

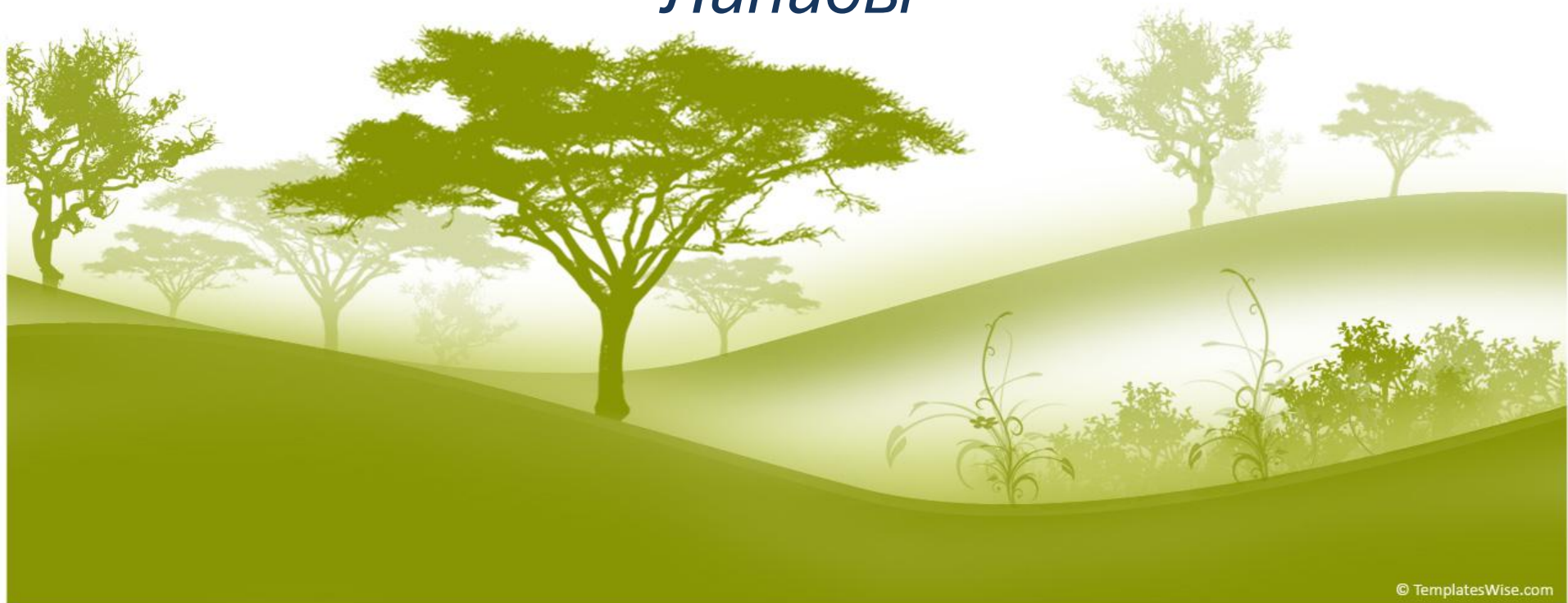
Коллоквиум 1

-Аминокислоты

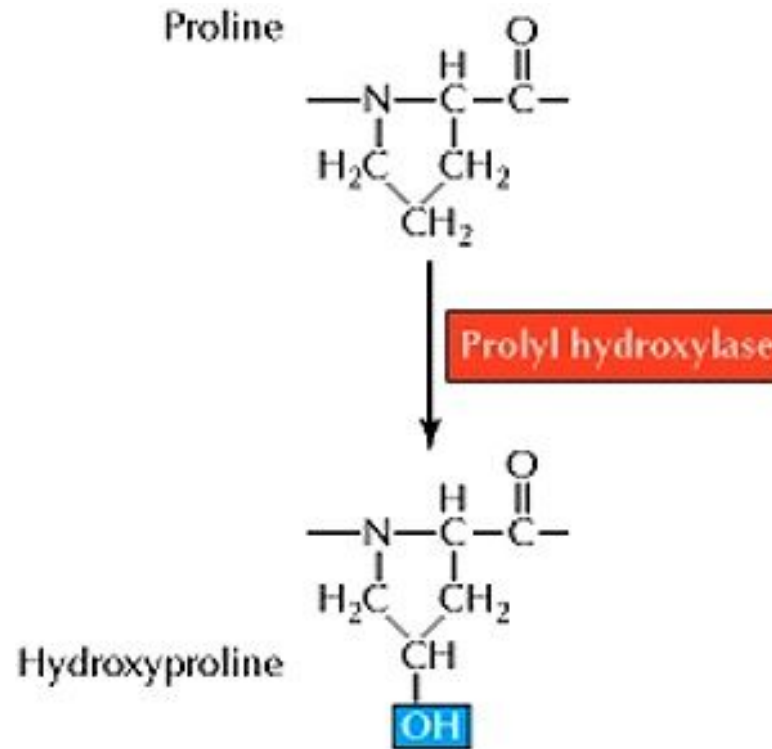
-Пептиды

-Белки

-Липиды



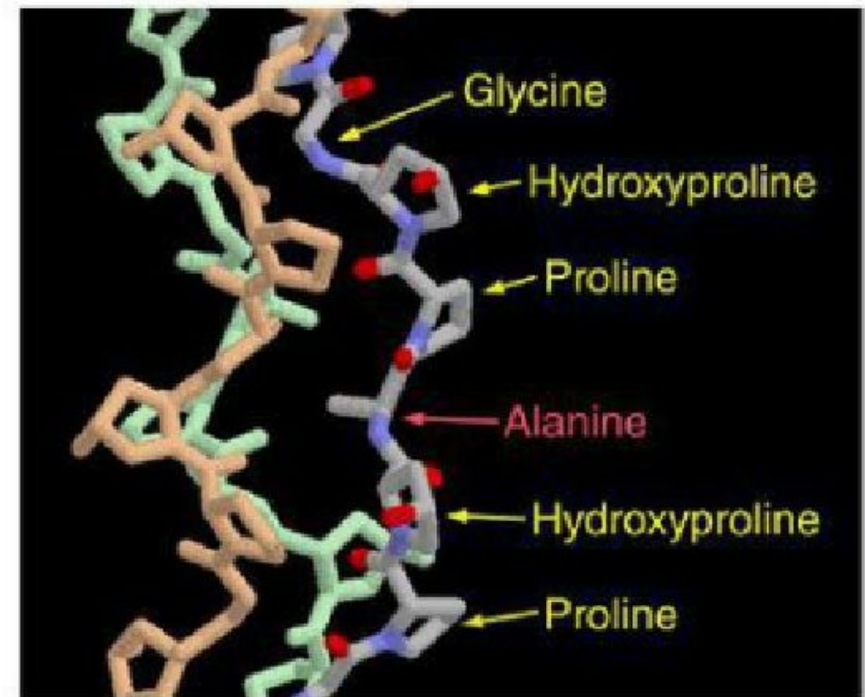
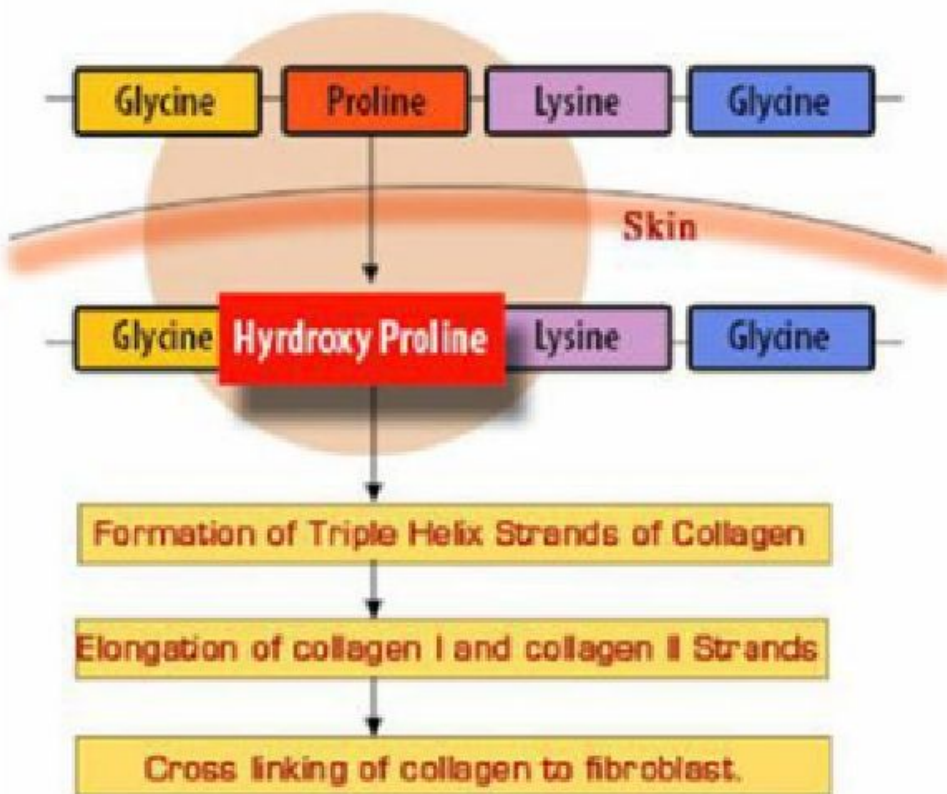
- Минорные аминокислоты - это производные протеиногенных аминокислот, образующиеся в результате модификации их радикалов в составе полипептидной цепи в ходе посттрансляционной модификации белков.
- К нестандартным аминокислотам относится 4-гидроксипролин и 5-гидроксилизин; обе эти аминокислоты входят в состав коллагена и фибриллярного белка соединительной ткани.



Нестандартные аминокислоты

Нестандартные аминокислоты появляются в белках в результате посттрансляционной модификации

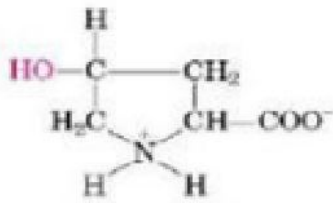
HYDROXYLASE + Ascorbic Acid



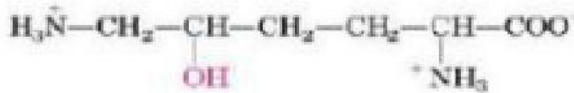
Специфическая последовательность аминокислот, включающая гидроксипролин, обеспечивает образование прочной спирали коллагена.

Из лизина образуется минорная аминокислота десмозин, присутствующая только в фибриллярном белке эластине. В некоторых случаях минорные аминокислоты встречаются только в составе одного белка и могут служить его маркерами. Это может быть использовано для идентификации белка или оценки скорости его распада. Во время голодания происходит ускоренный распад белков мышечной ткани и крови. Оценить такое состояние можно по величине экскреции с мочой метилгистидина – минорной аминокислоте мышечной ткани.

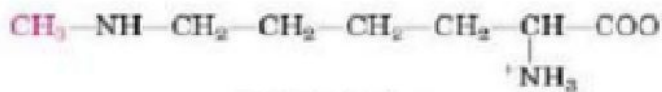
4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 6-N-метиллизин, γ -карбоксиглутамат и десмозин



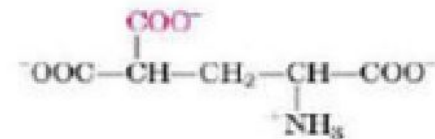
4-гидроксипролин



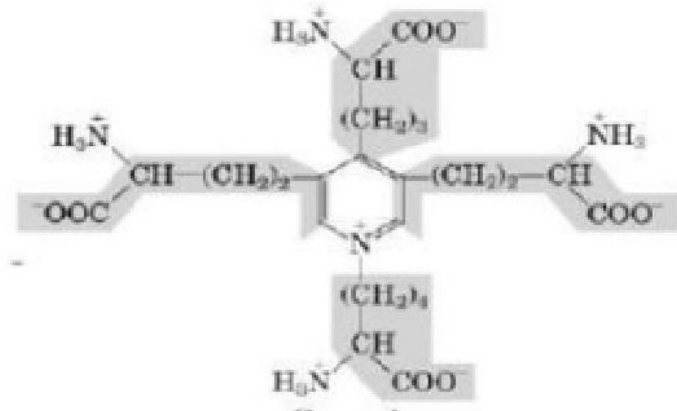
5-гидроксилизин



6-N-метиллизин



γ -карбоксиглутамат

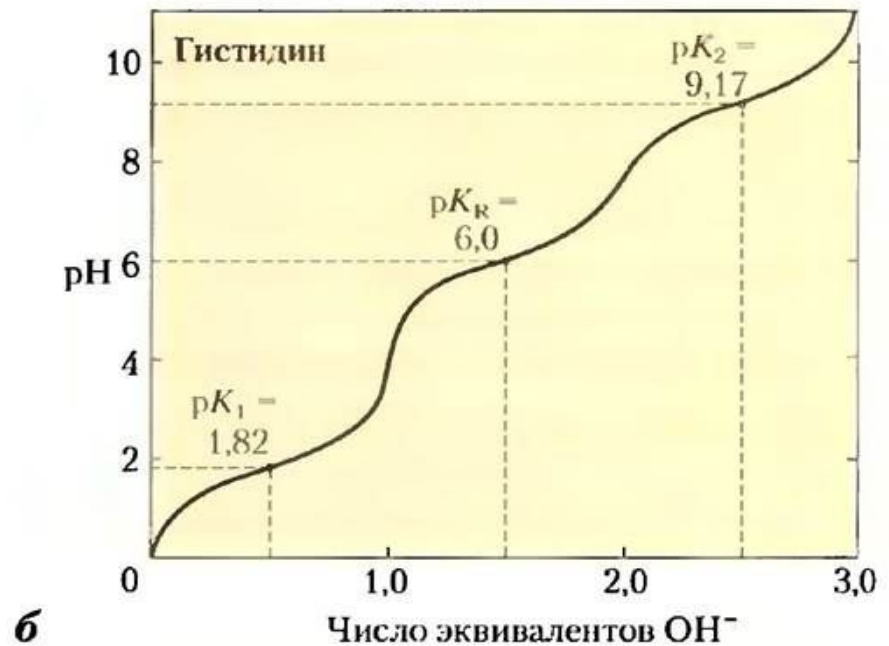
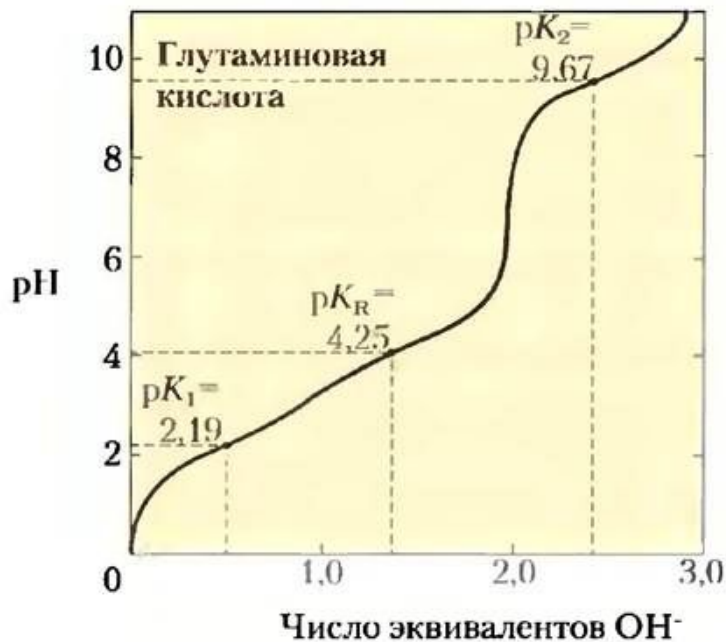
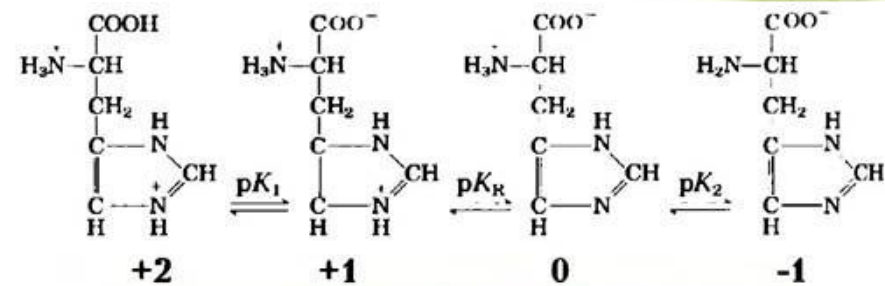
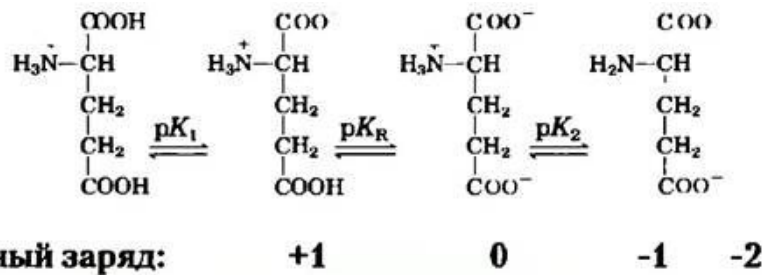


Десмозин

Многие непротеиногенные аминокислоты заслуживают внимания, потому что они есть;

- промежуточные продукты в биосинтезе,
- посттрансляционно образуется в белках,
- обладают физиологической ролью (например, компоненты стенок бактериальных клеток , нейротрансмиттеры и токсины),
- натуральные или искусственные фармакологические соединения,
- присутствует в метеоритах и в экспериментах с пребиотиками (например, в эксперименте Миллера – Юри).

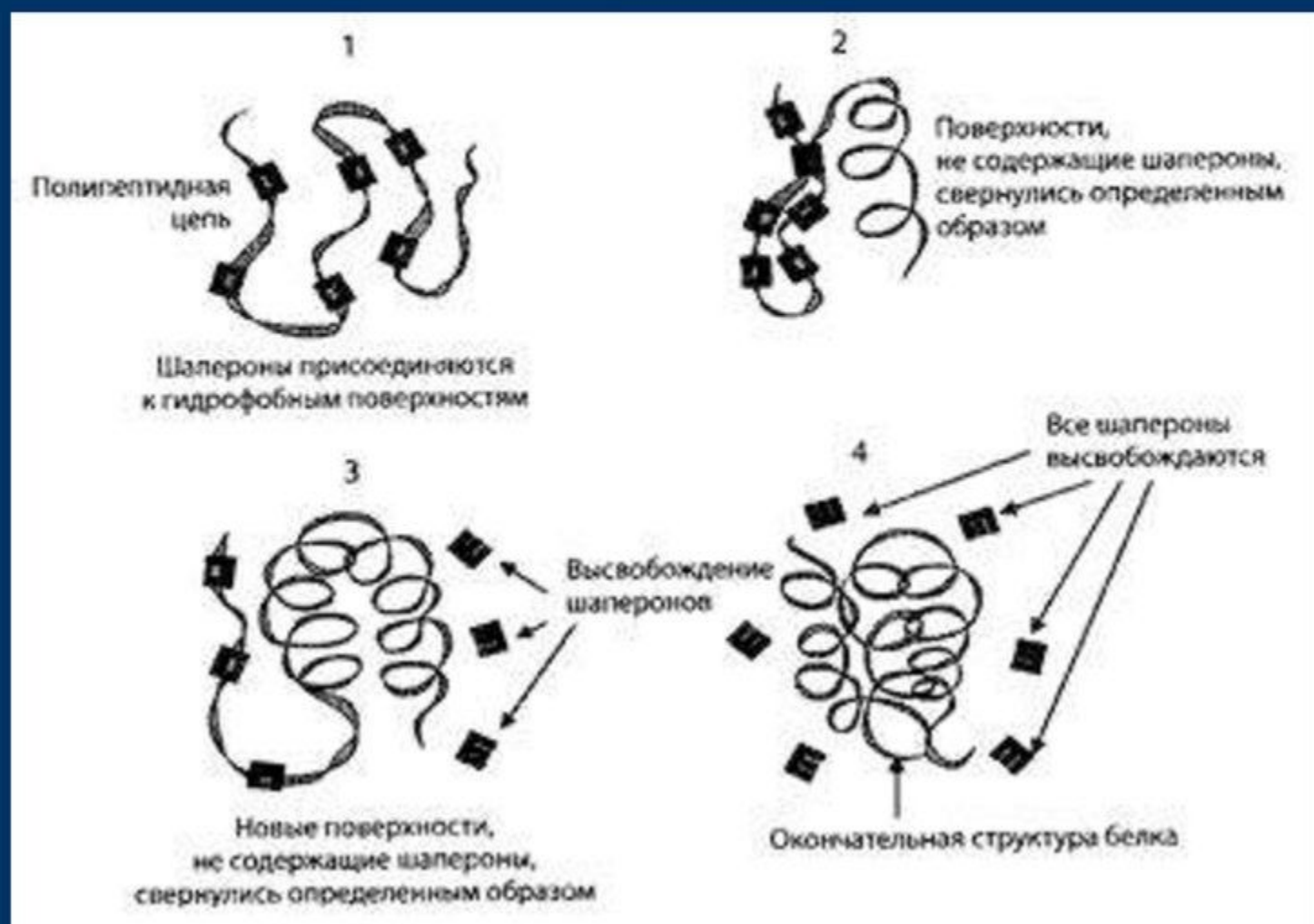
Для аминокислот характерны специфические кривые титрования, зависящие от числа ионогенных группировок. Если аминокислота имеет одну аминную и одну карбоксильную группировки, то кривая титрования имеет два перегиба, соответствующих отщеплению одного протона.



- Сложные белки (протеиды, холопротеины) — двухкомпонентные белки, в которых помимо пептидных цепей (простого белка) содержится компонент неаминокислотной природы — простетическая группа. При гидролизе сложных белков, кроме аминокислот, освобождается небелковая часть или продукты её распада.
- В качестве простетической группы могут выступать различные органические (липиды, углеводы) и неорганические (металлы) вещества.
- В зависимости от химической природы простетических групп среди сложных белков выделяют следующие классы:
 - Гликопротеиды, содержащие в качестве простетической группы ковалентно связанные углеводные остатки и их подкласс — протеогликианы, с мукополисахаридными простетическими группами. В образовании связи с углеводными остатками обычно участвуют гидроксильные группы серина или треонина. Большая часть внеклеточных белков, в частности, иммуноглобулины — гликопротеиды. В протеогликах углеводная часть составляет ~95 %, они являются основным компонентом межклеточного матрикса.
 - Липопротеиды, содержащие в качестве простетической части нековалентно связанные липиды. Липопротеиды, образованные белками-аполипопротеинами связывающимися с ними липидами и выполняют функцию транспорта липидов.
 - Металлопротеины, содержащие негемовые координационно связанные ионы металлов. Среди металлопротеидов есть белки, выполняющие депонирующие и транспортные функции (например, железосодержащие ферритин и трансферрин) и ферменты (например, цинксодержащая карбоангидраза и различные супероксиддисмутазы, содержащие в качестве активных центров ионы меди, марганца, железа и других металлов)
 - Нуклеопротеины, содержащие нековалентно связанные ДНК или РНК, в частности, хроматин, из которого состоят хромосомы, является нуклеопротеидом[2].
 - Фосфопротеиды, содержащие в качестве простетической группы ковалентно связанные остатки фосфорной кислоты. В образовании сложноэфирной связи с фосфатом участвуют гидроксильные группы серина или треонина, фосфопротеинами являются, в частности, казеин молока[3]:
 - Хромопротеиды — собирательное название сложных белков с окрашенными простетическими группами различной химической природы. К ним относится множество белков с металлосодержащей порфириновой простетической группой, выполняющие разнообразные функции — гемопроотеины (белки, содержащие в качестве простетической группы простетическую группу гемма, например, гемоглобин, миоглобин и др.)

- Многие **шапероны являются белками теплового шока**, то есть белками, экспрессия которых начинается в ответ на рост температуры или другие клеточные стрессы
- Белки теплового шока – **Hsp (heat shock protein)**. **Hsp60, Hsp70**
- Шапероны участвуют в **фолдинге только что созданных белков в тот момент, когда они «вытягиваются» из рибосомы.**
- Другие шапероны участвуют в **исправлении потенциального вреда, который возникает из-за неправильного сворачивания белков**

Участие шаперонов в фолдинге белка



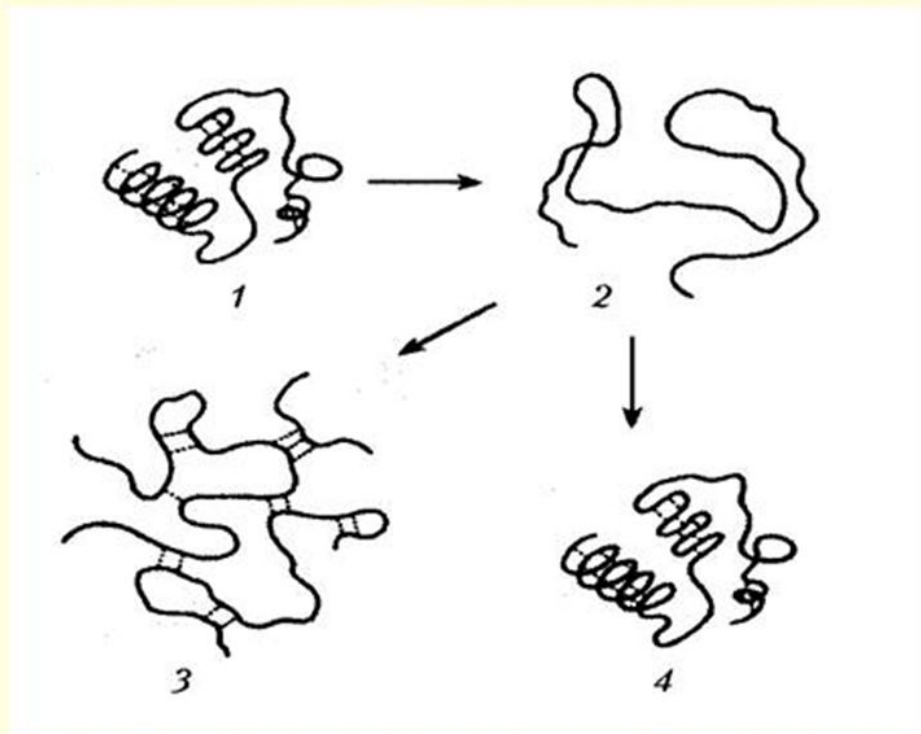
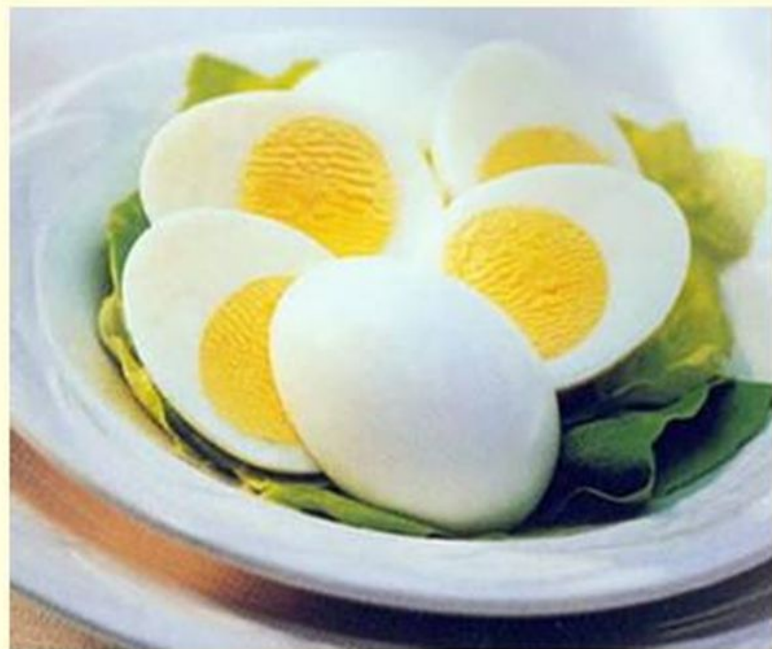
Денатурация белка

Разрушение вторичной и третичной структур до первичной под влиянием высокой или низкой температур, сильных кислот и щелочей, этилового спирта и др. факторов.

←
Необратимая

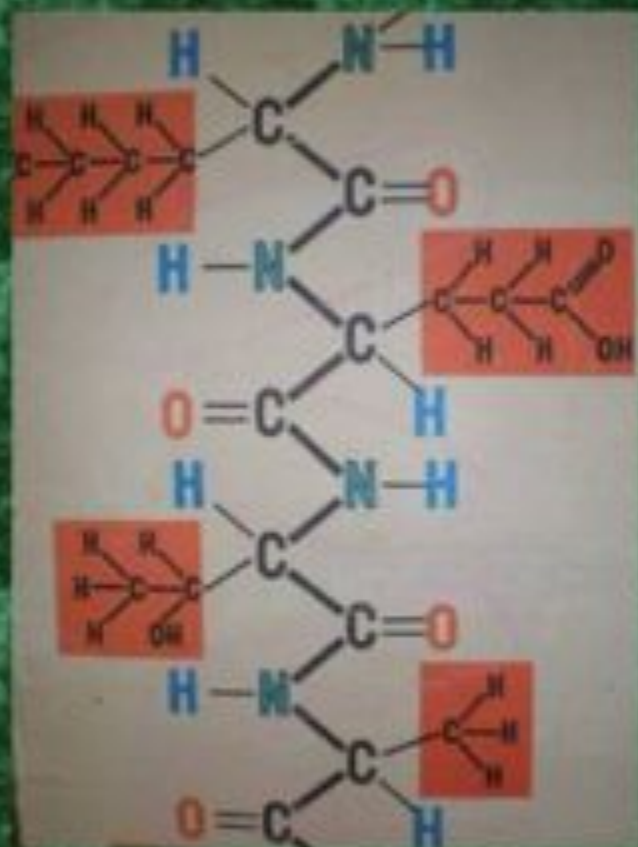
Пример: вареное яйцо

→
Обратимая



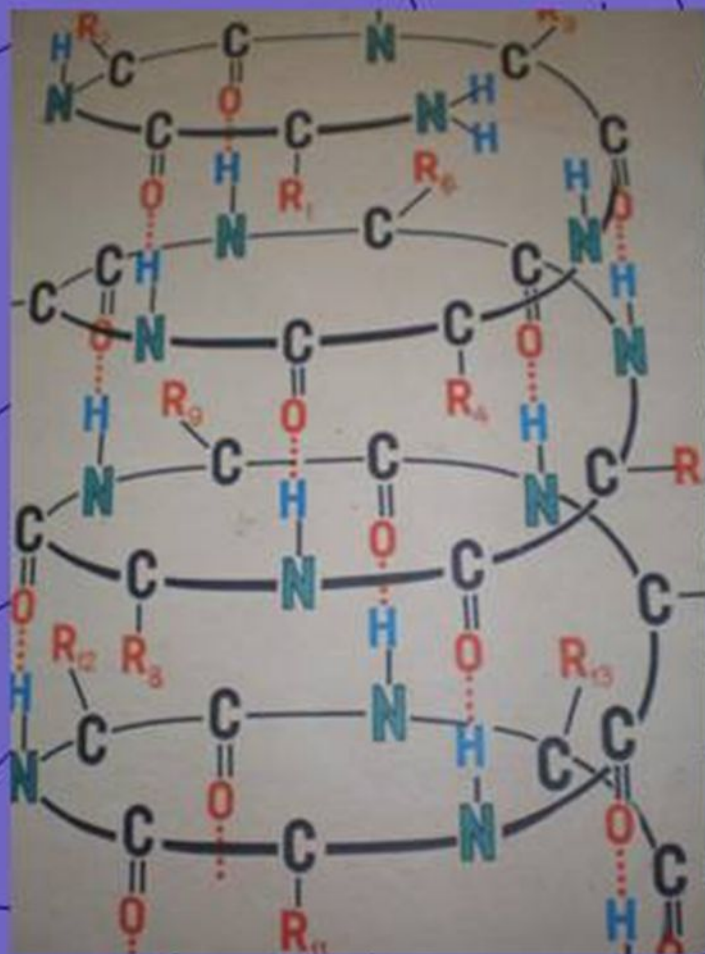
Первичная структура белка.

- Последовательность аминокислотных звеньев в полипептидной цепочке
- (между звеньями - ковалентные связи)

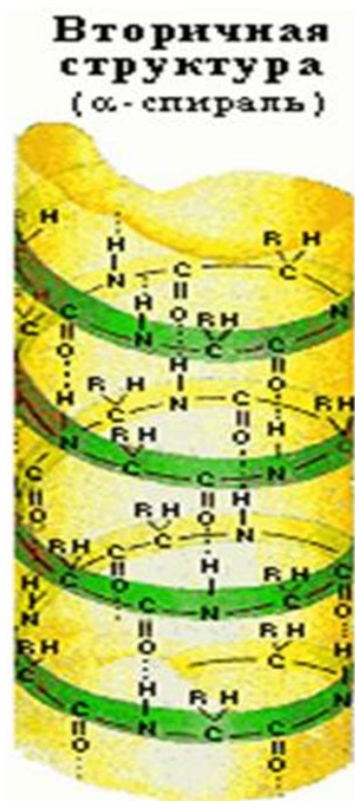
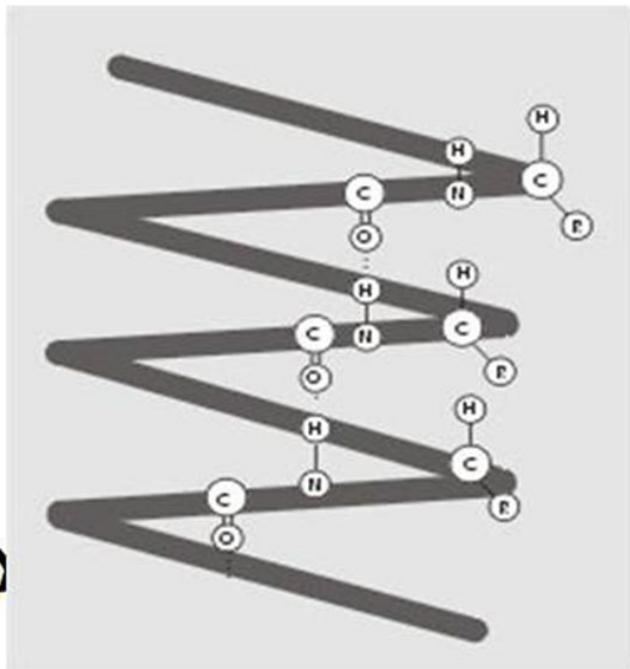


Вторичная структура белка

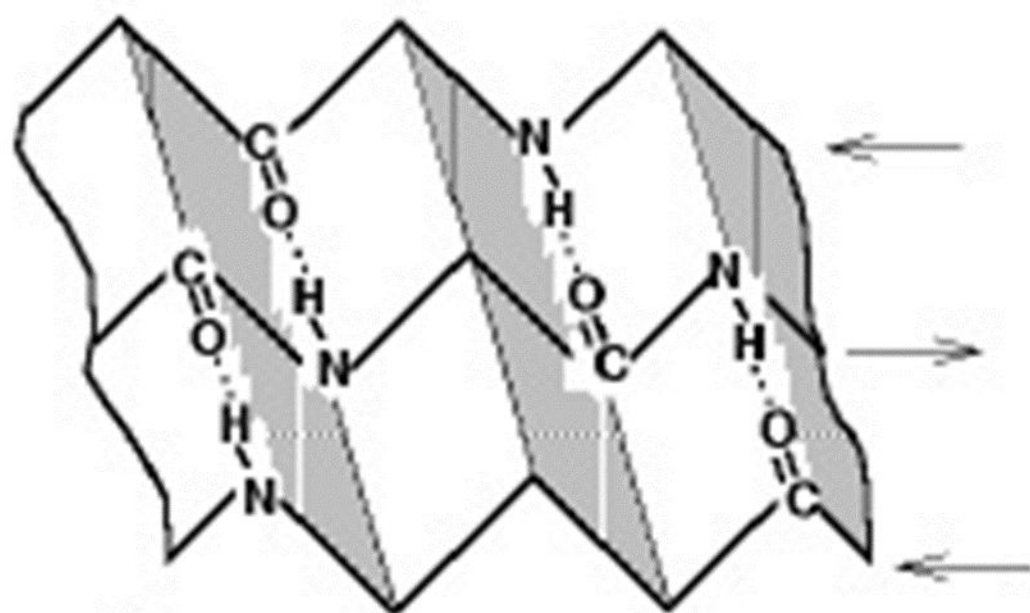
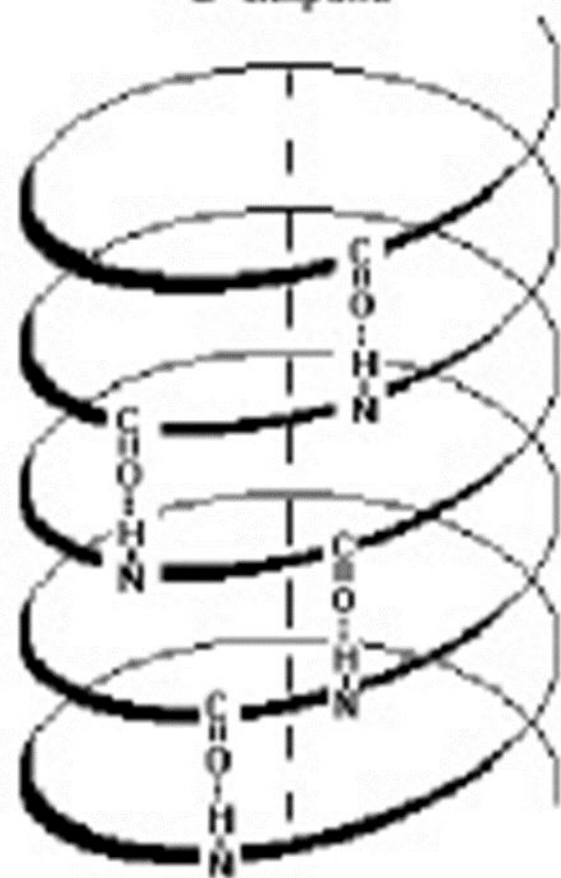
- ▶ Белковая макромолекула свернутая в спираль, которую удерживают связи:
- ▶ Ковалентные (-N-C-
H O)
- ▶ Водородные (-O...H-)



- **Вторичная структура белка** - конформация полипептидной цепи, т.е. способ скручивания цепи в пространстве за счет водородных связей между группами NH и CO. Одна из моделей вторичной структуры – α -спираль.



α -спираль

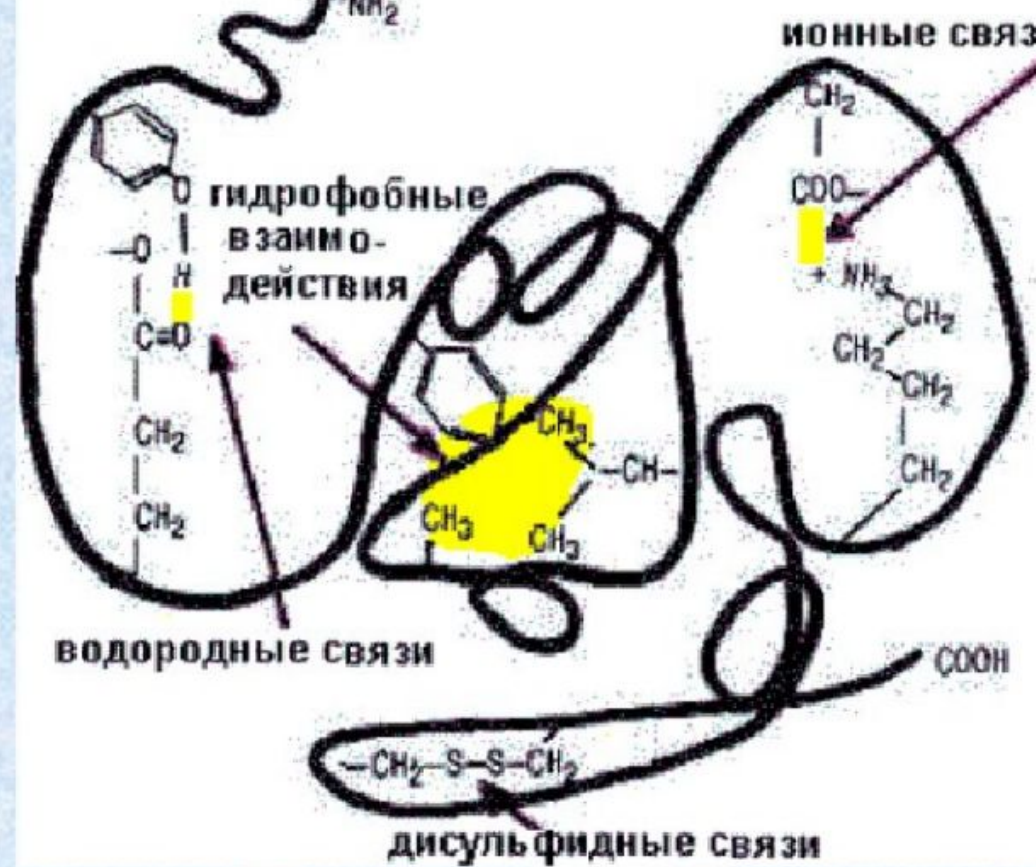


β -складчатая структура
(антипараллельная).

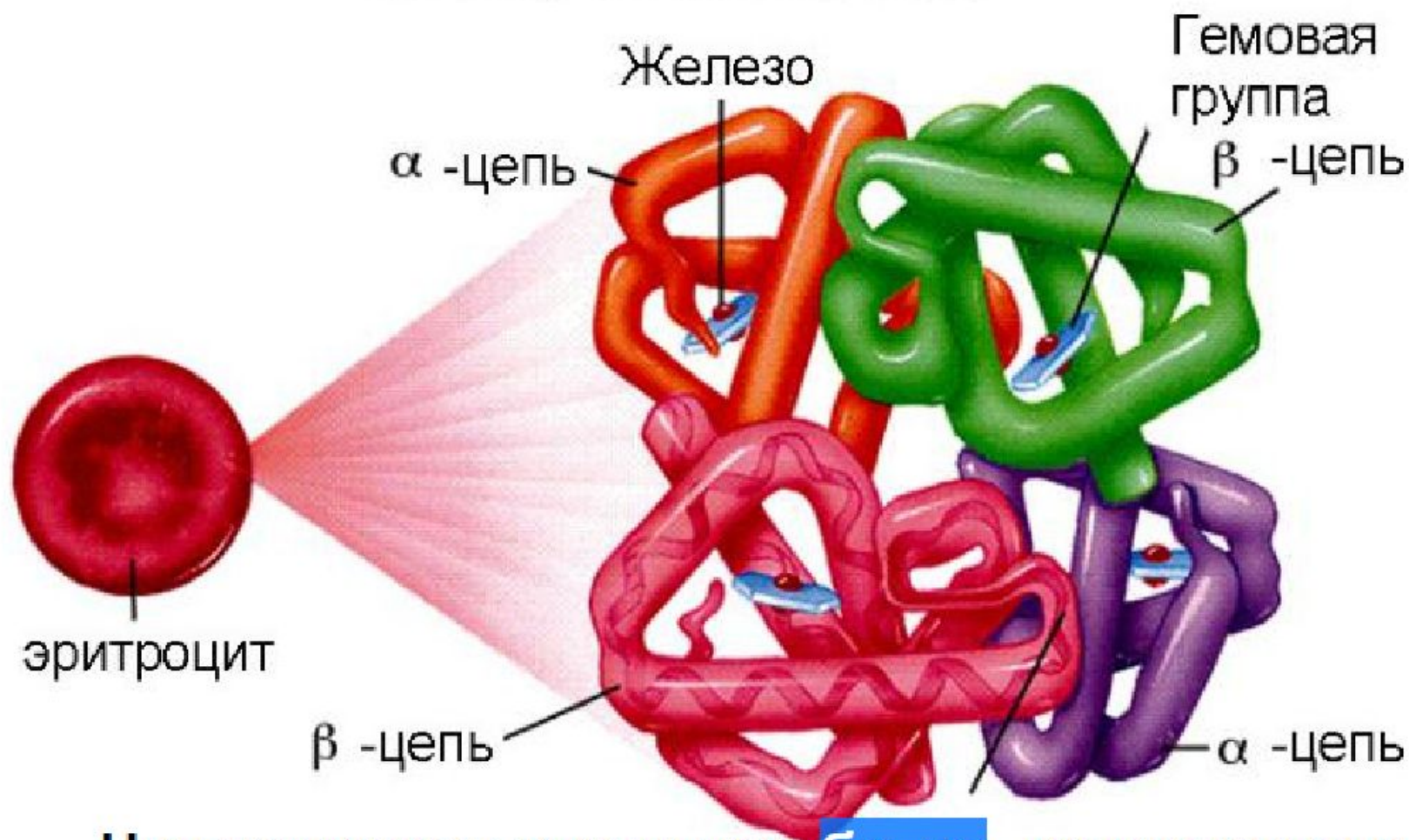
(стрелками показано направление
полипептидных цепей)

СВЯЗИ

- дисульфидная – ковалентная,
Все остальные связи нековалентны:
- гидрофобные – между аминокетонами с неполярными радикалами (вал, мет, ала, фен, иле),
- водородные между полярными радикалами (ОН, NH₂, SH, COOH),
- ионные - между заряженными полярными радикалами (лиз, арг, гис, асп, глу).

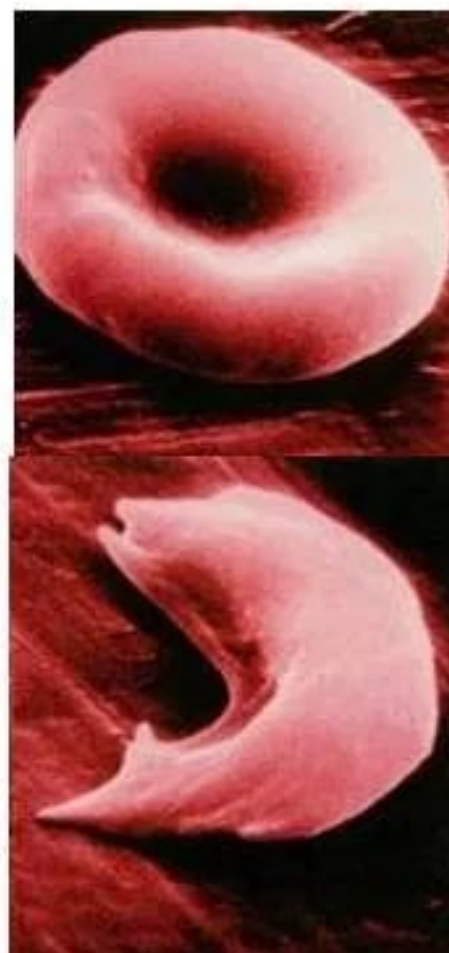
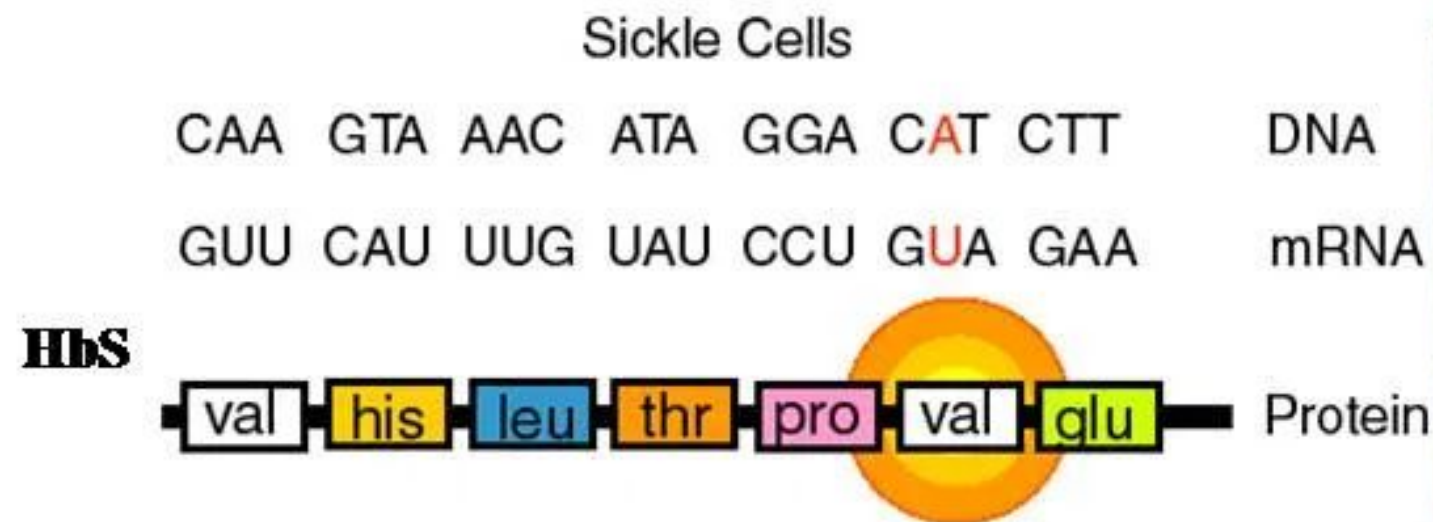
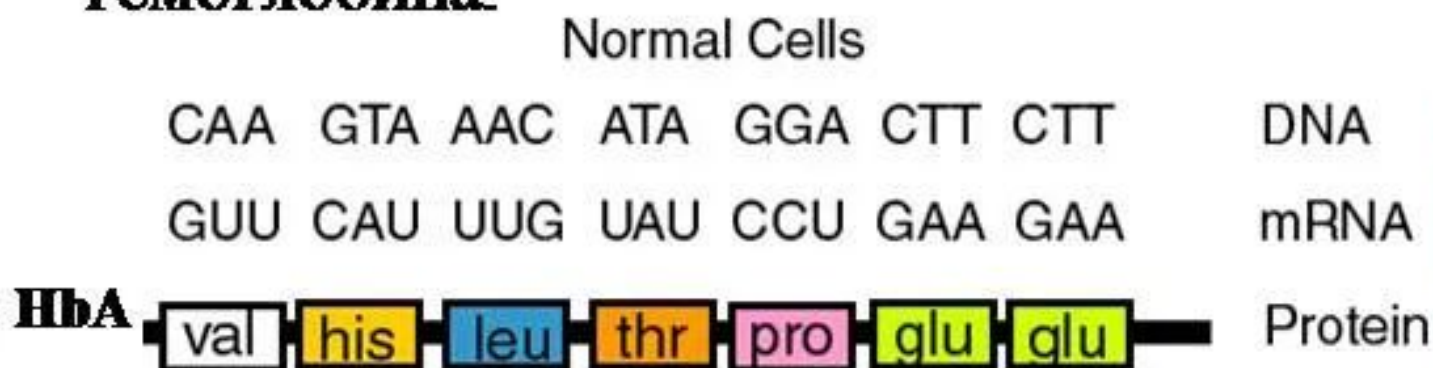


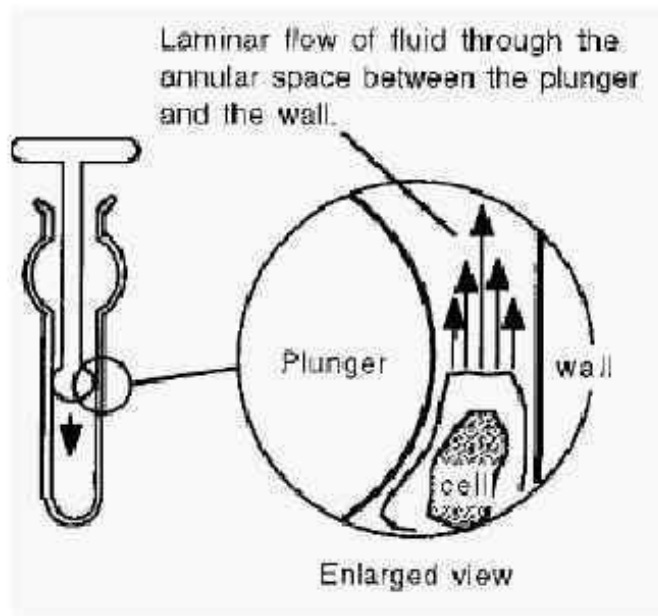
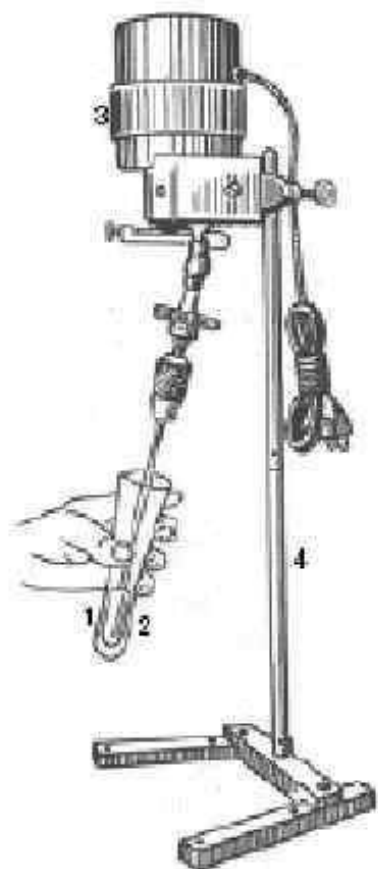
Молекула гемоглобина



Четвертичная структура белка - количество и взаиморасположение полипептидных цепей в пространстве в составе молекулы белка

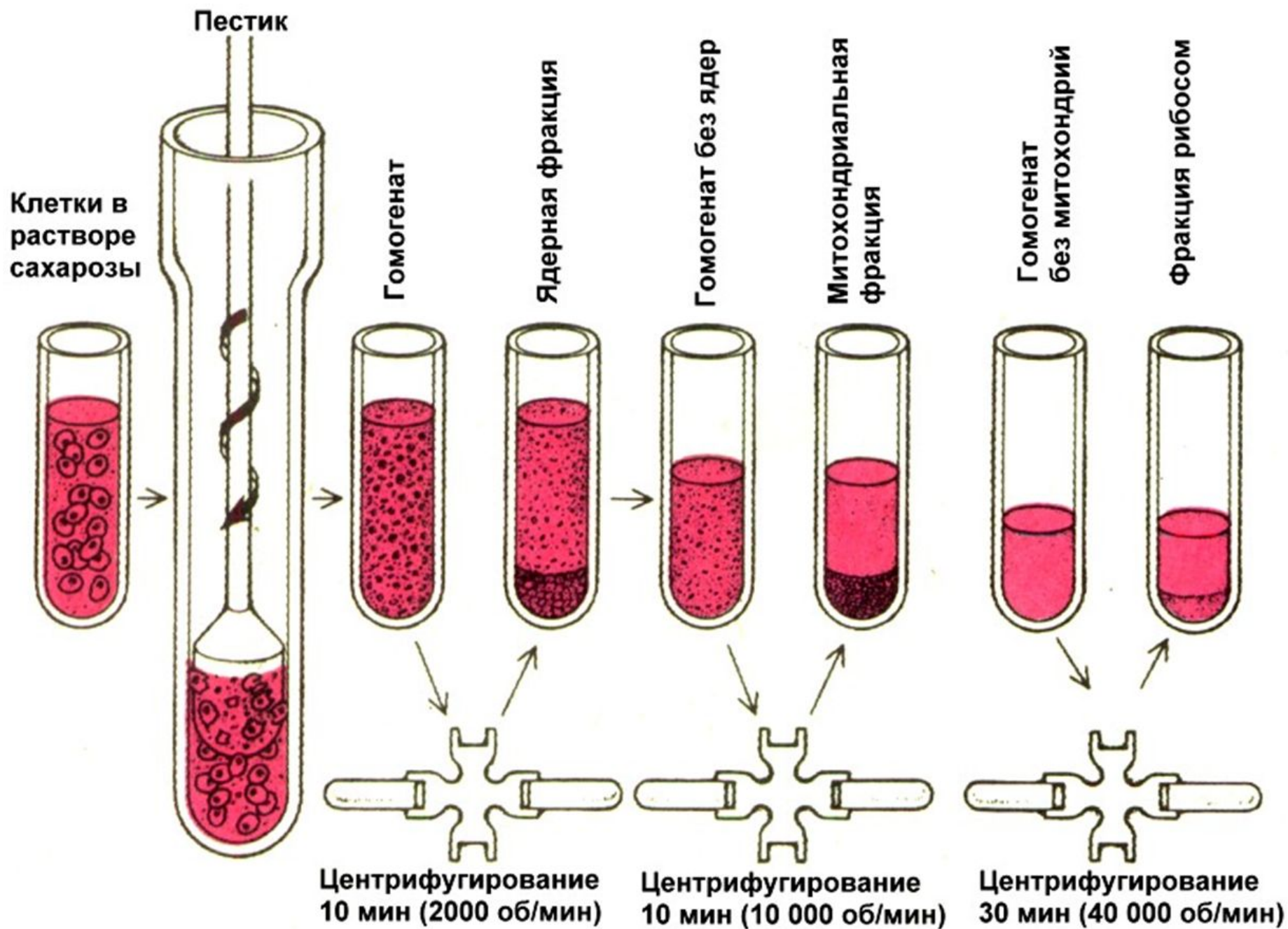
СЕРПОВИДНО-КЛЕТОЧНАЯ АНЕМИЯ – группа генетически гетерогенных заболеваний, возникающих у гомо- и гетерозигот по мутации в гене β -глобина, детерминирующей серповидную форму гемоглобина.





Пестиковый ручной гомогенизатор
1 – пестик; 2 – корпус; 3 – мотор; 4 – штатив





Клетки в растворе сахарозы

Пестик

Гомогенат

Ядерная фракция

Гомогенат без ядер

Митохондриальная фракция

Гомогенат без митохондрий

Фракция рибосом

Центрифугирование 10 мин (2000 об/мин)

Центрифугирование 10 мин (10 000 об/мин)

Центрифугирование 30 мин (40 000 об/мин)

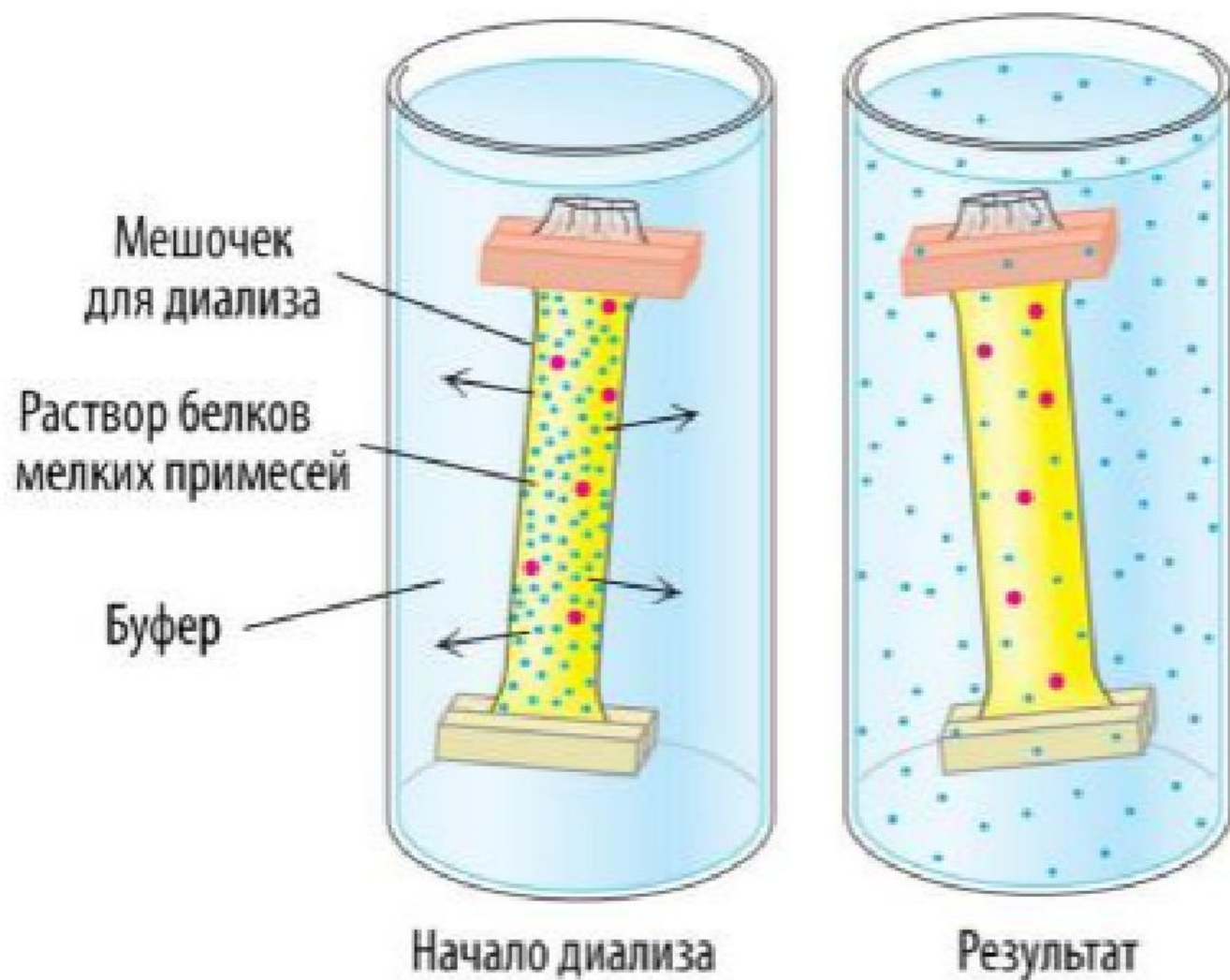
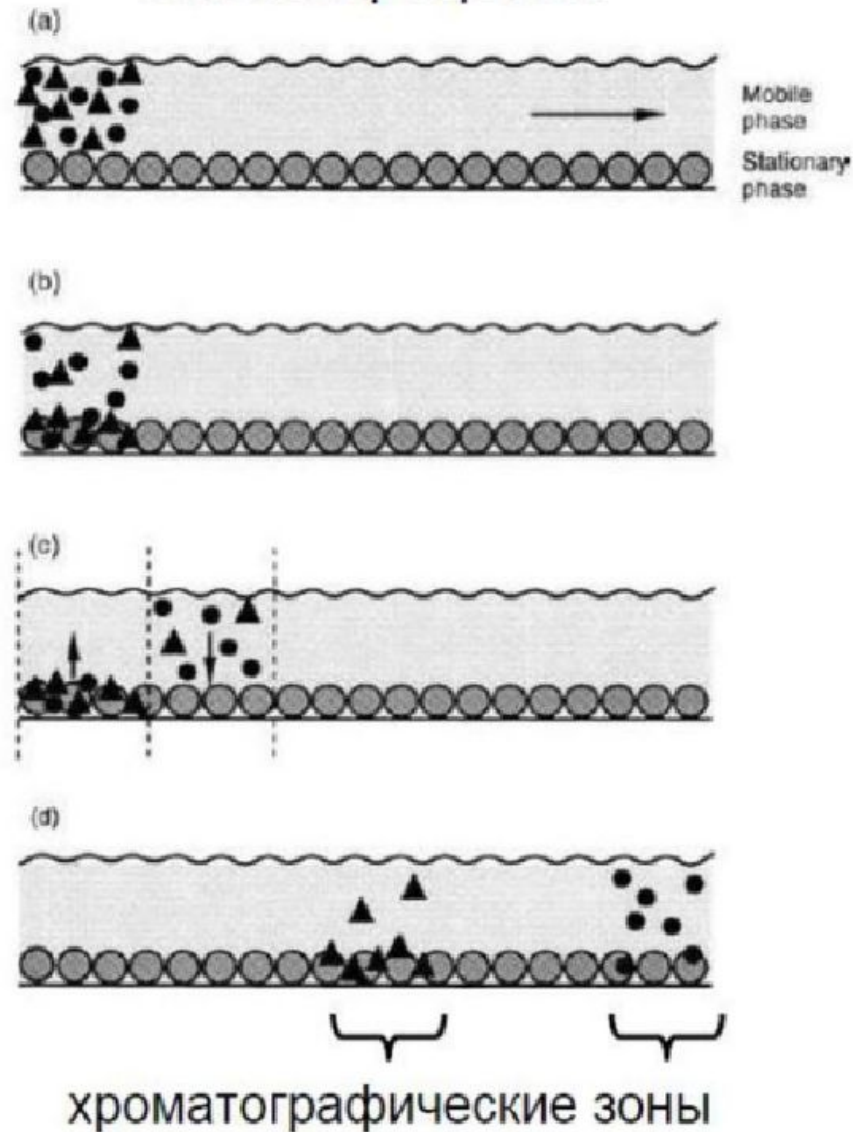


Рис. 24. Диализ.

Колоночная хроматография часто используется для разделения смеси белков (фракционирования). В цилиндрическую колонку, наполненную нерастворимым материалом или синтетическими гранулами («стационарная» фаза), наливают растворитель, затем раствор белка и вымывают его с помощью элюента («мобильная фаза»). Элюент может быть тем же растворителем, однако его можно и заменить более полярным раствором для ускорения процесса. При этом элюент будет конкурировать с белками за матрицу, связываясь с ней прочнее, а белки — двигаться вниз. По мере продвижения всего раствора белков через колонку внизу собирают элюат (жидкость, выделяющаяся из колонки). Скорость, с которой белки продвигаются через твёрдую матрицу (стационарную фазу) зависит от тех взаимодействий, в которые они вступают с ней. Различные белки элюируют с разной скоростью. Как правило, более полярные белки дольше задерживаются в колонке, поскольку между ними и матрицей образуются нековалентные химические связи. Концентрация белка в каждой фракции может быть измерена с помощью пропускания через раствор УФ-света с длиной волны 280 нм (фотометрия). Чтобы понять, в какой именно фракции находится очищаемый белок, фракции проверяют на биологическую активность (особенно актуально для ферментов, т.е. к ним добавляют их субстрат, и определяют, появился ли в среде продукт, так делают вывод о наличии фермента во фракции).

Хроматографический процесс – многочисленные циклы сорбции–десорбции

Схема процесса:



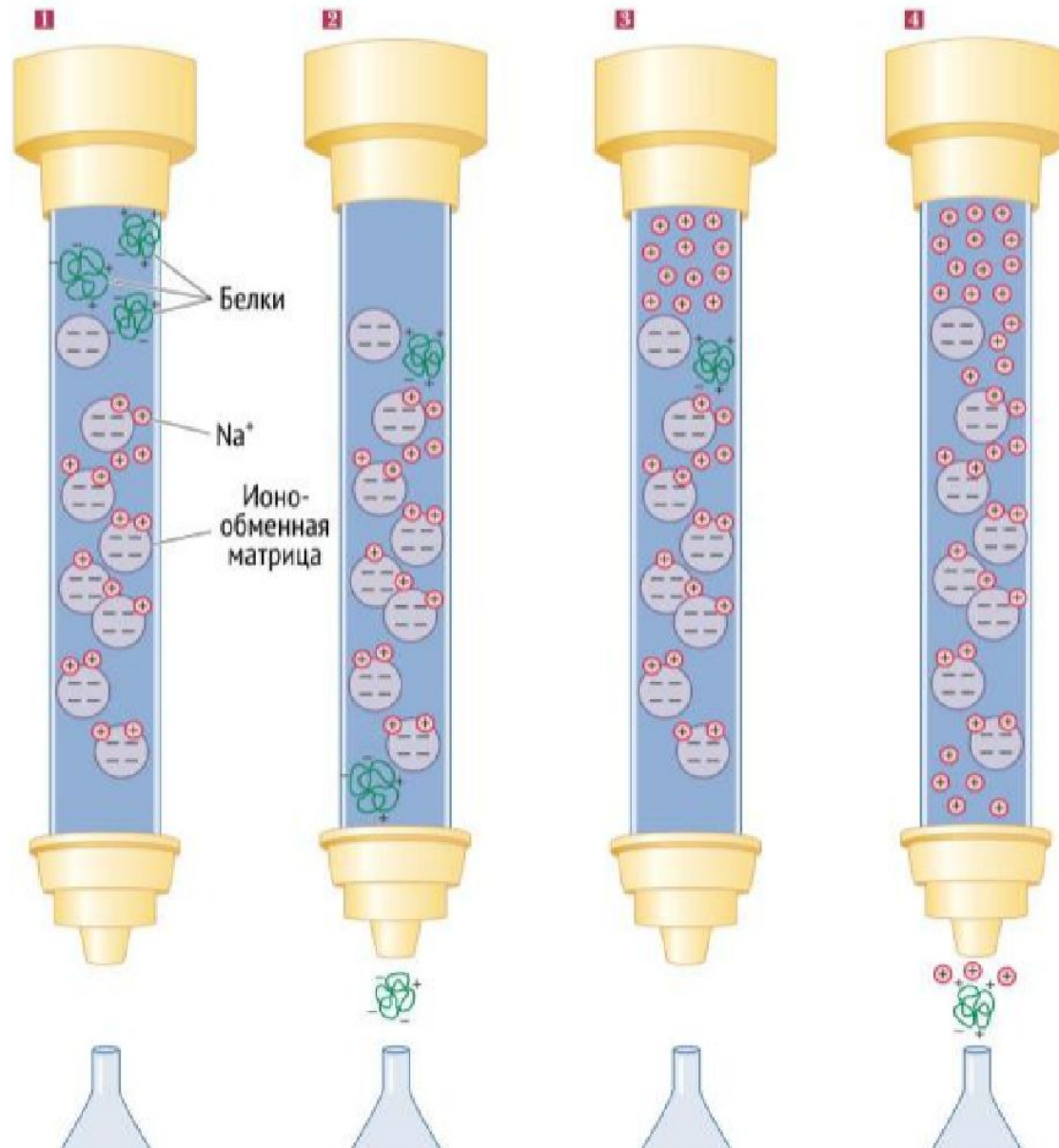
Классификация хроматографических методов

Признак	Виды
По агрегатному состоянию фаз	Газовая хроматография, жидкостная, флюидная и др.
По механизму межфазного распределения	распределительная, адсорбционная, ионообменная и др.
По способу проведения	колоночная, планарная (ТСХ, БХ)
По способу перемещения сорбата	элюентная, вытеснительная, фронтальная
По целям и задачам	аналитическая, препаративная

Так, метод Цвета – жидкостная адсорбционная колоночная элюентная препаративная хроматография

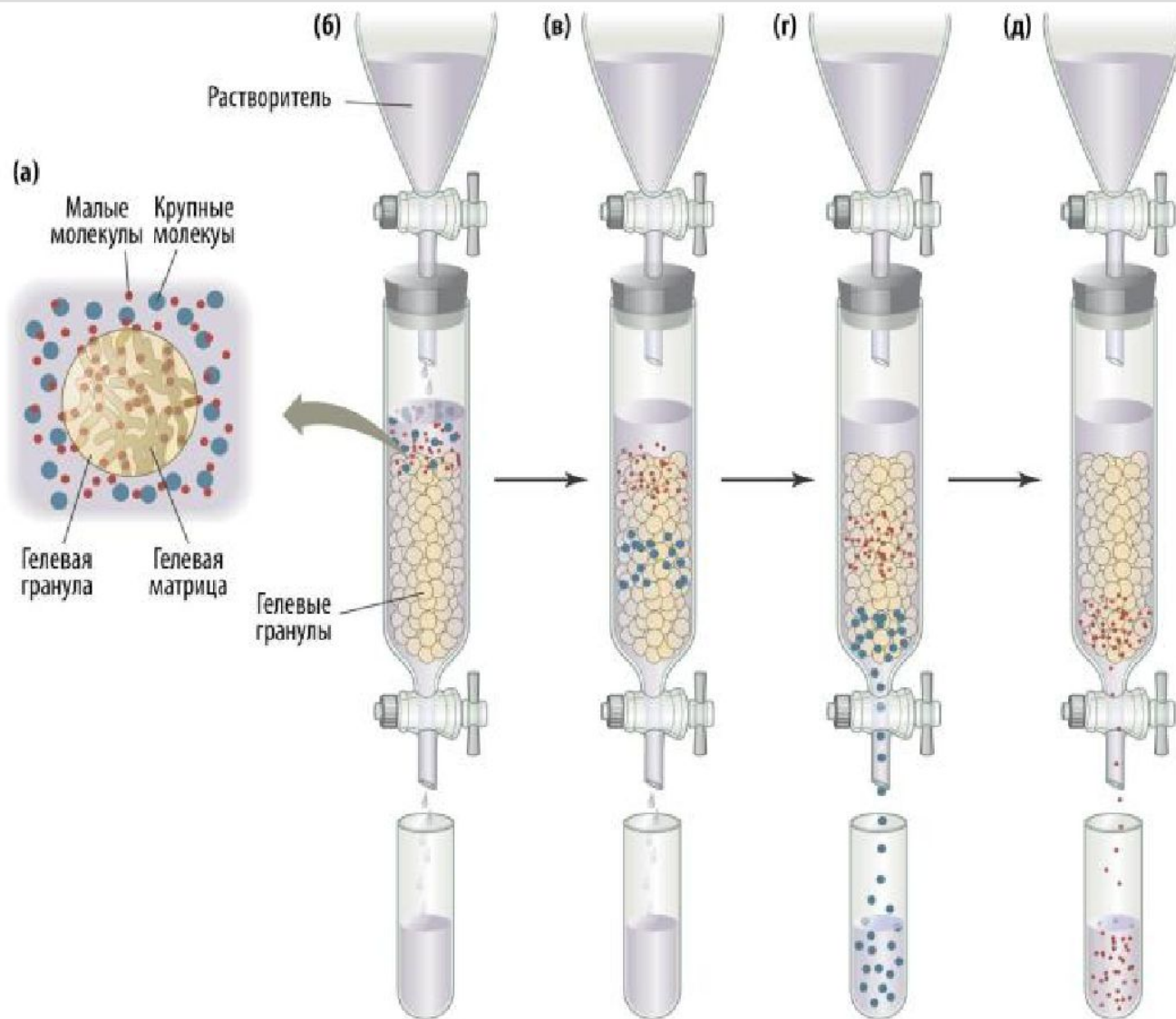
В ионообменной хроматографии матрица заряжена положительно (анионообменная) или отрицательно (катионообменная).

Анионообменная матрица связывает отрицательно заряженные белки и задерживает их в колонке для последующего элюирования. Схожим образом, катионообменная матрица взаимодействует с положительно заряженными белками. Связанные с матрицей белки могут быть элюированы (вымыты из колонки) постепенным повышением концентрации соли в растворе. Когда концентрация солей достигнет нужной отметки, соли будут прочнее и быстрее связываться с матрицей (соли тоже имеют заряд), тем самым взаимодействие белков с твердой фазой будет нарушено, и они будут элюированы из колонки.



- Ионообменная хроматография. 1) В колонку вносят раствор с белками. Матрица связана с ионами Na⁺. 2) Белки, общий заряд которых нейтрален или отрицателен, легко вымываются из колонки. Белки, заряженные положительно, взаимодействуют с матрицей и вытесняют ионы Na⁺. 3) Избыток ионов Na⁺ добавляется в колонку. 4) Теперь уже они вытесняют белки, связываясь с матрицей. Белки элюируют.

- Гельфилтрационная (или эксклюзионная) хроматография разделяет белки на основании их размера. Матрицей служит особый пористый гель. Малые белки проникают в поры геля и задерживаются там. Большие белки в поры не попадают и потому быстро минуют стационарную фазу, слабо контактируя с ней. Чем меньше размер белка, тем позднее он вымывается из колонки. Большие белки элюируются быстрее.



Гельфильтрационная хроматография. (а) Гелевые гранулы имеют поры (гелевую матрицу). Малые молекулы свободно попадают в них. Крупные молекулы не проникают в гелевые гранулы. (б) Сверху в колонку подают раствор, содержащий образец. (в) Малые молекулы проникают в гель и мигрируют медленнее, чем крупные. (г и д) Сначала элюируют (вымываются из колонки) крупные молекулы. Малые молекулы требуют

Аффинная хроматография

Аффинная хроматография (от лат. affinis - родственный) (биоспецифическая. хроматография, хроматография по сродству), **метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем.**

В качестве лигандов используют соединения, взаимодействие которых с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних.

Так, **при разделении ферментов** (для чего преимущественно и применяется аффинная хроматография) **лигандами служат их субстраты, ингибиторы**

