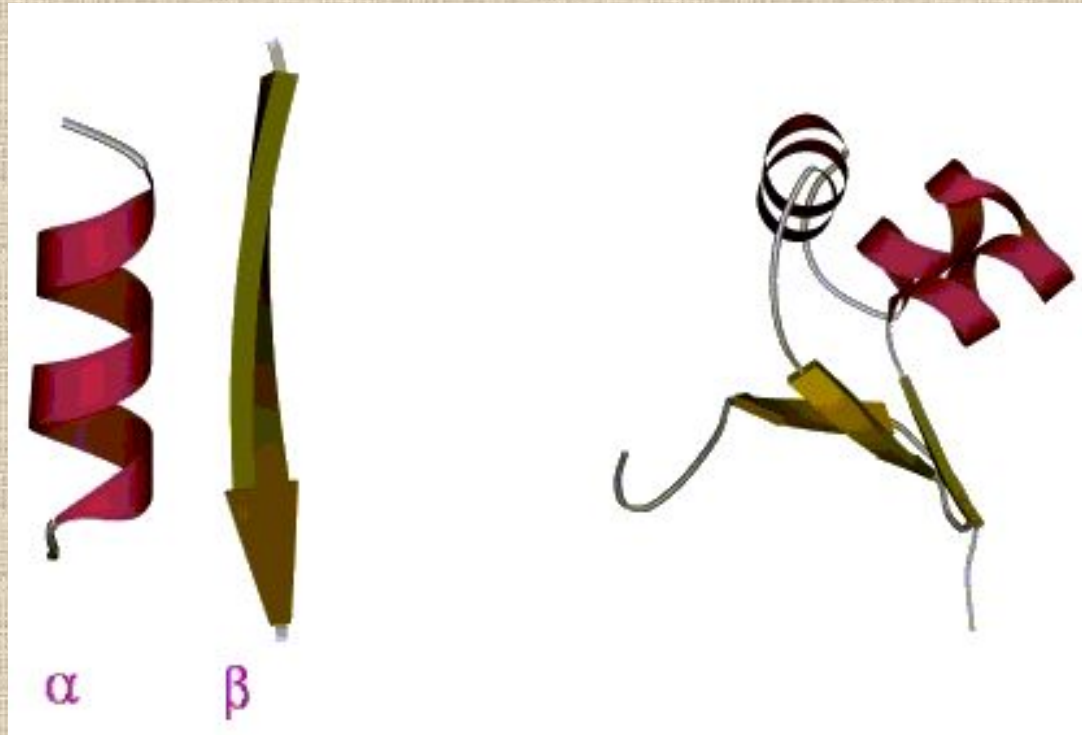
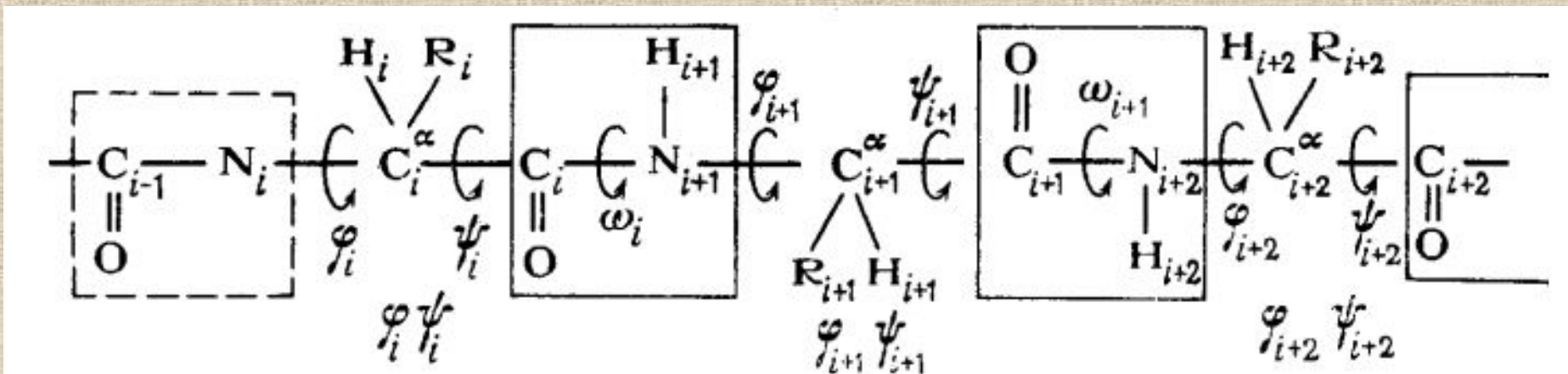


Раздел: Молекулярная биофизика

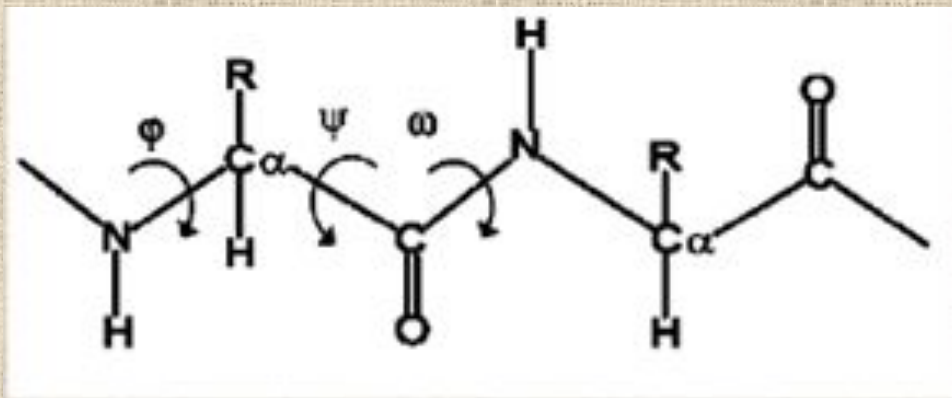


Тема: Структура белка

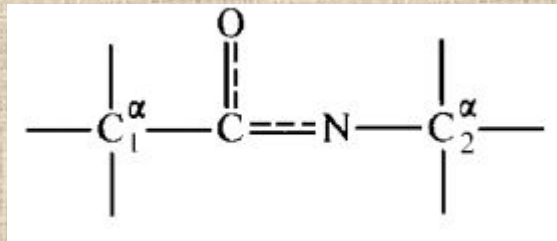
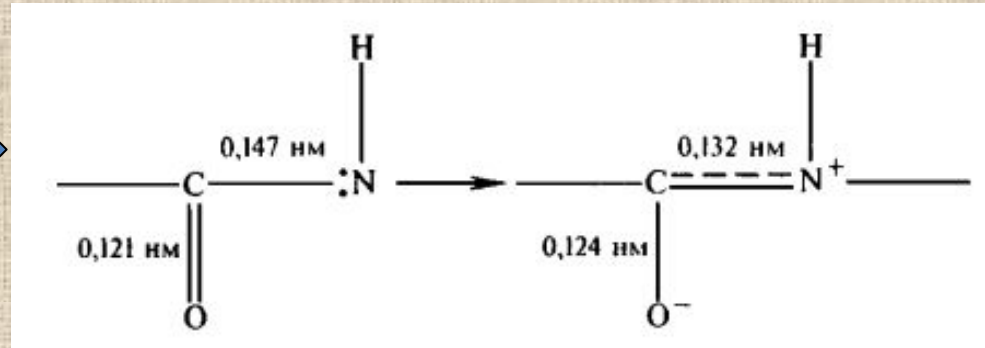
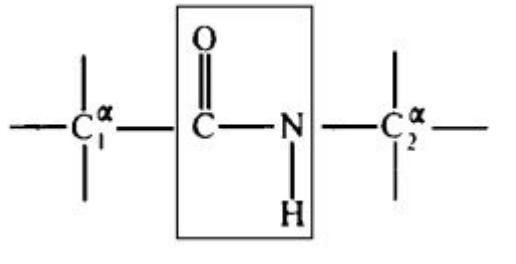
Конформационная энергия полипептида



*Общее строение полипептидной цепи,
характеризуется тремя углами:*

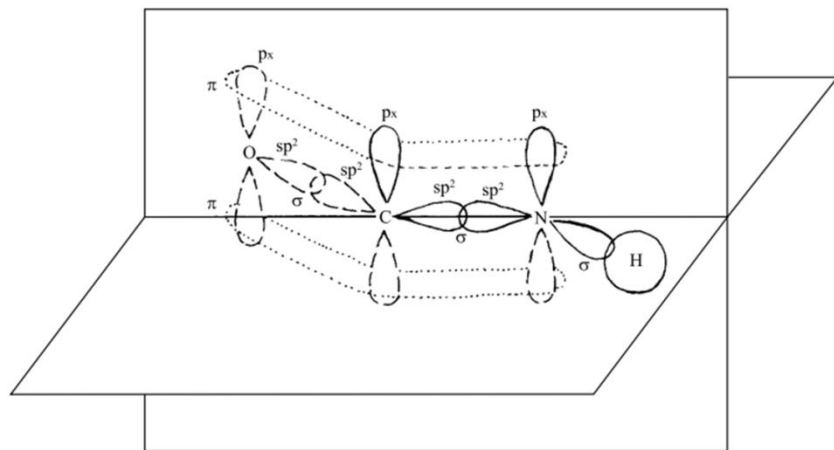
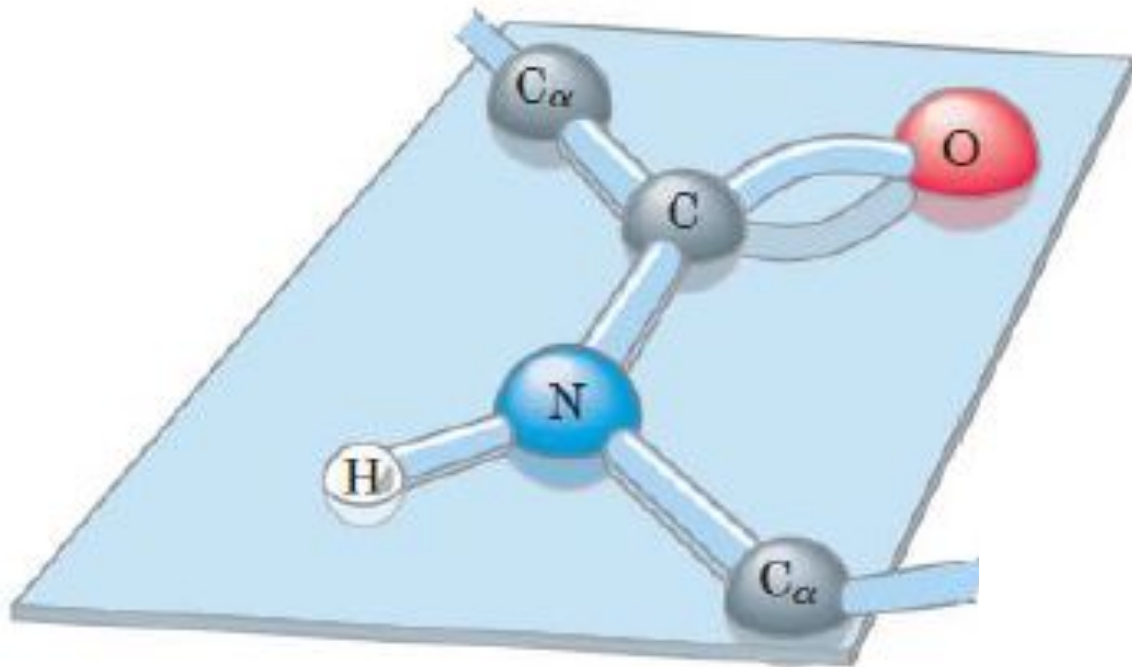


Пептидная связь – ω - угол



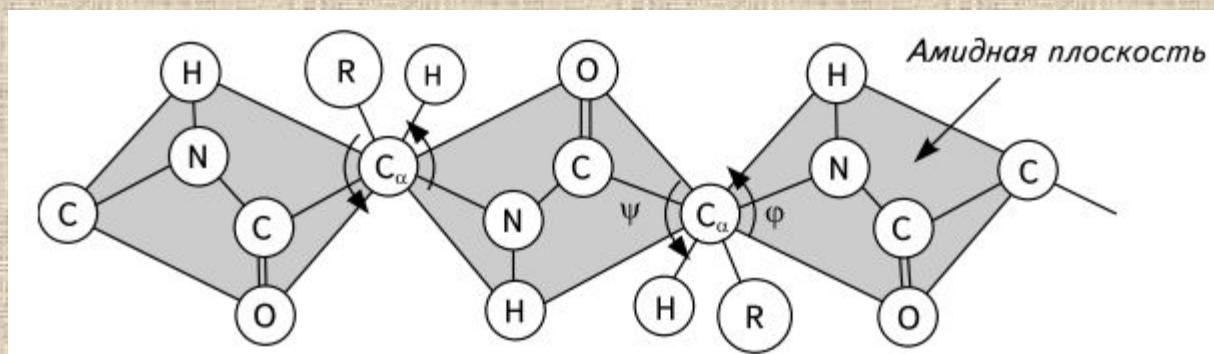
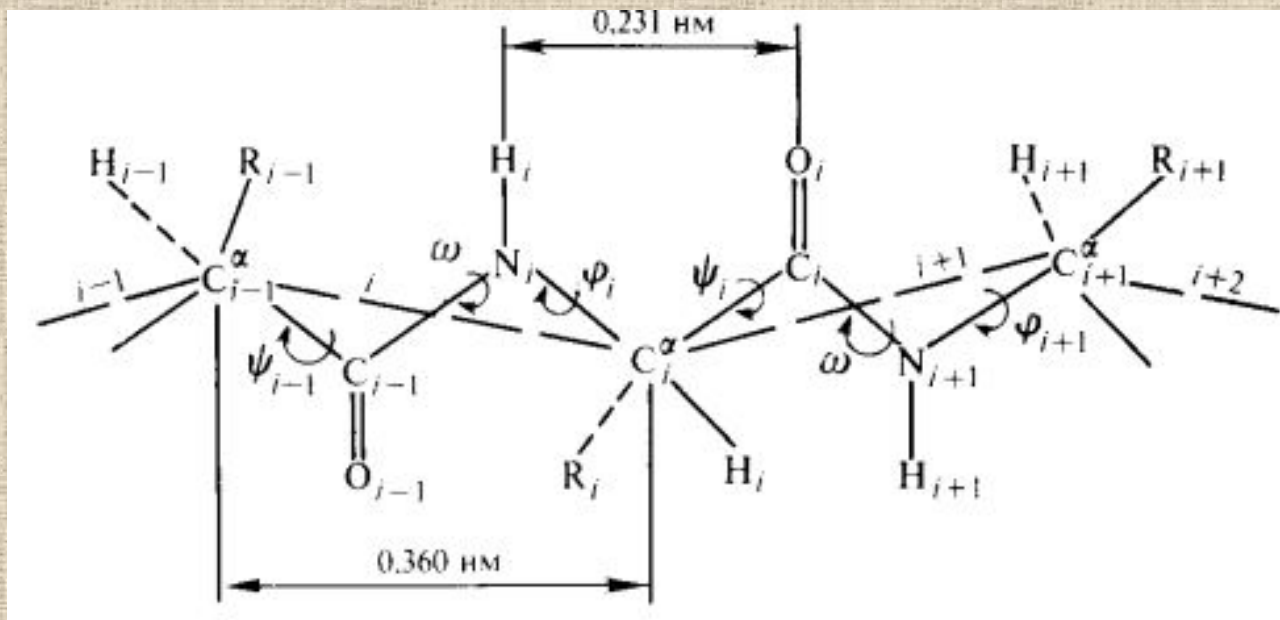
Однако, двойной характер пептидной связи препятствует вращению вокруг нее: $\omega = \text{const} = 180^\circ$. В полипептидной цепи имеет место только попарное кооперативное взаимодействие при вращении вокруг единичных связей при одном α -атоме аминокислот.

Электронная конфигурация полипептидной цепи

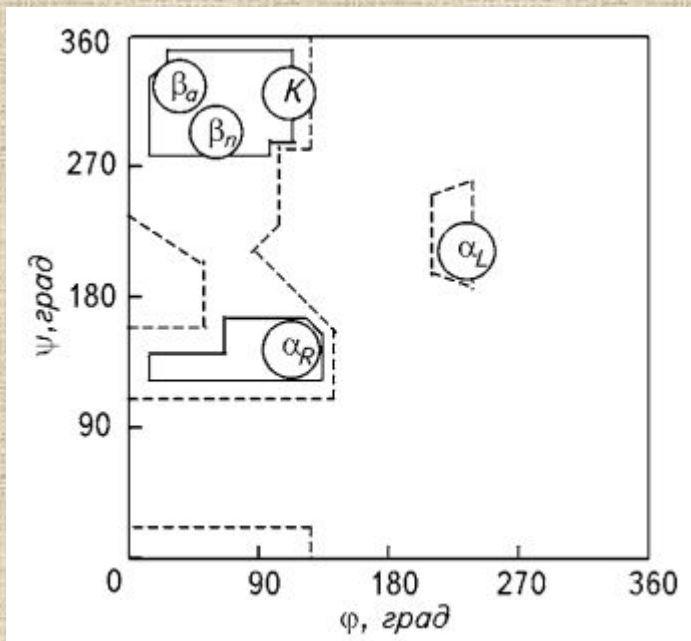


1. Компланарность – все атомы, входящие в пептидную группу, находятся в одной плоскости.
2. Способность к существованию в двух резонансных формах: (кето- или енольная)
3. Транс-положение заместителей по отношению к C-N-связи.
4. Способность к образованию водородных связей.

Пространственная конфигурация полипептидной цепи



Таким образом, пространственная конфигурация полипептидной цепи будет зависеть от кооперативного взаимодействия ϕ и ψ углов у альфа атома углерода.



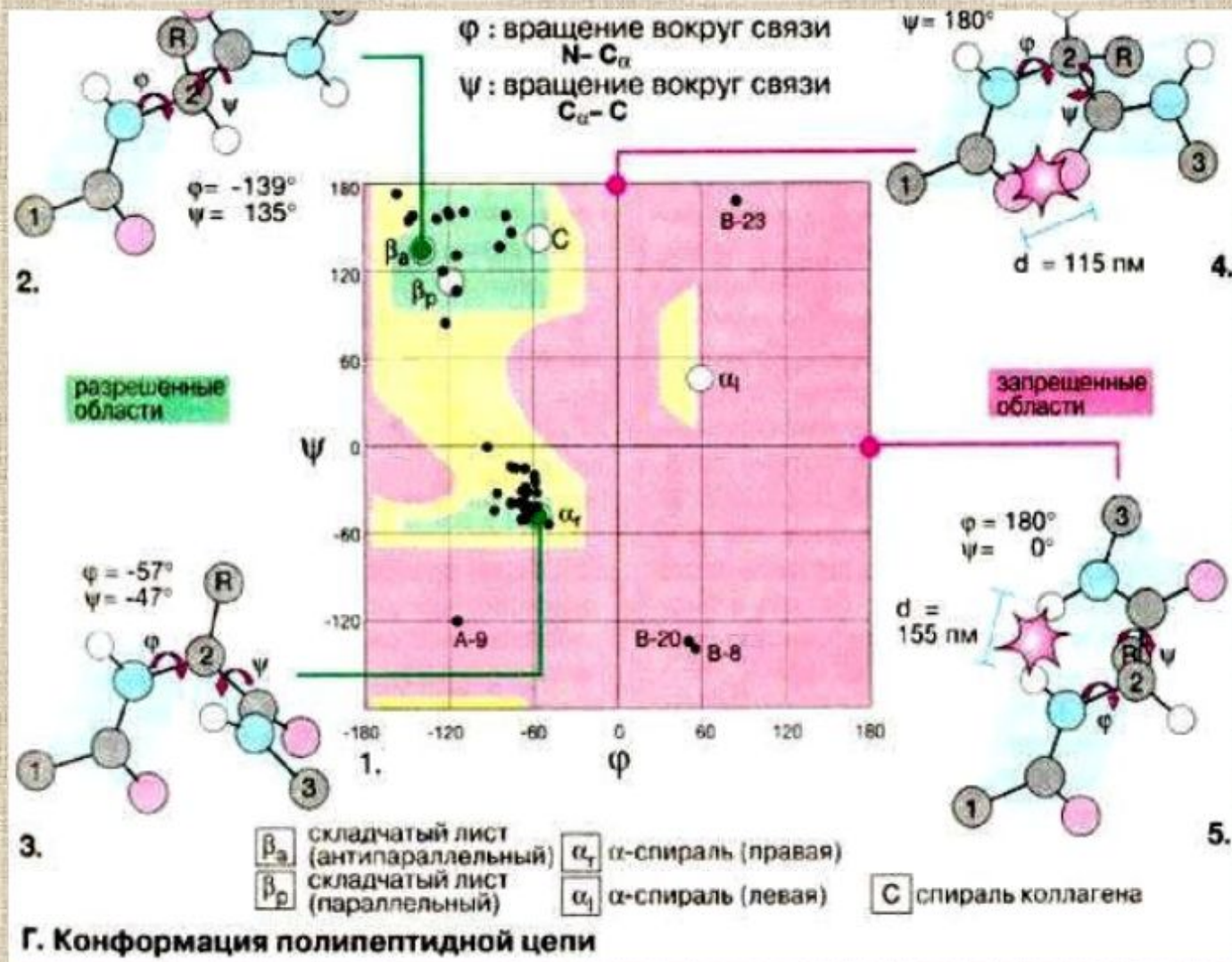
Стерическая карта Рамачандрана для поли-L-аланина.

Сплошные линии обозначают границы полностью разрешенных областей; пунктирные - частично разрешенных. На карте указаны области значений углов ψ и ϕ для параллельной ($\beta_{п,}$) и антипараллельной (β_a) β -форм, спирали белка коллагена (K), правой (α_R) и левой (α_L) α -спиралей.

Не все значения углов ψ и ϕ допустимы вследствие возможного стерического несоответствия двух соседних аминокислотных остатков. Индийский ученый Г. Рамачандран рассчитал допустимые значения углов ψ и ϕ (углы отсчитываются от плоской транс-конформации полипептидной цепи) и построил стерические карты, на которых по оси абсцисс откладываются значения углов ϕ от 0 до 360° , а по оси ординат - значения углов ψ . На карте отмечаются полностью разрешенные (при обычных межатомных расстояниях) и частично разрешенные (при минимальных межатомных расстояниях) области значений этих углов.

Конформационная энергия полипептида

Изображенные в координатах (ϕ , ψ) "разрешенные" и "запрещенные" конформации остатка называются **картами Рамачандрана**.



Конформационная энергия полипептида

Общее выражение для конформационной энергии

$$U(\varphi, \psi) = \sum_{i,k} U_{i,k}(\varphi, \psi) + \frac{U_{\varphi}^0}{2} (1 - \cos 3\varphi) + \frac{U_{\psi}^0}{2} (1 - \cos 3\psi) + U_{\text{эл.стат}}$$

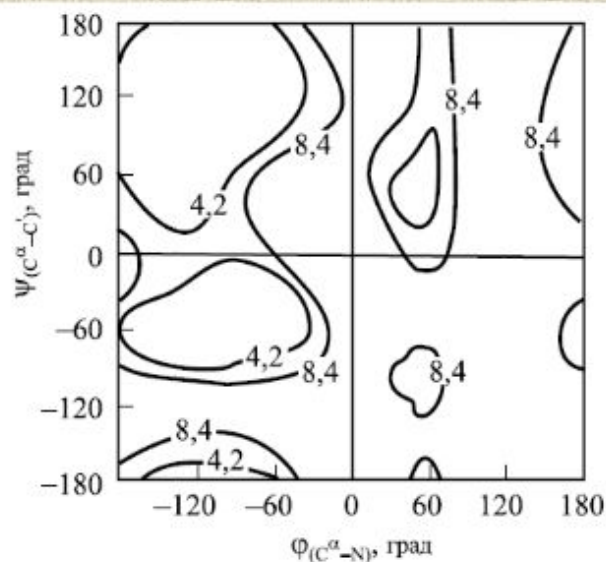


Рис. IX.9

Диаграмма потенциальной поверхности молекулы метиламида-N-ацетил-L-аланина (цифрами указана энергия конформации, кДж/моль) (по Е. М. Попову, 1981)

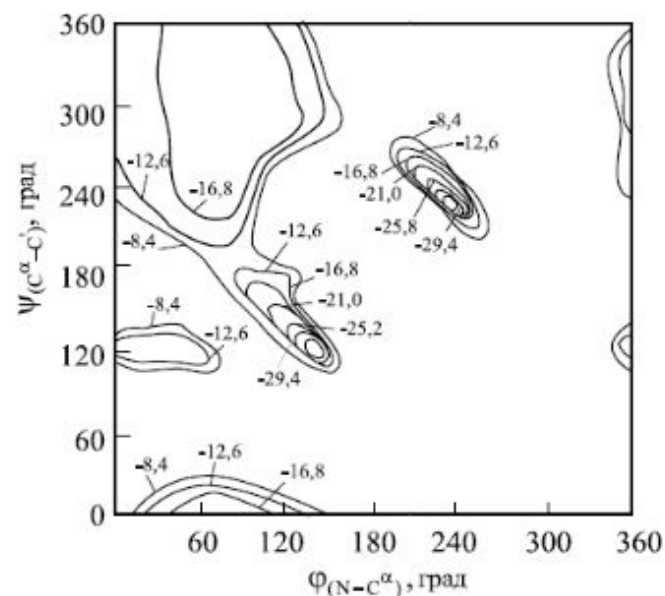
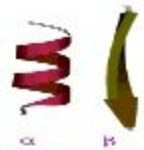


Рис. IX.10

Карта конформационной энергии поли-L-аланина (энергии конформации указаны так же, как на рис. IX.9) (по А. G. Walton, J. Blackwell, 1973)



Предсказание пространственной организации белков

? В какой степени уникальность конформации белка определяется первичной аминокислотной последовательностью ?

1) Насколько детерминирован процесс укладки цепи в нативную форму?

2) Возможна ли укладка случайной последовательности остатков в структуру, подобную нативной структуре белка?

3) Каким образом возникли и были закреплены в ходе эволюции существующие природные первичные последовательности аминокислотных остатков?

Методы предсказания вторичной и третичной структуры белка на основе аминокислотной последовательности

Эмпирический

Физическое
моделирование



Предсказание пространственной организации белков

Эмпирические правила, отражающие связь первичной структуры со вторичной и третичной

Полярные группы – на поверхности
Неполярные – внутри глобулы

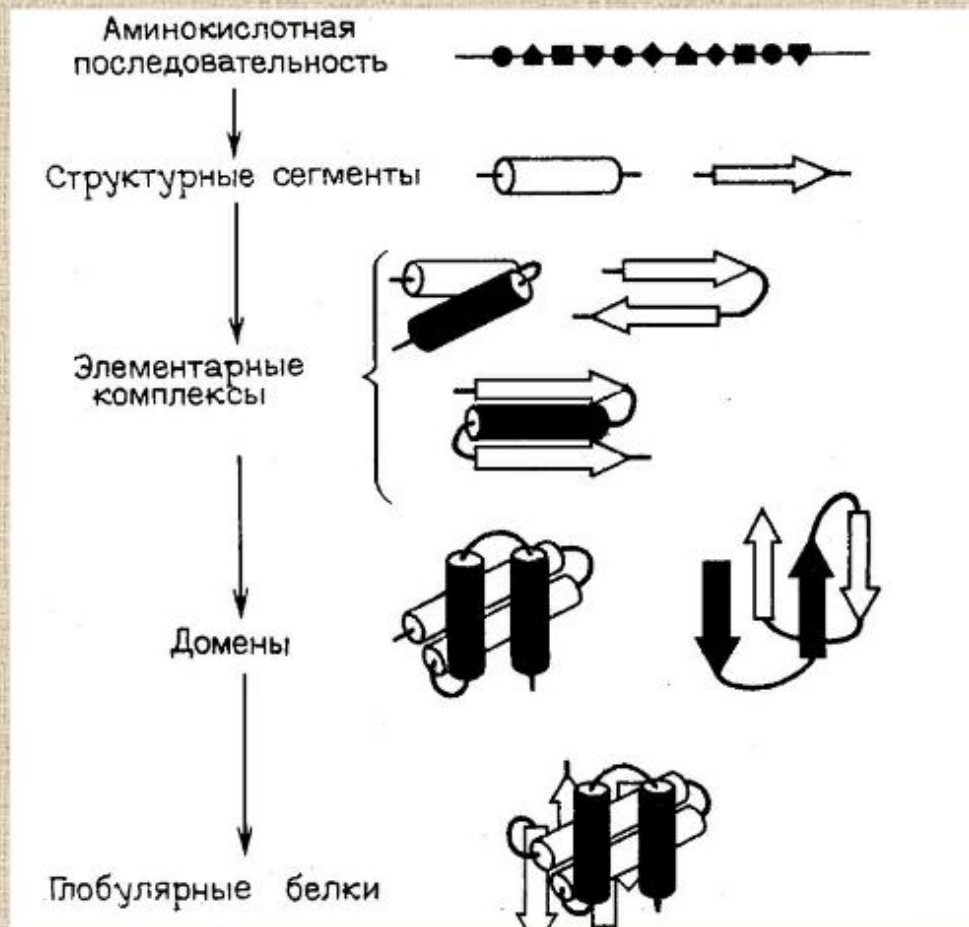
На поверхности α -спиралей и β -структур – также гидрофобные области

Внутримолекулярные водородные связи между пептидами максимально насыщены.

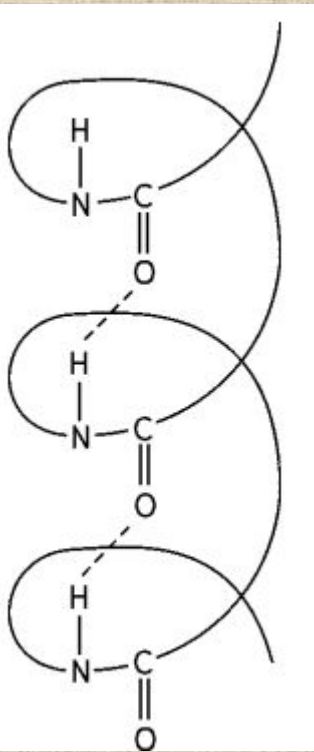
Статистические данные о частоте появления а.о. в α - и β -структурах.

Предсказание пространственной организации белков

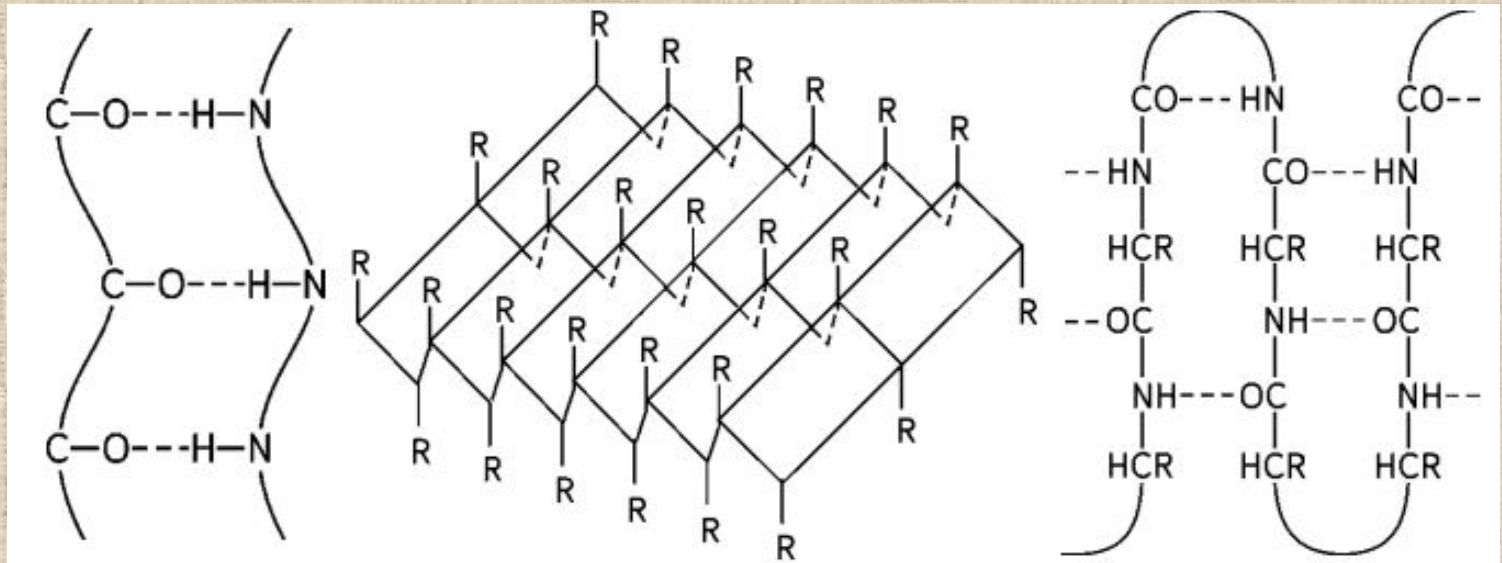
Иерархия \approx последовательность стадий сворачивания белка



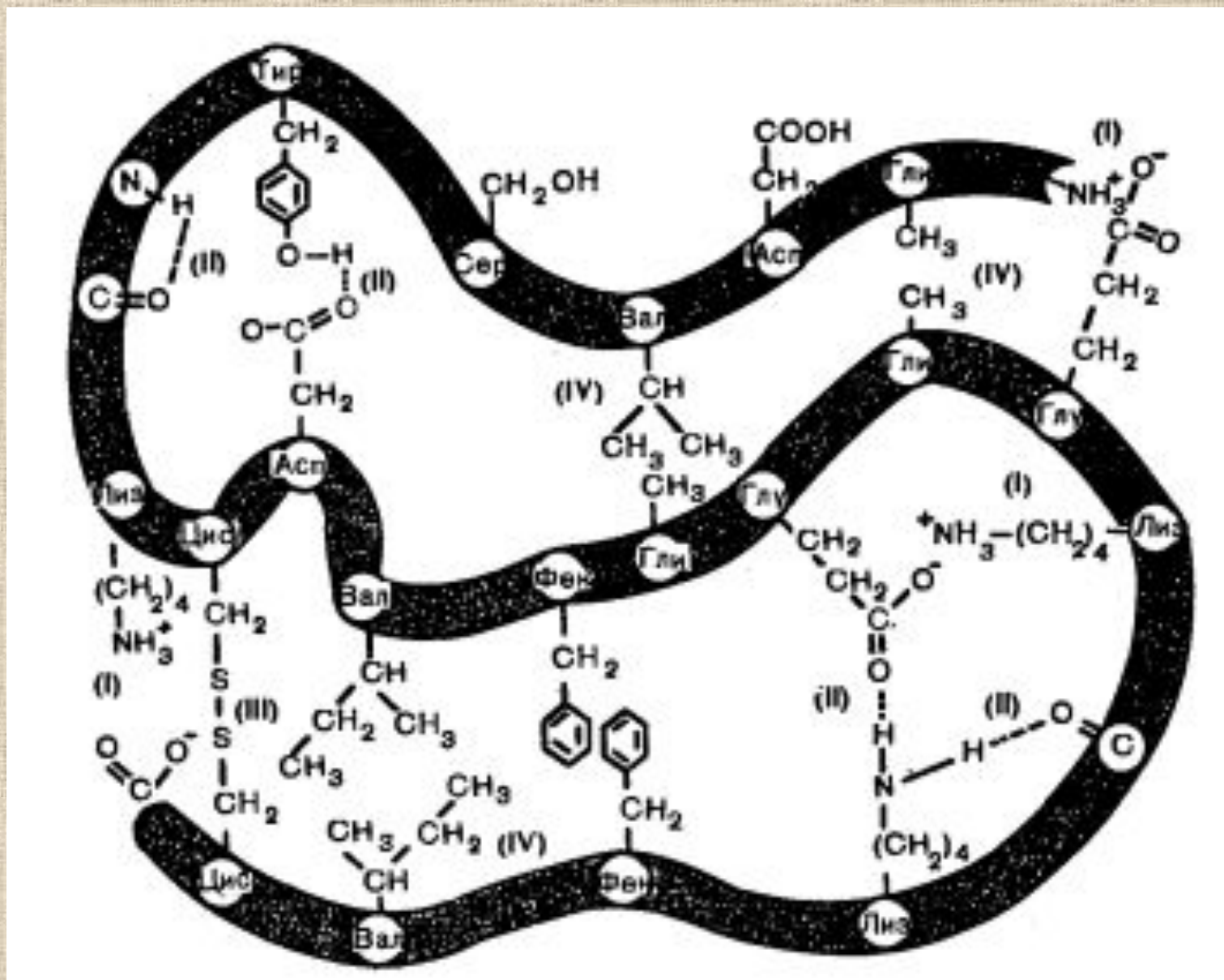
Вторичная структура полипептида



А-спираль

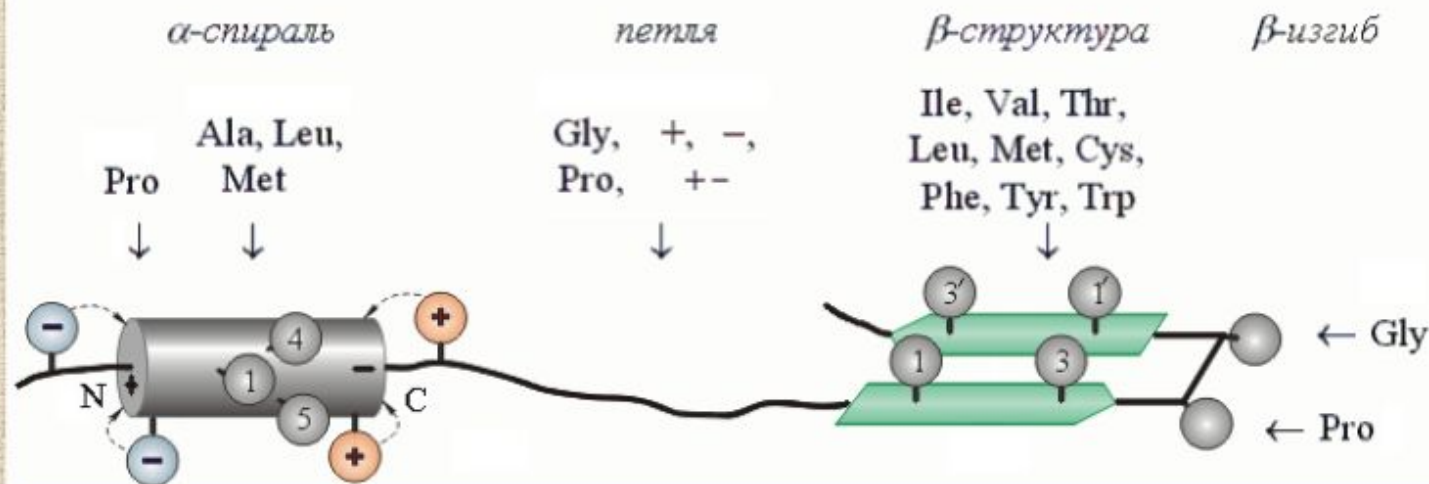


β – формы



Связи и взаимодействия, стабилизирующие пространственную структуру белков: I — ионная; II — водородная; III — дисульфидная; IV — область гидрофобных взаимодействий между неполярными группами.

Предсказание пространственной организации белков



Шаблоны α -спирали, петли, β -структуры и β -изгиба — те остатки, которые стабилизируют их или их отдельные части.

"+" означает все положительно заряженные аминокислоты,

"-" — все отрицательно заряженные,

"+ -" — все аминокислоты с диполем в боковой цепи.

Показан также стабилизирующий α - и β -структуру порядок чередования гидрофобных групп в цепи (см. нумерованные группы). Такого типа чередование приводит также к образованию гидрофобных и полярных поверхностей α а-спиралей и β -тяжей.



Предсказание пространственной организации белков

Метод физического моделирования

Поэтапная оценка взаимодействия валентно несвязанных атомов между собой и с растворителем

На первом этапе расчета – оценивают набор низкоэнергетических состояний свободных остатков.

Расчет низкоэнергетических состояний ди- и три-пептидов.

Конформационный анализ более сложных олигопептидов методом последовательного увеличения цепи на один остаток.

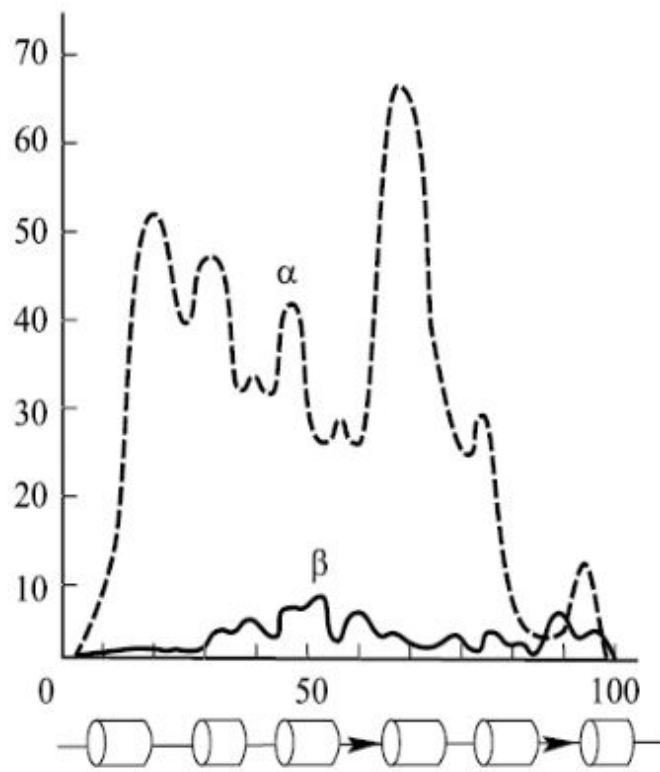


Рис. IX.15

Вторичная структура развернутой цепи кальций-связывающего белка мышц карпа на 1-й стадии самоорганизации (по О. Б. Птицыну, А. В. Финкельштейну, 1979)

Ось абсцисс — номера остатков в белковой цепи, оси ординат — вероятность α -спирального (пунктир) и β -структурного (сплошная линия) состояния для каждого остатка цепи. Внизу показана экспериментальная локализация α -спиралей (цилиндры) и β -участков (стрелки)



Состояние воды в биополимерах

Гидрофобные взаимодействия, определяющие общую топологию белковой молекулы, имеют чисто термодинамическую природу.

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S, \text{ где } \Delta S > 0.$$

Неполярные углеводороды, встраиваясь, повышают энтропию воды → выгодно.

$$\Delta U > |T\Delta S|.$$

Но замена водородных связей на ван-дер-ваальсовы → невыгодно.

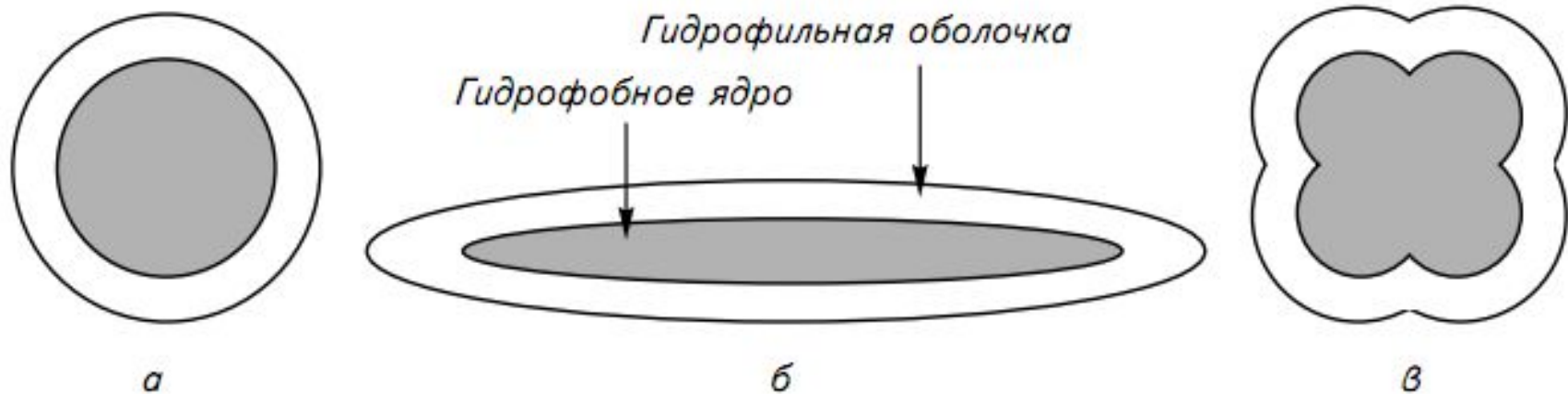
В целом ΔF повышается

Особенности взаимодействия макромолекул с водой:

А) Гидрофобные взаимодействия в целом стабилизируют макромолекулы.

Б) Молекулы воды распределены в глобуле неоднородно:

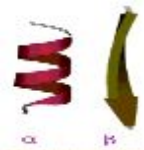
- Снаружи имеются локальные полярные центры гидратации, где молекулы сильнее связаны по сравнению с тонкой гидратной оболочкой на поверхности глобулы
- Около поверхности белка удерживается до 2-3 слоев воды
- Имеется фракция прочно связанной воды, которая фиксируется на малоподвижных элементах белковой структуры.



Различные формы белковой глобулы:

a — сфера ($b = b_s$); *б* — эллипсоид ($b > b_s$); *в* — надмолекулярные структуры ($b < b_s$)

Форма глобулы определяется соотношением числа полярных и неполярных аминокислотных остатков. Если в белке $b = b_s$ (где b — отношение числа полярных остатков к неполярным; b_s — отношение объема гидрофильной фазы к объему гидрофобного ядра), то глобула будет стремиться образовать сферу. При $b > b_s$, то есть полярных остатков больше, чем необходимо, чтобы покрыть сферическое гидрофобное ядро, глобула примет вытянутую форму. При $b < b_s$ полярных остатков не хватает и части гидрофобного ядра приходится контактировать с водой. Во избежание этого несколько таких молекул образуют комплекс друг с другом. На рис. 6.4.9 приведены возможные формы белковых глобул в зависимости от параметра b .



Теоретические методы изучения структуры ДНК

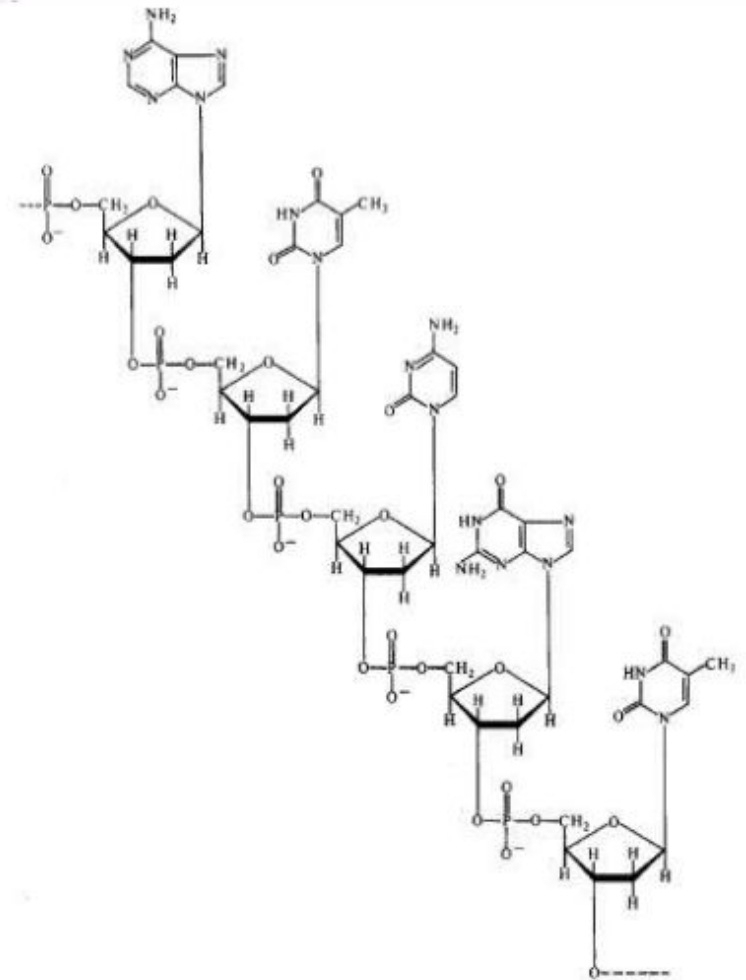
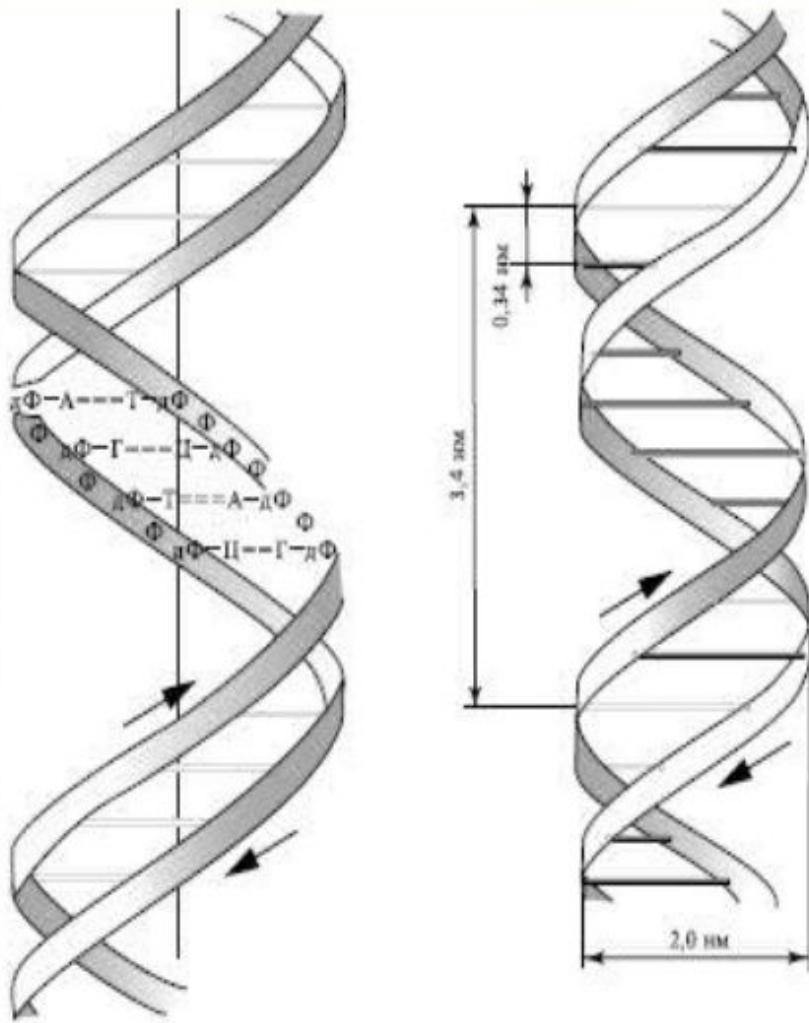
Методы построения упрощенных физических моделей, основанные на экспериментальных данных и отражающие совокупность свойств целостной молекулы ДНК

- Модель гибкого стержня
- Модель спираль-клубок

Методы конформационного анализа и квантовой химии

Учитывают, что двойная спираль ДНК, обладая общей жесткостью по длине спирали, представляет собой вместе с тем своего рода шарнирное устройство (степени свободы вокруг единичных химических связей).

Пространственная организация нуклеиновых кислот

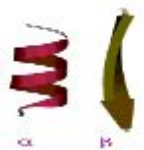


A

B

B

Рис. IX.16
Строение ДНК. А, Б — двойная спираль, В — участок цепи ДНК



❖ Описание цепи ДНК – 6 углов

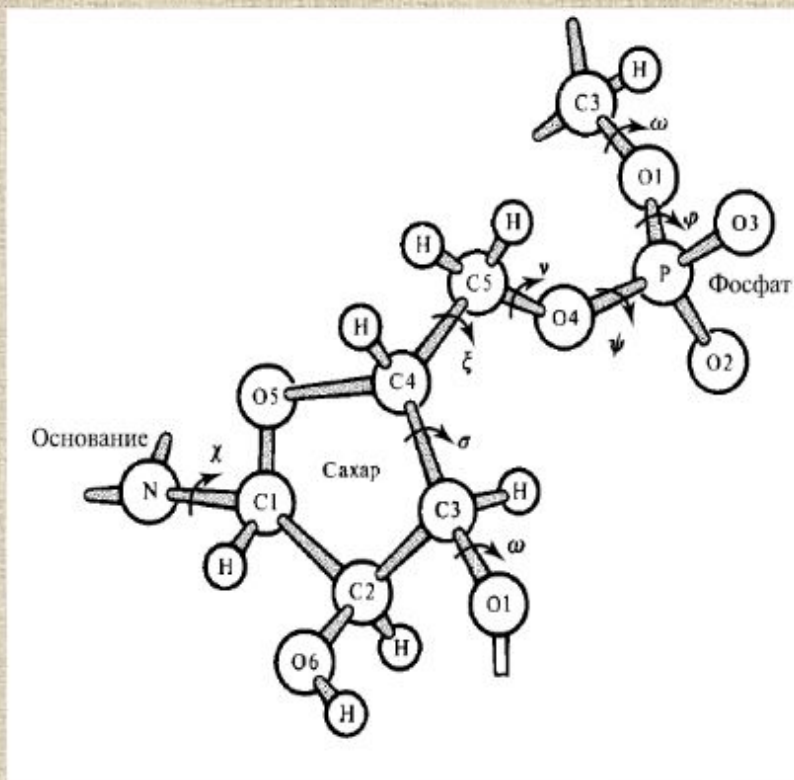


Рис. IX.18

Обозначения атомов и двугранных углов повторяющейся единицы сахарофосфатной цепи

Конформация мономера нуклеиновой кислоты задается конформацией сахарного кольца, пятью углами вращения вокруг единичных связей в сахарофосфатной цепи $\xi, \nu, \phi, \omega, \theta$. одним углом χ (N-C1, гликозидная связь), определяющим ориентацию основания относительно сахарного кольца

Число степеней свободы для цепи ДНК на порядок больше, чем для полипептида

❖ Описание цепи ДНК – 6 углов и 5 параметров

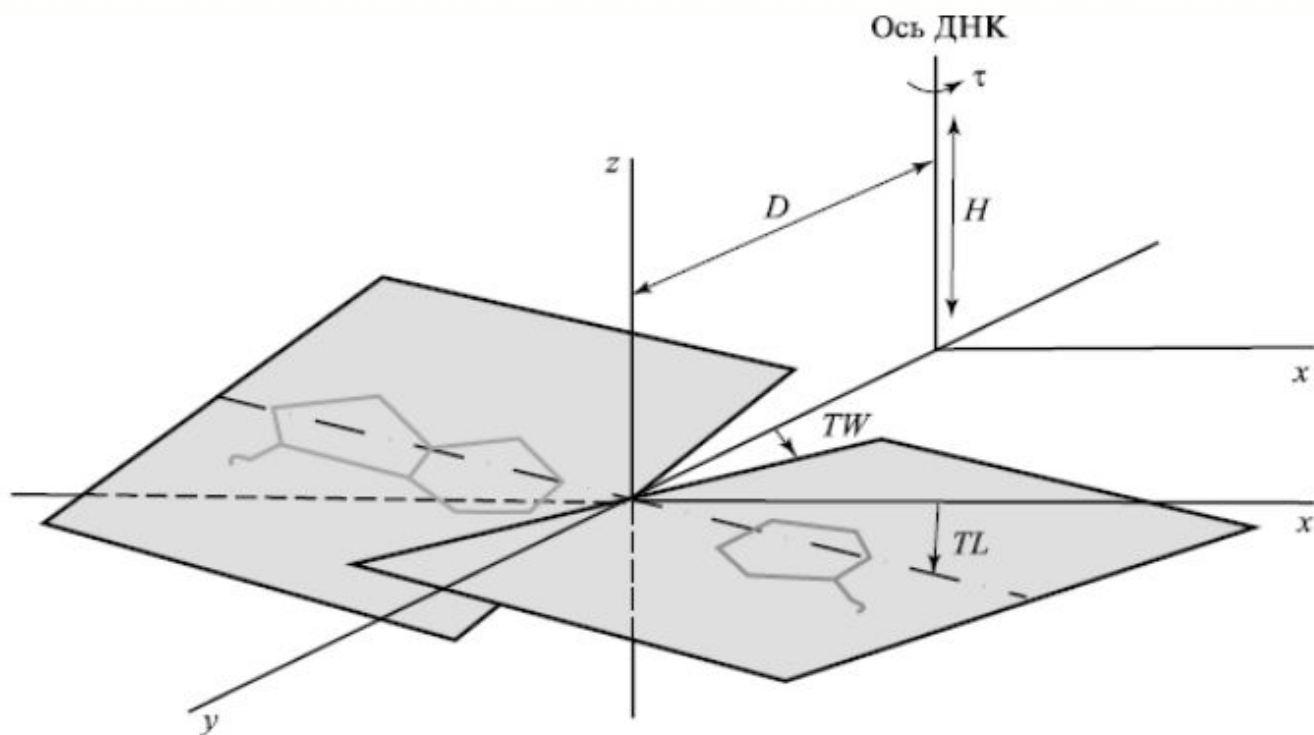


Рис. IX.19

Пять параметров Арнотта, задающих расположение оснований в регулярной двойной спирали: поворот пар τ , расстояние от оси спирали D , наклон TL , «пропеллер» оснований в паре TW , проекция повторяющейся единицы на ось спирали H по В. И. Иванову, 1980)

Число степеней свободы для цепи ДНК на порядок больше, чем для полипептида



Пространственная организация нуклеиновых кислот

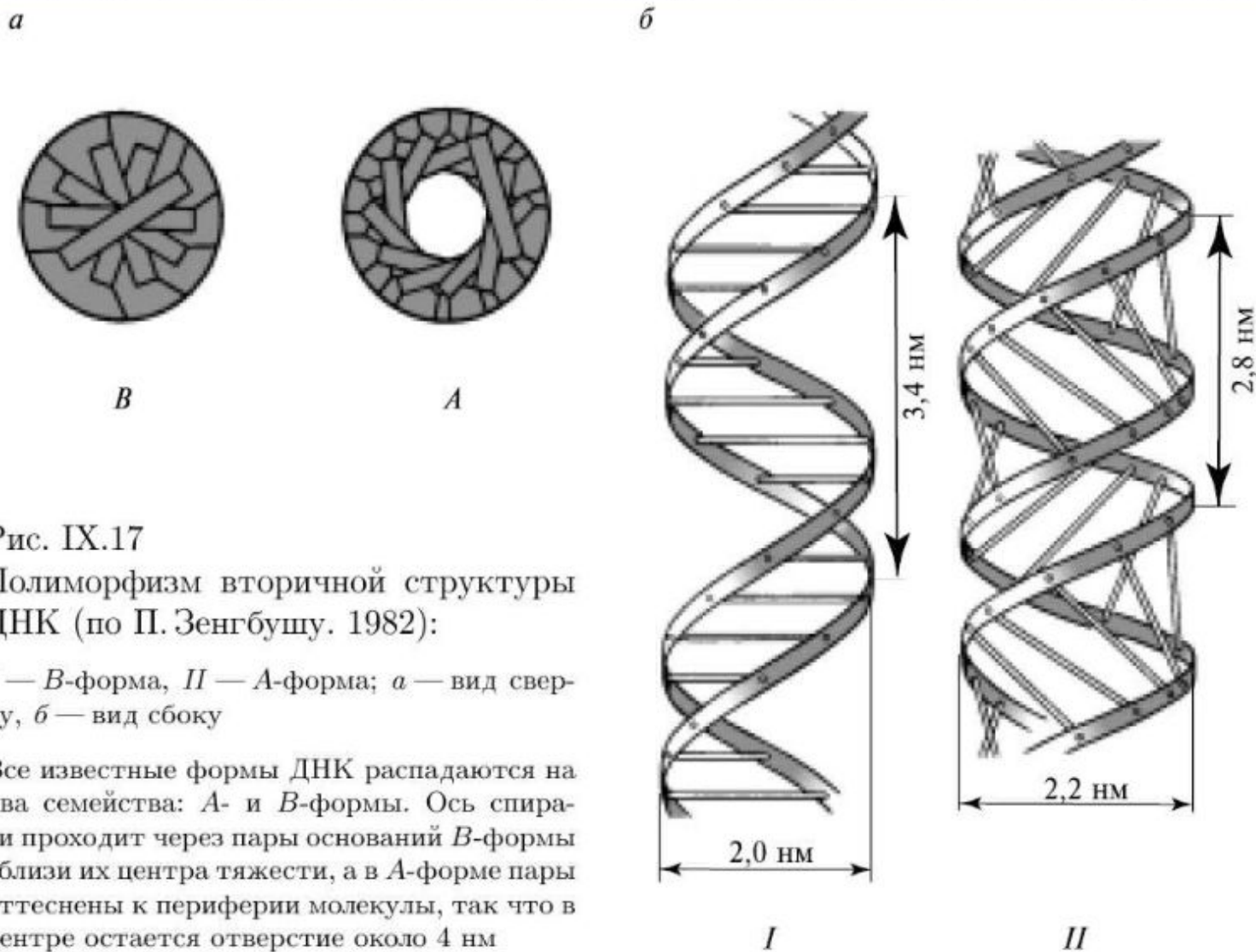


Рис. IX.17

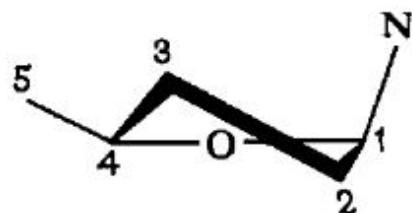
Полиморфизм вторичной структуры ДНК (по П. Зенгбушу. 1982):

I — *B*-форма, *II* — *A*-форма; *a* — вид сверху, *б* — вид сбоку

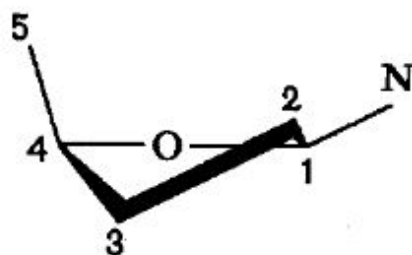
Все известные формы ДНК распадаются на два семейства: *A*- и *B*-формы. Ось спирали проходит через пары оснований *B*-формы вблизи их центра тяжести, а в *A*-форме пары отеснены к периферии молекулы, так что в центре остается отверстие около 4 нм

❖ Основная причина различий А и В-форм ДНК – альтернативная геометрия сахарного кольца

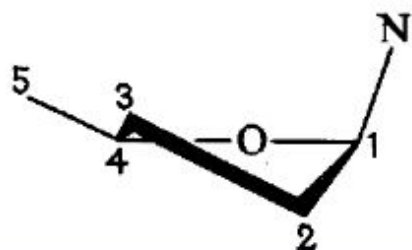
С3-эндо



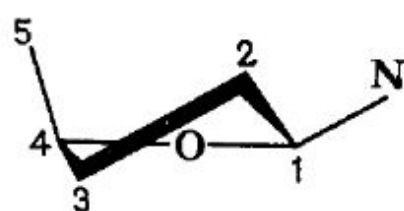
С3-экзо



С2-экзо



С2-эндо



Четыре наиболее устойчивые конформации сахарного кольца в нуклеотиде (по В. И. Иванову, 1980)

В В-формах присутствует С2-эндо- (С3-экзо) сахар; в А-формах — С3-эндо. При изменении геометрии сахара от С2-эндо (S-тип) к С3-эндо (N-тип) связи С4-С5 и N-С1, занимающие вначале почти экваториальное и меридиональное положения соответственно меняют свою ориентацию на противоположную.

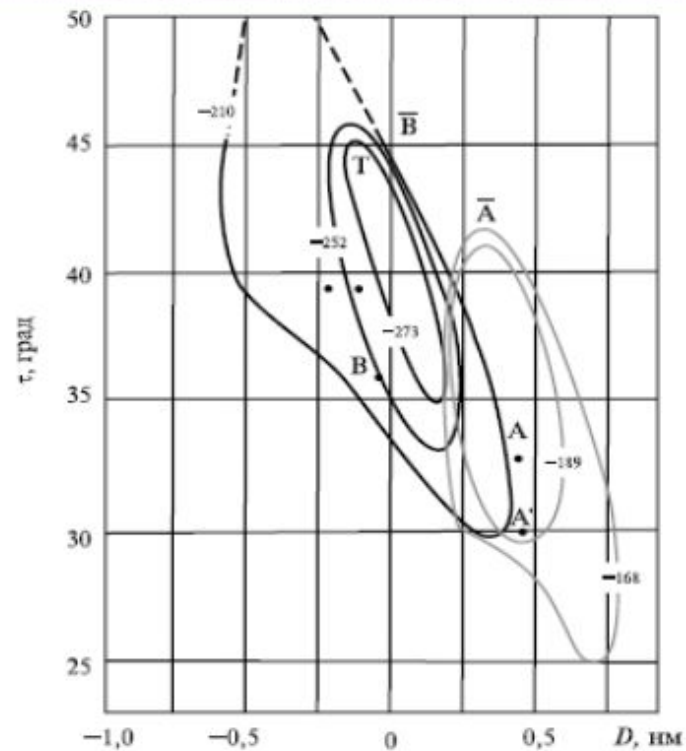


Рис. IX.21

Карта (D, τ) для канонических семейств спиралей нуклеиновой кислоты (по В. И. Иванову, 1980)

Черными линиями обозначены семейства форм с C2-эндо-сахарами (B-форма), цветными линиями — с C3-эндо-сахарами (A-форма). Линии уровней маркированы величинами энергии в кДж/моль. Верхние части некоторых «оврагов» изображены точками, чтобы выделить области, в пределах которых спирали имеют очень узкий сахарный желоб (тот, в который входят гликозидные связи)



Вопросы для самоконтроля по теме

1. Что такое «карта Рамачандрана»?

2. Какова причина наличия «запрещенных зон» на картах Рамачандрана?

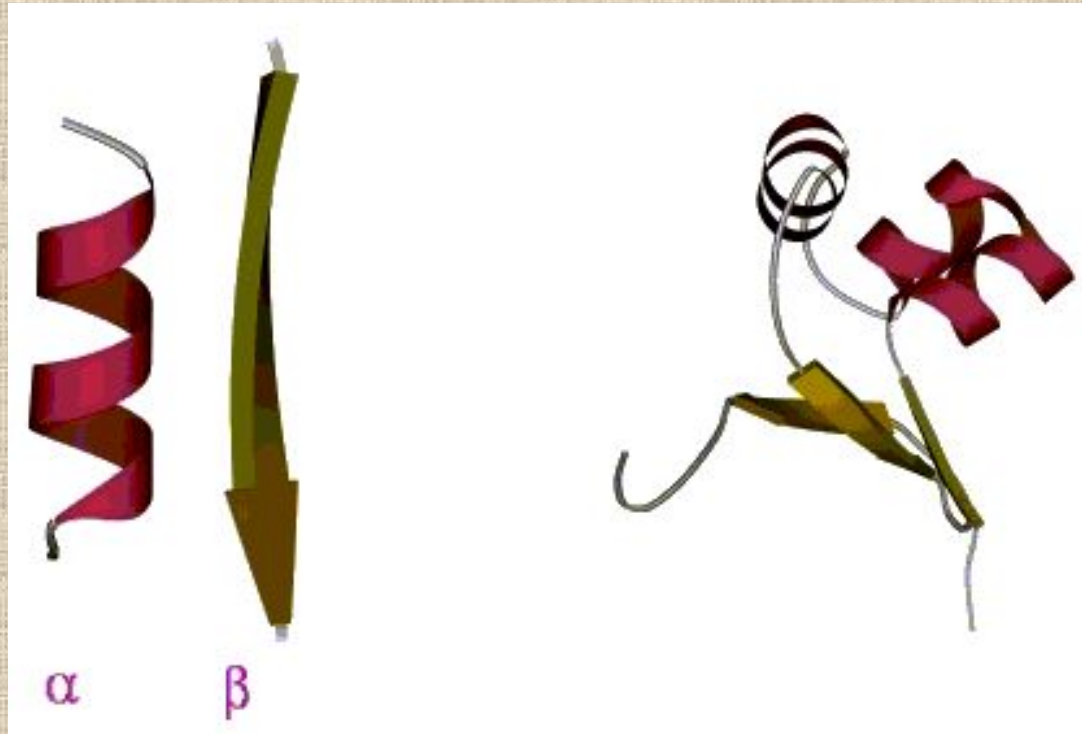
3. Какие существуют методы для предсказания вторичной и третичной структуры полипептида по первичной последовательности аминокислот?

4. Что такое шаблон α -спирали, петли, β -структуры?

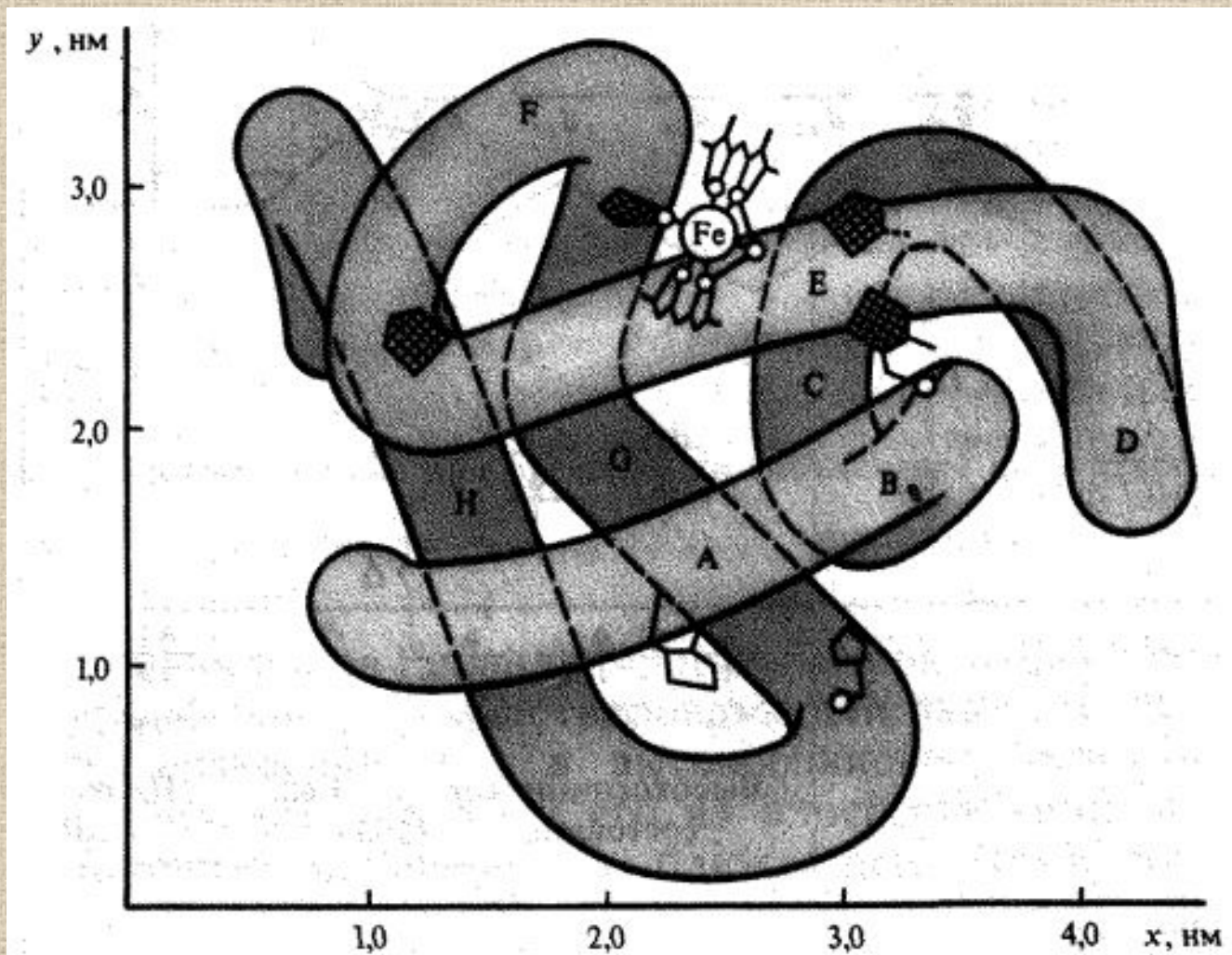
5. Чем различаются вторичные структуры А и В форм ДНК?
В чем причина различий?

5. Какие параметры используют для описания пространственной структуры ДНК?

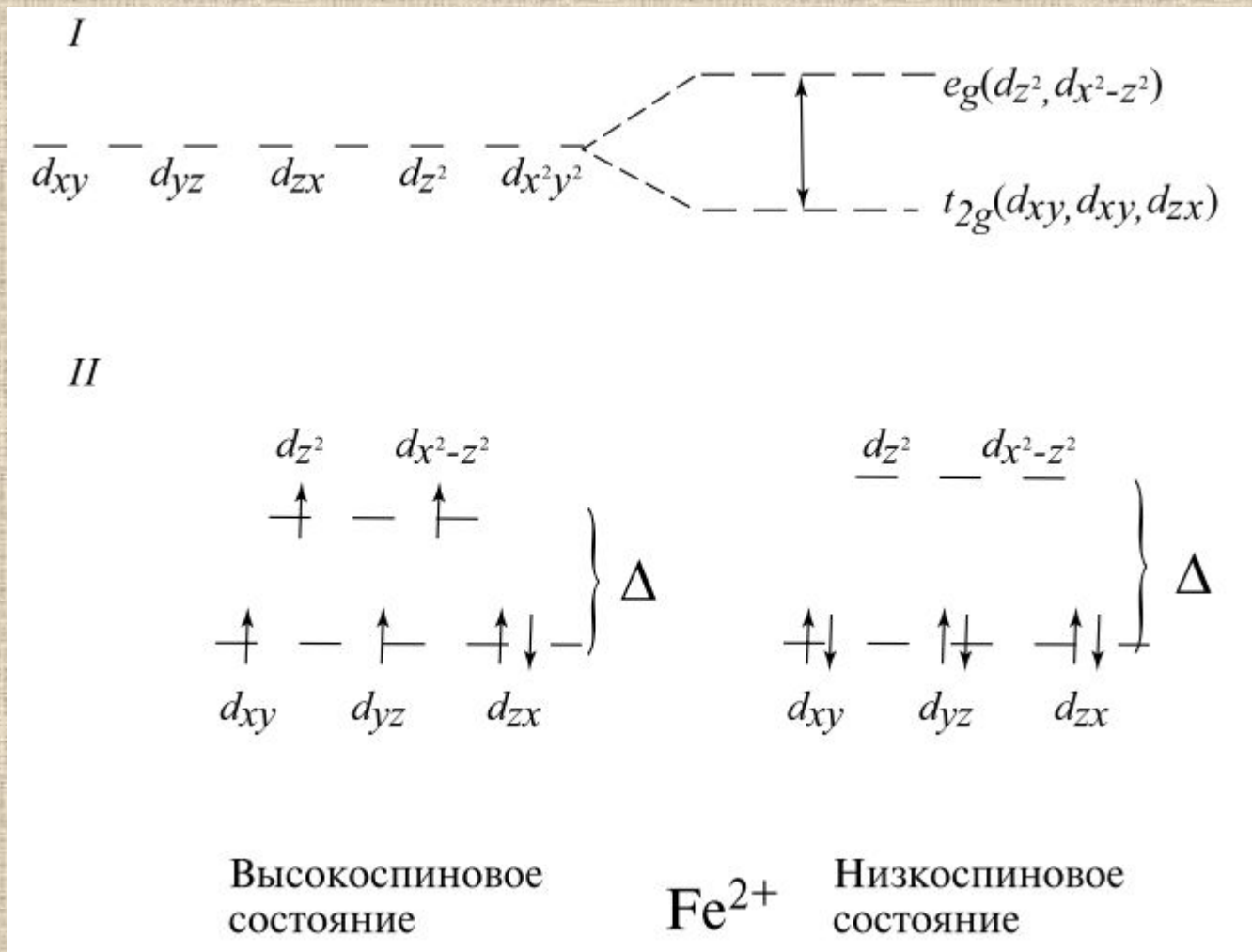
Раздел: Молекулярная биофизика



**Тема: Динамика
биополимеров**

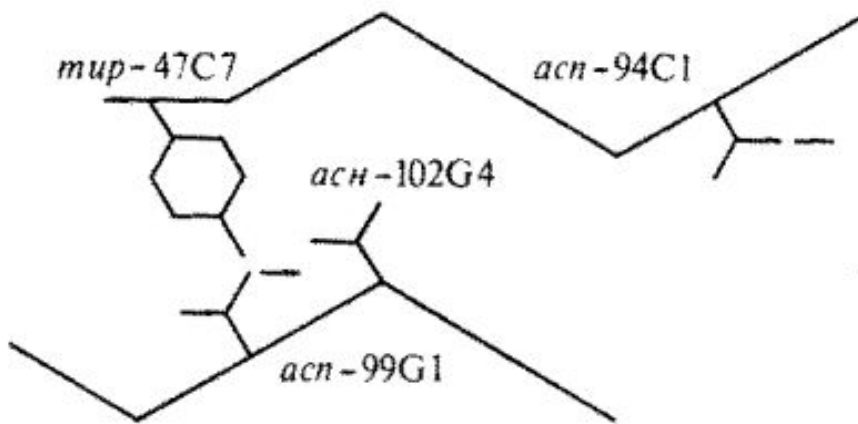


Пространственная структура миоглобина (кашалота) в проекции xy
Миоглобин (переносчик кислорода в мышцах) содержит один гем и одну полипептидную цепь, включающую 153 остатка, которые распределены в основном по 8 α -спиральным участкам (А — Н). Гем, в центре которого расположен атом Fe, находится между спиралями Е и F.



Расщепление d-орбиталей в октаэдрическом комплексе (I): и распределение d-электронов по орбиталям высокоспинового (расщепление Δ мало) и низко спинового (расщепление Δ велико) состояний иона Fe^{2+} (II)

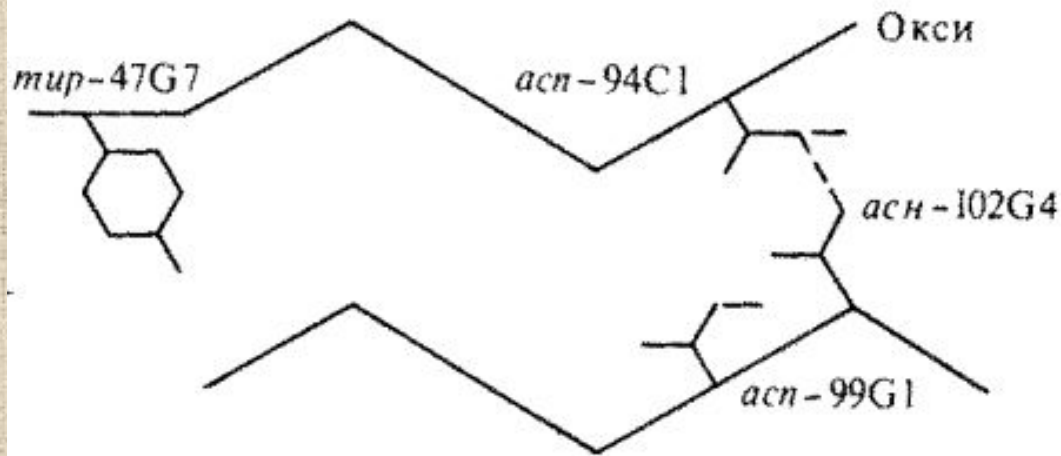
α – Субъединица



β – Субъединица

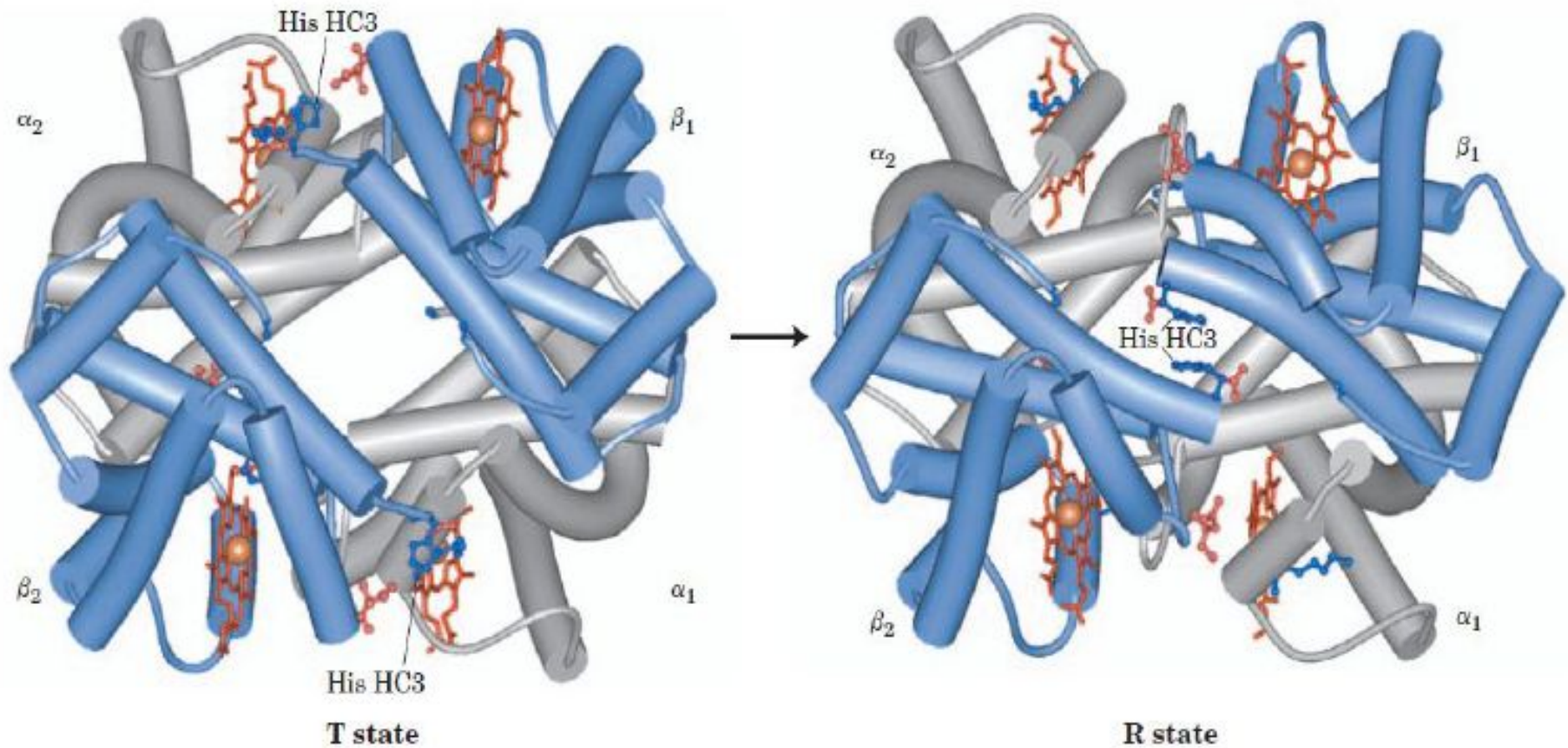
Структурные изменения, происходящие в гемоглобине при оксигенации (объяснение см. в тексте) (по Д. Мецлеру, 1980)

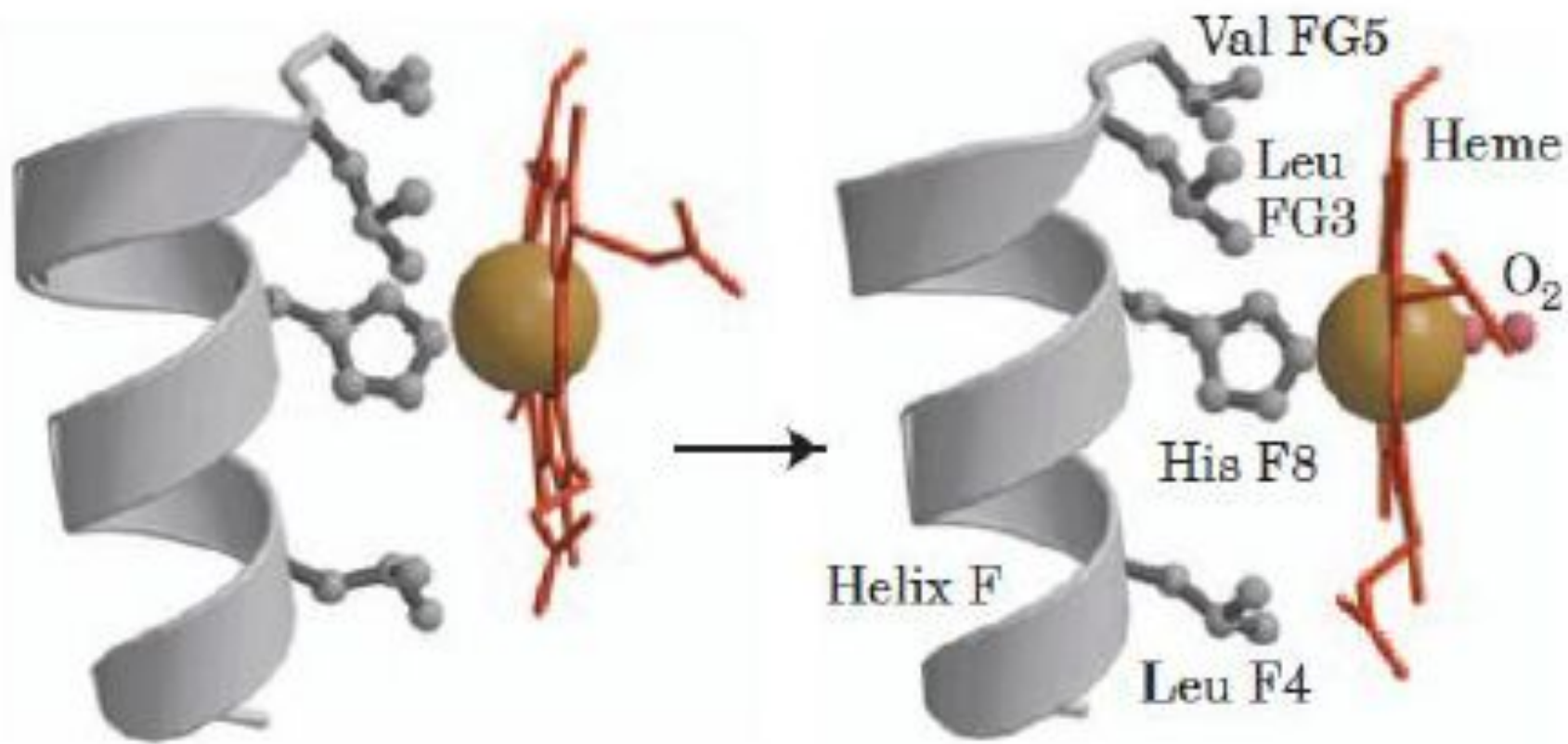
α – Субъединица



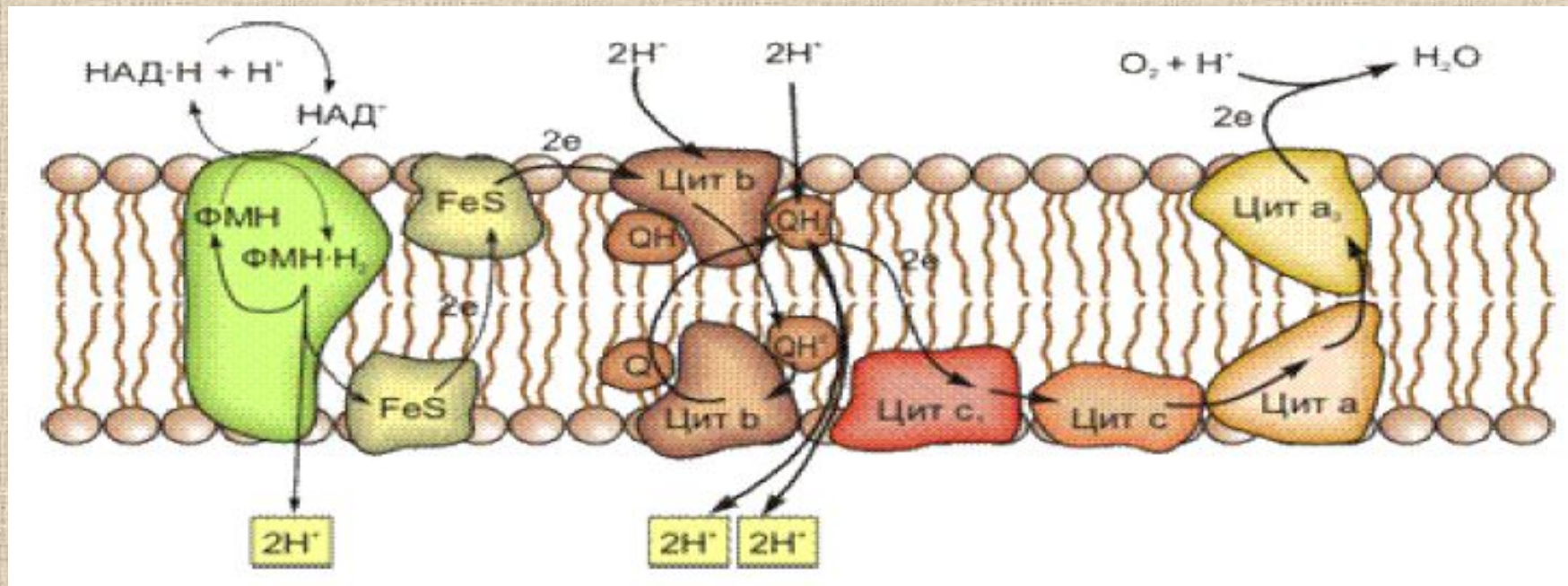
β – Субъединица

Переход из Т в R форму у гемоглобина



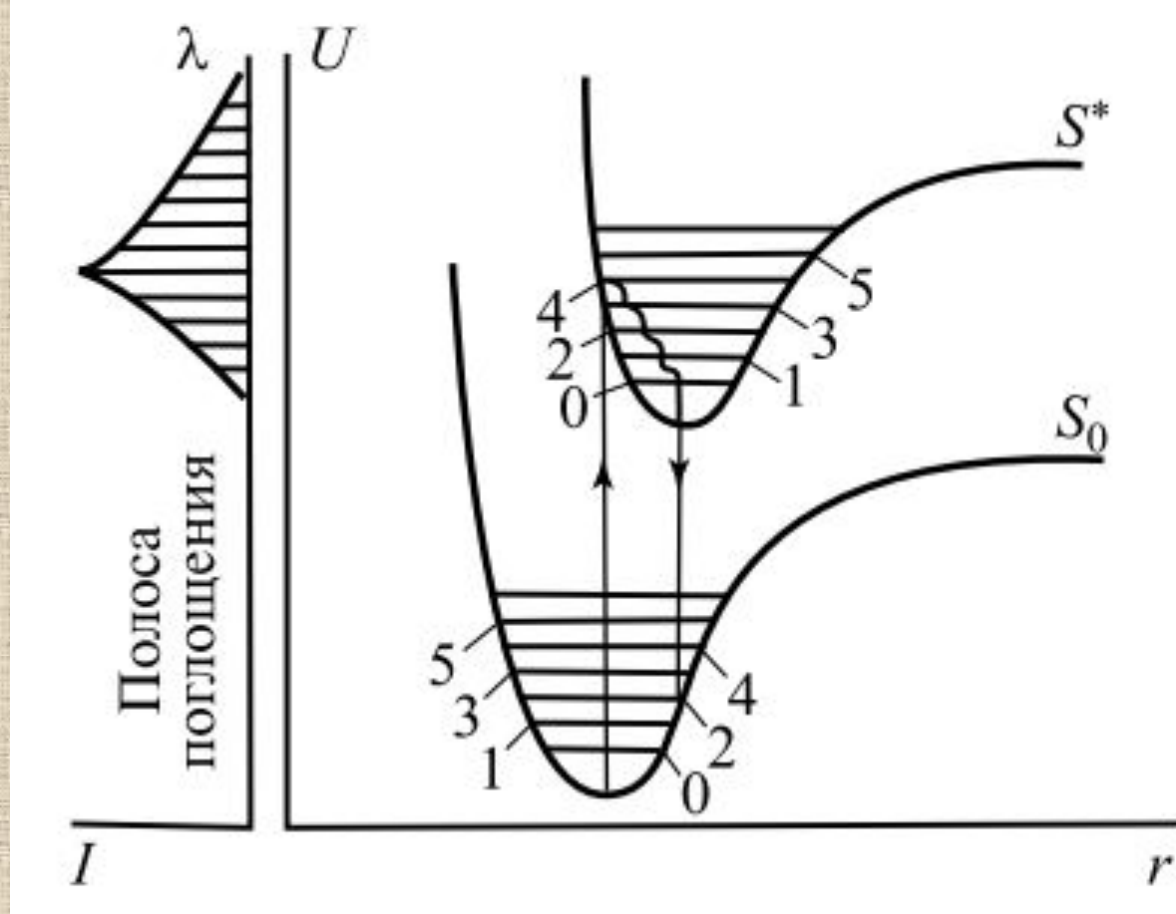


Туннельный перенос электрона в биоструктурах



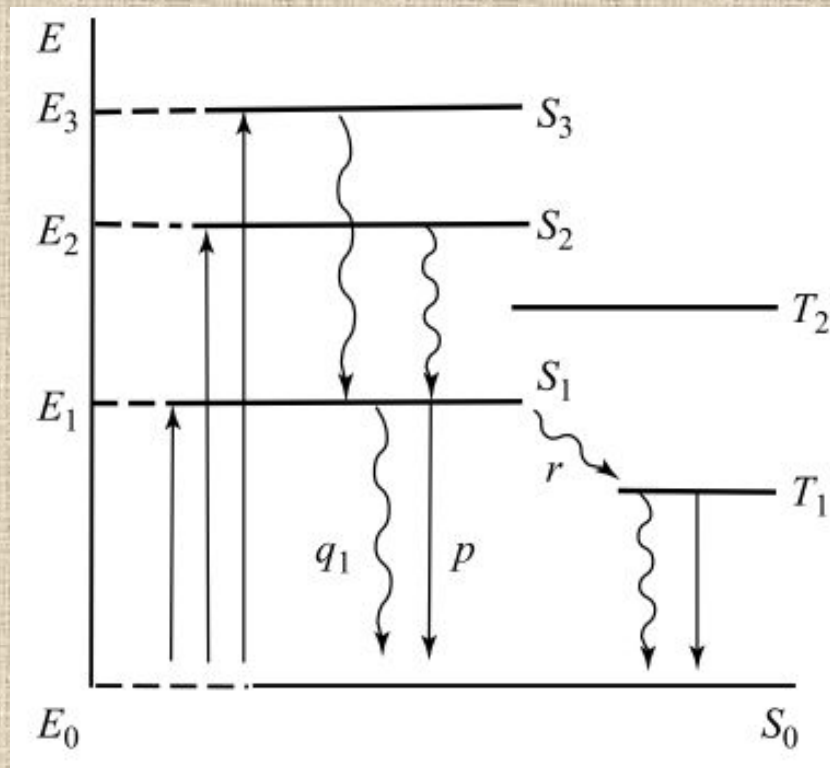
Методы изучения подвижности белков

- Люминесцентные методы
- ЭПР
- ЯМР
- ЯГР спектроскопия
- Метод изотопного обмена



Кривые потенциальной энергии основного (S_0) и синглетного возбужденного (S^*) состояний двухатомной молекулы:

U — потенциальная энергия; r — межъядерное расстояние; I — интенсивность поглощения; λ — длина волны; 0-5 — колебательные подуровни ядерных состояний



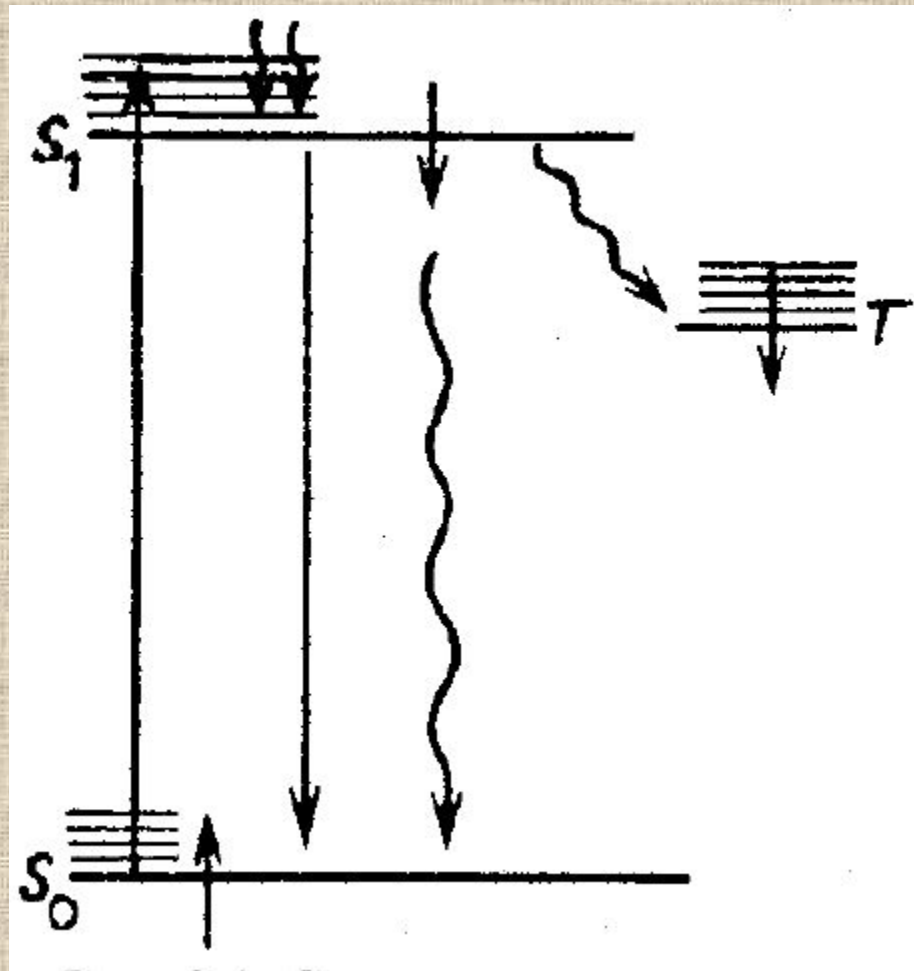
Электронные уровни органической молекулы и переходы между ними (схема Яблонского): p — вероятность переходов в единицу времени на основной уровень с испусканием флуорисценции, q_i — то же, без излучения; r — вероятность конверсии и триплетное состояние.

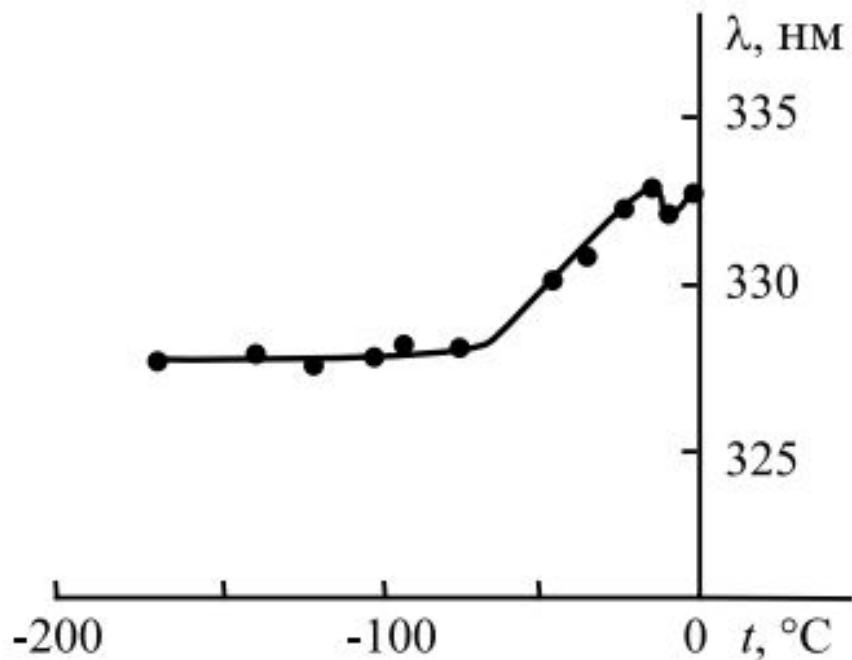
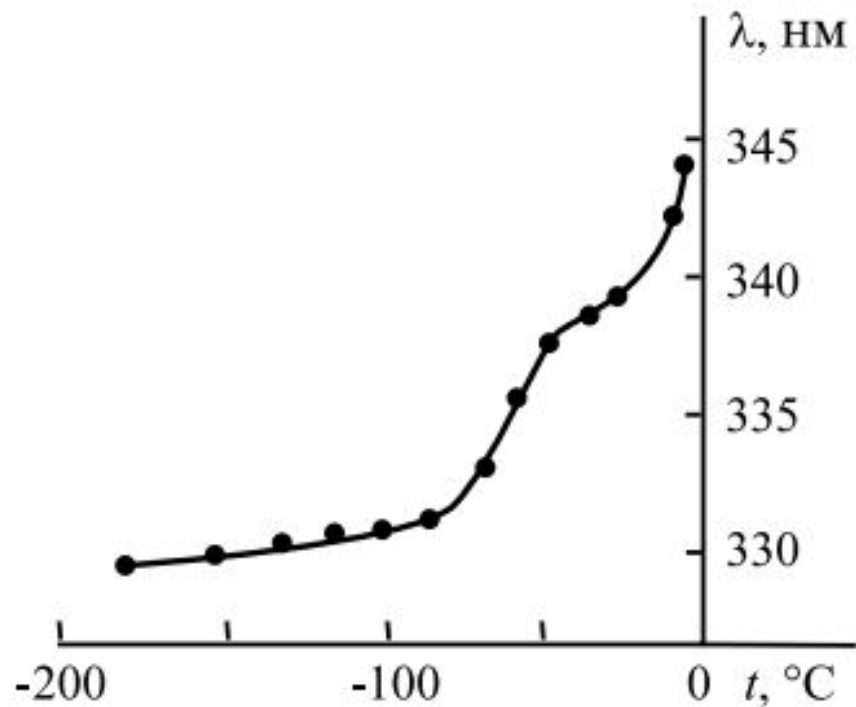
Молекула обладает системой триплетных T_1, T_2, \dots и синглетных возбужденных уровней S_1, S_2, \dots, S_n . При переходе на один из высших возбужденных синглетных уровней избыток энергии быстро (10^{-12} с) диссипирует; молекула попадает на низший возбужденный синглетный уровень S_1 , с которого и происходит переход ($S_1 \rightarrow S_0$) или внутримолекулярная конверсия ($S_1 \rightarrow T_1$). Суммарная вероятность (P) дезактивации определяется суммой величину, q_i, r :

$$P = p + q_i + r$$

Люминесцентные методы

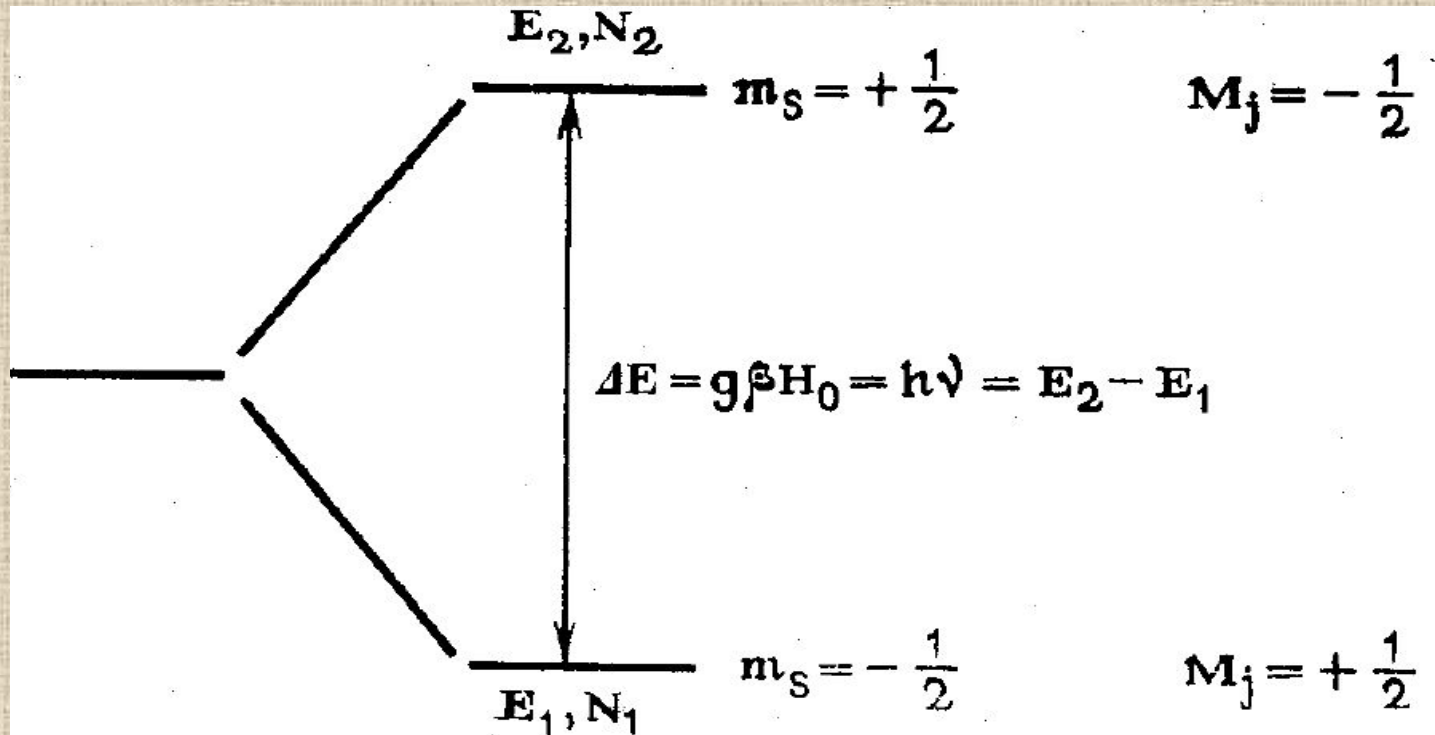
- Измерение внутримолекулярной подвижности белка по зависимости положения максимума люминесценции метки, введенной в белок, либо собственной люминесценции триптофана белка от температуры
- Характеристика подвижности окружения метки
- $t = 10^{-2} - 10^{-6}$ с
- $\tau = 10^{-1} - 10^{-2}$ с
- $\tau^* = 10^{-8} - 10^{-9}$ с



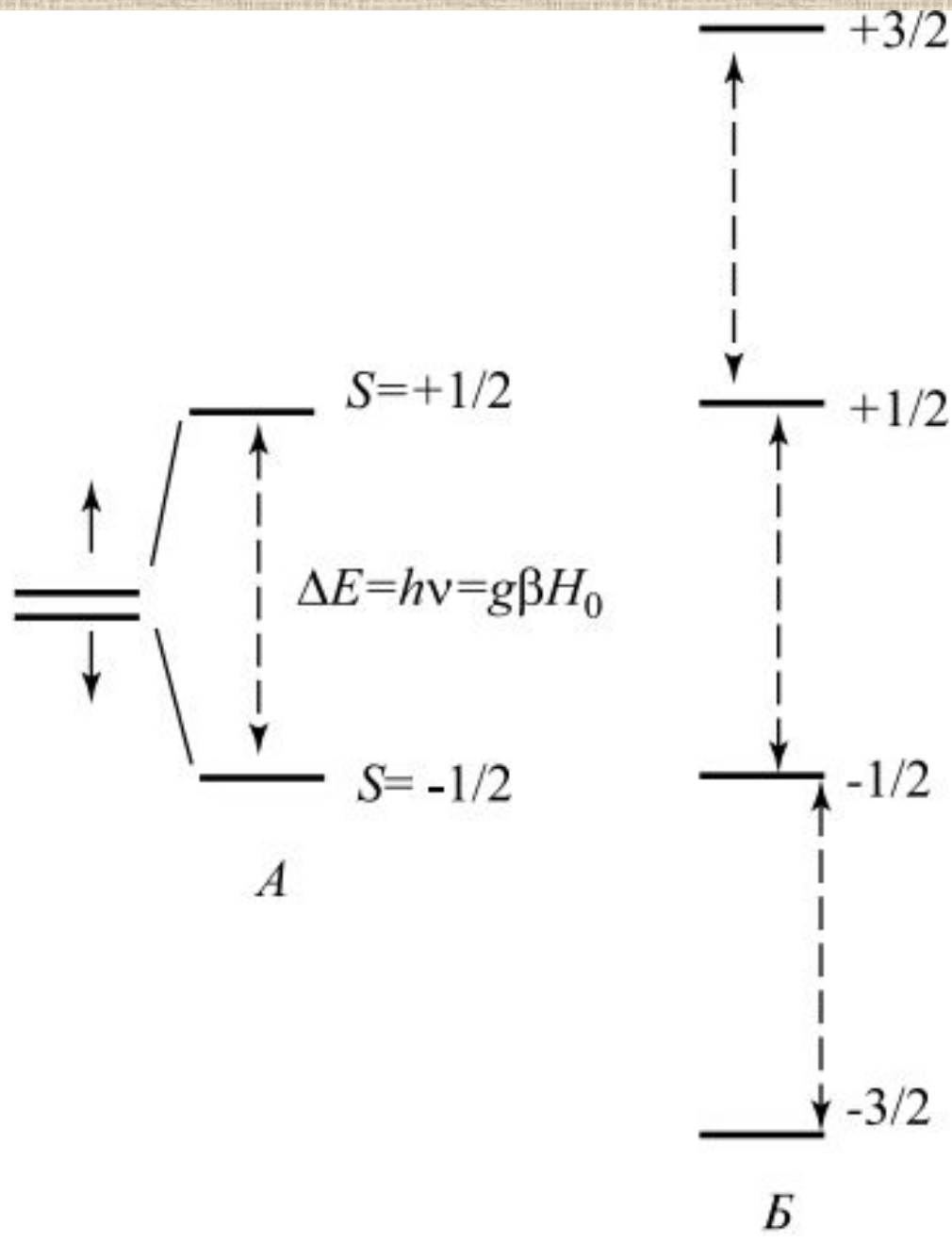
I*II*

Зависимость положения спектра флуорисценции водного раствора (3-лактоглобулина (I) и нейротоксина II кобры (II) от температуры при рН 6,5 (по Е. А. Пермякову, 1977)

Методы радиоспектроскопии ЭПР и ЯМР

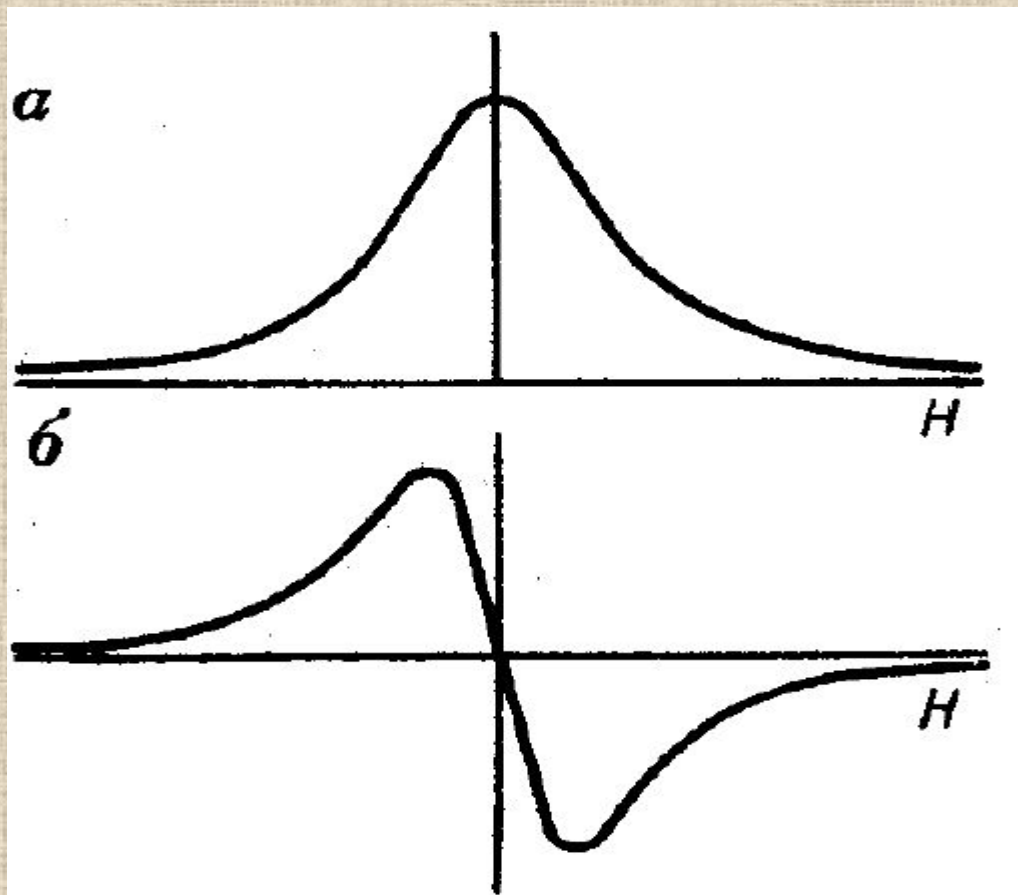


Расщепление энергетических уровней
электрона (протона) в магнитном поле (H)



Энергетические уровни электрона в магнитном поле. А — один электрон (спин $1/2$); Б — три электрона (максимальное значение спина $3/2$;

Линия поглощения СВЧ- а) поля б) ее первая производная



Ось абсцисс — величина постоянного магнитного поля H , которая плавно меняется при постоянной частоте СВЧ-поля до достижения значений, соответствующих условию резонансного поглощения

Линия резонанса ЭПР

- Ширина: $\Delta H \cong \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2}$
- T_1 – время передачи энергии окружающей среде
- T_2 – время спин-спинового взаимодействия

Для свободных радикалов: $T_1 \gg T_2$
$$\Delta H \cong \frac{1}{T_2}$$

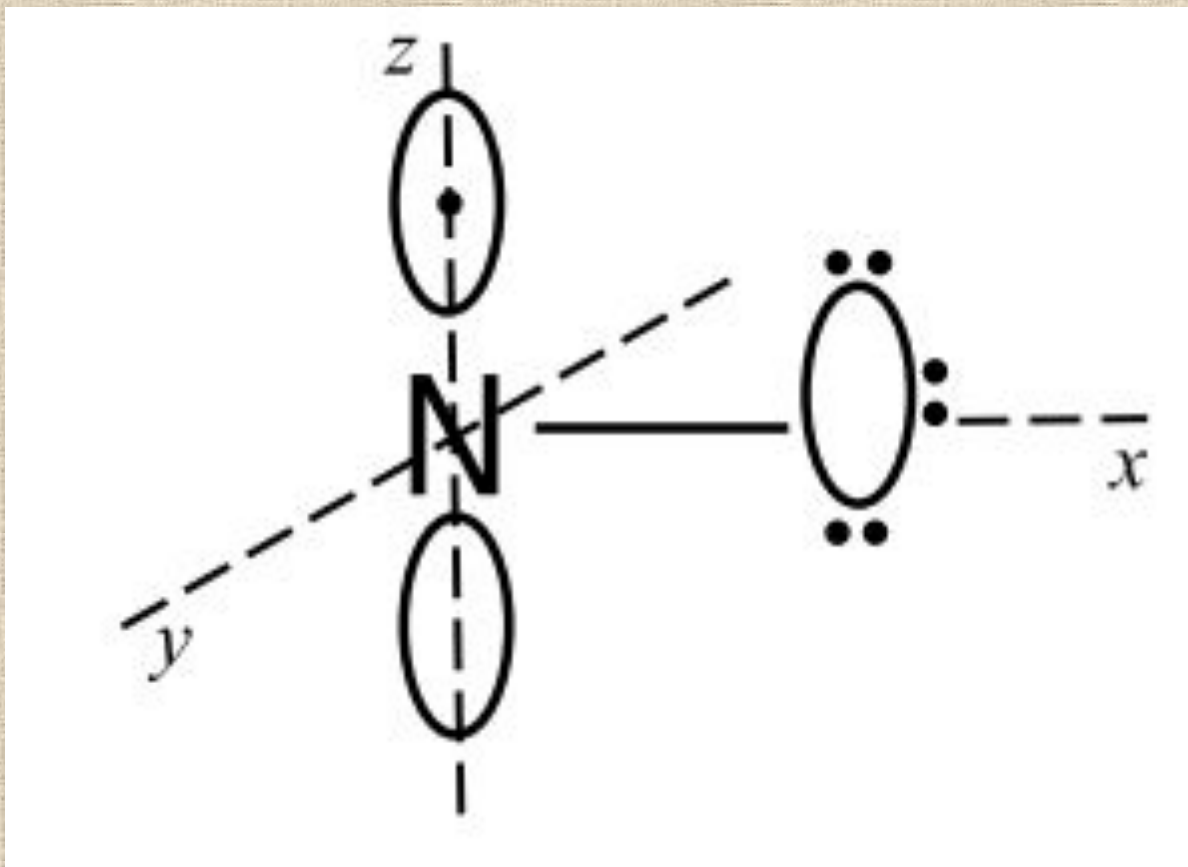
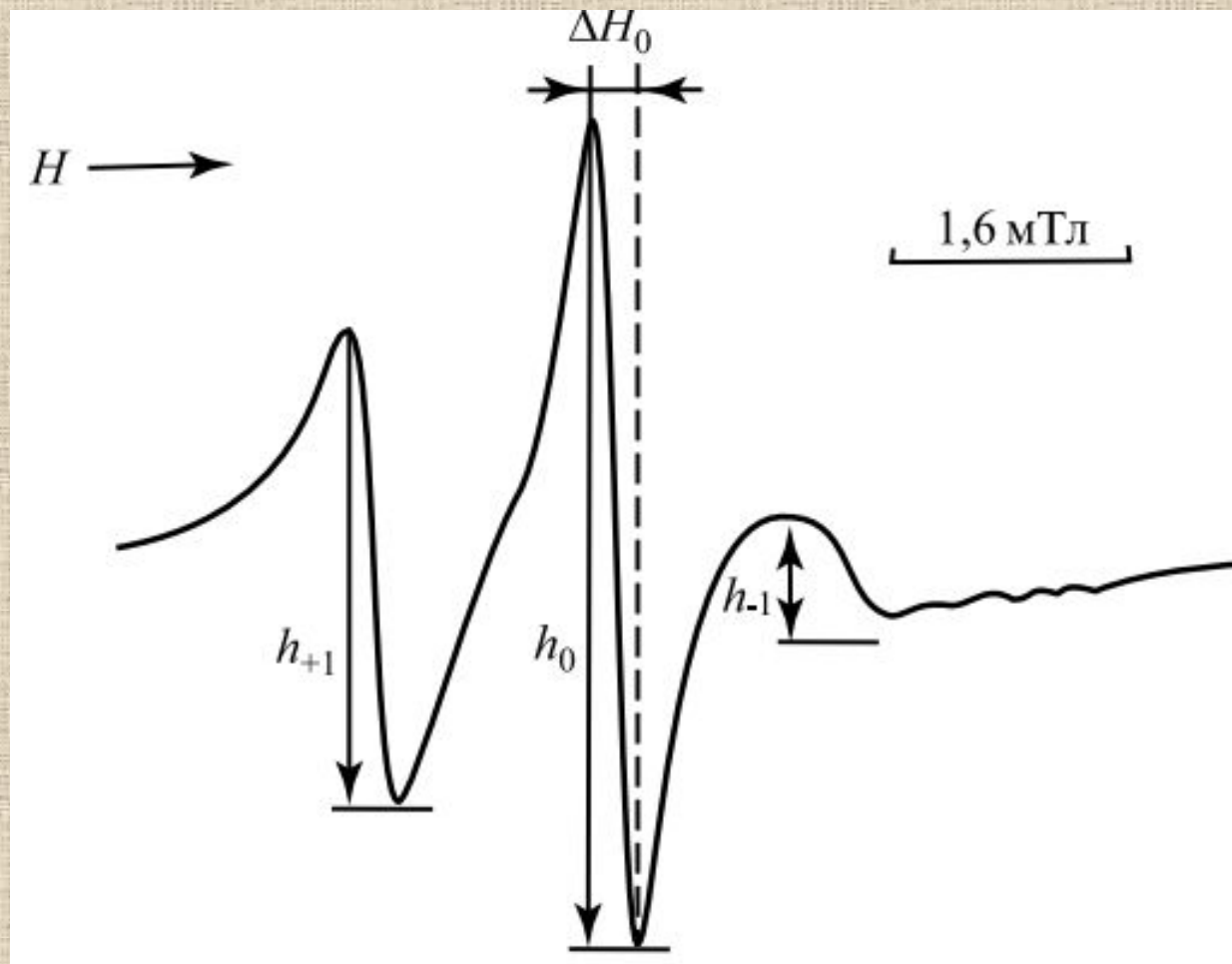


Схема парамагнитного фрагмента
нитроксильного радикала



Спектр ЭПР парамагнитной метки, присоединенной к *guc*-15 лизоцима (рН 7,0; $t=26^\circ\text{C}$) (по Г.И. Лихтенштейну, 1971):

h_{-1} , h_0 , h_{+1} — интенсивность компонентов, соответствующих $M = -1; 0; +1$; ΔH_0 — ширина центрального компонента

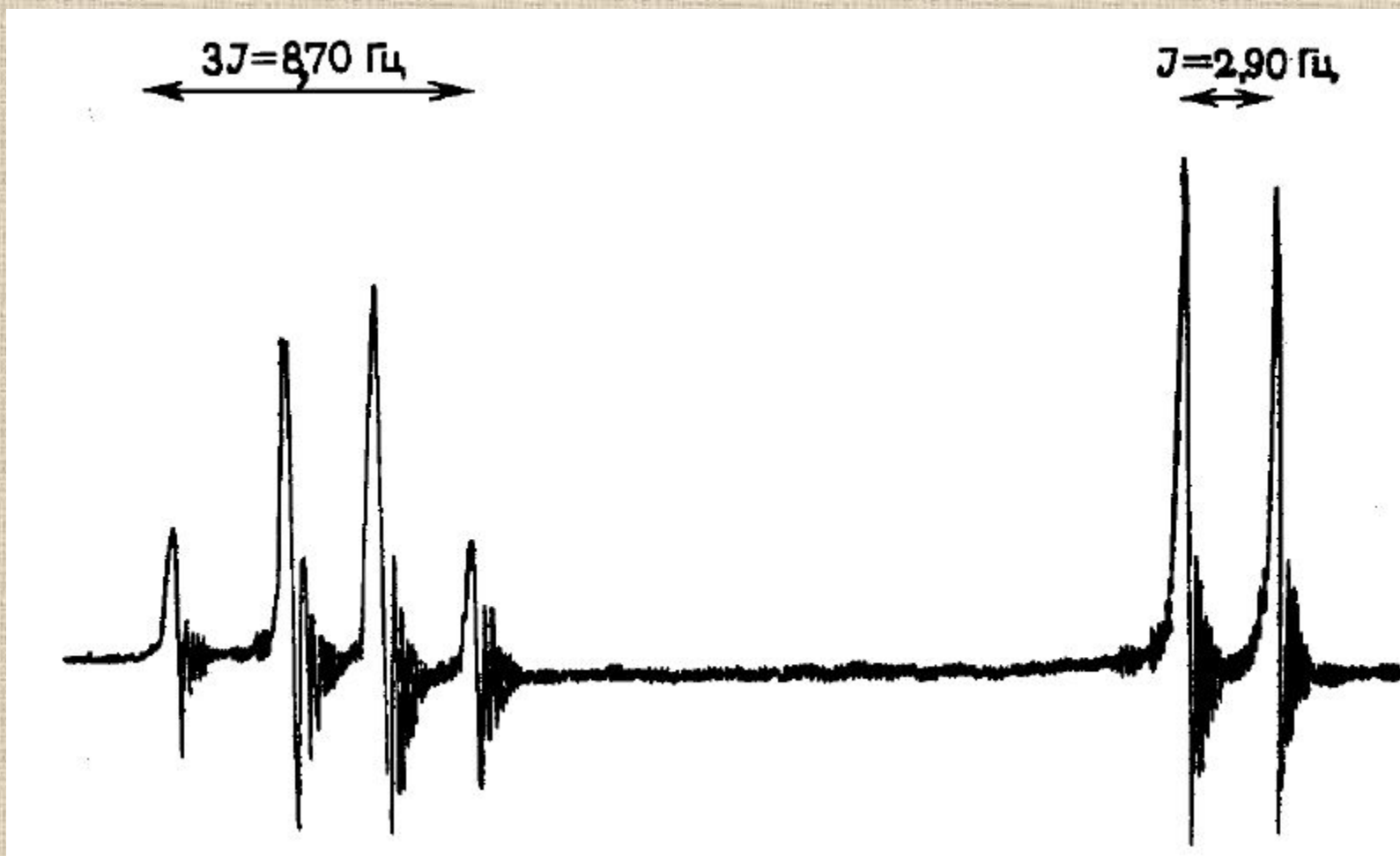
ЯМР-спектроскопия

- Измерение времени релаксации T_1 и T_2 по ширине линии резонанса.
- Определение времени вращения метки, на которой наблюдается резонанс
- Оценка подвижности белковых структур в состав которых входят «резонирующие» протоны
- Изучение некоторых видов внутримолекулярного движения в белках
- Информация о химической структуре молекулы

Спектр ЯМР ацетальдегида



по А.Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970



CHO

химический сдвиг

ЯГР спектроскопия

- Дает информацию не только о временных, а также амплитудных характеристиках движений в белке (средние величины смещений атомов в структуре белка за $t=10^{-7}-10^{-9}$ с)

Основан на резонансном поглощении γ -квантов тяжелым ядром атома

Эффект Мёссбауэра

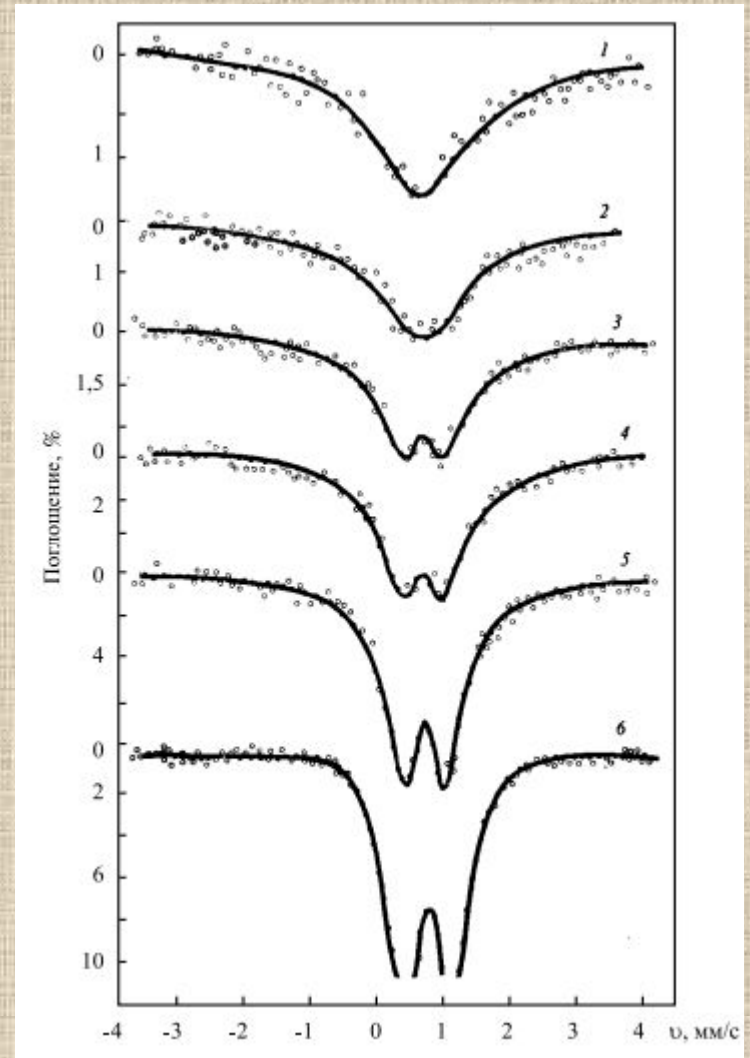
Эффект Мёссбауэра

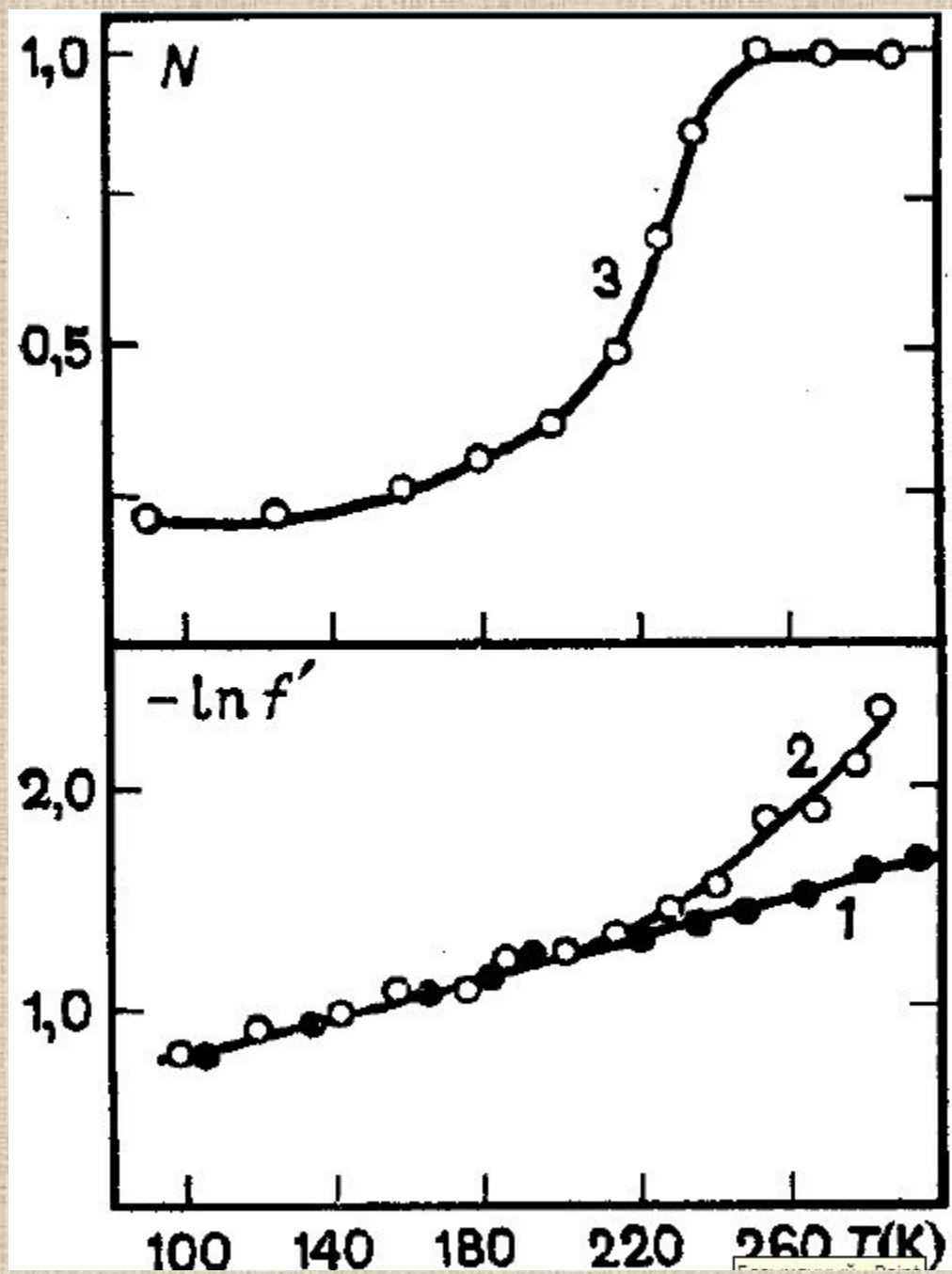
$$f' = e^{-x^2/\lambda}$$

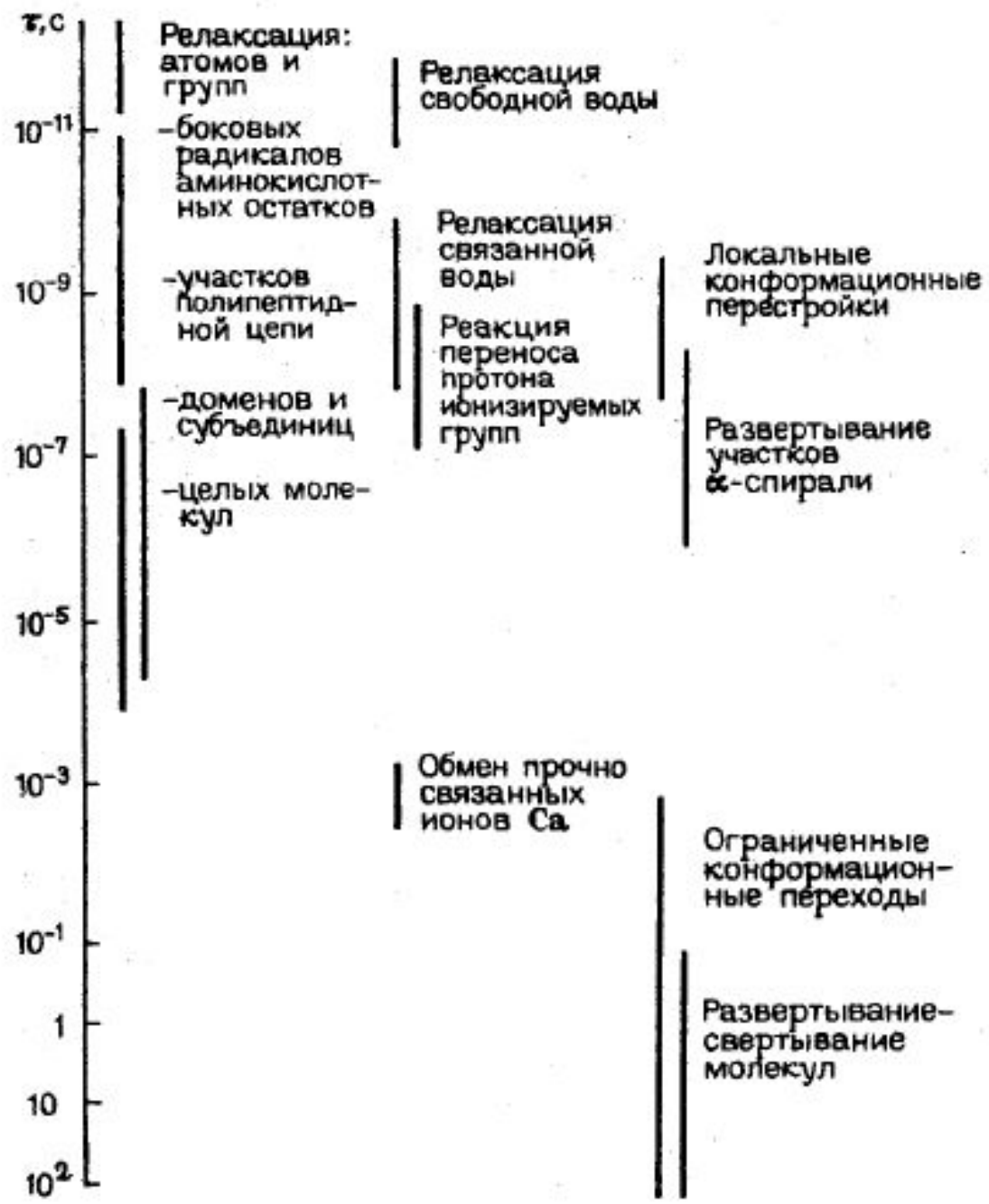
$$\tilde{\lambda} = \lambda/2\pi$$

$$\tilde{\lambda} = 0,13 \text{ \AA} \text{ для } ^{57}\text{Fe}$$

Уширение спектра обусловлено диффузией молекул белка.
Изменение частоты уширения пропорционально скорости источника (v)







Ферментативный катализ

Ферменты (от латинского fermentum – закваска), энзимы (от греческого en – "в" и zyme – "закваска") или биокатализаторы, – это вещества биологического происхождения, ускоряющие химические реакции

Ферменты отличаются от других катализаторов тремя уникальными свойствами:

- высокой эффективностью действия,
- специфичностью действия,
- способностью к регуляции.

Таблица 8 – Эффективность протекания реакции разложения перекиси водорода

Катализатор	Энергия активации, кДж/моль	Относительная скорость реакции $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ при 300 К
Без катализатора	70	1
Pt (гетерогенный)	45	$2 \cdot 10^3$
Ионы железа (гомогенный)	42	$8 \cdot 10^3$
Каталаза (фермент)	7	$9 \cdot 10^{10}$

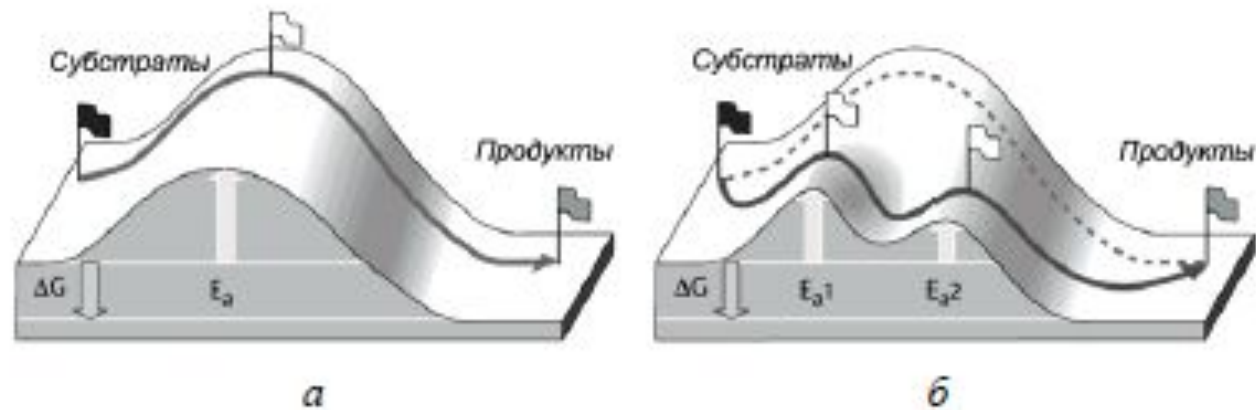


Рисунок 122 – Влияние катализатора на энергетический профиль реакции:
 а – энергетический профиль в отсутствие катализатора; б – энергетический профиль в присутствии катализатора

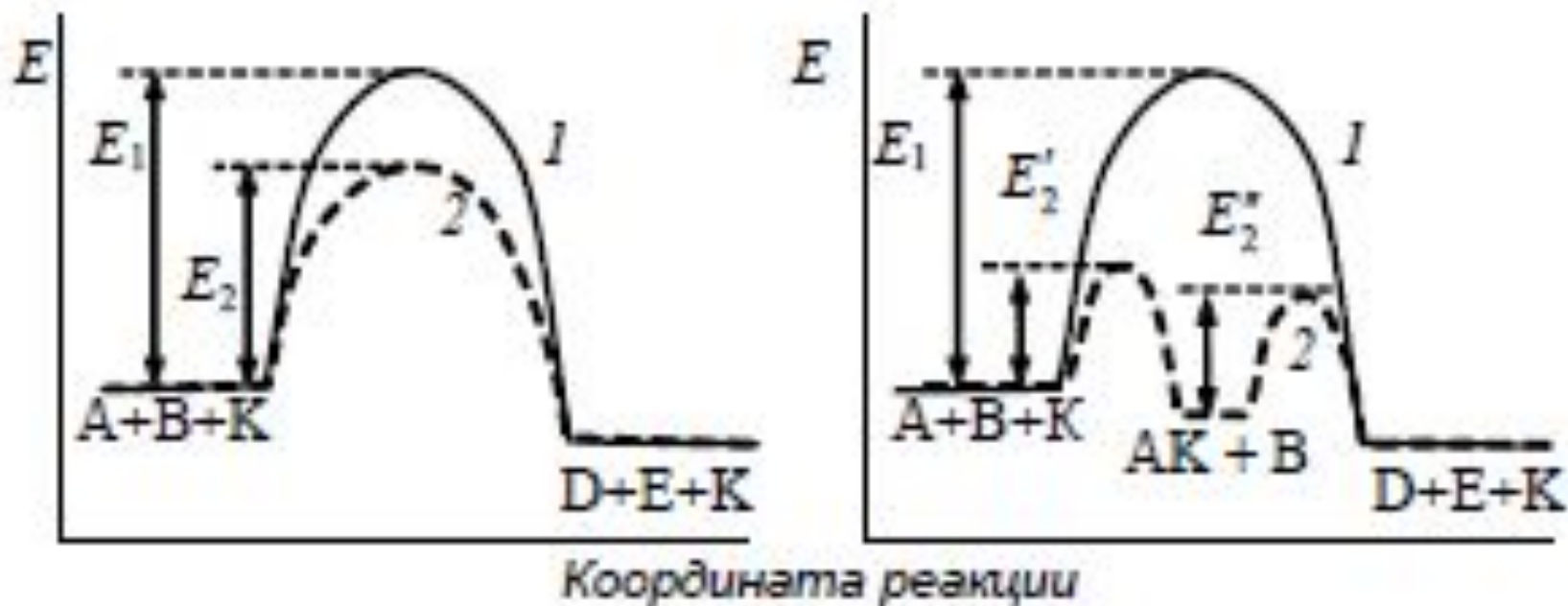
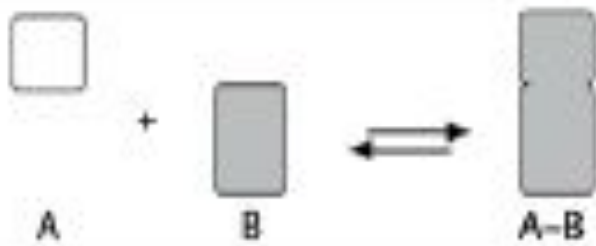




Таблица 10 – Классы ферментов

№	Класс	Тип реакции	Важнейшие под-классы
1	Окси-редуктазы	<p>○ = Восстановительный эквивалент</p> <p>$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$</p>	Дегидрогеназы Оксидазы Пероксидазы Редуктазы Монооксигеназы Днуксигеназы
2	Трансфе-разы	<p>$A-B + C \rightleftharpoons A + B-C$</p>	C ₁ -Трансферазы Гликозил- трансферазы Аминотрансферазы Фосфотрансферазы
3	Гидролазы	<p>$A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$</p>	Эстеразы Гликозидазы Пептидазы Амидазы

4	<p>Лиазы ("син-тазы")</p>		<p>С-С Лиазы С-О Лиазы С-N Лиазы С-S Лиазы</p>
5	<p>Изомеразы</p>		<p>Эпимеразы цис-транс-изомеразы Внутримолекулярные трансферазы</p>
6	<p>Лигазы ("син-тазы")</p>		<p>С-С Лигазы С-О Лигазы С-N Лигазы С-S Лигазы</p>

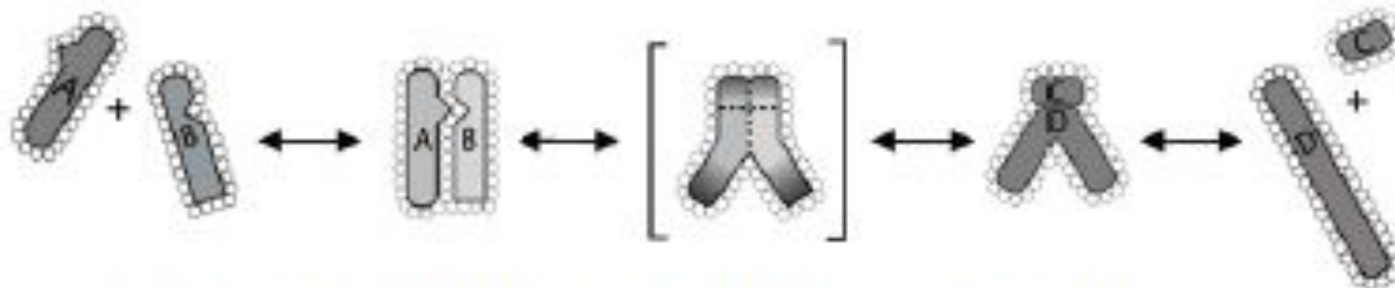


Рисунок 124 – Некатализируемая реакция (в отсутствие фермента)

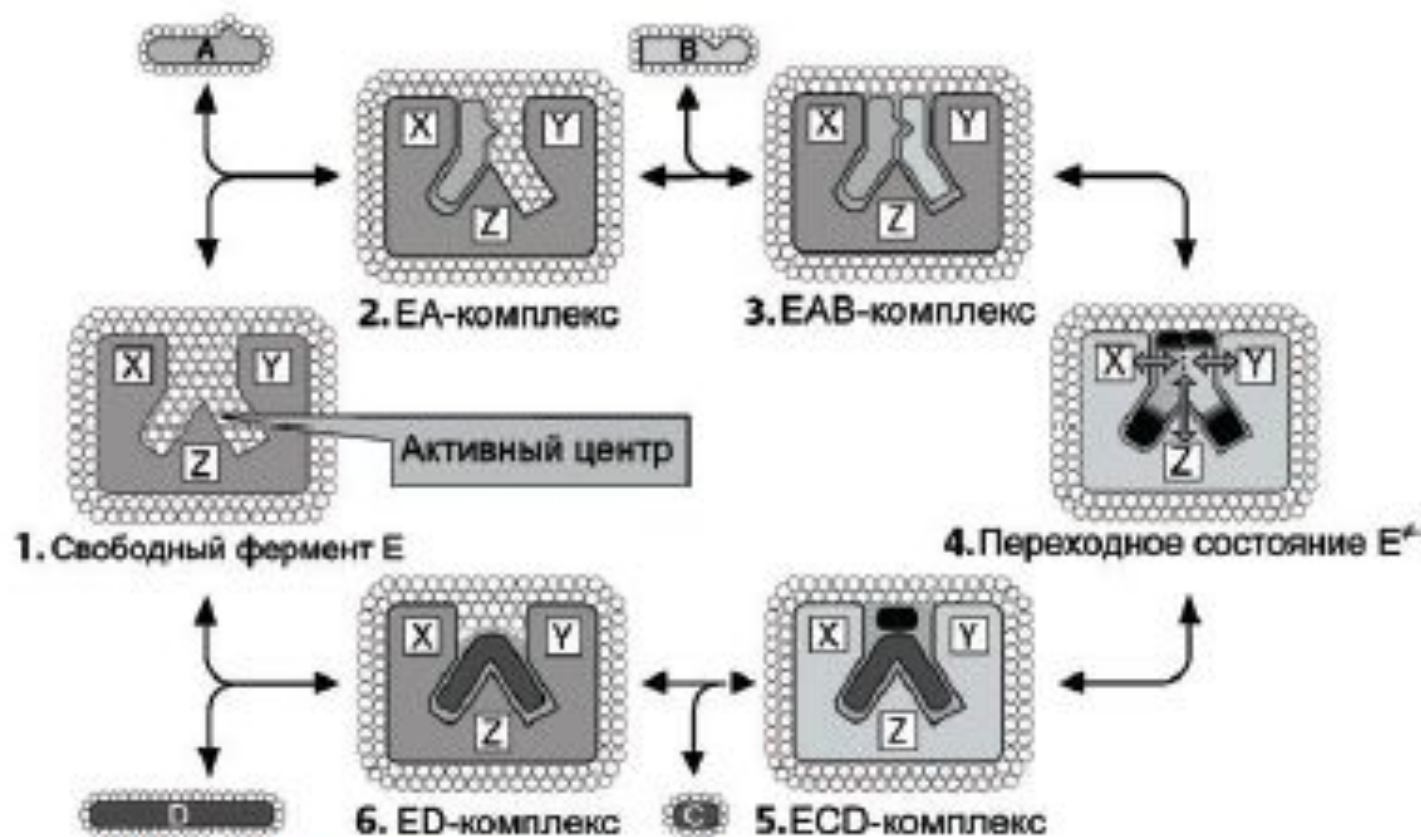


Рисунок 125 – Схема ферментативной реакции

Взаимодействия, которые играют главную роль при связывании субстрата в активном центре фермента и образовании комплекса фермент-субстрат в воде:

- 1) образование ковалентных связей;
- 2) гидрофобные взаимодействия между неполярными (углеводородными) фрагментами субстратной молекулы и дегидратированными (хотя бы частично) областями поверхностного слоя глобулы;
- 3) электростатические взаимодействия между заряженными группами субстрата и ионизованными аминокислотными остатками полипептидных цепей;
- 4) образование водородных связей.

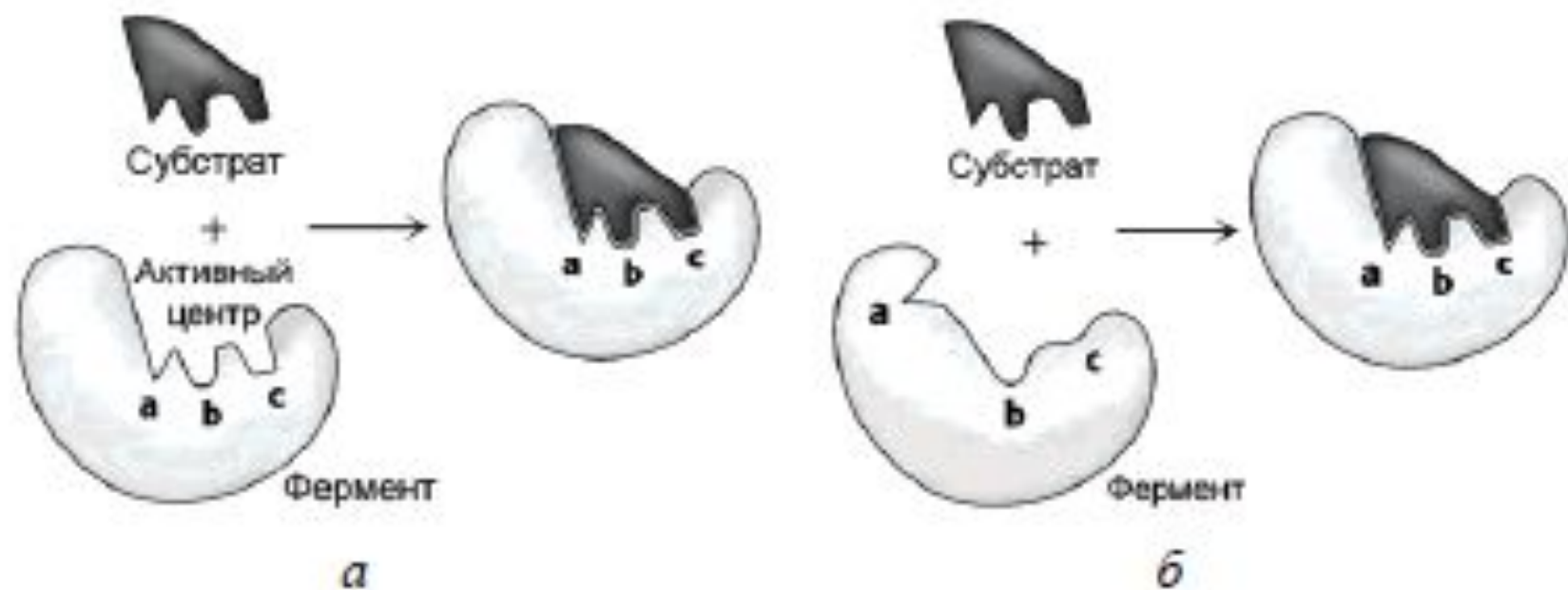


Рисунок 128 – Модели фермент-субстратного связывания: *a* – модель "ключ-замок" Фишера; *б* – Модель "рука-перчатка" Кошланда

Основные механизмы управления каталитической активностью фермента связаны со следующими явлениями и процессами:

- 1) аллостерия;
- 2) кооперативность;
- 3) связывание с лигандами (ингибиторами, активаторами, эффекторами, индукторами);
- 4) существование белковых переключателей.

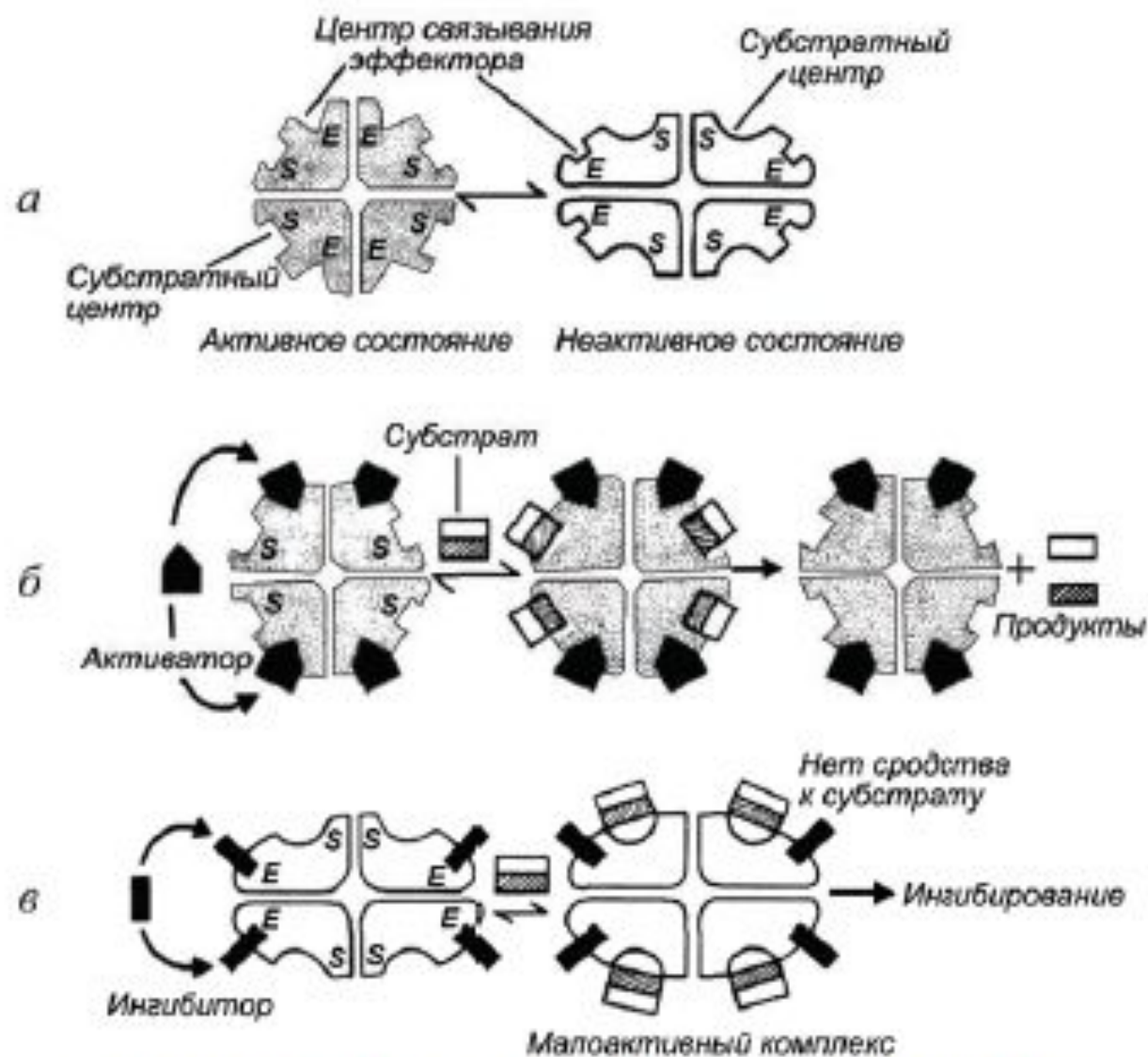


Рисунок 138 – Схема функционирования аллостерического фермента:

a – активность аллостерического фермента зависит от конформации его субъединиц;
б – аллостерическая активация достигается связыванием активатора (положительного эффектора);
в – аллостерическая инактивация происходит благодаря связыванию ингибитора (отрицательного эффектора)

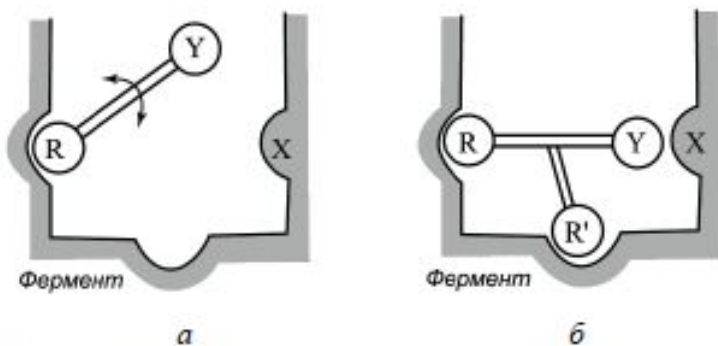


Рисунок 147 – Снижение свободной энергии активации химического превращения фермент-субстратного комплекса за счёт эффекта сближения и ориентации

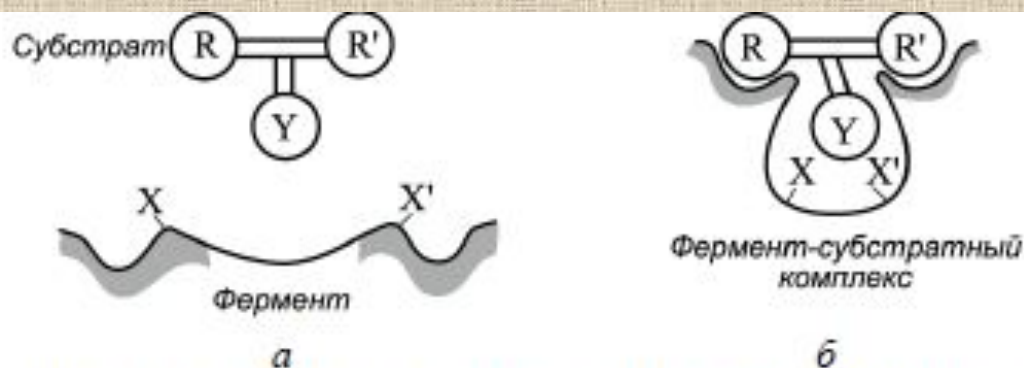
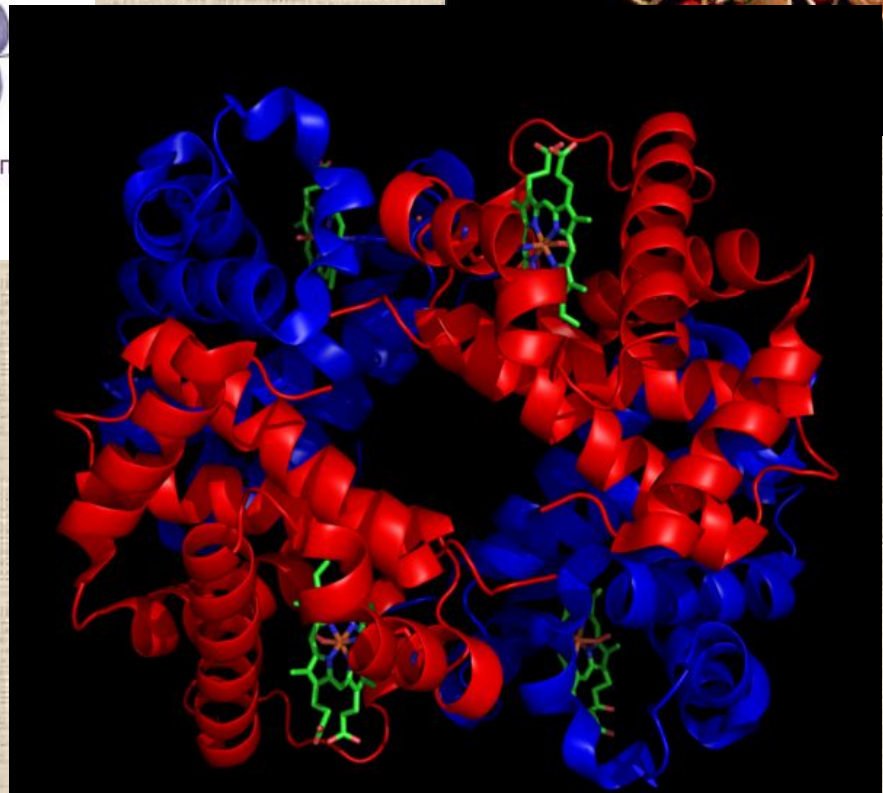
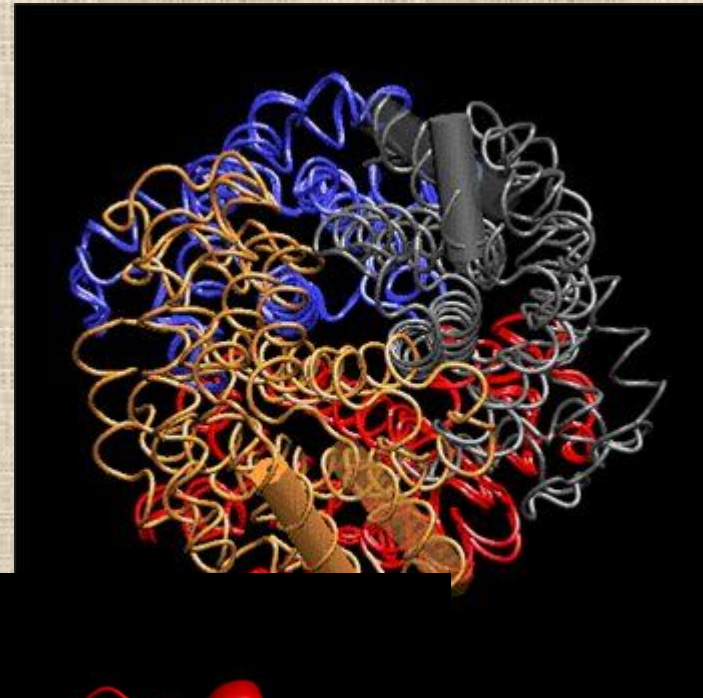
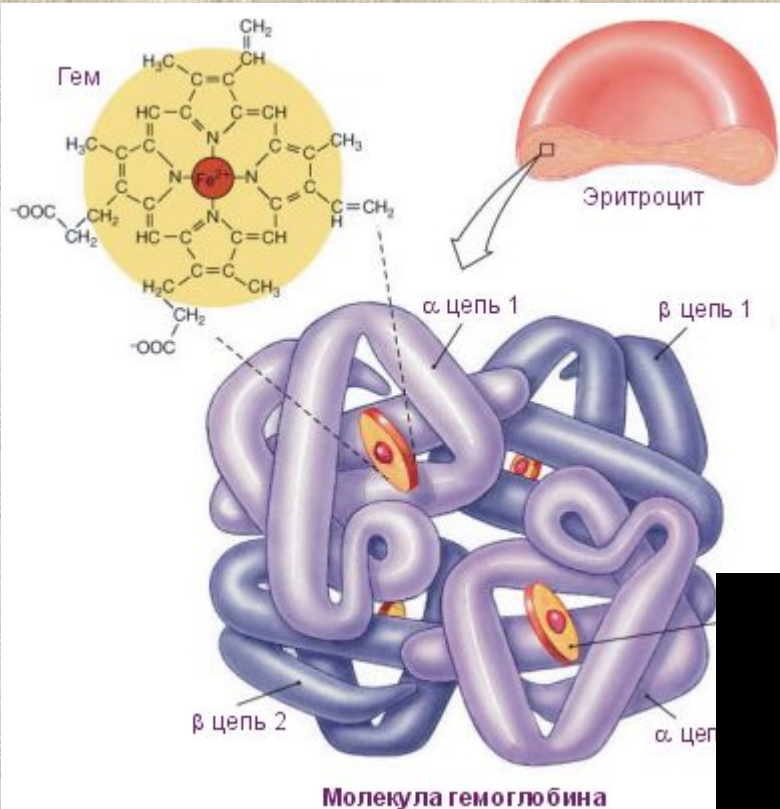
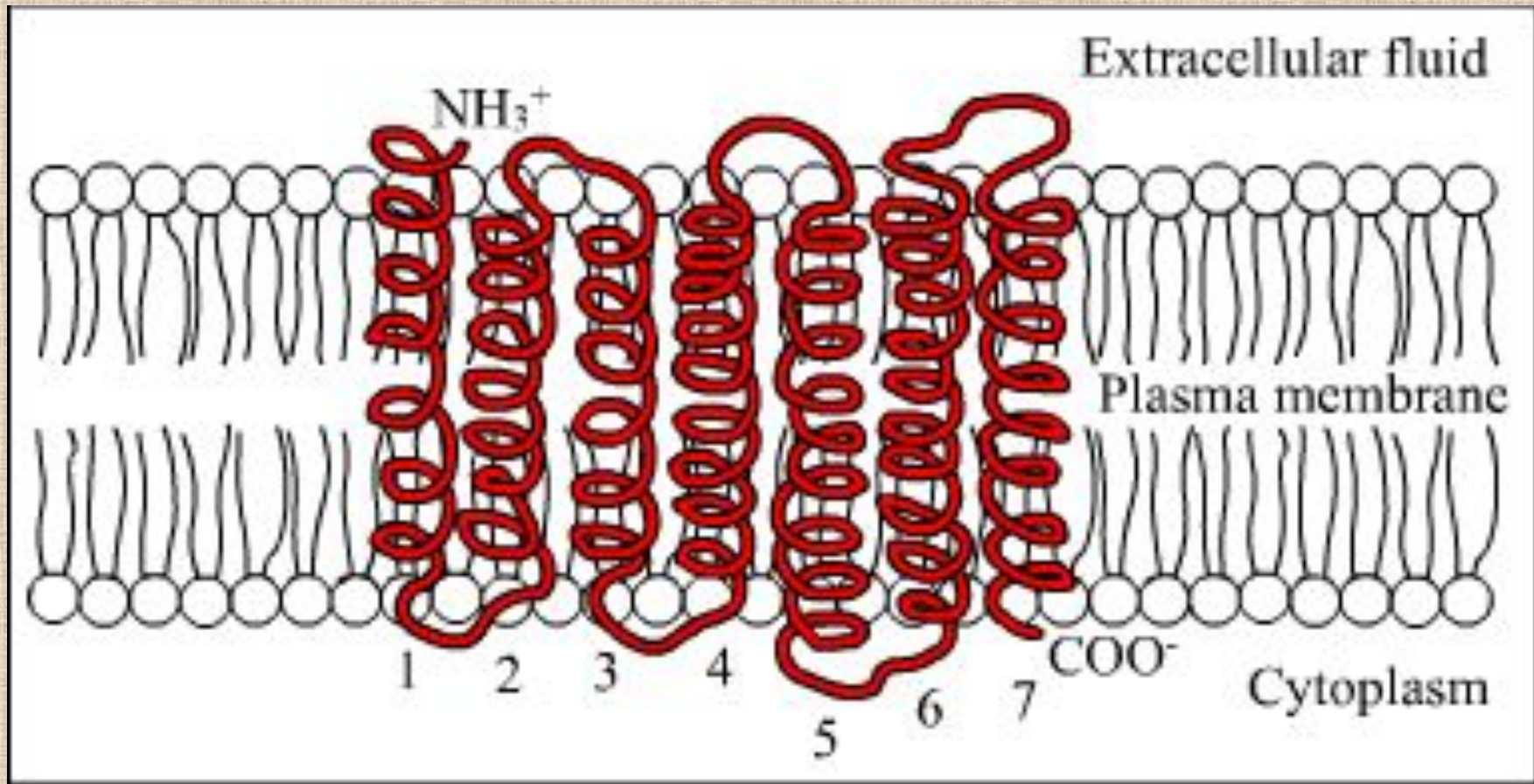


Рисунок 148 – Схема изменений в ферменте, индуцированных субстратом – механизм индуцированного соответствия

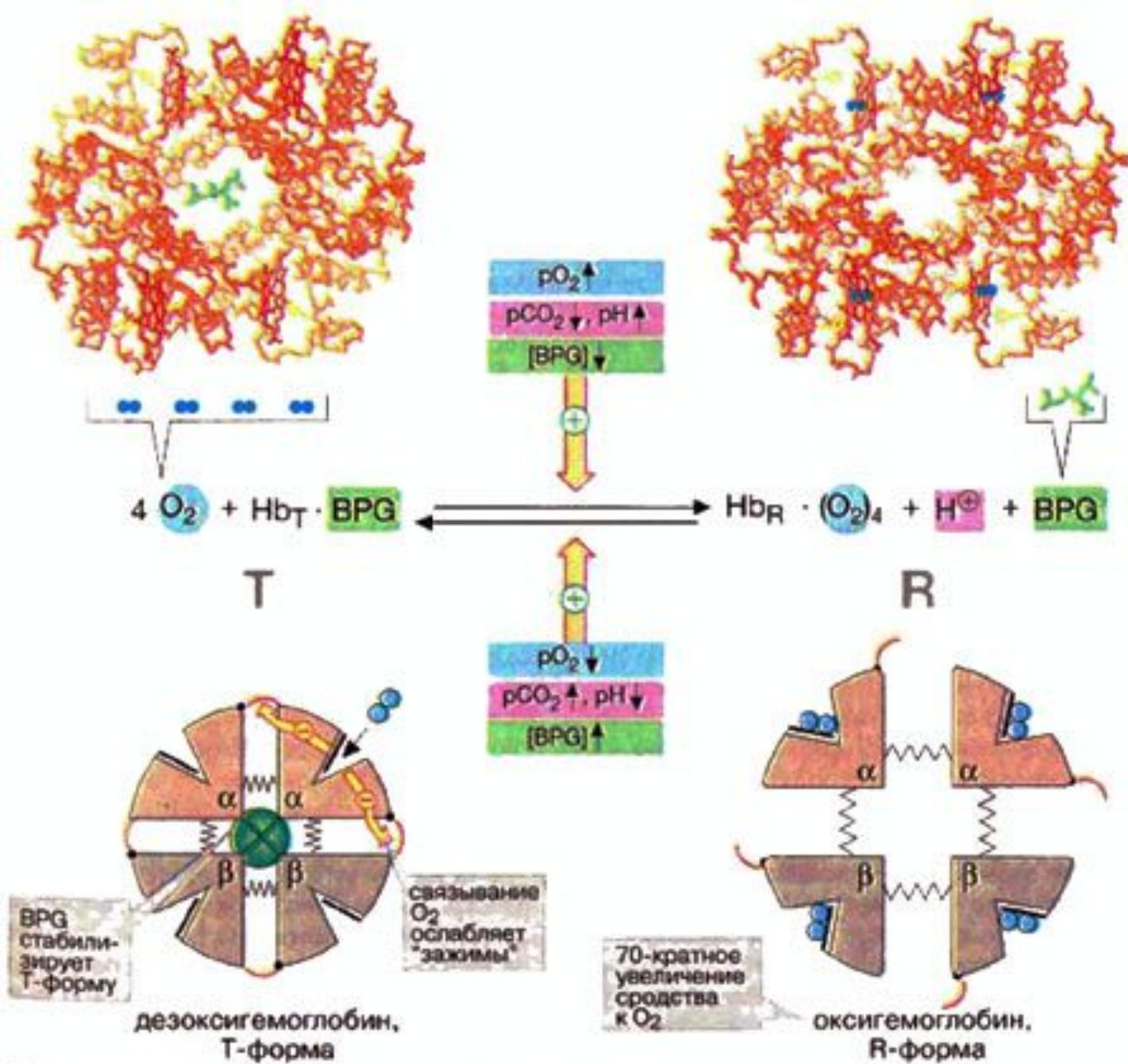


Рисунок 149 – Схема механизма "напряжения"





**Picture of G-Protein Receptor Family 7 TM
Transmembrane Domains**

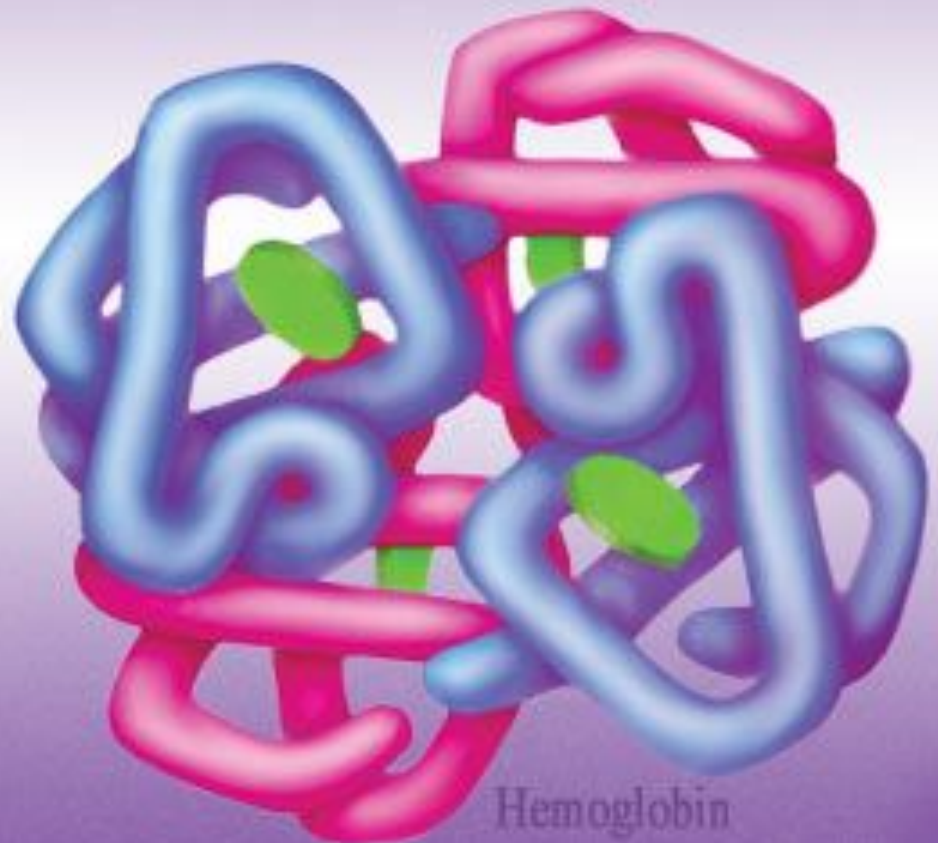


Б. Аллостерические эффекты в гемоглобине

TWO MARVELS OF CREATION: MYOGLOBIN AND HEMOGLOBIN

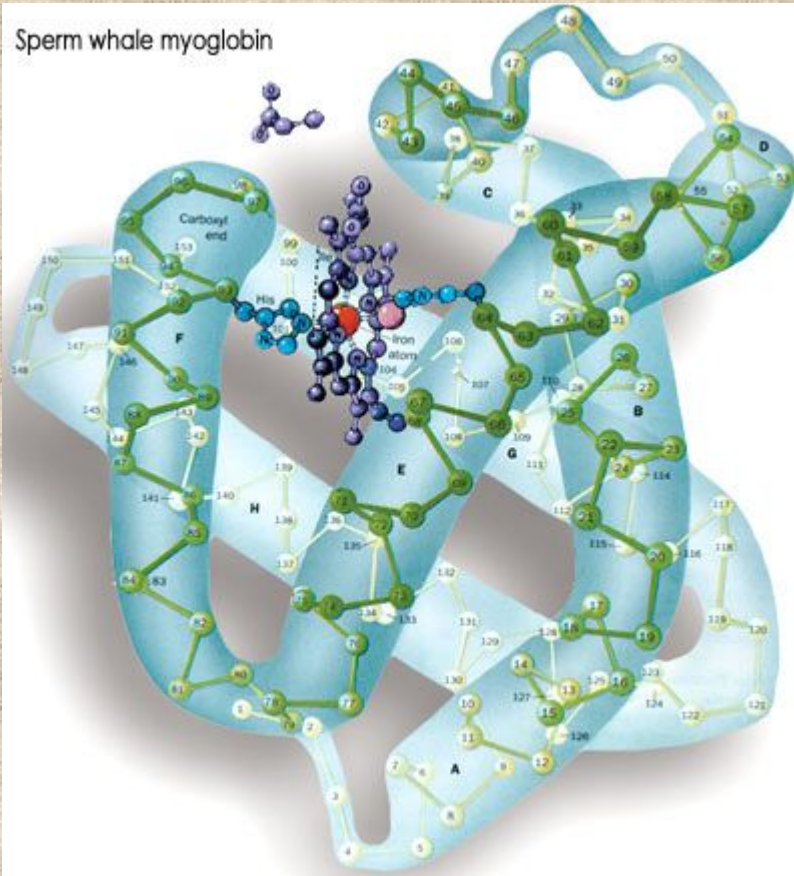


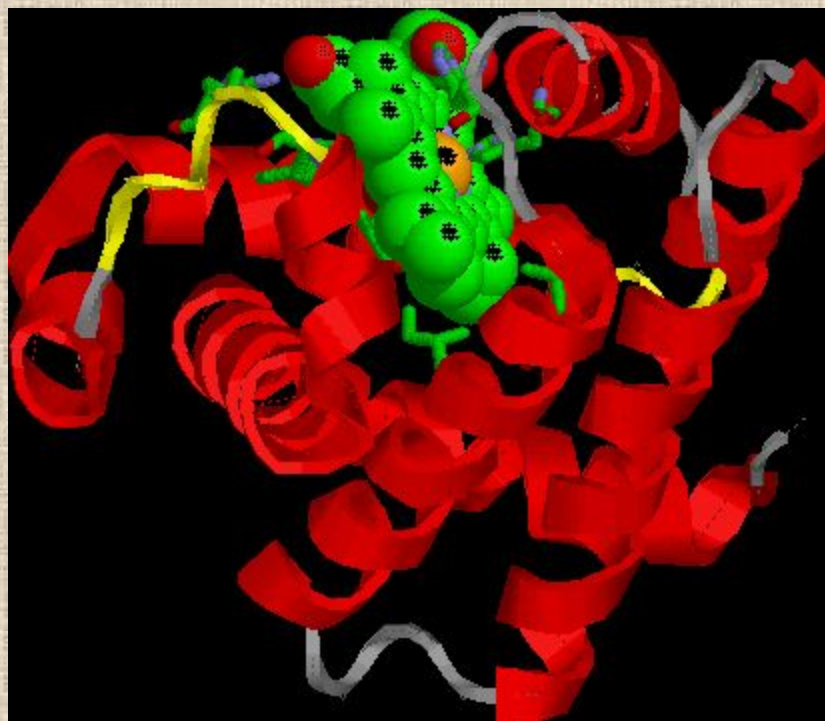
Myoglobin



Hemoglobin

Sperm whale myoglobin





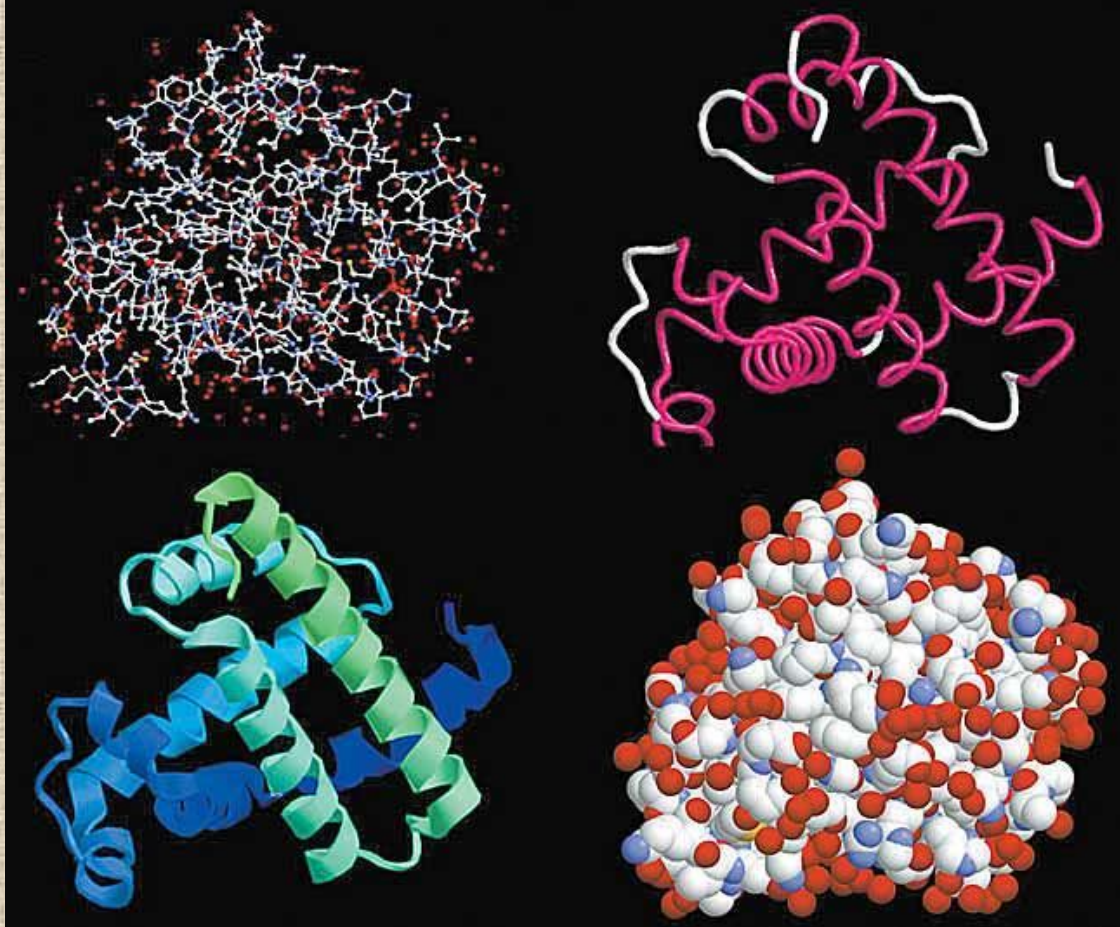


Рис.2. Компьютерные изображения структуры белка миоглобина.

1 - атомы в виде небольших сфер разного цвета: красные - кислород, белые - углерод, синие - азот, желтые - сера.

Атомы водорода очень слабо рассеивают рентгеновские лучи и на изображении их нет. Красные сферы по краям белковой молекулы - это кислородные атомы структурированной воды, прочно связанной с белковой глобулой.

2 - общий ход полипептидной цепи. Участки α -спирали выделены красным цветом, неструктурированные петли цепи - белым цветом.

3 - спиральные структуры в виде лент.

4 - атомы даны как сферы с радиусами Ван-дер-Ваальса.

Рассматривая рисунки 1-3, можно подумать, что полипептидная цепь уложена рыхло и потому обладает большой подвижностью. Но это не так: белковая глобула выглядит как плотная гроздь атомов, лишенных возможности свободного перемещения (4).