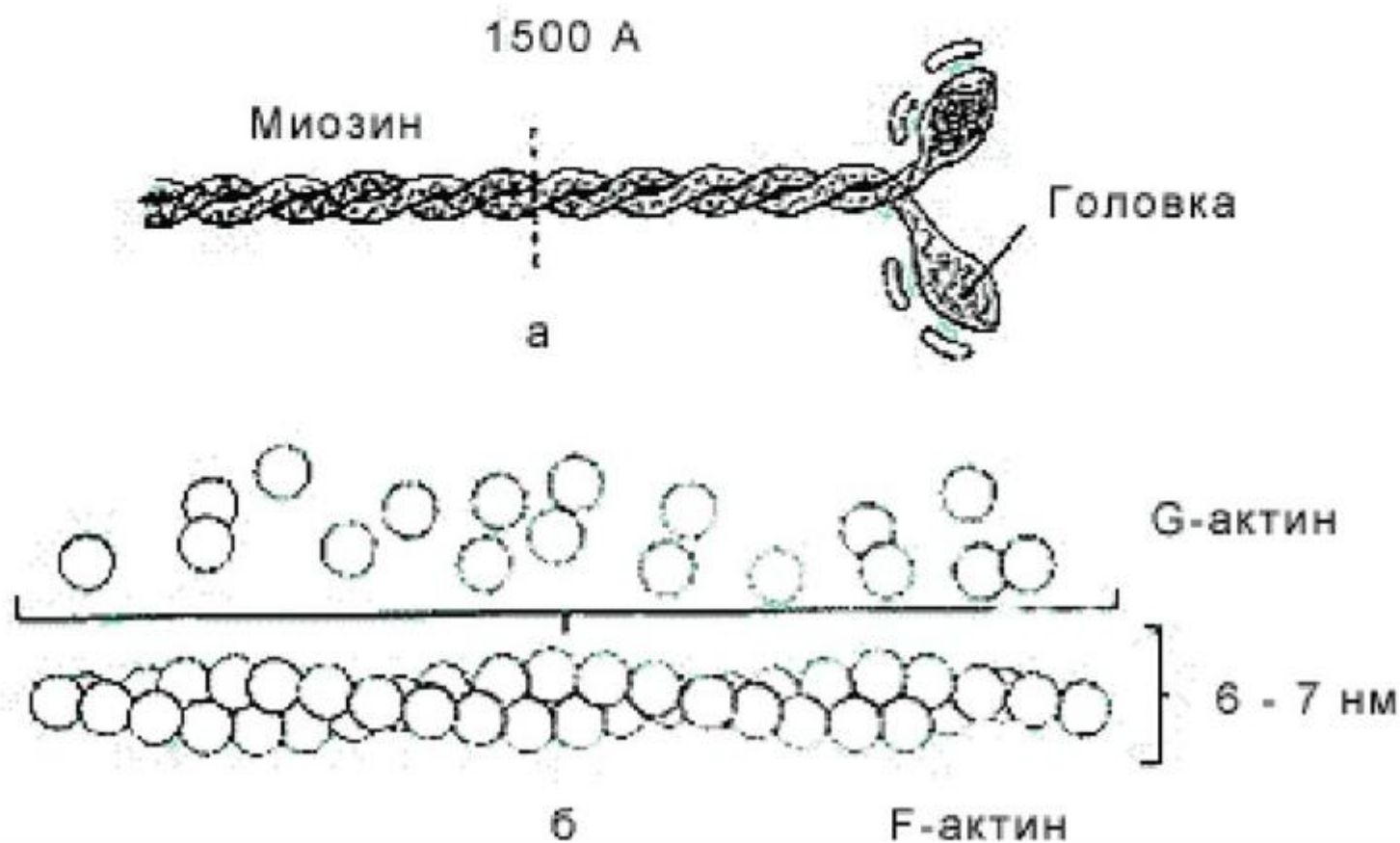
- Структурная – коллаген, эластин, кератины
- Каталитическая – ферменты
- Сократительная – актин, миозин
- Гормональная – инсулин
- Регуляторная – кальмодулин, в регуляции генов – гистоны, негистоновые белки ядра
- Защитная – фибрин, иммуноглобулин, интерферон
- Транспортная – гемоглобин (кислород), альбумины (билирубин, жирные кислоты...), трансферрин (Fe)
- Резервная и питательная (энергетическая) – яичный альбумин, молоко, белки печени и крови при голодании

ПРОСТЫЕ БЕЛКИ



Фибриллярные растворимые белки

Актин, миозин - уникальные сократительные белки



Фибриллярные нерастворимые белки

- **Склеропротеины**

В них повышено содержание ГЛУ, АЛА,

коллагены

ПРО, ГЛИ

эластин

кератин

фиброин

Глобулярные белки плазмы крови

Электрофоретическое разделение белков плазмы крови

A – альбумины
(транстиретин)

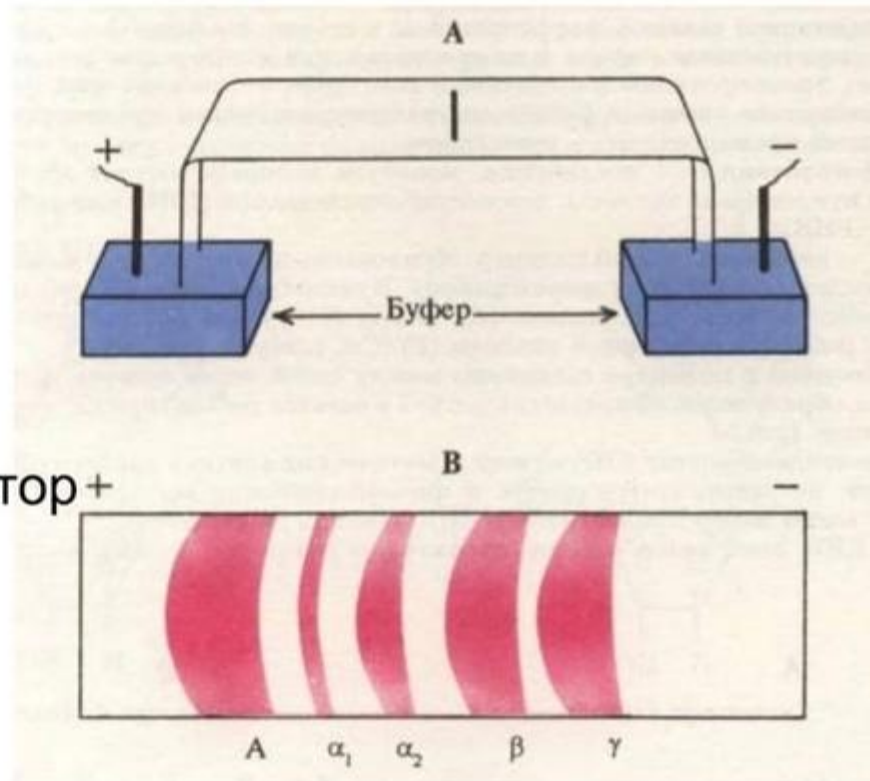
Глобулины:

α_1 – протеиназный ингибитор+
(антитрипсин)

α_2 – церулоплазмин
(транспорт ионов Cu)

β – трансферрин
(транспорт Fe)

γ – иммуноглобулины (антитела)

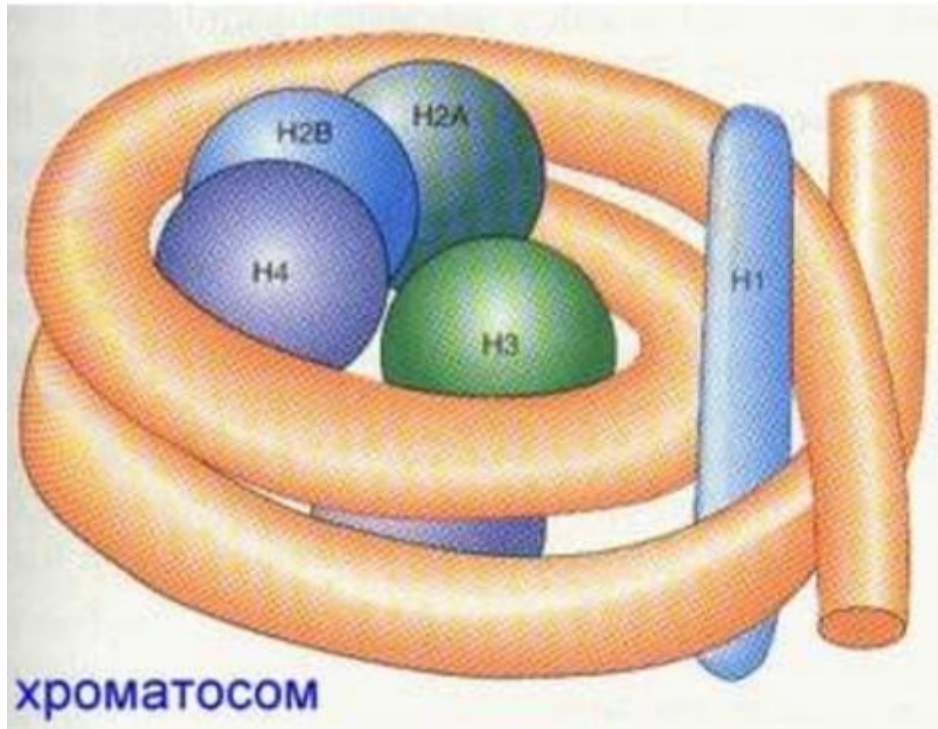


Простые глобулярные белки

- **Проламины, глютелины** – простые белки растительной природы.
Протамины – простые белки, не содержат серы, у некоторых видов играют роль гистонов, подобны им по свойствам (АРГ $\approx 80\%$).

Простые белки, связанные с ДНК

ГИСТОНЫ ($\approx 50\%$ хроматина, масса ≈ 24 кД)



4 вида гистонов:

H1 (очень много ЛИЗ)

H2a и H2b (умеренно
богаты ЛИЗ и АРГ)

H3 (умеренно АРГ, ЛИЗ, ЦИС)

H4 (умеренно АРГ, ЛИЗ, ГЛИ)

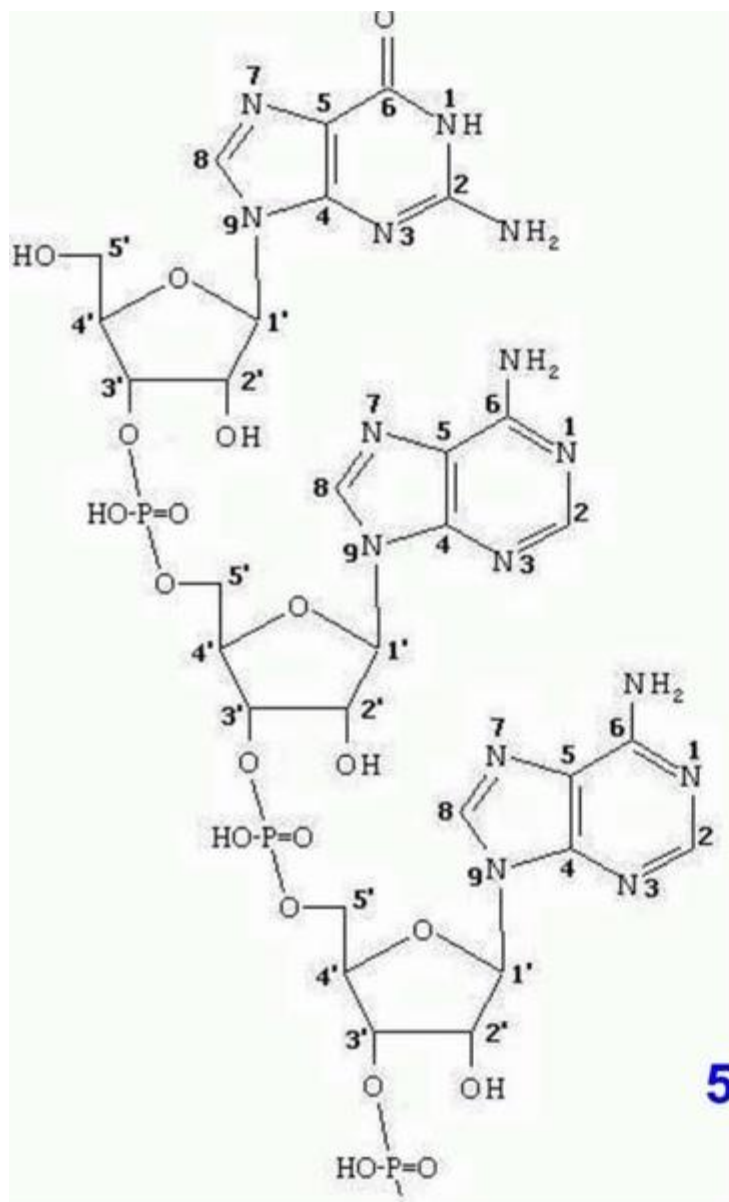
СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ



Нуклеопротейны

- Небелковая часть нуклеопротейнов — **нуклеиновые кислоты.**
- рРНК вступает в комплекс со специфическими рибосомальными белками в рибосомах.
- иРНК в комплексе со стабилизирующими белками цитоплазмы образует информосомы.
- ДНК в комплексе с гистонами составляет хроматин ядра.

- **Нуклеиновые кислоты** – полимеры из нуклеотидов.
- Белки-гистоны, протамины нуклеопротеинов имеют «+» заряд и уравнивают «–» заряд фосфора нуклеиновых кислот.



**Нуклеиновая кислота –
полинуклеотид**

**Основа -
САХАРОФОСФАТНЫЙ
ОСТОВ**
с гидрофобными
азотистыми основаниями в
качестве боковых групп

5'-HO-G-A-A-3'

Фосфопротеины

2+

- Белки фосфорилируются через радикалы аминокислот, имеющих OH-группу (SER, THR, TYR).

Металлопротеины

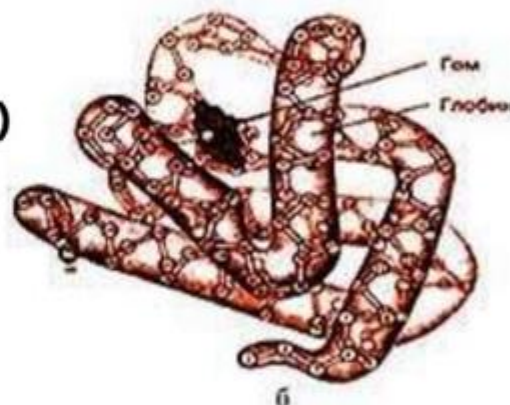
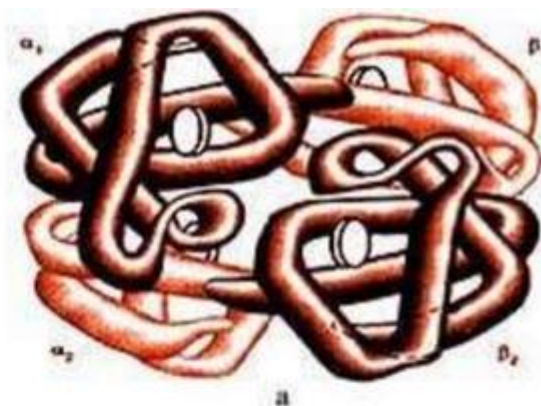
- В своем составе содержат ионы одного или нескольких металлов. Выполняют функцию транспорта и хранения металлов в организме – в основном это металлы с переменной валентностью Fe, Cu и др.

Хромопротеины

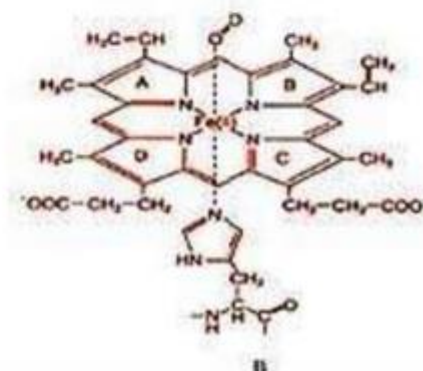
- Сочетание белков с окрашенными веществами: флаво-, гемо-, ретинальпротеины и другие
- **Флавопротеины:** окислительно-восстановительные ферменты, их небелковый компонент витамин В₂ (рибофлавин) в виде ФМН или ФАД.
ФМН (флавинмоноклеотид) – фосфорилированный витамин,
ФАД (флавинадениндинуклеотид) – с ФМН соединён АМФ
- **Гемопротеины:** их небелковый компонент – гем.
 - 1) **ферменты** каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2\uparrow$), цитохромы дыхательной цепи митохондрий (a, b, c), микросомальной цепи окисления (P₄₅₀)
 - 2) **неферментативные белки** мио-, гемоглобин

строение гемоглобина и миоглобина

Строение: **гемоглобина** (а)
субъединицы (б)
структура гема (в)



Расположение гема
и белковой части
в **миоглобине**



Лipoppотеины (ЛП)

- В классическом смысле это белки, ковалентно связанные с липидами (мембраны, ткани кости и зуба)
- **Не путать с транспортными липопpотеинами крови!** — надмолекулярными структурами, содержащими все классы липидов и белки.

Классы
липопротеинов:
хиломикроны,
липопротеины
очень низкой
(ЛПОНП или пре- β -
ЛП), низкой (ЛПНП
или β -ЛП), высокой
(ЛПВП или α -ЛП)
плотности.

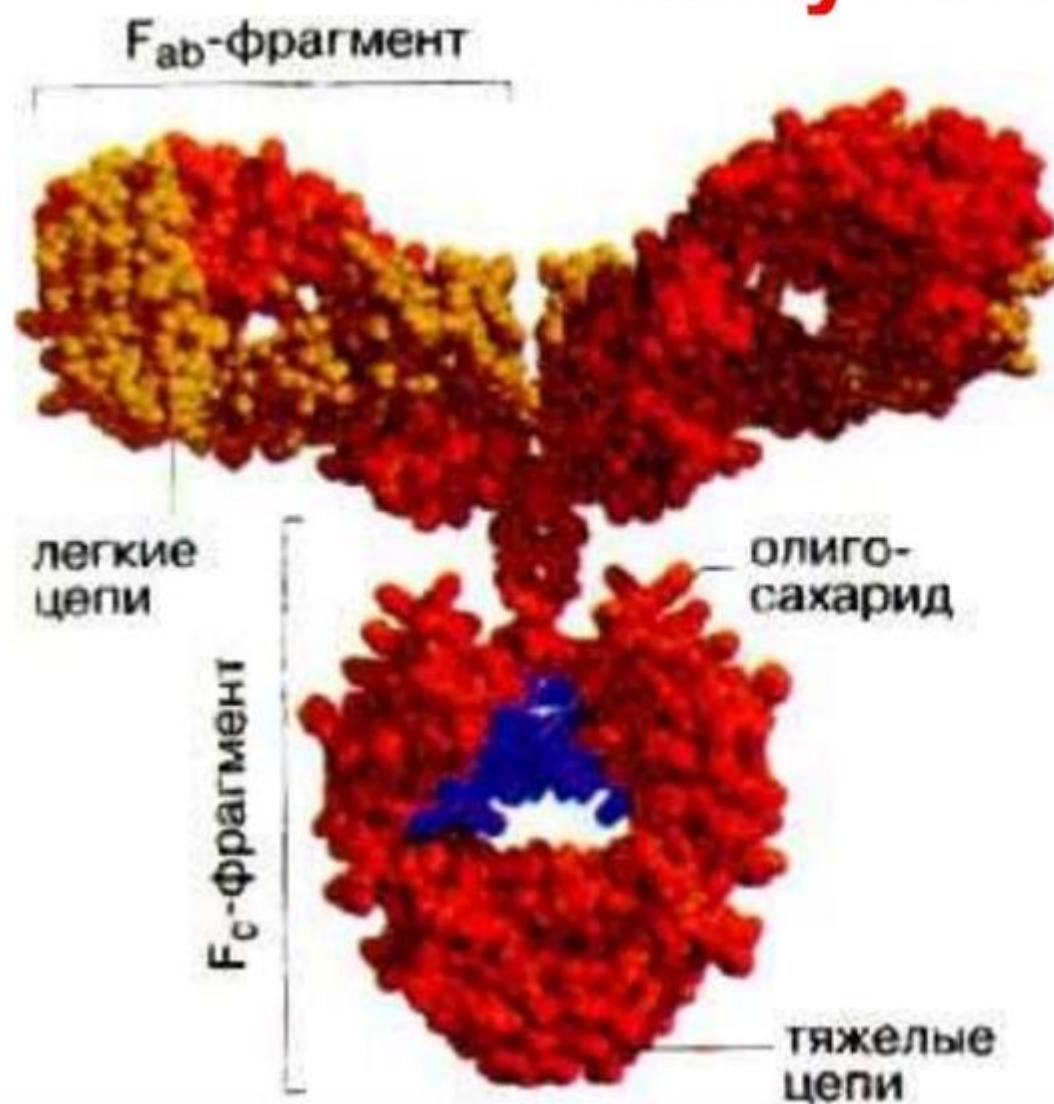


Гликопротеины

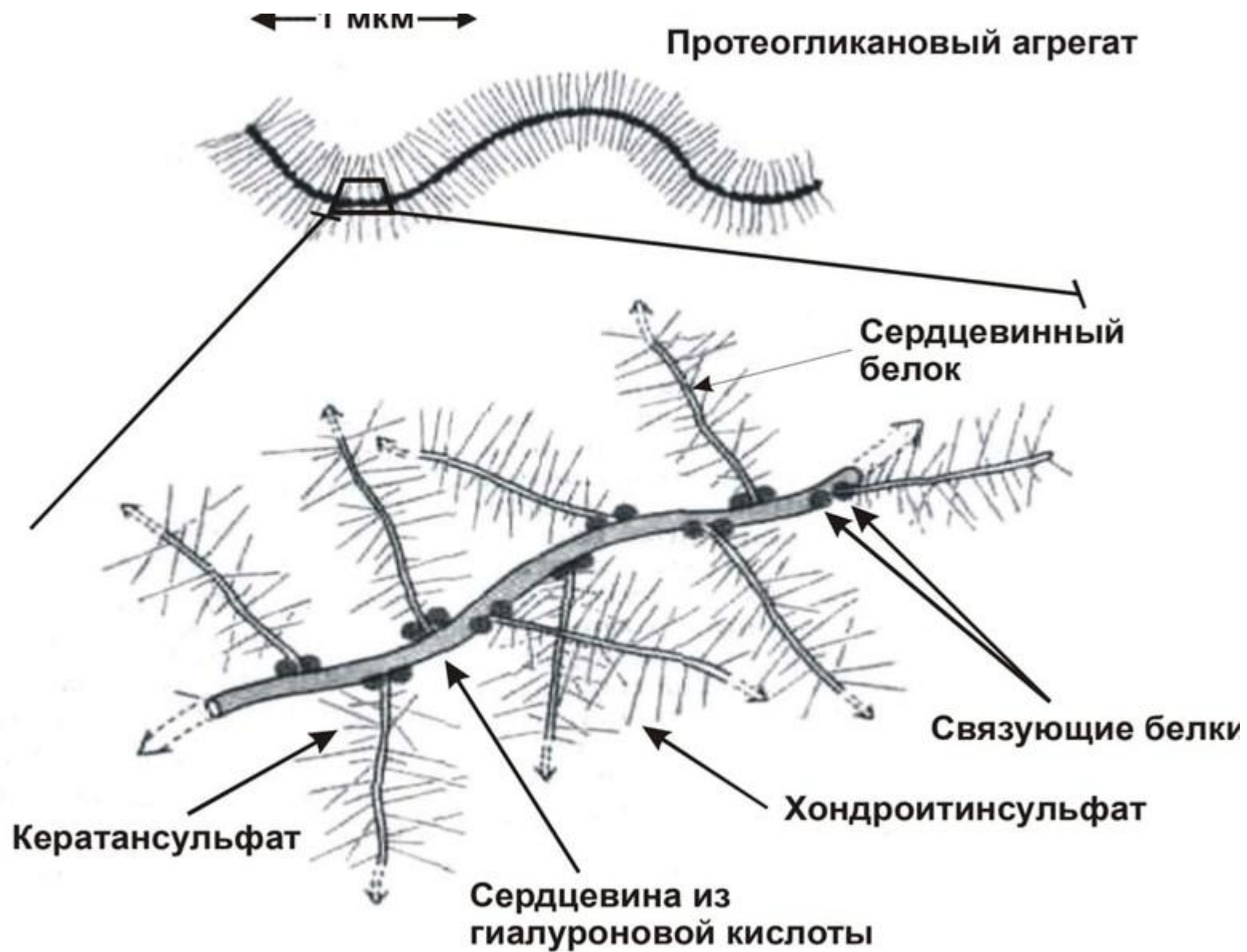
- **2 класса белков.** В **гликопротеинах** 15-20% углеводов в составе коротких цепей и нет уроновых сахарных кислот, в **протеогликанах** 85-90% углеводов в очень длинных упорядоченных цепях ГАГ (гликозаминогликанах), содержащих уроновые кислоты.

- Гликопротеины:
 - гормоны (ТТГ, АКТГ),
 - белки соединительной и костной тканей (коллаген, фибронектин, ламинин и др.),
 - транспортные белки (трансферрин и др.), - белки свёртывающей сист. (фибриноген),
 - белки иммунной системы (Ig A, M, G, D, E),
 - белки групп крови,
 - составная часть рецепторов клеток.

Иммуноглобулин G



- В **протеогликанах** основная часть – цепи полимерных углеводов из кислых гетерополисахаридов (структурной единицей является дисахарид из уроновой кислоты и аминсахара).



Общие физико-химические свойства белков

- Гидрофильность, способность к набуханию, растворимость в воде
- Амфотерность
- Подвижность в электрическом поле
- Оптическая активность
- Поглощение УФ-лучей
- Коллоидные свойства

Коллоидные свойства белков

- Онкотическое давление
- Вязкость растворов
- Светорассеяние (светящийся конус Тиндаля)
- Незначительная диффузия
- Не проникают через полупроницаемую мембрану

Растворимость белка зависит от:

- реакции среды (рН), поскольку у белка есть изоэлектрическая точка
- ионной силы раствора (ионы Na, K и др.)
- температуры раствора

Факторы устойчивости белка в растворе:

- **Заряд белка**
- **Гидратная оболочка**
- Молекулярная масса
- Форма молекулы

Осаждение белков:

- 1) Высаливание** – одна из обратимых реакций осаждения белка из раствора с помощью больших концентраций нейтральных солей (NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4)
- Происходит: а) дегидратация молекул, б) устранение их заряда
 - Белки снова растворяются при добавлении растворителя

2) Водоотнимающие средства

- Белки осаждаются водоотнимающими средствами (ацетон, этанол).

3) Изменение pH

- С изменением pH постепенно происходит:
 - а) снижение заряда и дегидратация молекул белка – растворимость снижается, а в изоэлектрической точке заряд исчезает.
 - б) или увеличение заряда и гидратация белка – его растворимость растёт.

ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА –

осаждение с нарушением пространственной структуры и потерей биологических свойств белка

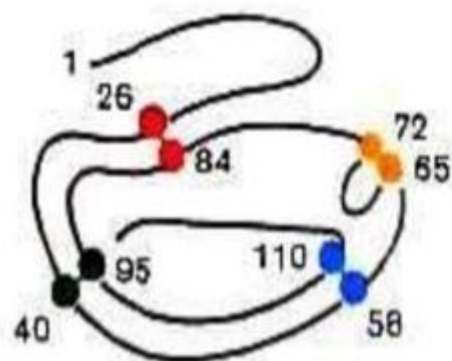
- **Происходит:** разрыв слабых связей и разрушение нативной структуры белка. Растворение в первоначальном растворителе уже невозможно.
 - **Факторы денатурации** по своей природе бывают:
 - Физические** – механические и термические воздействия, ультрафиолетовое и микроволновое излучение, ионизация заряженными частицами.
 - Химические** – соли тяжёлых металлов, алкалоиды нарушают полярные связи; концентрированные минеральные и органические кислоты, щелочи дают водородные связи с пептидными группами; органические растворители нарушают водородные связи и ведут к дегидратации.
 - Биологические.**
-

Денатурация бывает: необратимая и обратимая

- **НЕОБРАТИМО** осаждение солями тяжёлых металлов, алкалоидами, концентрированными минеральными и органическими кислотами, щелочами; воздействие высокой $t^{\circ}\text{C}$, УФО
 - **РЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКА** возможна только **при сохранении его первичной структуры** и после его помещения (или возвращения) в условия, оптимальные (или допустимые) для существования и функционирования этого белка.
При ренатурации:
 - 1) белок сворачивается в нативную конформацию и
 - 2) его биологическая активность восстанавливается
-

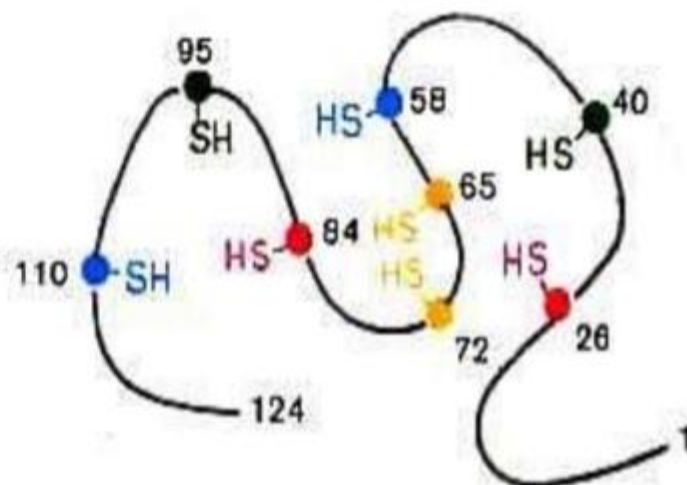
Связь первичной структуры, конформации и функциональной активности белка – опыты Merrifield и Anfinsen (1964 г.)

- Меррифилд синтезировал *in vitro* молекулу РНК-азы из 124 аминокислот.
- Денатурированная, раскрученная спираль рибонуклеазы теряет ферментативную активность.
- Восстановление конформации при ренатурации ведет к восстановлению функции фермента.



Нативная рибонуклеаза

8 М Мочевина и
β-меркаптоэтанол

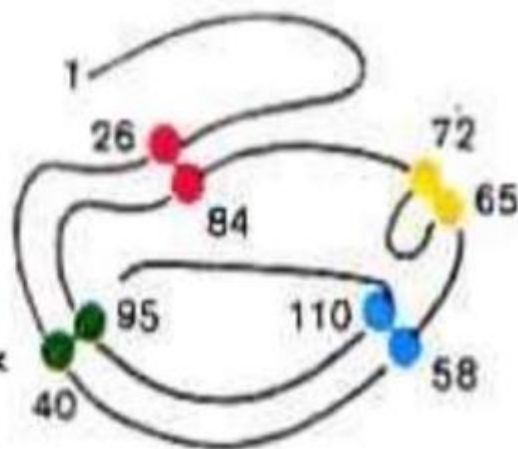


Денатурированная восстановленная
рибонуклеаза

Денатурированная
восстановленная
рибонуклеаза

Диализ для
удаления
мочевины и
β-меркапто-
этанола

Окисление
воздухом
сульфгидрильных
групп вос-
становленной
рибонуклеазы

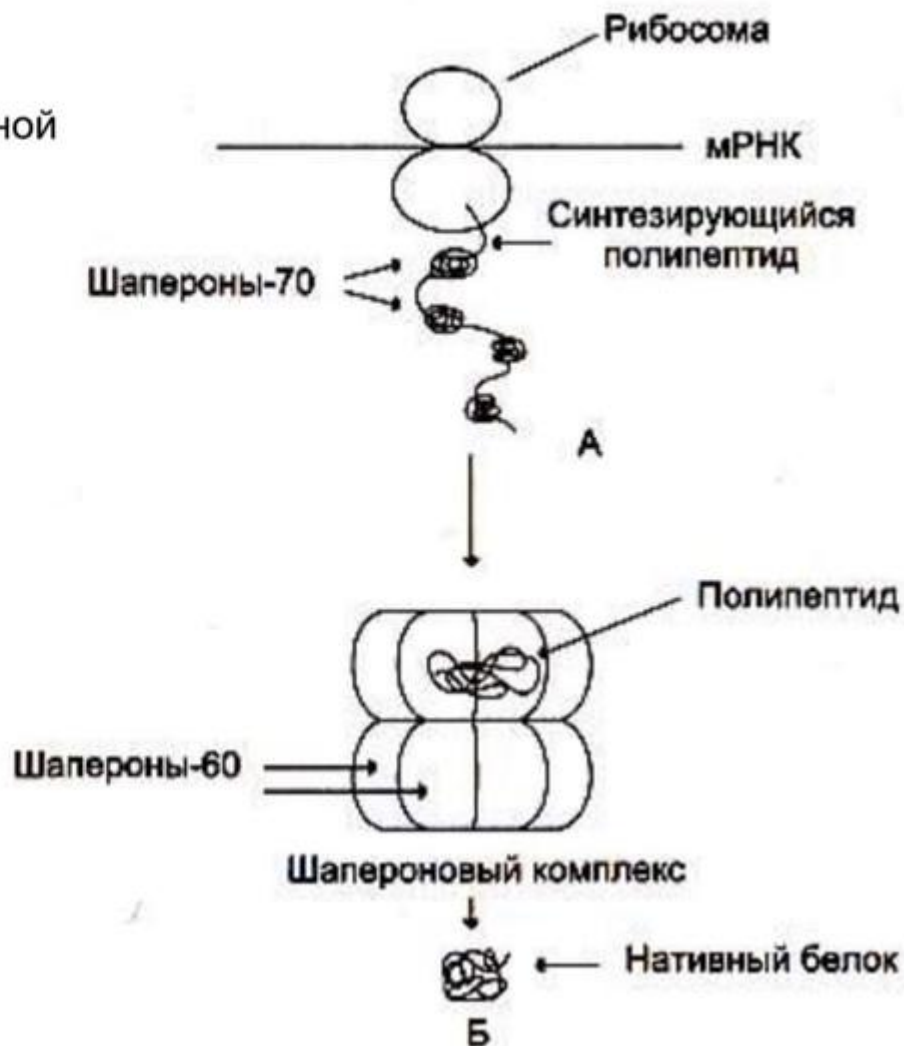


Нативная рибонуклеаза

- **Фолдинг** – процесс спонтанного сворачивания синтезированной полипептидной цепи в уникальную пространственную структуру.
Рефолдинг – восстановление нативной конформации белка после денатурирующих воздействий и возврата в оптимальные для него условия.

- **Шапероны** разделяют на 6 классов по их молекулярной массе (от 110 до 15 кДа)
- **Фолдинг** энергозатратен, поэтому в составе комплексов шаперонов есть белки с АТФ-азной активностью.

Шапероны



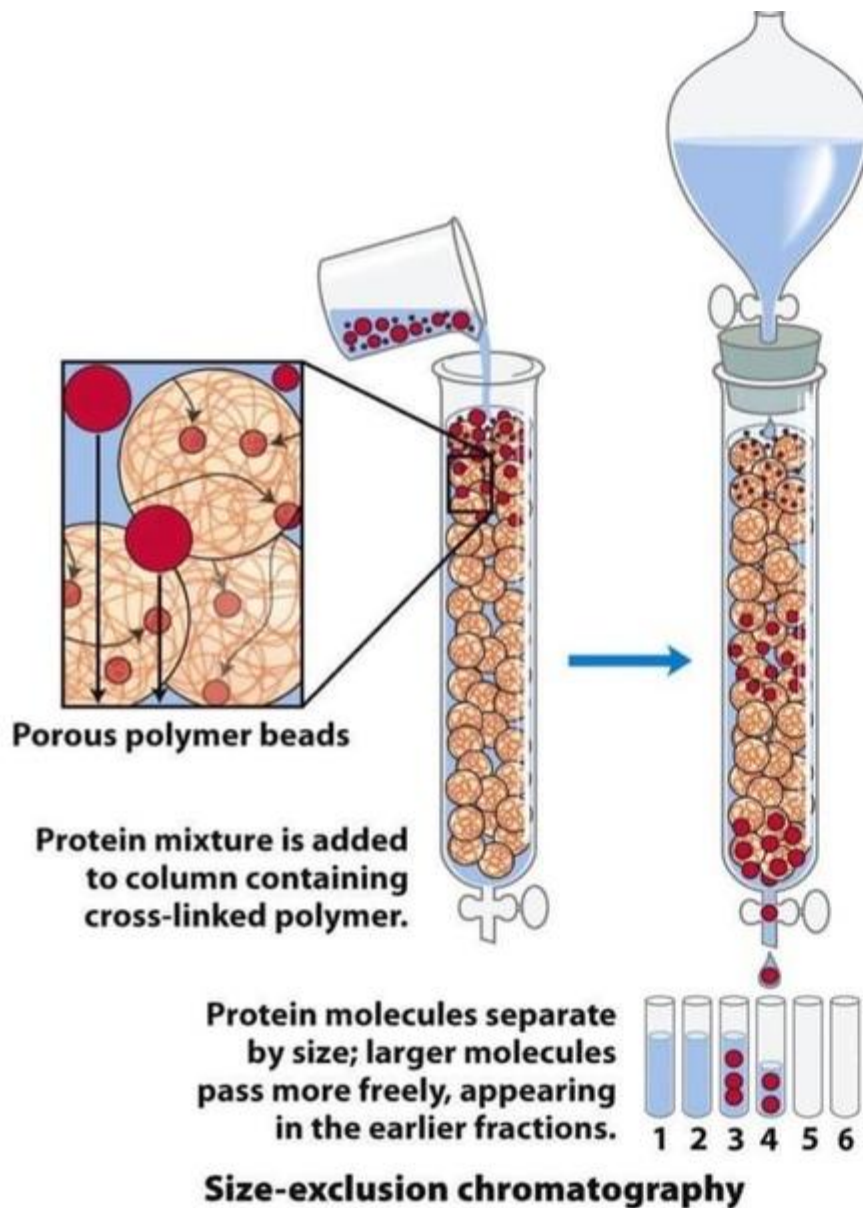
Практическое использование

- При отравлениях рекомендуют использовать сырой яичный белок и некипяченое молоко для связывания денатурирующего агента в ЖКТ.
- Денатурацию применяют в лабораториях КЛД при проведении биохимических анализов – осаждают белки крови трихлоруксусной кислотой (затем в надосадке определяют различные небелковые компоненты), осаждают белки патологической мочи сульфосалициловой кислотой и определяют их количество.
- В клинической диагностике используют **осадочные пробы (тимоловую и Вельтмана) для оценки устойчивости белка в растворе** при воспалительных и др. заболеваниях (**см. к занятию пробы в лабораторном практикуме**)

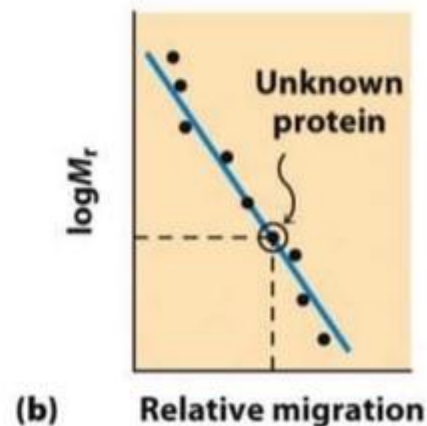
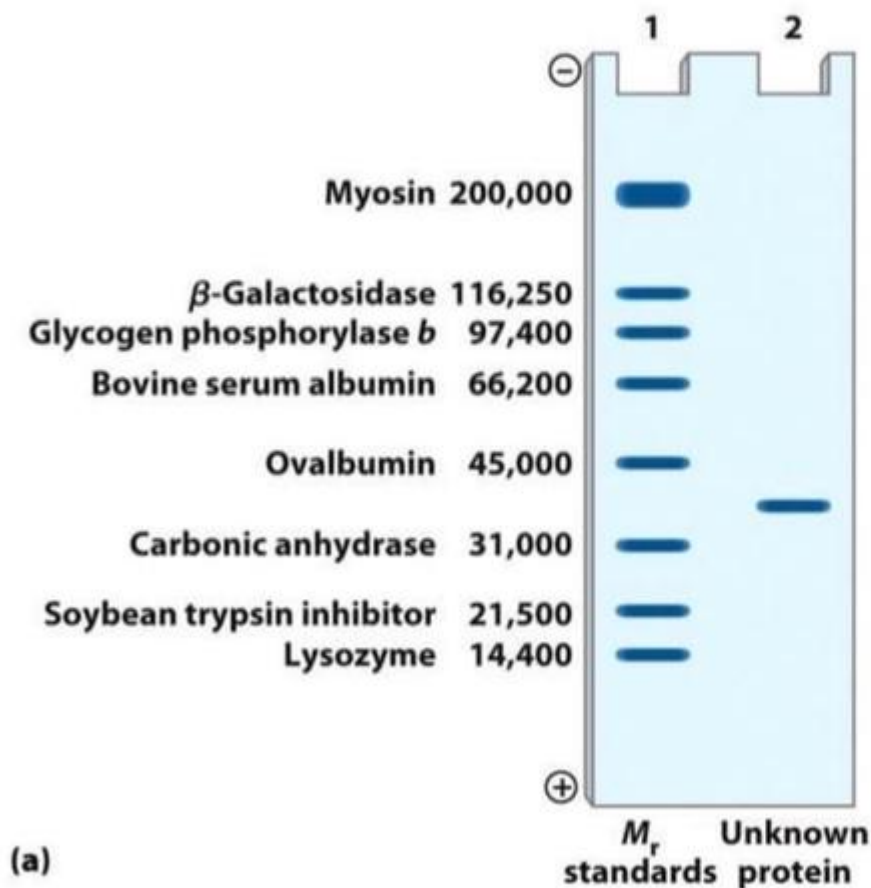
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВ

- РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОК**
- ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**
- ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ**
- ХРОМАТОГРАФИЯ ПО СРОДСТВУ (АФФИННАЯ)**
- ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**
- ЭЛЕКТРОФОРЕЗ**

Гель- фильтрация



Определение молекулярной массы белка методом электрофореза



Методы разделения белков от низкомолекулярных соединений. Диализ

