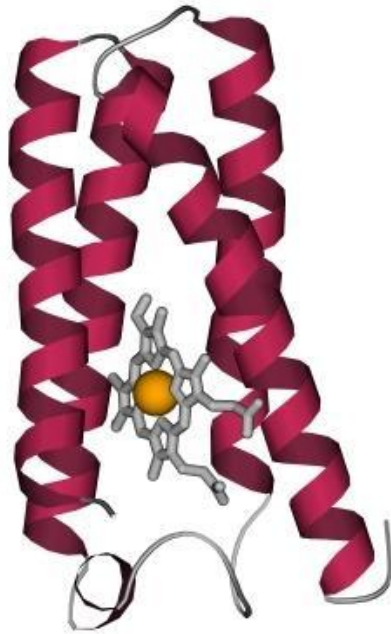


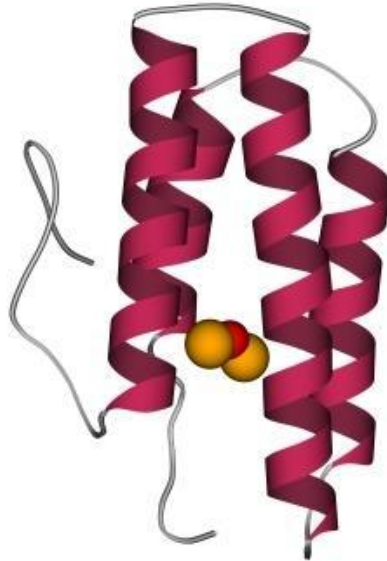
Строение α и α - β белков



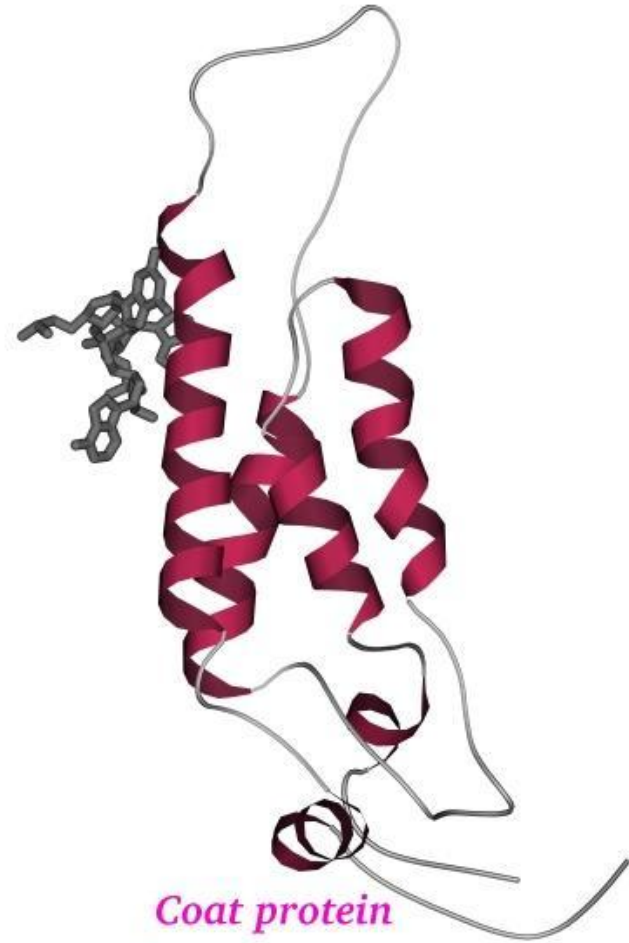
α-Белки



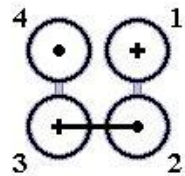
Cytochrome c'



Hemerythrin



*Coat protein
Tobacco mosaic virus*



Три сходных по архитектуре («четырёхспиральный пучок»), но разных по функции α-спиральных белка.

α-Белки



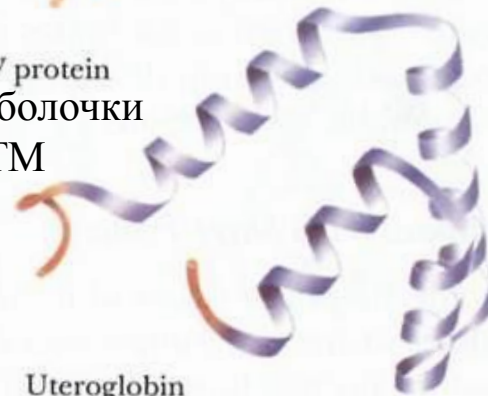
Influenza virus hemagglutinin HA2
Гемагглютинин HA2
вируса гриппа



TMV protein
Белок оболочки
ВТМ



Myohemerythrin
Миогемэретрин



Uteroglobin
Утероглобин

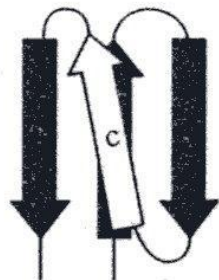
Структурные мотивы (по Ефимову)

- **Структурными мотивами** принято считать пространственно организованные структурные единицы, образованные двумя, тремя и более соседними по цепи и связанными между собой α -спиралями и/или β -тяжами, которые часто встречаются как в гомологичных, так и негомологичных белках или многократно повторяются в одном и том же белке.
- С одной стороны, структурные мотивы являются "готовыми структурными блоками" или элементами третичной структуры белков, с другой - их можно рассматривать в качестве зародышей в процессах сворачивания белков или использовать в качестве стартовых структур при моделировании и предсказании пространственной структуры белков. 4

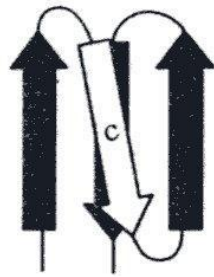
Новые структурные мотивы в α -спиральных белках

- Комбинации из α - α -уголка и L-образной структуры
- ABCD-мотив и его разновидности
- α -I- α -Мотивы
- φ -Образные мотивы

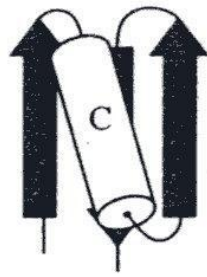
ABCD-мотив и его разновидности



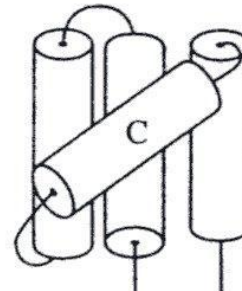
d a b
(a)



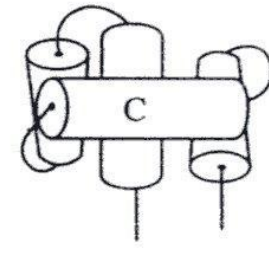
d a b
(б)



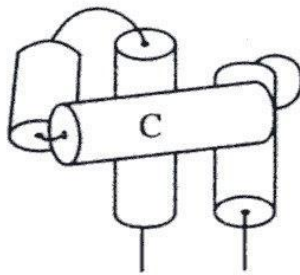
d a b
(в)



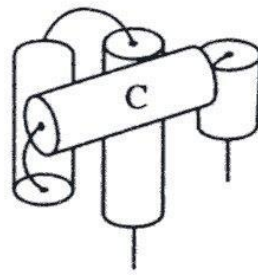
B A D
(г)



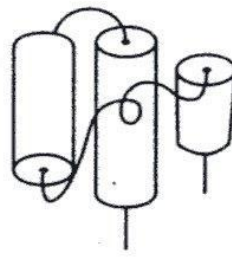
B A D
(д)



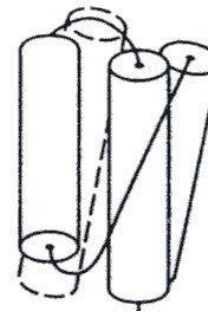
B A D
(e)



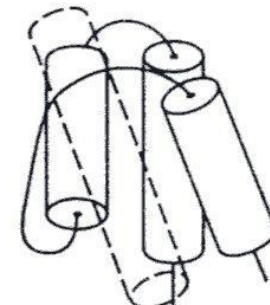
B A D
(ж)



B A D
(з)

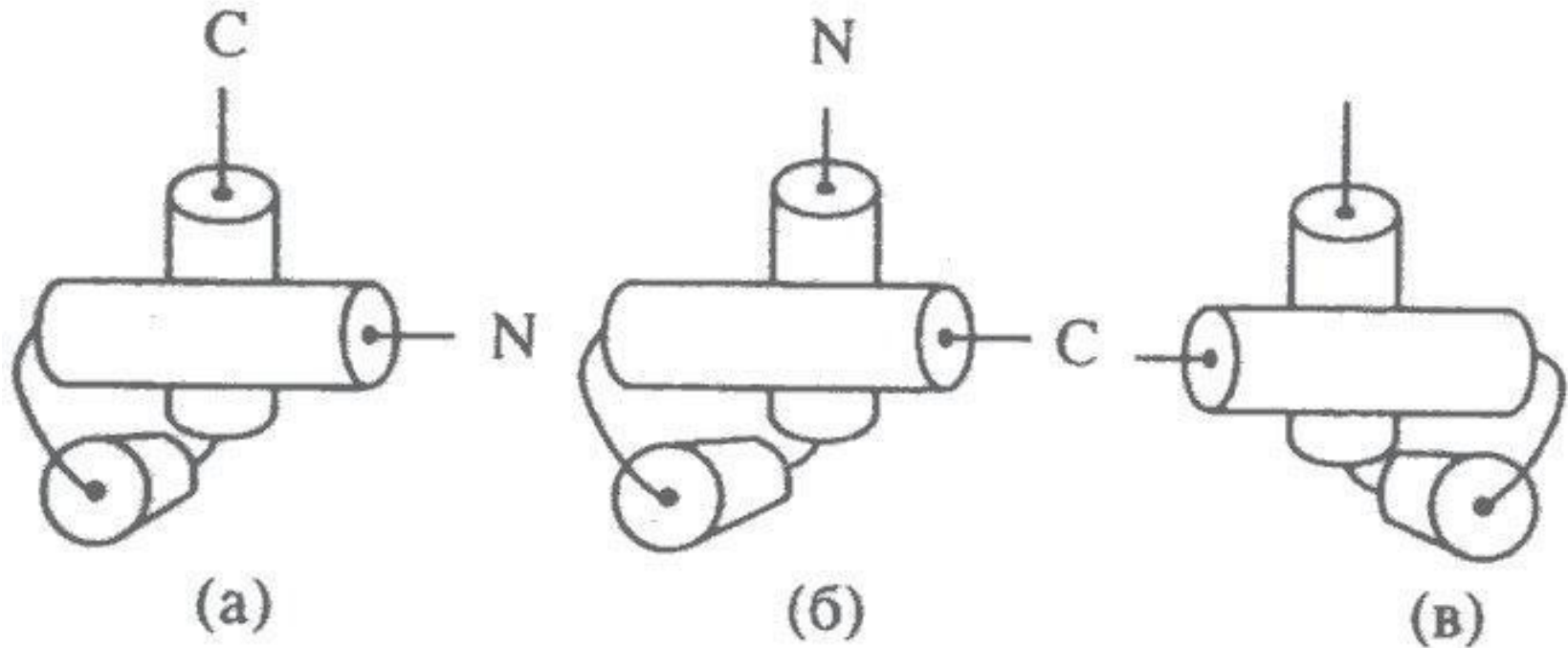


B A D
(и)

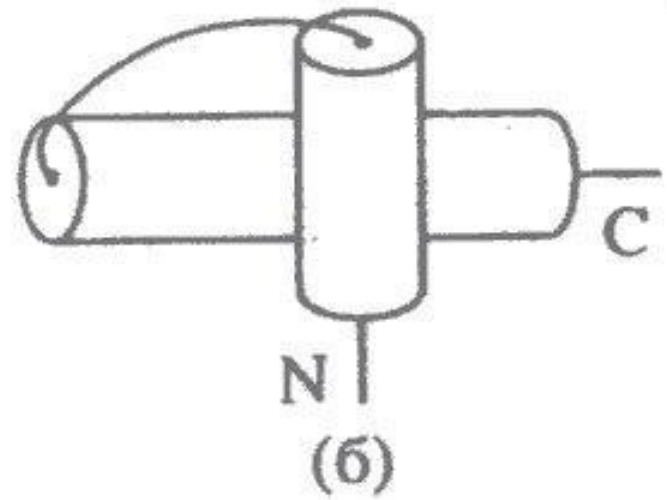
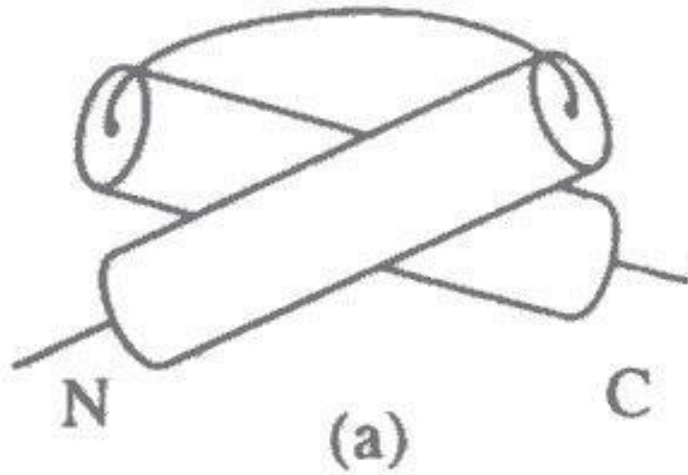


B A D
(к)

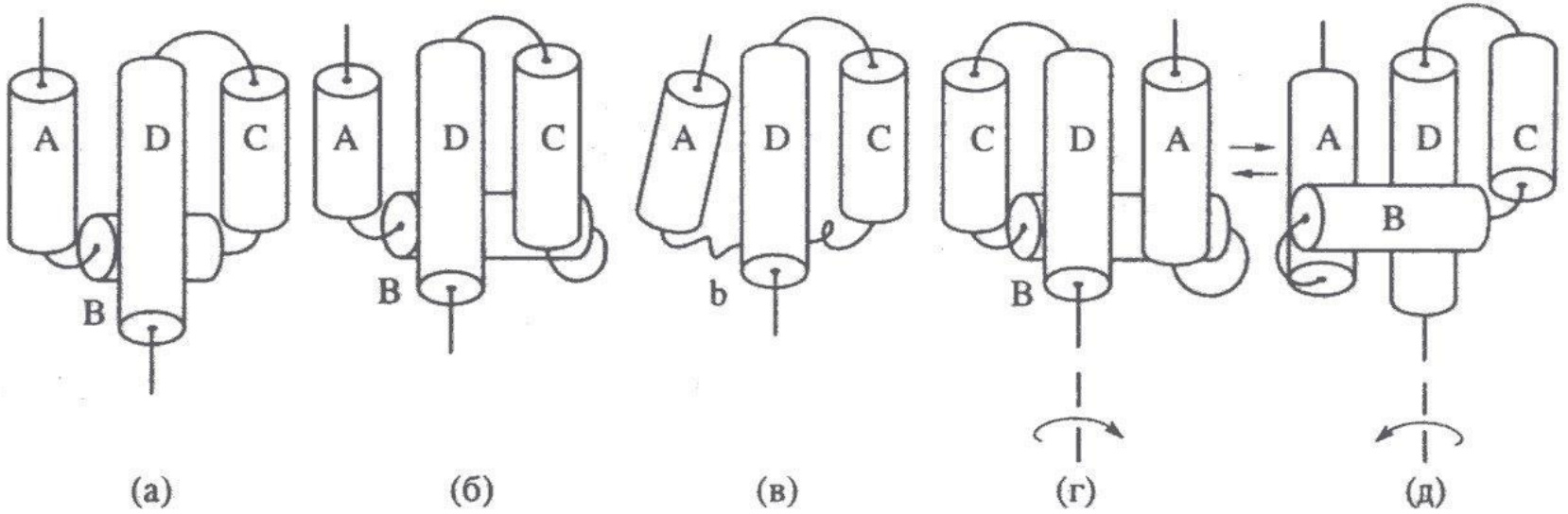
Комбинации из α - α -уголка и L-образной структуры



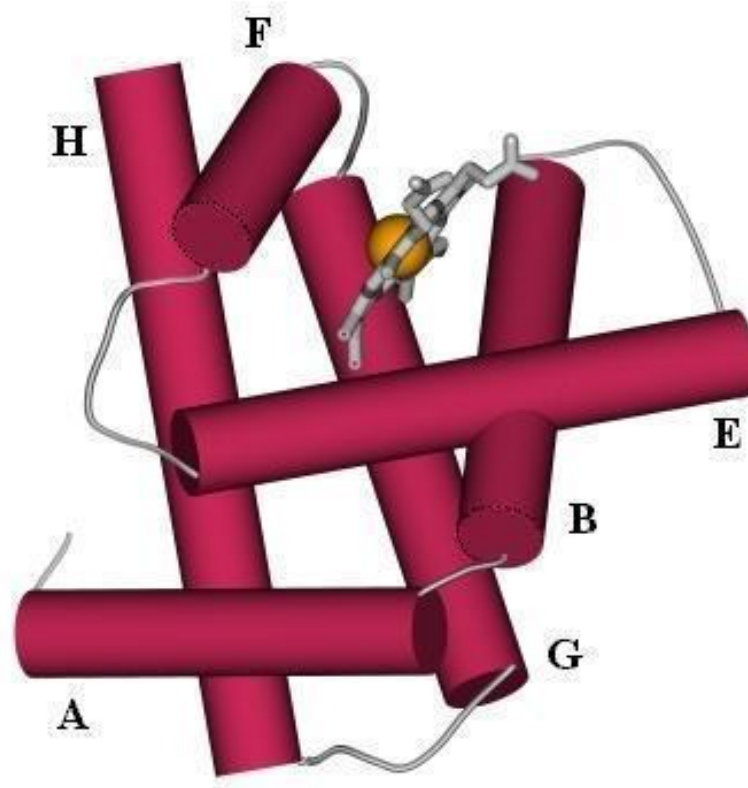
α -I- α -Мотивы



ϕ -Образные мотивы

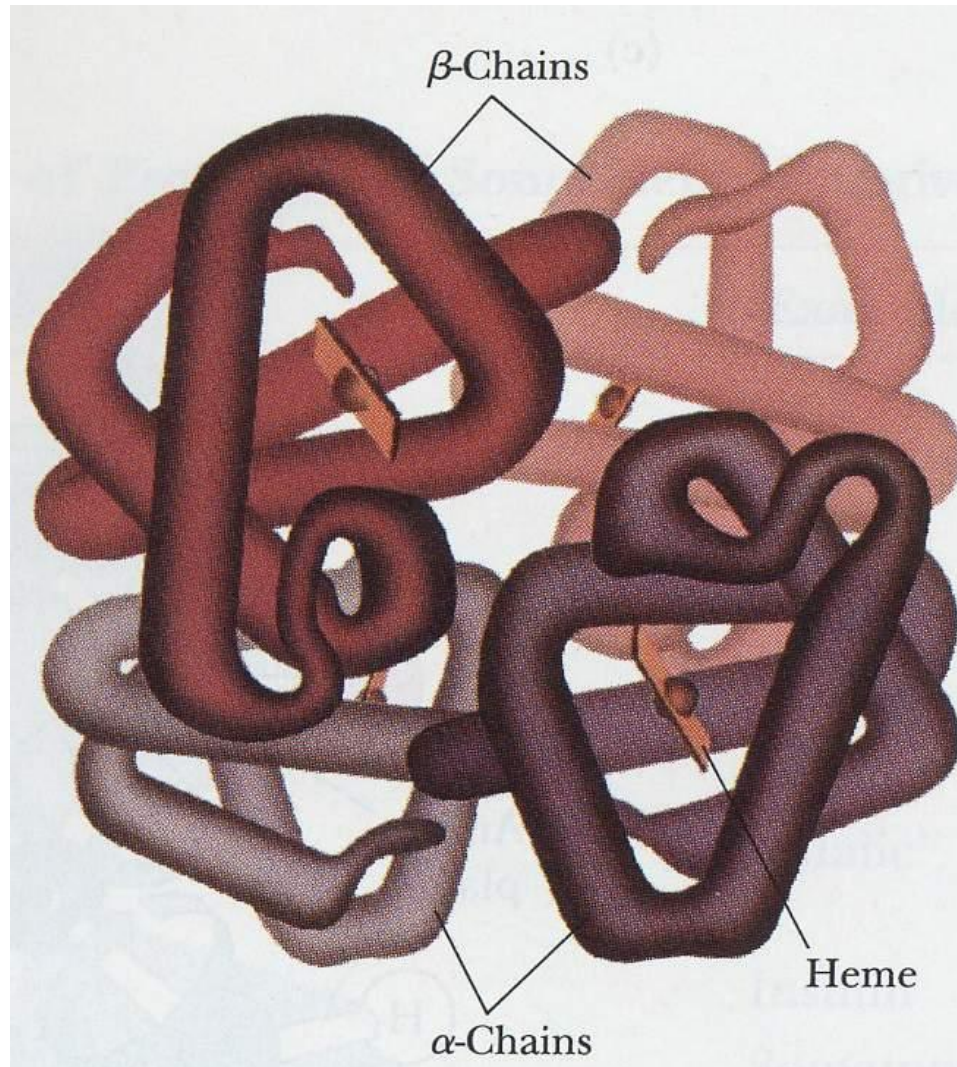


α -Белки: миоглобин

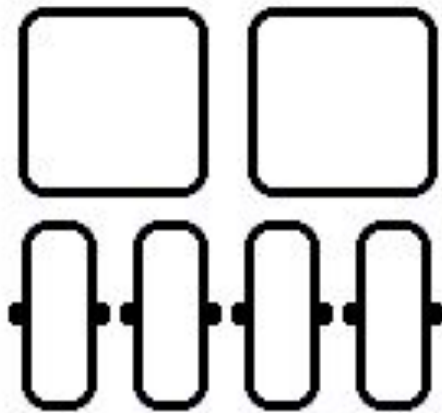


В миоглобине спирали организованы в два перпендикулярных слоя по три α -спирали в каждом.

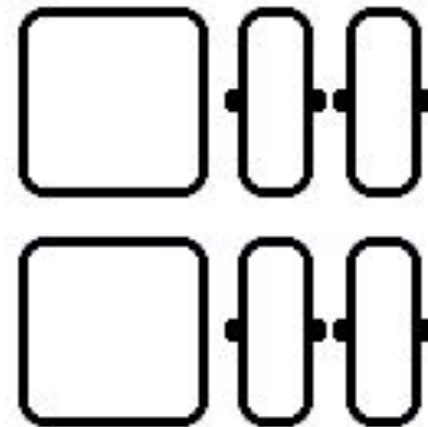
Гемоглобин - α -спиральный белок с четвертичной структурой



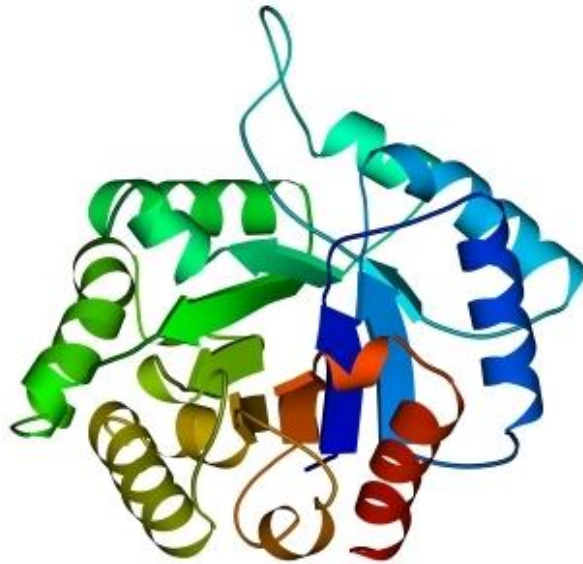
«Смешанные» (α/β и $\alpha+\beta$) белки обладают слоистой структурой



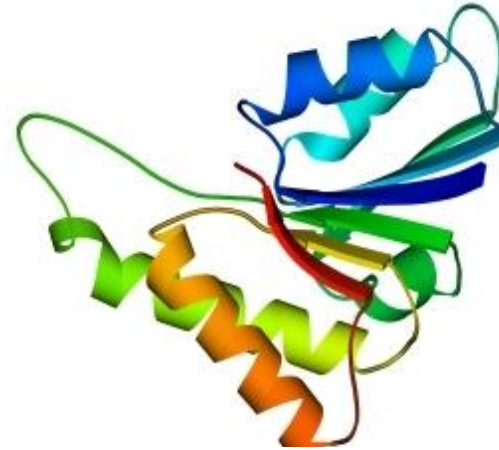
НЕТ:



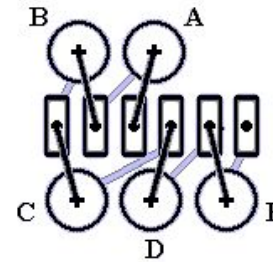
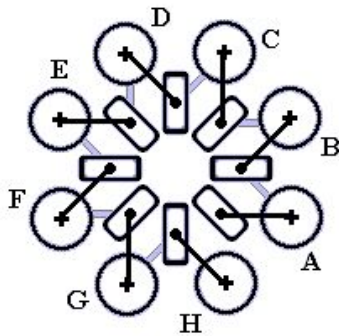
α/β Белки



а



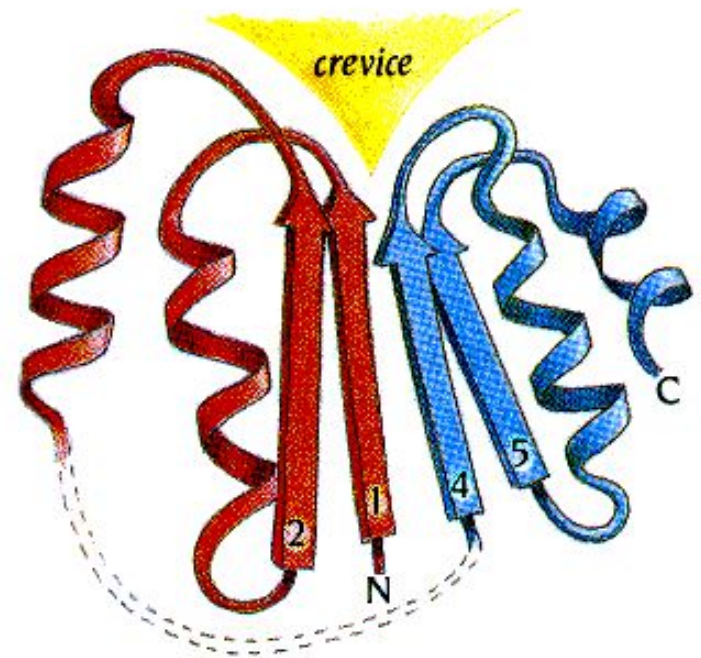
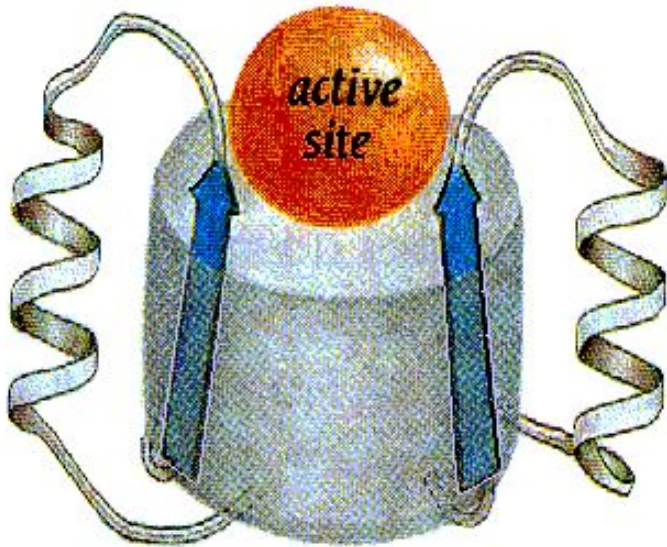
б



Типичные мотивы строения α/β белков и их упрощенные модели (вид на модели — с торца β -слоя): " α/β цилиндр" в триозофосфатизомеразе (а) (TIM-укладка);

"укладка Россмана" в NAD-связывающем домене малатдегидрогеназы (б).

Типичное положение активного центра (active site)
в α/β белках:
в "воронке" на оси α/β цилиндра, и в щели (crevice),
образованной расходящимися петлями в "укладке Россманна".

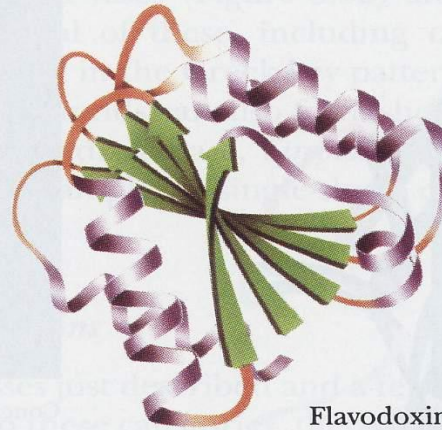


α - β Белки

(β -Структура - параллельная!
Тип укладки - «седло»)



Hexokinase domain 1
Домен 1 гексокиназы



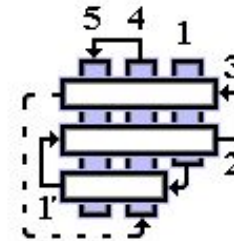
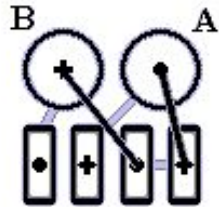
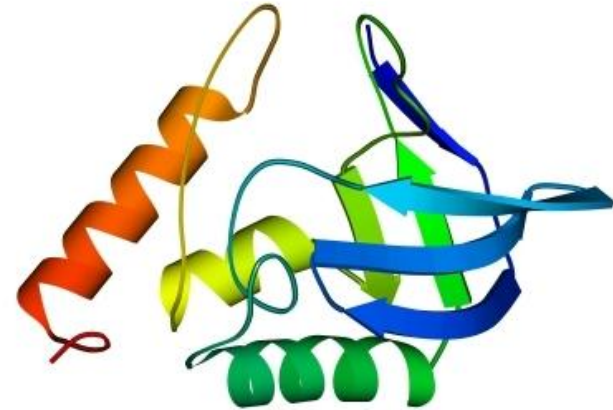
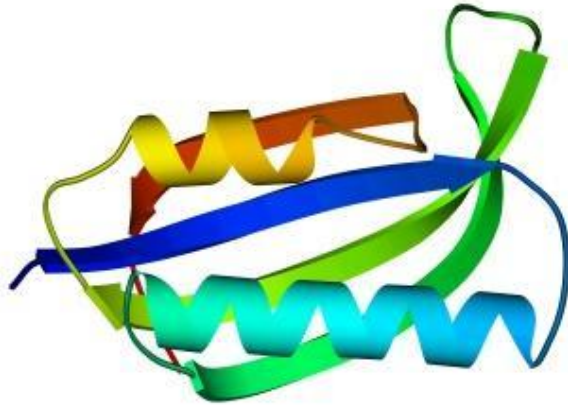
Flavodoxin
ФлавоДОКСИН



Phosphoglycerate mutase

15
ФосфоГлицерат-мутаза

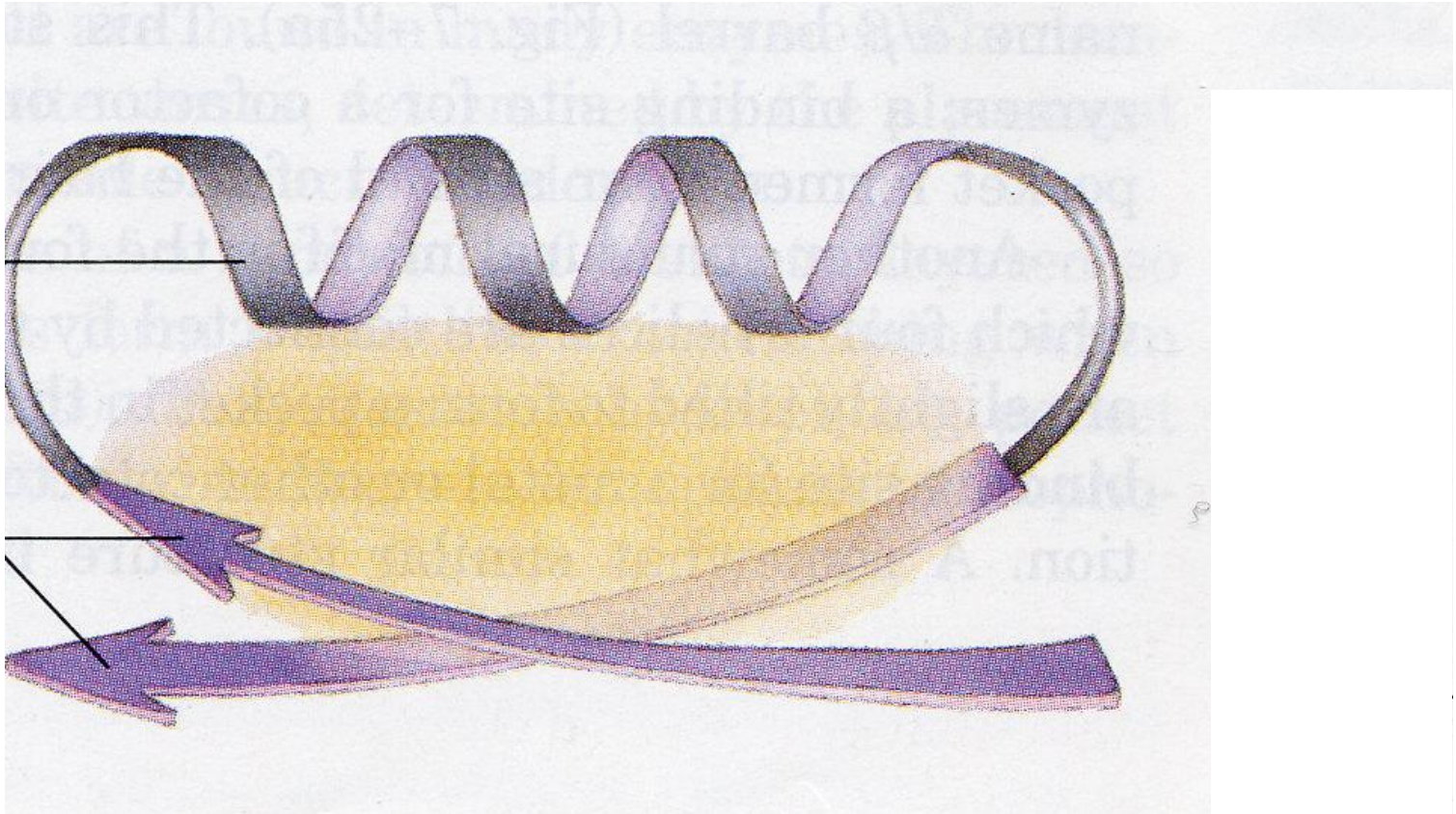
$\alpha+\beta$ Белки



Один из типичных мотив строения $\alpha+\beta$ белка:
"αβ складка" ($\alpha\beta$ -plait) в рибосомальном белке S6.

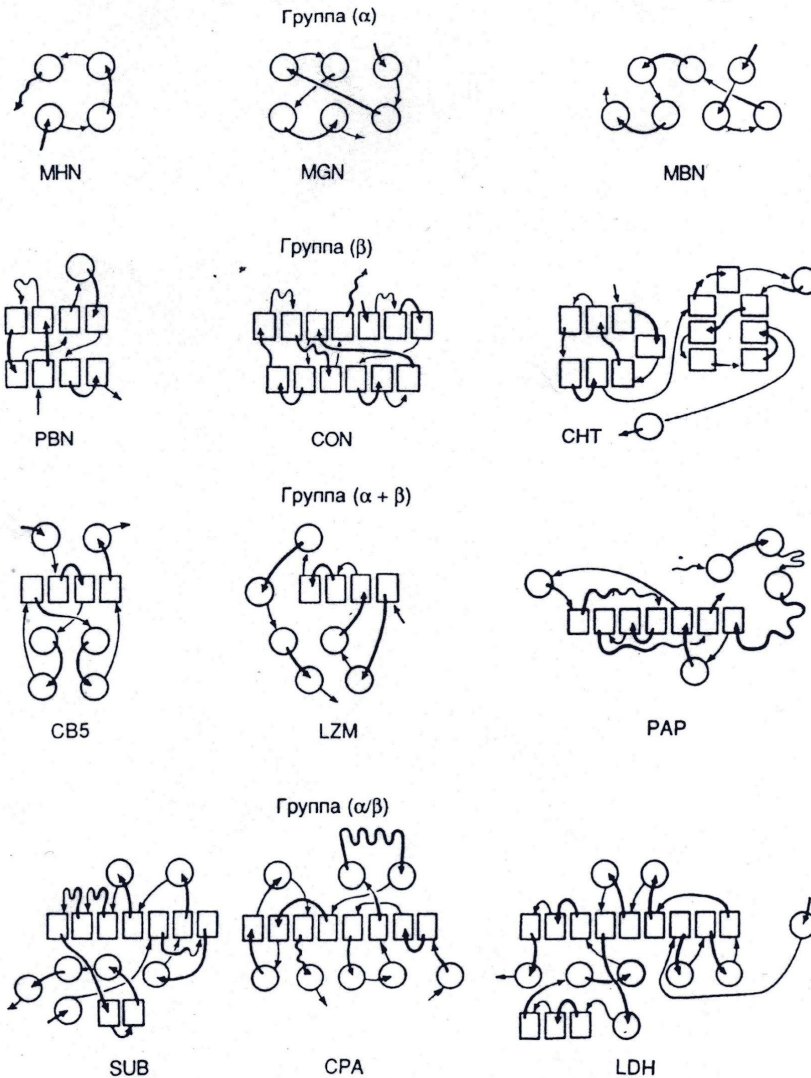
Мотив укладки цепи, наблюдаемый в β -домене нуклеазы, называется "ОБ-укладка" ("OB-fold", то есть "Oligonucleotide-Binding fold").

βαβ-Петля (loop)



Типичный, *правовинтовой* ход перемычек между параллельными β-тяжами одного листа.

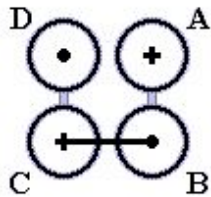
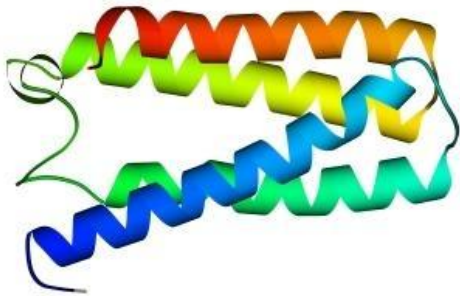
Топологические диаграммы трехмерных структур белков четырех групп



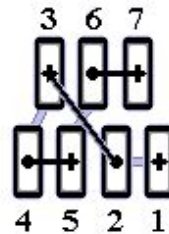
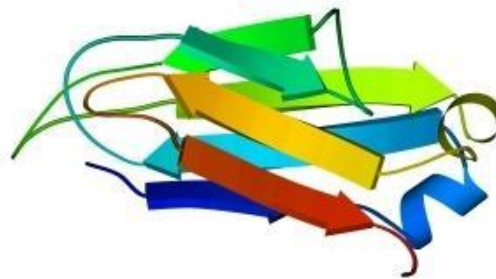
Топологические диаграммы трехмерных структур белков четырех групп

α : MHN — миогамеритрин, MGN — миоген, MBN — миоглобин; (β): PBN — преальбумин, CON — конканавалин А, CHT — химотрипсин; ($\alpha+\beta$): CB5 — цитохром b_5 , LZM — лизоцим, PAP — папаин; (α/β): SUB — субтилизин, CPA — карбоксипептидаза, LDH — лактатдегидрогеназа

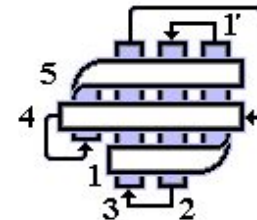
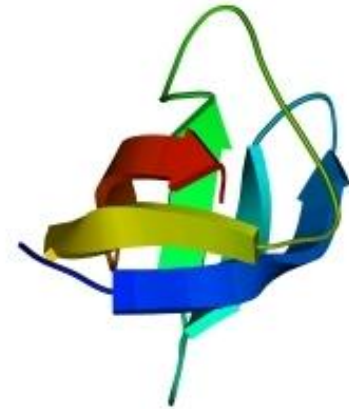
Характерные мотивы укладки белковой цепи в α , β - белках



α : пучок спиралей

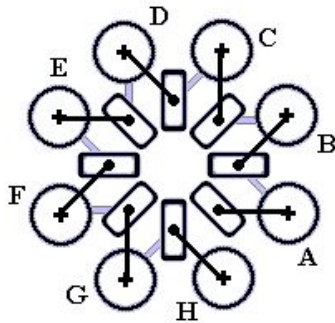
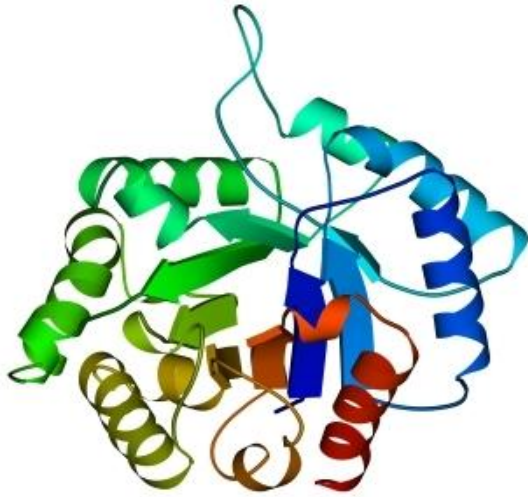


β : иммуноглобулиновая укладка

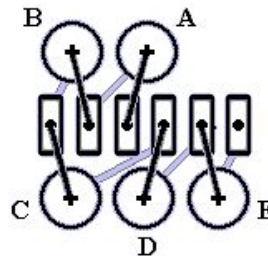


β : ОБ-укладка

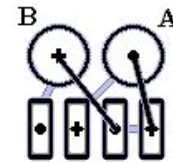
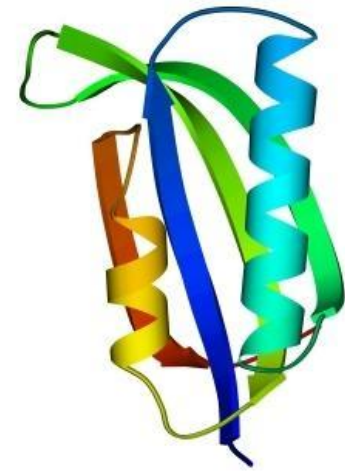
Характерные мотивы укладки белковой цепи в α/β и $\alpha+\beta$ белках



α/β : $\alpha\beta$ -цилиндр

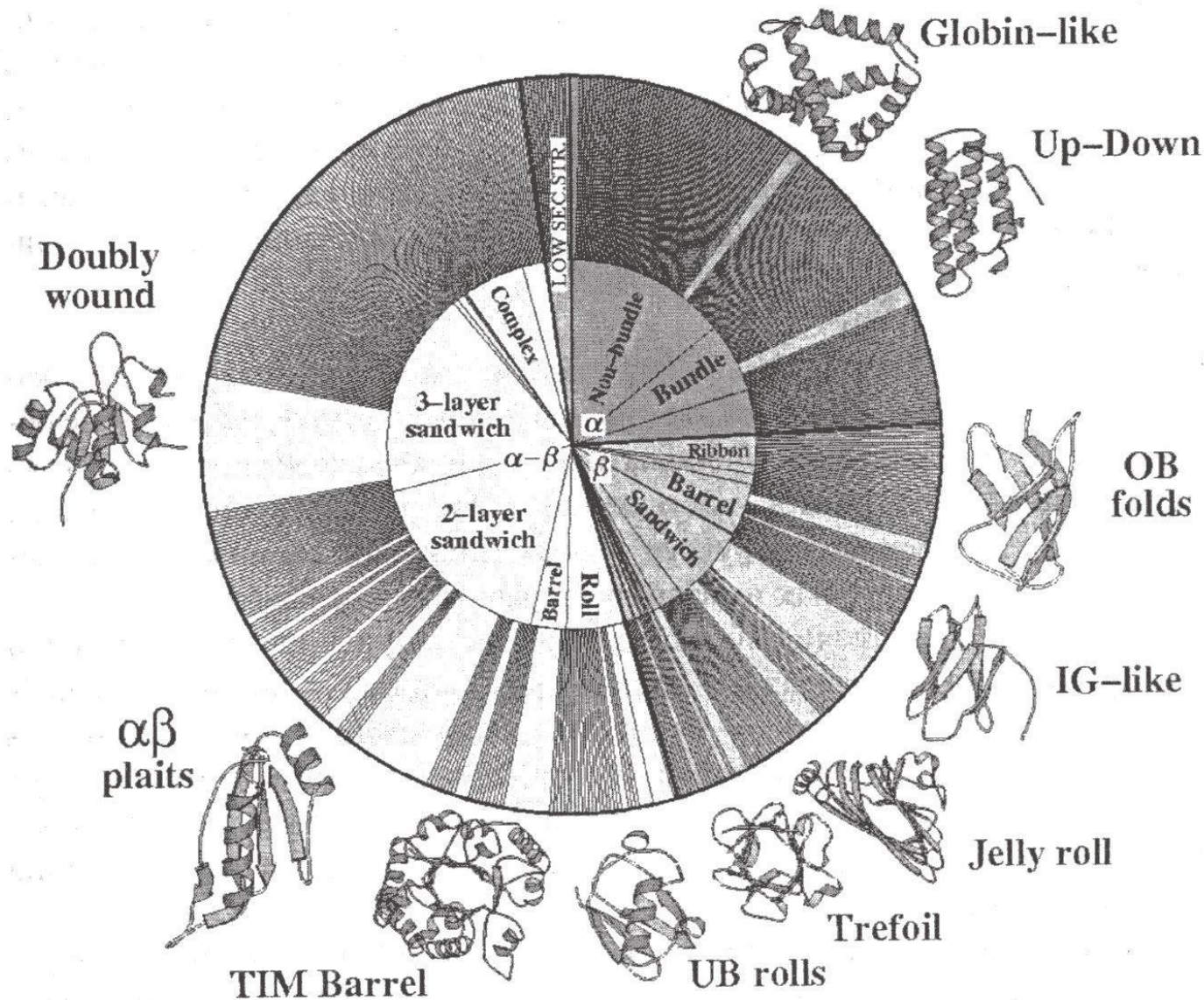


α/β : укладка Россманна

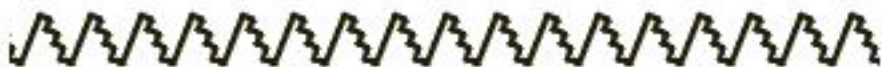
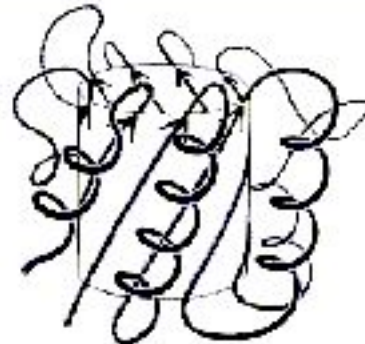


$\alpha+\beta$: $\alpha\beta$ -складка

Структурные классы белков, типичные архитектуры и типичные мотивы укладки цепи (топологии)

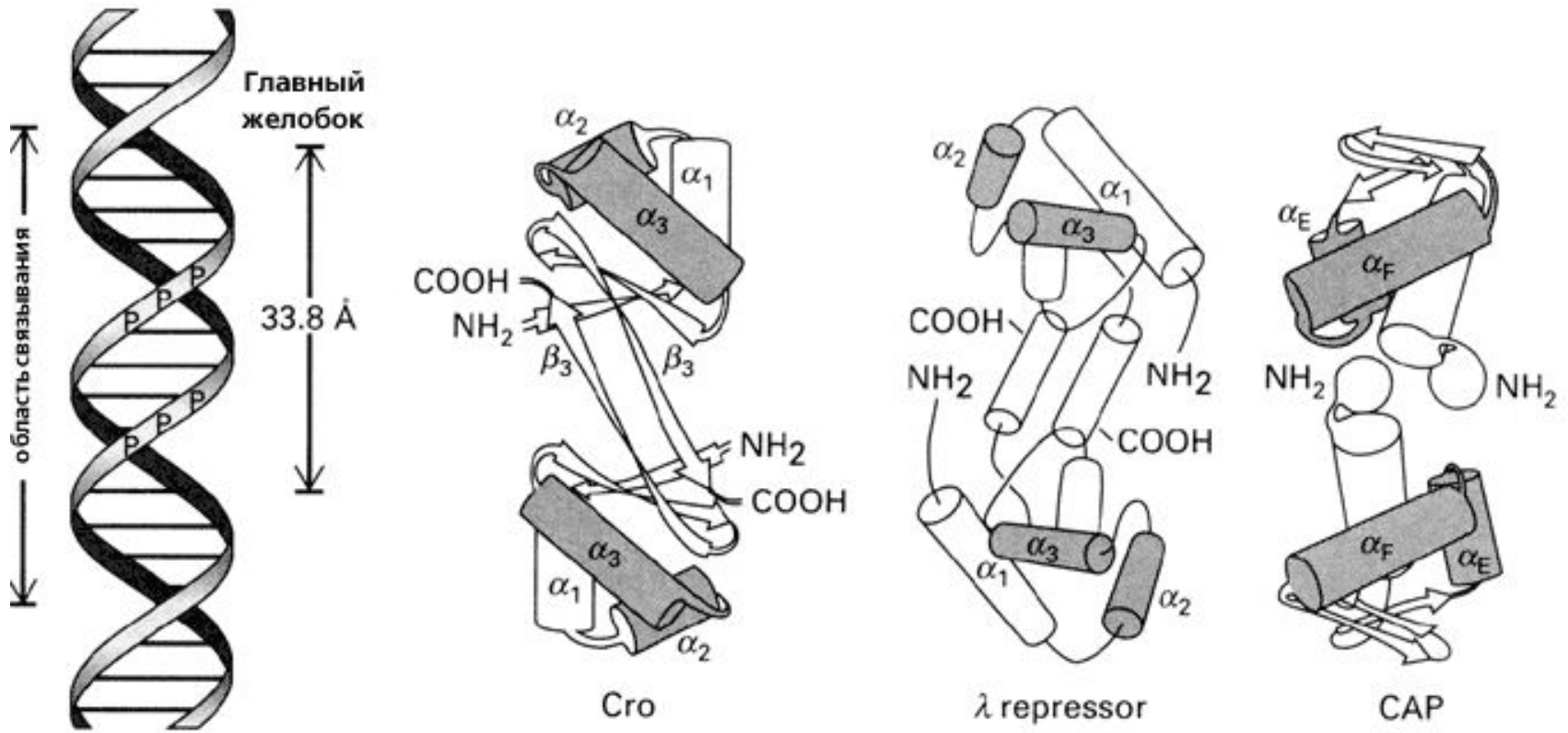


Мотив
ваз



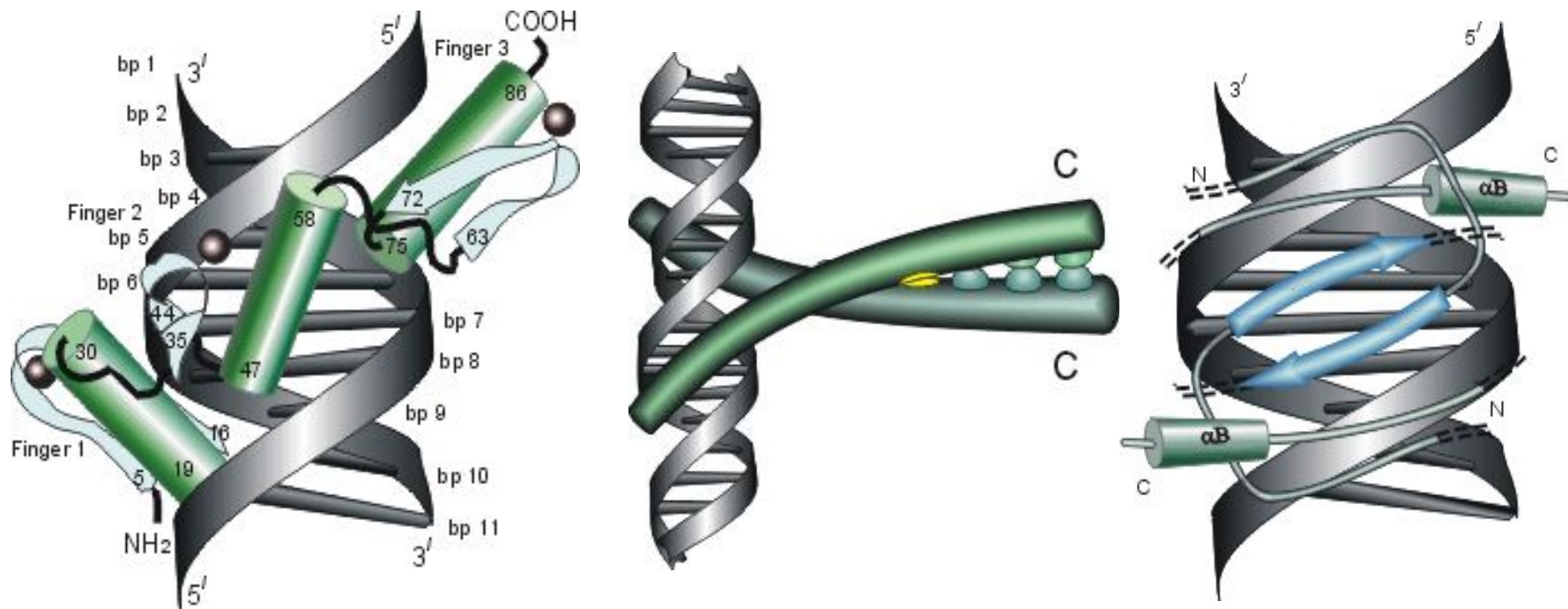
Мотивы укладки балковой
индийских и греческих
несамопресекающихся
элементов на
индейских и греческих
вазах: два решения задачи
окружения объема
несамопресекающейся
линией.

ДНК-связывающие белковые мотивы (hth-motif)



Структура ДНК (слева) и ряда белков, обладающих характерным ДНК-связывающим мотивом "*спираль-изгиб-спираль*" (**hth-motif**, **helical-turn-helical**) (он выделен серым цветом). Для белка — активатора катаболитического гена (CAP — catabolite gene activator protein) показан только его С-концевой домен. Все эти белки димерны, и все они опознают большой желобок ДНК своими спиралями α_3 (α_F у CAP), расстояние между которыми в димере близко к периоду двойной спирали ДНК (33.8 Å).

ДНК-связывающие белковые мотивы (Zn-fingers; Leu-zipper; β -шпилька)



Три характерных ДНК-связывающих белковых мотива. В двух из них ключевая роль принадлежит α -спиралям: (а) *"цинковые пальцы"* (Zn-fingers) (шарики — ионы Zn) и (б) *"лейциновый zipper (застежка-«молния»)"* (Leu-zipper). В третьем, met-репрессоре (в) — ключевая роль принадлежит β -шпильке: она специфически связывается с большим желобком ДНК, в то время как α -спирали αB связываются неспецифически с сахара-фосфатным остовом ДНК.

Самоорганизация белков

In vivo:

1. Рибосома выдает белковую цепь постепенно, с паузами (приостановка биосинтеза цепи на «редких» кодонах). Предполагается, что соответствие пауз границам структурных доменов способствует их спокойному созреванию. Ко-трансляционное сворачивание.
2. В клетке белковая цепь сворачивается под опекой специальных белков - шаперонов, которые препятствуют агрегации белков.
3. Самоорганизация белков может ускоряться некоторыми ферментами типа пролил-изомеразы или дисульфид-изомеразы.

In vitro:

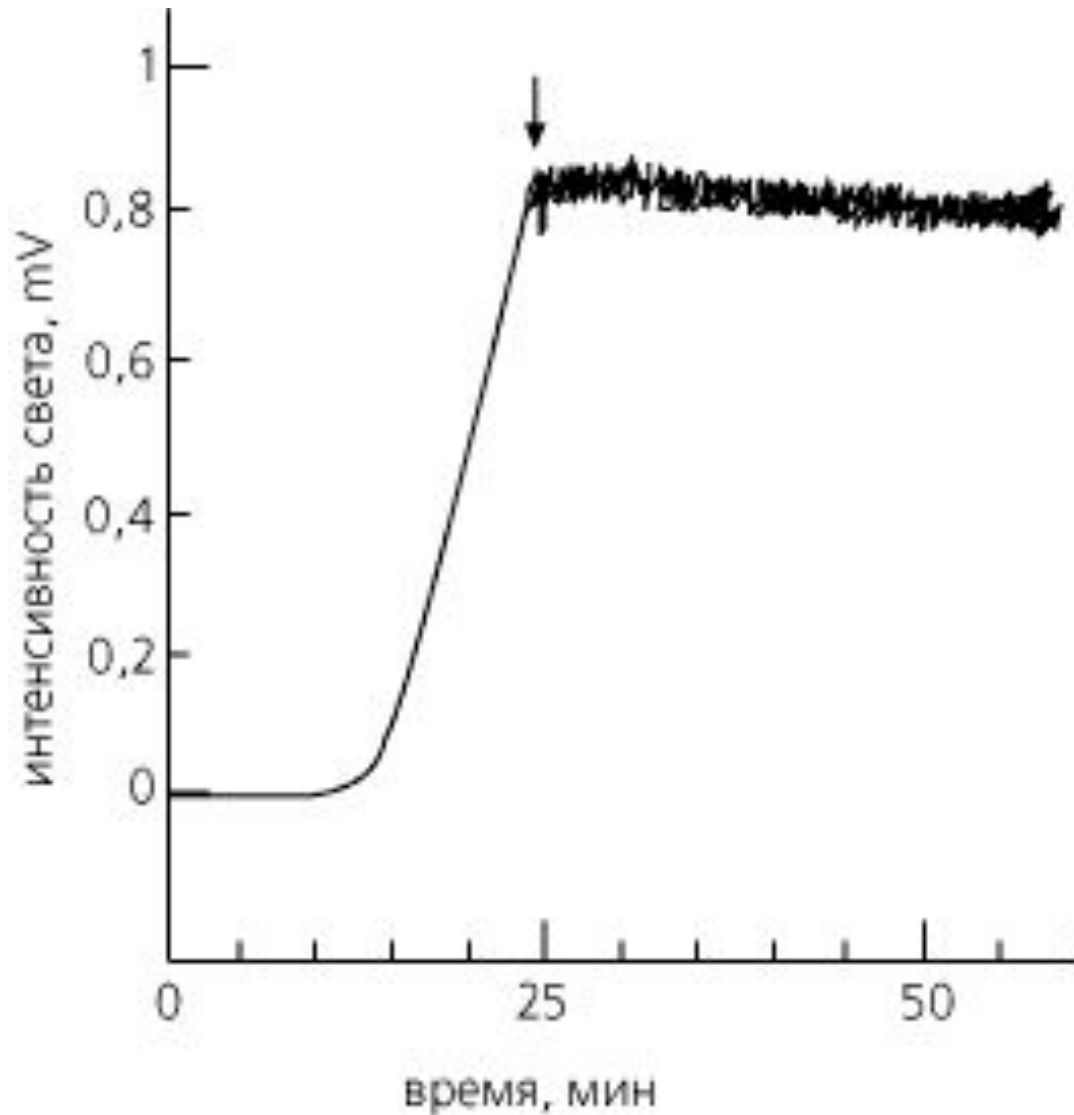
Спонтанная самоорганизация белка происходит при ренатурации белка в растворе при соответствующих внешних условиях (малая концентрация белка, нужный окислительно-восстановительный потенциал). Если белок свернулся *in vitro*, то он свернулся в ту же структуру, что и *in vivo*.

Это означает, что необходимая для построения трехмерной структуры белка информация содержится в химической последовательности аминокислот в его цепи.

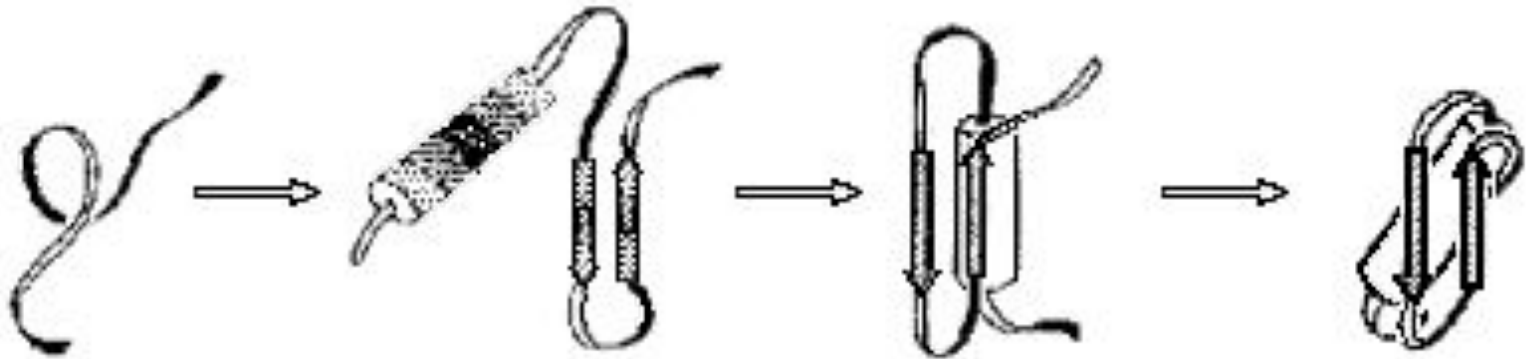
Парадокс Левинталя: $\sim 10^{100}$ возможных конформаций для цепи из 100 остатков, их «перебор» занял бы $\sim 10^{80}$ лет при времени перехода из одной конформации в другую 10^{-13} сек (возраст Вселенной 10^{10} лет).

Ответ: самоорганизующийся белок следует по специальному «пути сворачивания», его нативная структура определяется не стабильностью, не термодинамикой, а кинетикой, т.е. она соответствует не глобальному, а просто быстро достижимому минимуму свободной энергии цепи.

Свечение нативной люциферазы, синтезируемой в бесклеточной системе



Концепция стадийного сворачивания белка («каркасная модель», «framework model»)



**Развернутая
цепь**

**Вторичная
структура,
флуктуирующая
возле своего
нативного
положения**

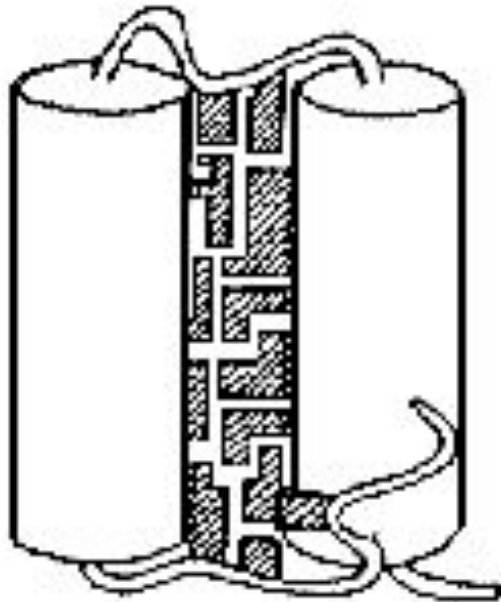
**Нативоподобная
вторичная
структура
и мотив укладки
белковой цепи**

**Нативная
пространственная
структура**

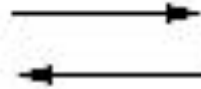
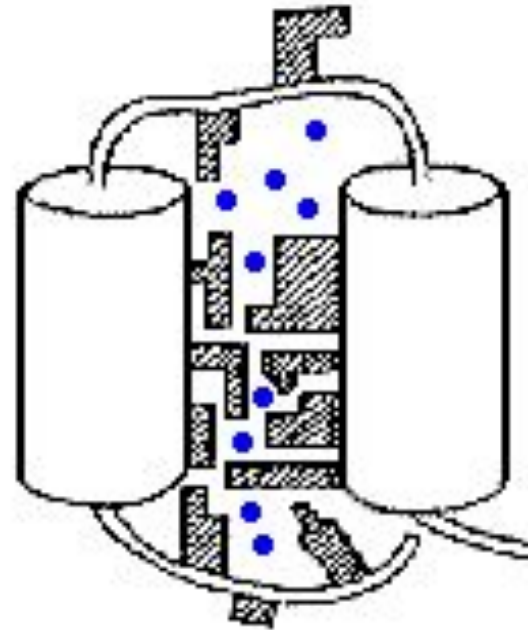
«Расплавленная глобула»

- флуктуирующее состояние белка без уникальной пространственной структуры, универсальный интермедиат сворачивания белков, формируется за 0.1-1 сек

Нативная глобула



Расплавленная глобула



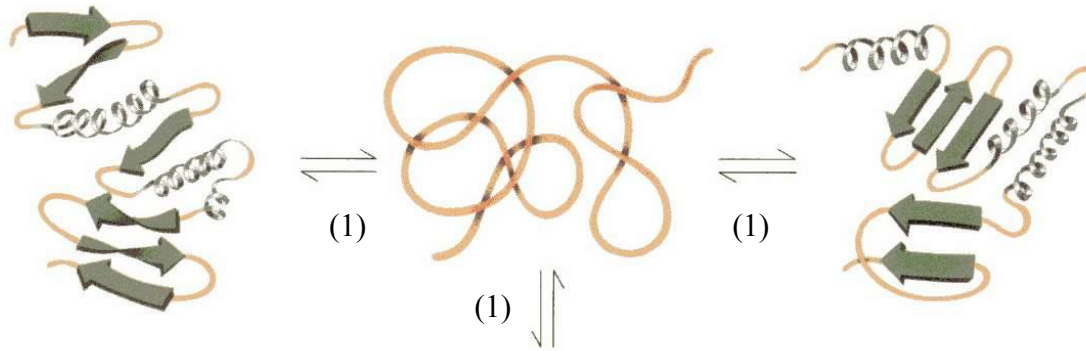
In vivo: транслокация белков через мембрану;
взаимодействие с шаперонами; сборка сложных клеточных структур;
генетические заболевания. 29

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА РАСПЛАВЛЕННОЙ ГЛОБУЛЫ и методы их регистрации

«ГЛОБУЛА» (сходство с нативным белком)		«РАСПЛАВЛЕННАЯ» (<u>несходство</u> с нативным белком)				
Гидродинамический объем Мало- и среднеугловое рас- сеяние рентгеновских лучей	} =>	КД в ближнем УФ ¹ H ЯМР спектры	} =>	НЕТ УНИКАЛЬ- НОЙ УПАКОВКИ БОКОВЫХ ГРУПП		
Большеугловое рассеяние рентгеновских лучей	=>	НАЛИЧИЕ ЯДРА	} =>	ВОДОРОДНЫЙ ОБМЕН, ЯМР ПРОТЕОЛИЗ	} =>	ФЛУКТУАЦИИ МОЛЕКУЛЫ
ЯМР (спиновое эхо)	=>	ЗАЖАТОСТЬ ЧАСТИ АРОМАТИЧЕСКИХ БОКОВЫХ ГРУПП	=>	ЯМР (спиновое эхо)	=>	ПОДВИЖНОСТЬ АЛИФАТИЧЕСКИХ БОКОВЫХ ГРУПП
КД в дальнем УФ ИК спектры ЯМР с H<=>D обменом	} =>	ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА	=>	Сканирующая и изотермическая микрокалориметрия	=>	НЕТ (как правило) ДАЛЬНЕЙШЕГО ПЛАВЛЕНИЯ
Флуоресценция	=>	ЧАСТЬ ОСТАТКОВ Trp СКРЫТА ОТ ВОДЫ	=>	Флуоресценция	=>	ЧАСТЬ ОСТАТКОВ Trp ВЫХОДИТ В ВОДУ
Двумерный ЯМР	=>	СОХРАНЕНИЕ ЧАСТИ ДАЛЬНИХ ПО ЦЕПИ КОНТАКТОВ	=>	Двумерный ЯМР	=>	РАСПАД БОЛЬШИНСТВА ДАЛЬНИХ ПО ЦЕПИ КОНТАКТОВ
Хроматография (HPLC)	=>	ВОЗМОЖНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ «ПРАВИЛЬНЫХ» SS-СВЯЗЕЙ				

ОТЛИЧИЕ и от нативного, и от развернутого белка:
 Усиленное связывание неполярных молекул (флуоресценция АНС)

Фолдинг белков



(1) The rapid and reversible formation of local secondary structures



(2) Formation of domains through the cooperative aggregation of folding nuclei



(3) "Molten globule" formation of the assembled domains

(4) An adjustment in the conformation of the domains

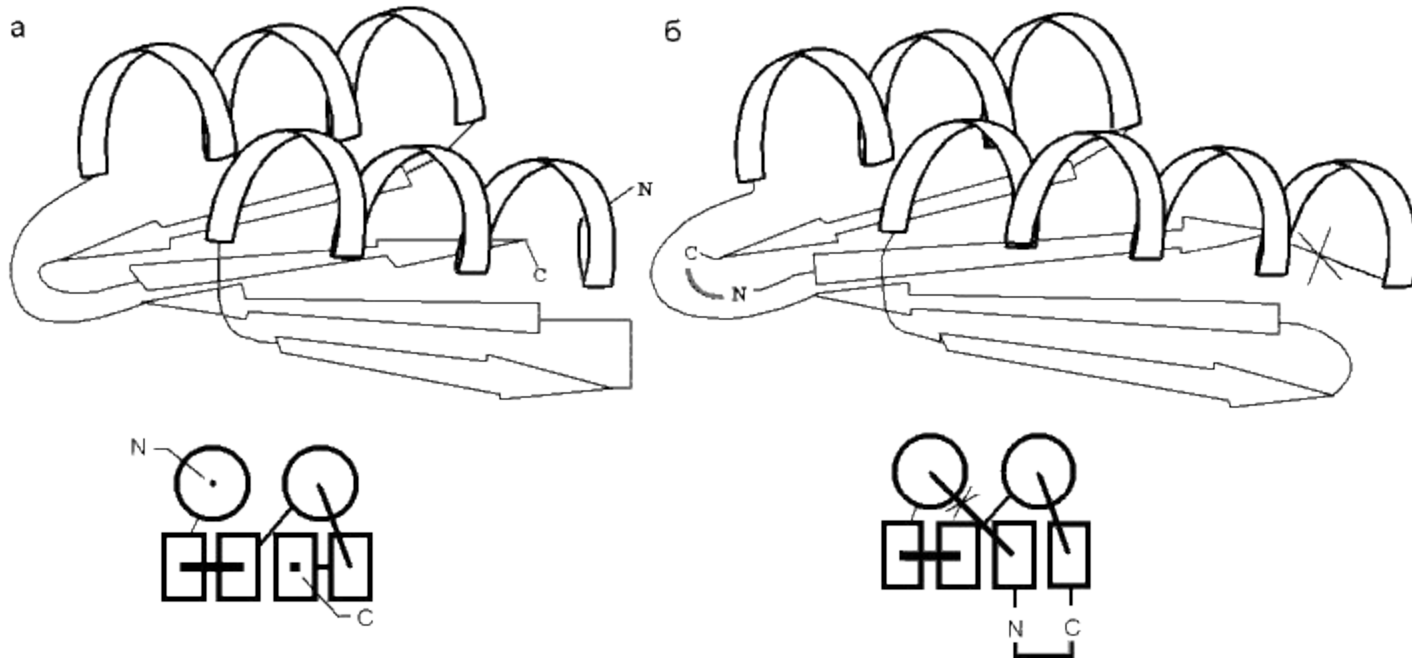
(4)



(5) Final protein monomer

(5)

Альбегетин - белок *de novo*



Белок с заданной вторичной структурой - **альбегетин** - кооперативно не плавится и находится в состоянии расплавленной глобулы.

Был использован в качестве носителя функциональной активности:

Альбегерон =

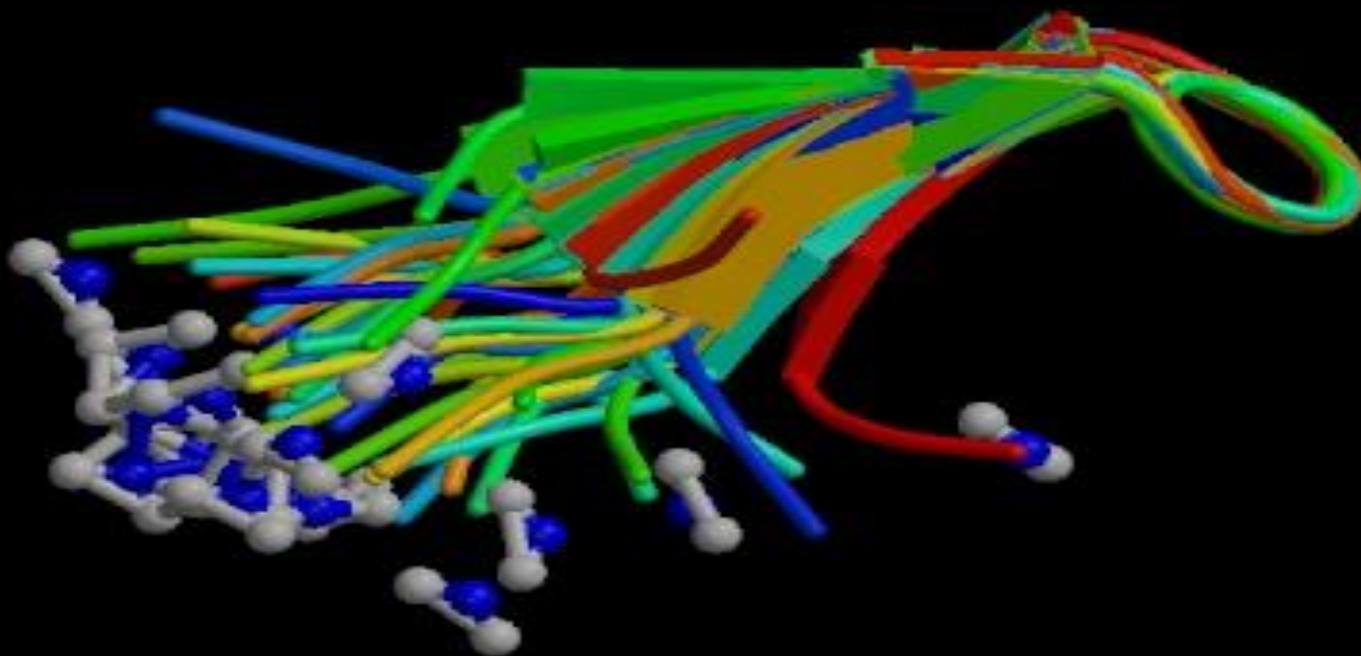
альбегетин + фрагмент 131-138

(активирует бласт-трансформацию тимоцитов)

интерферона $\alpha 2$ человека.

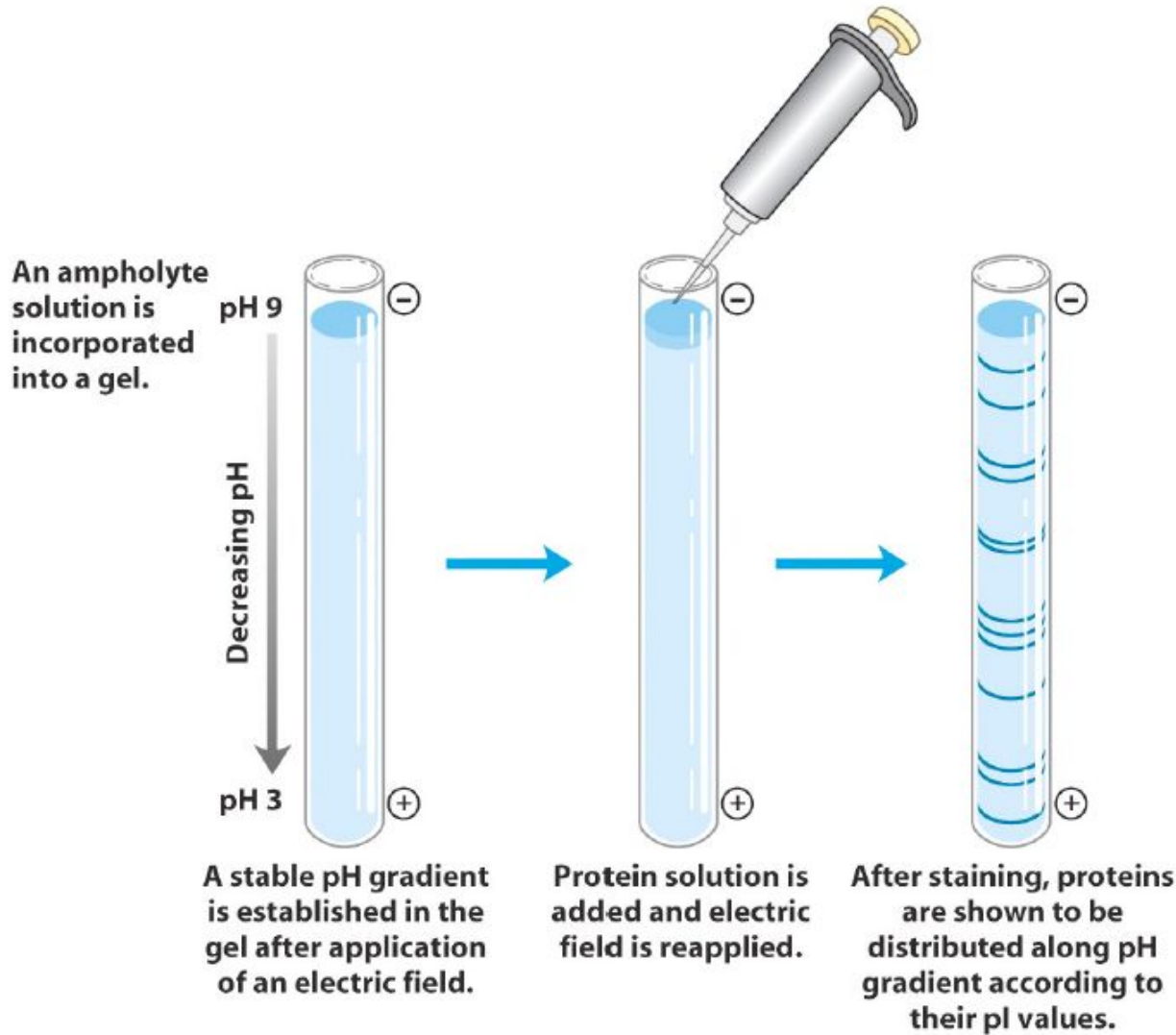
Еще один белок со структурой, запланированной для альбегетина, был получен при помощи циркулярной пермутации рибосомального белка S6 - обладает твердой, кооперативно плавящейся пространственной структурой.

Человеческий эритропоэтин (166 АКО)



Белок *de novo* – димер из двух β -шпилек,
состоит всего из 20 АКО.

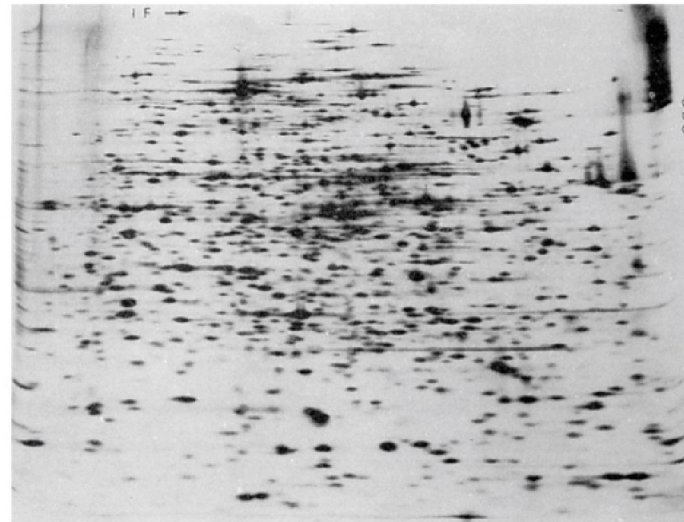
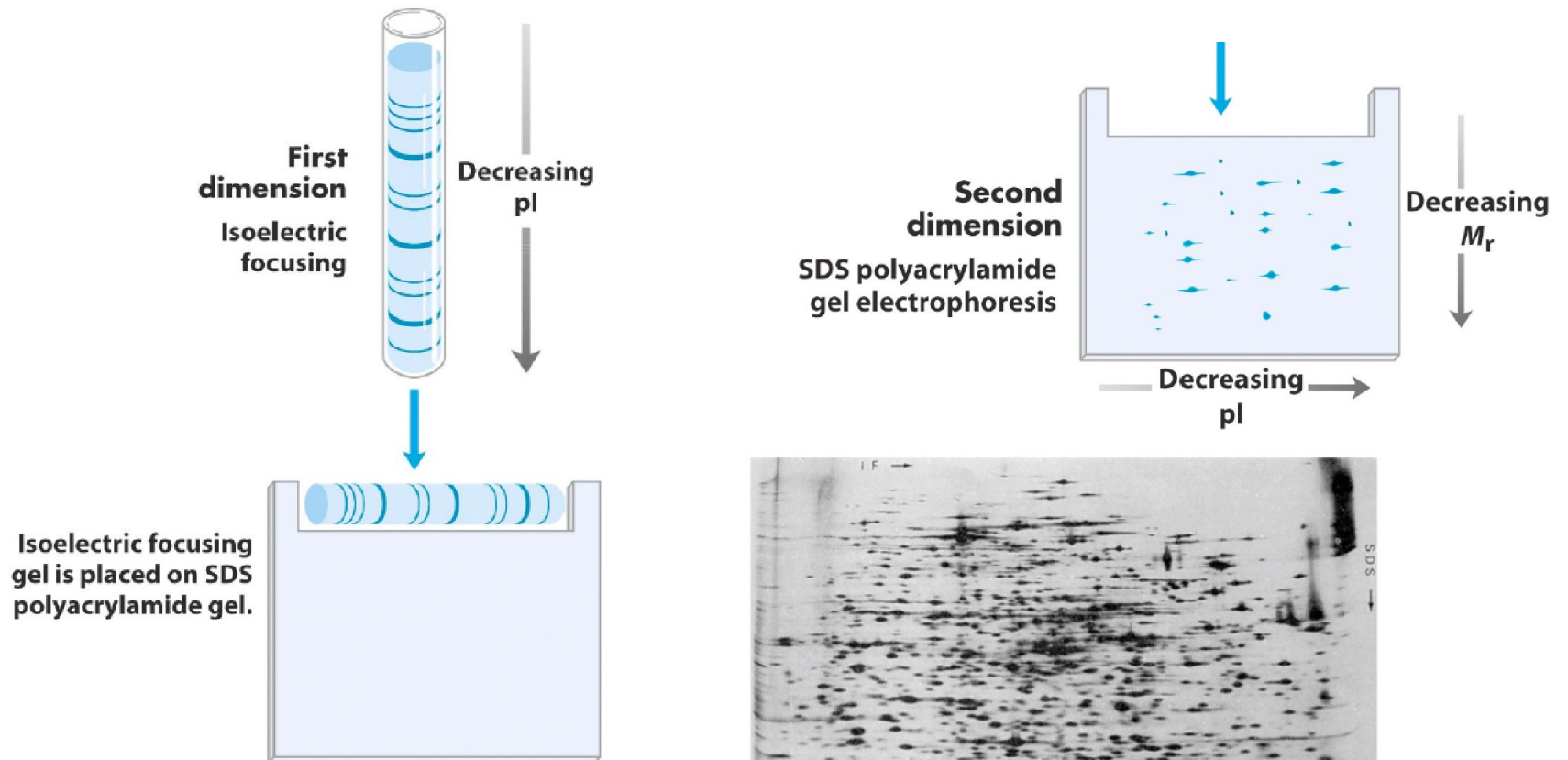
Изоэлектрическое фокусирование

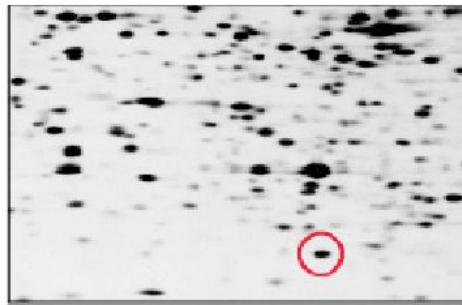


The Isoelectric Points of Some Proteins

<i>Protein</i>	<i>pI</i>
Pepsin	<1.0
Egg albumin	4.6
Serum albumin	4.9
Urease	5.0
β -Lactoglobulin	5.2
Hemoglobin	6.8
Myoglobin	7.0
Chymotrypsinogen	9.5
Cytochrome c	10.7
Lysozyme	11.0

+ гель-электрофорез

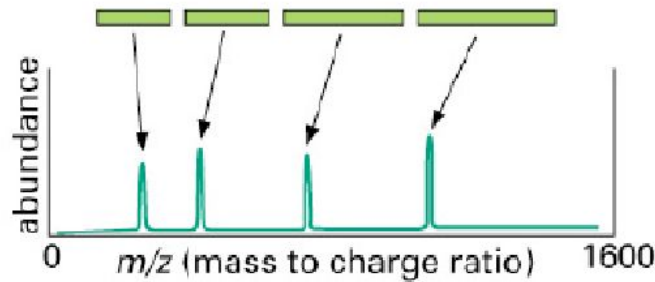




single protein spot excised from gel

N  C

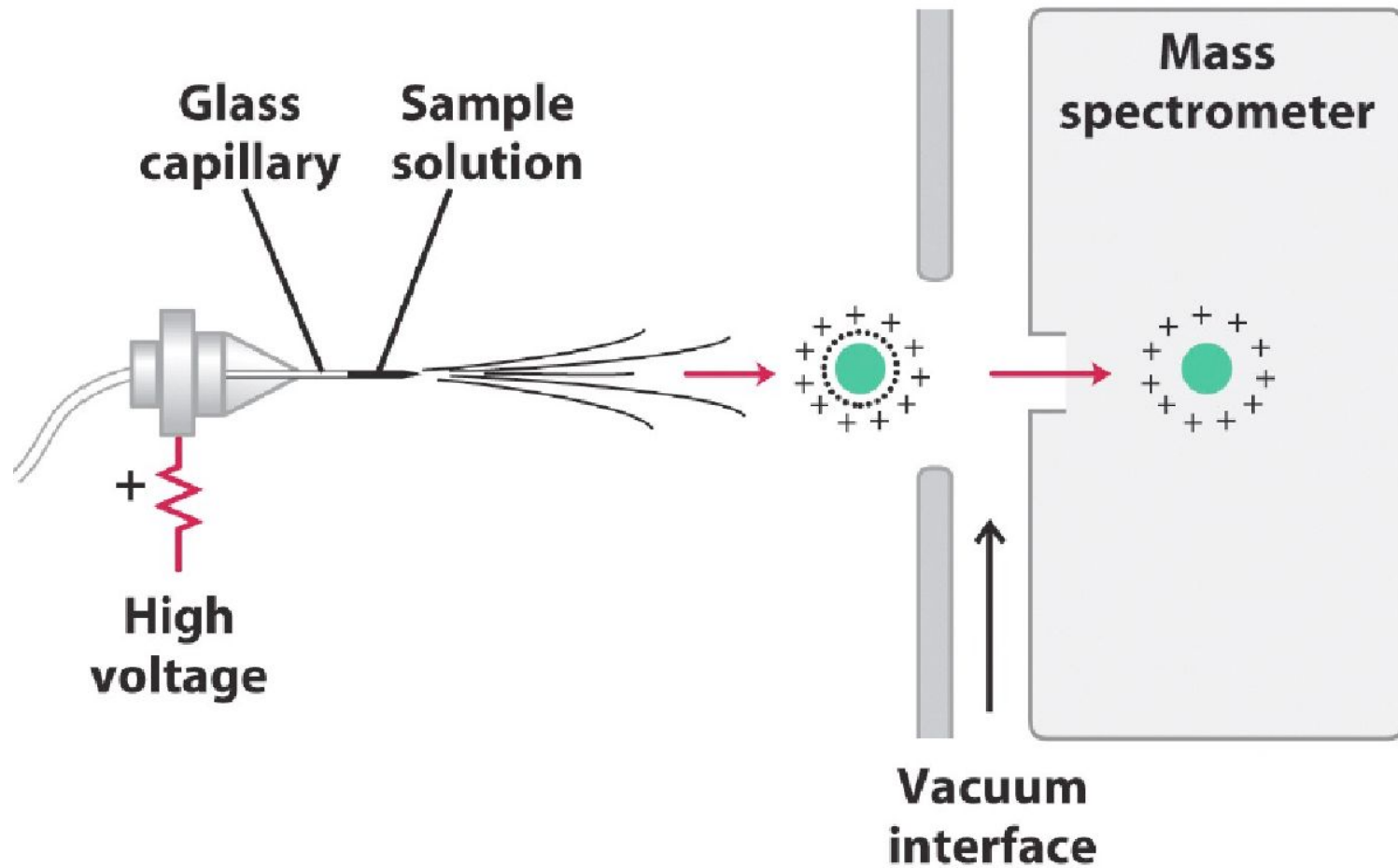
↓
PEPTIDES RELEASED BY
TRYPTIC DIGESTION AND
THEIR MASSES MEASURED
USING MALDI-TOF MASS
SPECTROMETRY



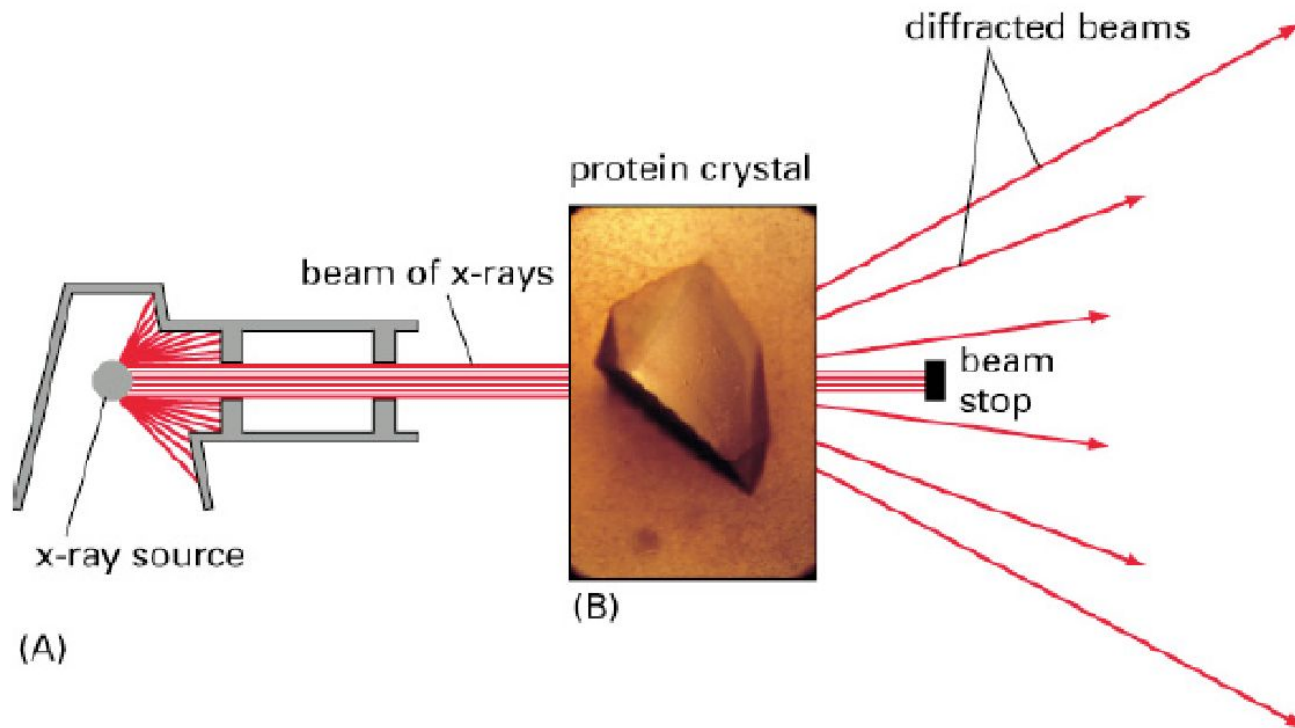
↓
PROTEIN SEQUENCE DATABASES SEARCHED FOR
MATCHES WITH THEORETICAL MASSES CALCULATED
FOR ALL TRYPSIN-RELEASED PEPTIDES

↓
IDENTIFICATION AND ISOLATION
OF CORRESPONDING GENE

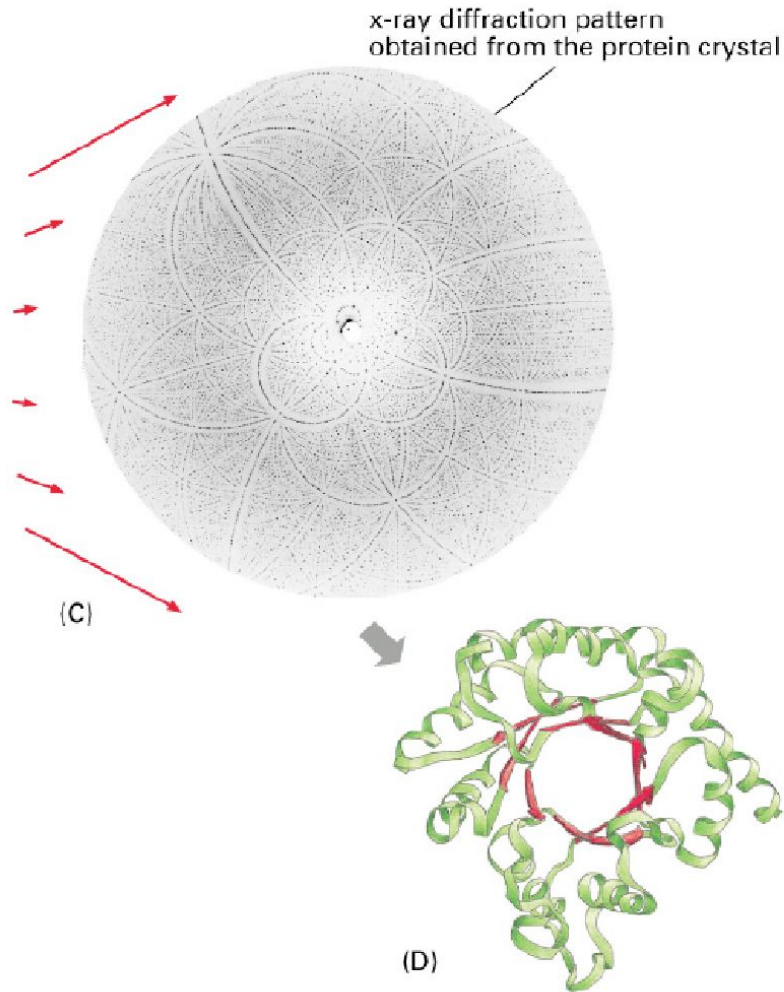
Масс-спектрометрия

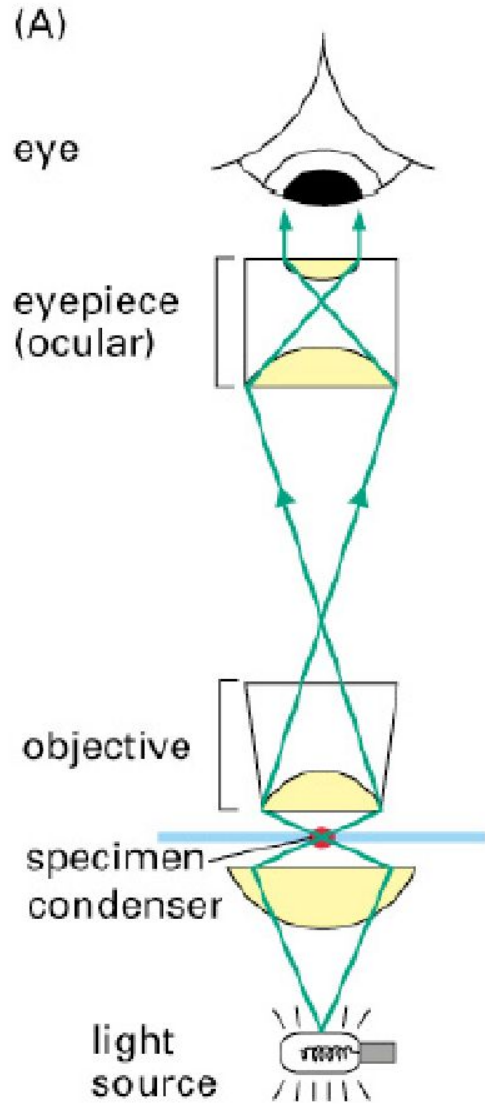


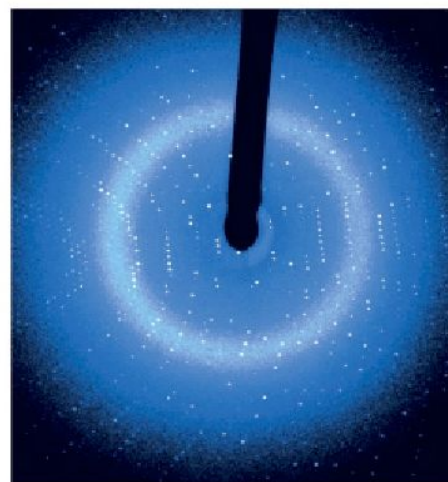
Рентгено-структурный анализ



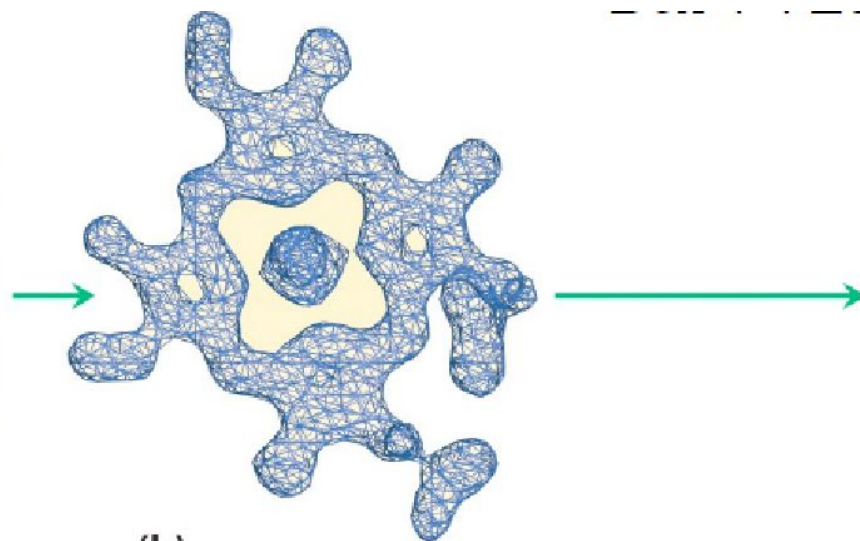
Рентгено-структурный анализ



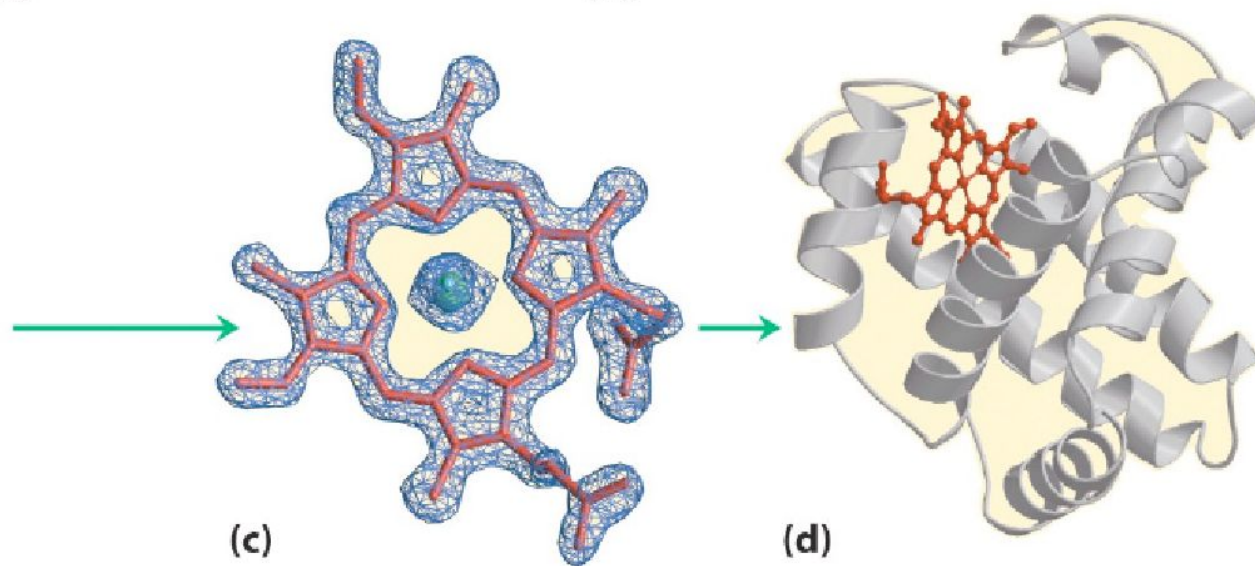




(a)



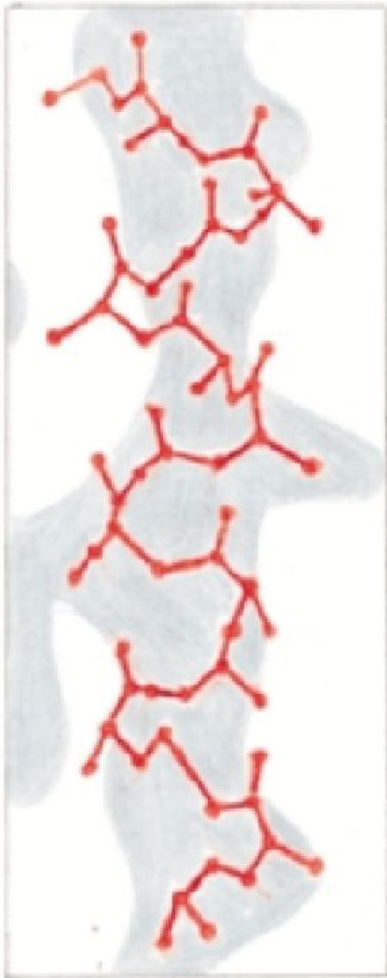
(b)



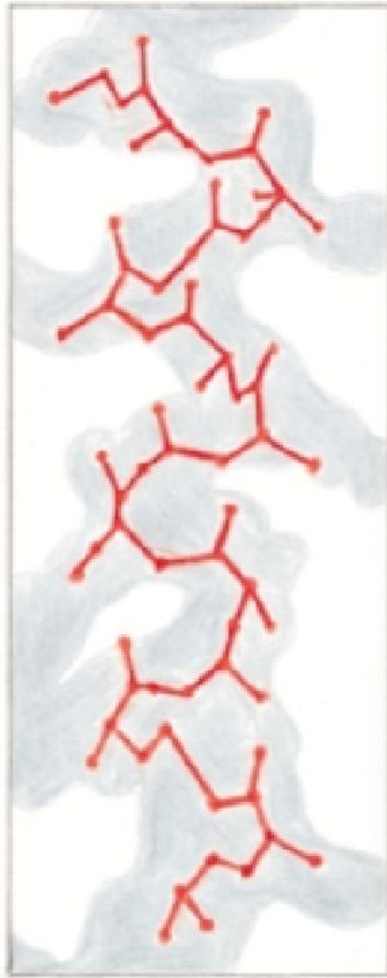
(c)

(d)

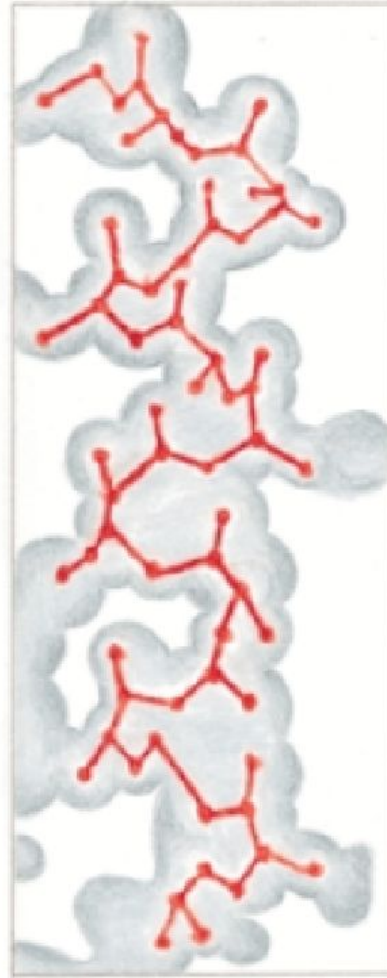
(a) 5.0 Å



(b) 3.0 Å



(c) 1.5 Å



Ядерный магнитный резонанс (ЯМР, NMR)

21 tesla NMR Magnet being loaded with a sample

