

Биосинтез белков. Построение и денатурация белков. Полиморфизм белков, аллоферменты, изоферменты. Ферменты: катализаторы и регуляторы

Выполнил:
магистрантка 1-го курса специальности
«Микробиология и биотехнология»
Борзова Оксана

Строение, свойства и функции белков

В живых клетках главную роль играют полимерные макромолекулы - белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды.

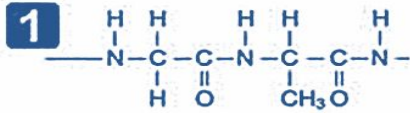
Синтезированные белки выполняют многообразные функции:

- ускоряют химические реакции,
- выполняют транспортную,
- структурную,
- защитную функции,
- участвуют в передаче сигналов от одних клеток другим

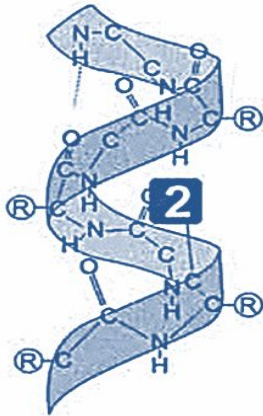
и таким образом реализуют наследственную информацию. Поэтому белки называют также протеинами (от греч. proteos - первый).

- **Белки́** (протеи́ны, полипепти́ды) — высокомолекулярные органические вещества, состоящие из альфа-аминокислот, соединённых в цепочку пептидной связью .
- **Пептид** – соединение, в котором количество аминокислотных остатков не превышает 10.
- **Полипептид** – если в соединении содержится от 10 до 40 АК остатков.
- **Белок** - более 40 АК остатков.

Белки



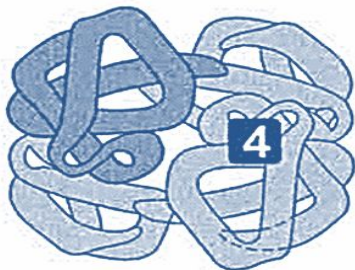
Линейная последовательность аминокислот в белке уникальна для каждого индивидуального белка; информация о ней содержится в участке молекулы ДНК, называемой геном.



Линейная последовательность аминокислот в белке содержит информацию о построении трёхмерной пространственной структуры.



Полипептидные цепи за счёт внутримолекулярных взаимодействий образуют пространственные структуры - **конформации** белков.



На определённом участке белковой молекулы из радикалов аминокислот формируется активный центр, который может специфично (комплементарно) связываться с молекулами-лигандами.

Рис. 1. Этапы формирования конформации белков.

1 - первичная структура; 2 - вторичная структура;
3 - третичная структура; 4 - четвертичная структура.

Биосинтез белков (трансляция)

Трансляция - перевод информации, заключённой в полинуклеотидной последовательности мРНК, в аминокислотную последовательность белка.

А. Генетический код и его свойства

Генетический, биологический, нуклеотидный, или аминокислотный код - своеобразный "словарь", позволяющий выяснить, какая последовательность нуклеотидов мРНК обеспечивает включение в белок аминокислот в заданной последовательности.

Свойства генетического кода

Триплетность

- Число кодирующих последовательностей из четырёх нуклеотидов по три равно $4^3 = 64$.
- **Кодоны** - кодирующими элементами при шифровании аминокислотной последовательности являются тройки нуклеотидов (**триплеты**).

61 триплет шифрует включение аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь, а 3 остальных - **UAA, UAG, UGA*** - сигнализируют о завершении трансляции (**терминирующие**, или **стоп-кодоны**).

Специфичность

Каждому кодону соответствует только одна определённая аминокислота. В этом смысле генетический код строго однозначен.

*Примечания: U - урацил; A - аденин; G - гуанин.

Свойства генетического кода

Вырожденность

В информационных молекулах включение в белок одной и той же аминокислоты определяют несколько кодонов.

Линейность записи информации

Универсальность

Смысл кодовых слов одинаков для всех изученных организмов, но митохондриальная мРНК содержит 4 триплета, имеющих другое значение, чем в мРНК ядерного происхождения. Так, в мРНК митохондрий триплет UGA кодирует Три, AUA - Мет, а ACA и AGG прочитываются как дополнительные стоп-кодона.

Колинеарность гена и продукта

- У прокариотов обнаружено линейное соответствие последовательности кодонов гена и последовательности аминокислот в белковом продукте.
- В эукариотических клетках аминокислотная последовательность белка колинеарна последовательности экзонов в гене или зрелой мРНК после посттранскрипционного удаления интронов.

Основные компоненты белоксинтезирующей системы

Необходимые компоненты	Функции
1. Аминокислоты	Субстраты для синтеза белков
2. тРНК	тРНК выполняют функцию адаптеров. Они акцепторным концом взаимодействуют с аминокислотами, а антикодоном - с кодоном мРНК.
3. Аминоацил-тРНК синтетазы	Каждая aa-тРНК-синтетаза катализирует реакцию специфического связывания одной из 20 аминокислот с соответствующей тРНК
4. мРНК	Матрица содержит линейную последовательность кодонов, определяющих первичную структуру белков
5. Рибосомы	Рибонуклеопротеиновые субклеточные структуры, являющиеся местом синтеза белков
6. АТФ, ГТФ	Источники энергии
7. Белковые факторы инициации, элонгации, терминации	Специфические вне ribосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации: eIF; 2 фактора элонгации: eEF1, eEF2, и факторы терминации: eRF)
8. Ионы магния	Кофактор, стабилизирующий структуру рибосом

Примечания: eIF (*eukaryotic initiation factors*) - факторы инициации; eEF (*eukaryotic elongation factors*) - факторы элонгации; eRF (*eukaryotic releasing factors*) - факторы терминации.

Аминоацил-тРНК

синтетазы

Суммарная реакцию, катализируемая аминоксил-тРНК синтетазами в присутствии ионов Mg^{2+} :

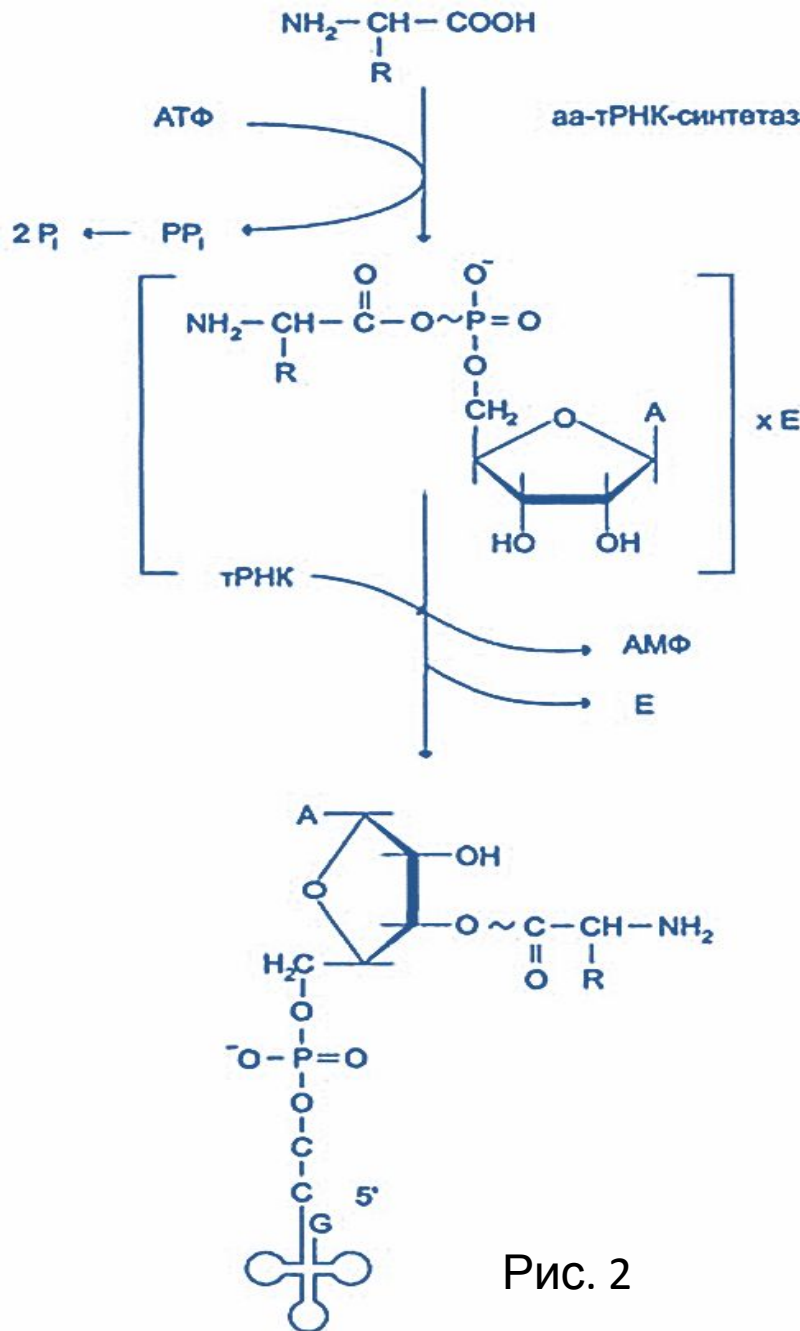
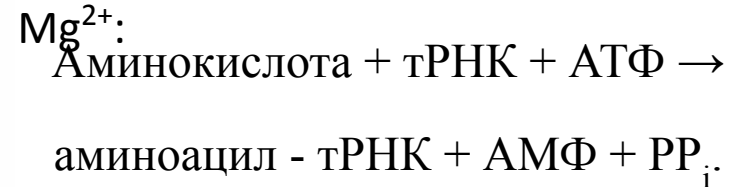


Рис. 2

Образование аминоксил-тРНК (рис.2).

Аминокислота взаимодействует с АТФ и активируется, образуя аминоксиладенилат, который, не освобождаясь из связи с ферментом (E), отдаёт активированную аминокислоту тРНК с образованием аминоксил-тРНК (aa-тРНК).

Рибосомы

Рибосомы представляют собой рибонуклеопротеиновые образования. На рибосомах идёт сборка аминокислот в белки.

Белки, входящие в состав субъединиц рибосомы в количестве одной копии выполняют структурную функцию, обеспечивая взаимодействие между мРНК и тРНК, связанными с аминокислотой или пептидом.

Центр А (аминоацильный) связывает аа-тРНК, строение которой определяет кодон, находящийся в области этого центра. В структуре этого кодона зашифрована природа аминокислоты, которая будет включена в растущую полипептидную цепь.

Центр Р (пептидильный) занимает пептидил-тРНК, т.е.

Белковые факторы

В каждой стадии белкового синтеза на рибосоме: инициации, элонгации и терминации участвует разный набор вне ribосомных белковых факторов.

Эти белки связываются с рибосомой или её субъединицами на определённых стадиях процесса и

- стабилизируют или
- облегчают

функционирование белоксинтезирующей машины.

Специфические вне ribосомные белки, необходимые для процесса трансляции (12 факторов инициации: eIF; 2 фактора элонгации: eEF1, eEF2, и факторы терминации: eRF)

АТФ и ГТФ как источники энергии

На включение одной аминокислоты в растущую полипептидную цепь клетка затрачивает 4 макроэргические связи:

- 2 из АТФ в ходе реакции, катализируемой аа-тРНК синтетазой (в процессе активации аминокислот АТФ расщепляется на АМФ и пирогосфат)
- 2 молекулы ГТФ: одна используется на связывание аа-тРНК в А-центре рибосомы, а вторая затрачивается на стадию транслокации.
- 2 макроэргические связи молекул АТФ и ГТФ используются на инициацию и терминацию синтеза полипептидной цепи.

Синтез полипептидной цепи на рибосоме

- В ходе синтеза белка прочтение информации мРНК идёт в направлении от 5'- к 3'-концу, обеспечивая синтез пептида от N- к С-концу.
- Эукариотические мРНК кодируют строение только одной полипептидной цепи (т.е. они моноцистронны)
- Прокариотические мРНК часто содержат информацию о нескольких пептидах (т.е. они полицистронны).
- На полицистронных мРНК синтез белка начинается до того, как заканчивается их собственный синтез.
- У эукариотов трансляция протекает в цитоплазме, куда из ядра поступают уже

События на рибосоме включают этапы:
инициация, элонгация и терминация.

1. Инициация

тРНК_i^{Мет} -инициирующая метиониновая
тРНК;

eIF (от англ. *eukaryotic initiation factors*) -
факторы инициации;

Кэпсвязывающий белок - один из факторов
инициации (eIF-4F), который узнаёт и
присоединяется к участку "кэп" на молекуле
мРНК;

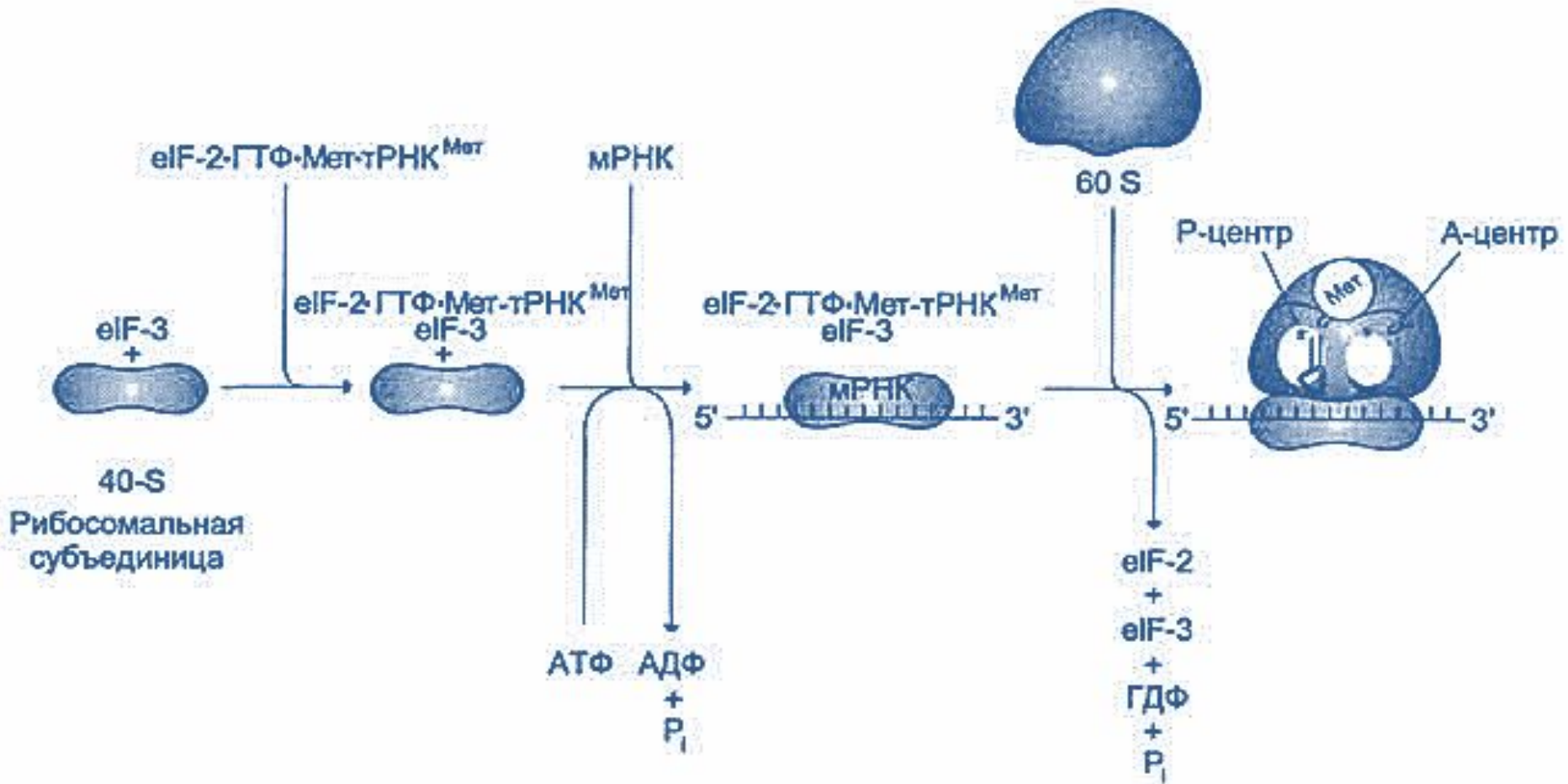


Рис. 3. Образование иницирующего комплекса в ходе синтеза белка у эукариотов. Мет-тРНК^{Мет} объединяется с малой субъединицей рибосомы в форме тройного комплекса: Мет-тРНК^{Мет}, eIF-2 и ГТФ. Образовавшийся более сложный четырёхкомпонентный комплекс присоединяется к 5'-концу мРНК с помощью нескольких дополнительных факторов, и малая субъединица начинает скользить по мРНК до тех пор, пока антикодон Мет-тРНК^{Мет} не свяжется с иницирующим кодоном AUG. При этом в комплексе происходит изменение состава иницирующих факторов, и ускоряется присоединение 60S субъединицы рибосомы, сопровождающееся гидролизом ГТФ. Мет-тРНК^{Мет} занимает на рибосоме Р-центр.

2. Элонгация

- это процесс, в ходе которого рибосома с помощью аа-тРНК последовательно "читает" мРНК в виде триплетов нуклеотидов, следующих за иницирующим кодоном в направлении от 5' к 3'-концу, наращивая полипептидную цепочку за счёт последовательного присоединения аминокислот.

Включение каждой аминокислоты в белок происходит в 3 стадии, в ходе которых:

- аа-тРНК каждой входящей в белок аминокислоты связывается с А-центром рибосомы;
- пептид от пептидил-тРНК, находящейся в Р-центре, присоединяется к α -NH₂-группе аминоацильного остатка аа-тРНК А-центра с образованием новой пептидной связи;
- удлинённая на один аминокислотный остаток пептидил-тРНК перемещается из А-центра в Р-центр в результате транслокации рибосомы.

2.1 Связывание аминокацил-тРНК в А-центре

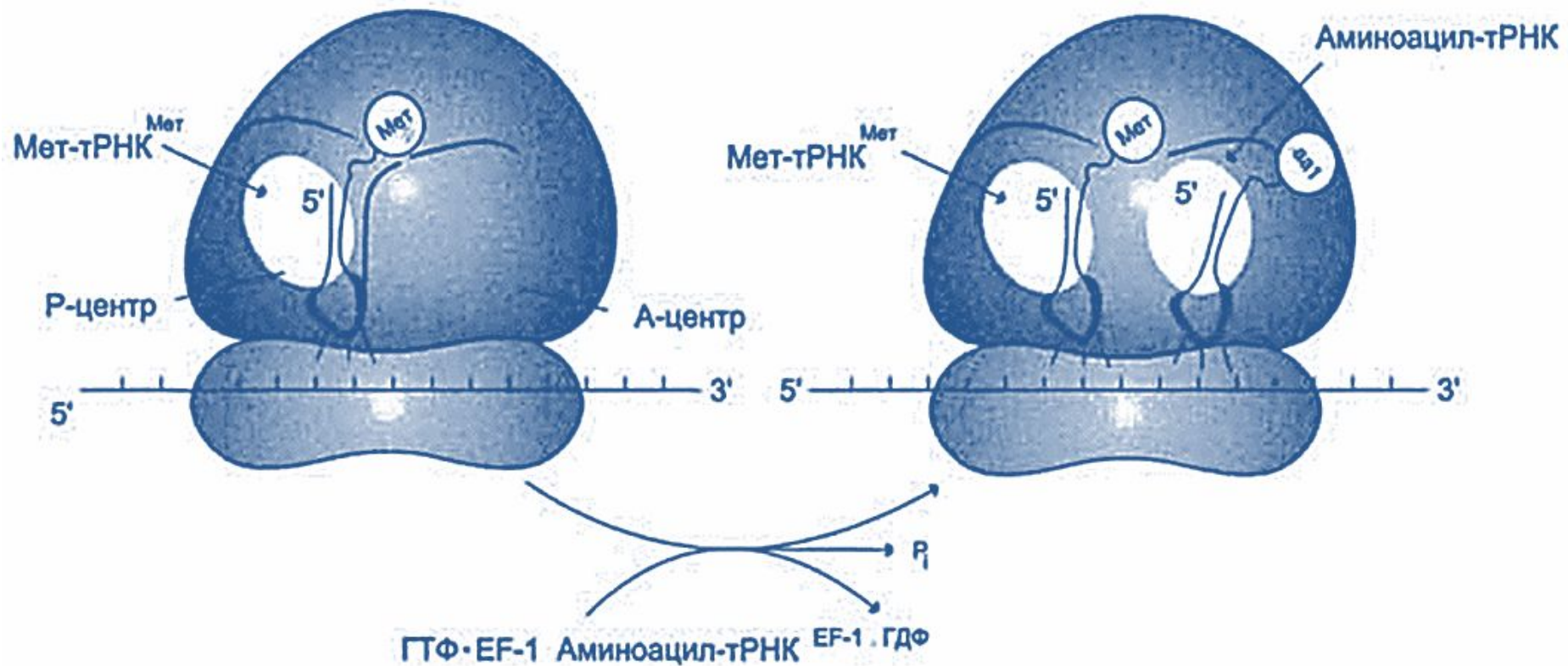


Рис. 4. Включение $aa_1\text{-тРНК}^{aa}_1$ в рибосому. $aa_1\text{-тРНК}^{aa}_1$ взаимодействует с рибосомой в виде тройного комплекса, состоящего из фактора элонгации EF-1I, $aa_1\text{-тРНК}^{aa}_1$ и ГТФ. Антикодон $aa\text{-тРНК}^{aa}_1$ комплементарен и антипараллелен кодону мРНК в А-центре. Связывание $aa_1\text{-тРНК}^{aa}_1$ происходит за счёт энергии гидролиза ГТФ до ГДФ и P_i

2.2 Образование пептидной СВЯЗИ

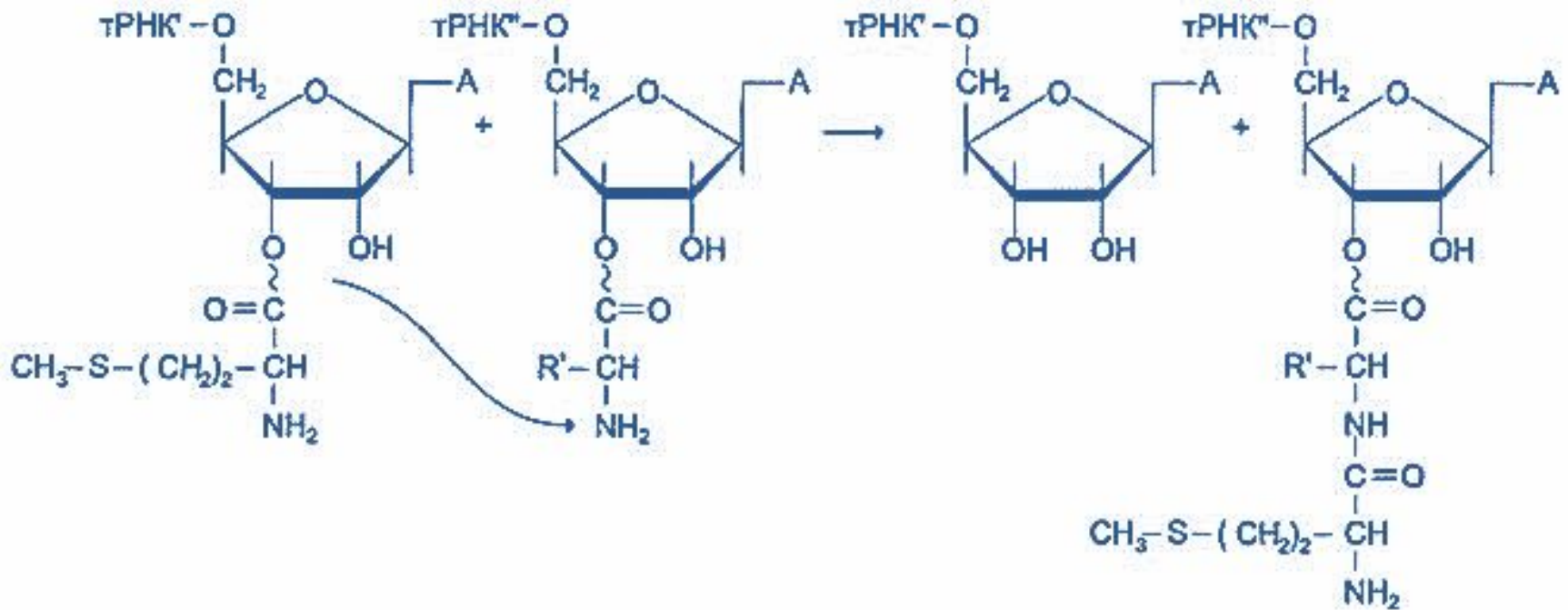


Рис. 5. Реакция транспептидации. Метионин от $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$, находящегося в Р-центре, присоединяется к $\alpha\text{-NH}_2$ -группе аминокислотного остатка $\text{aa}_1\text{-tRNA}_{\text{aa}_1}^{\text{aa}_1}$ А-центра с образованием новой пептидной связи.

2.3 Транслокация

- третья стадия элонгации.

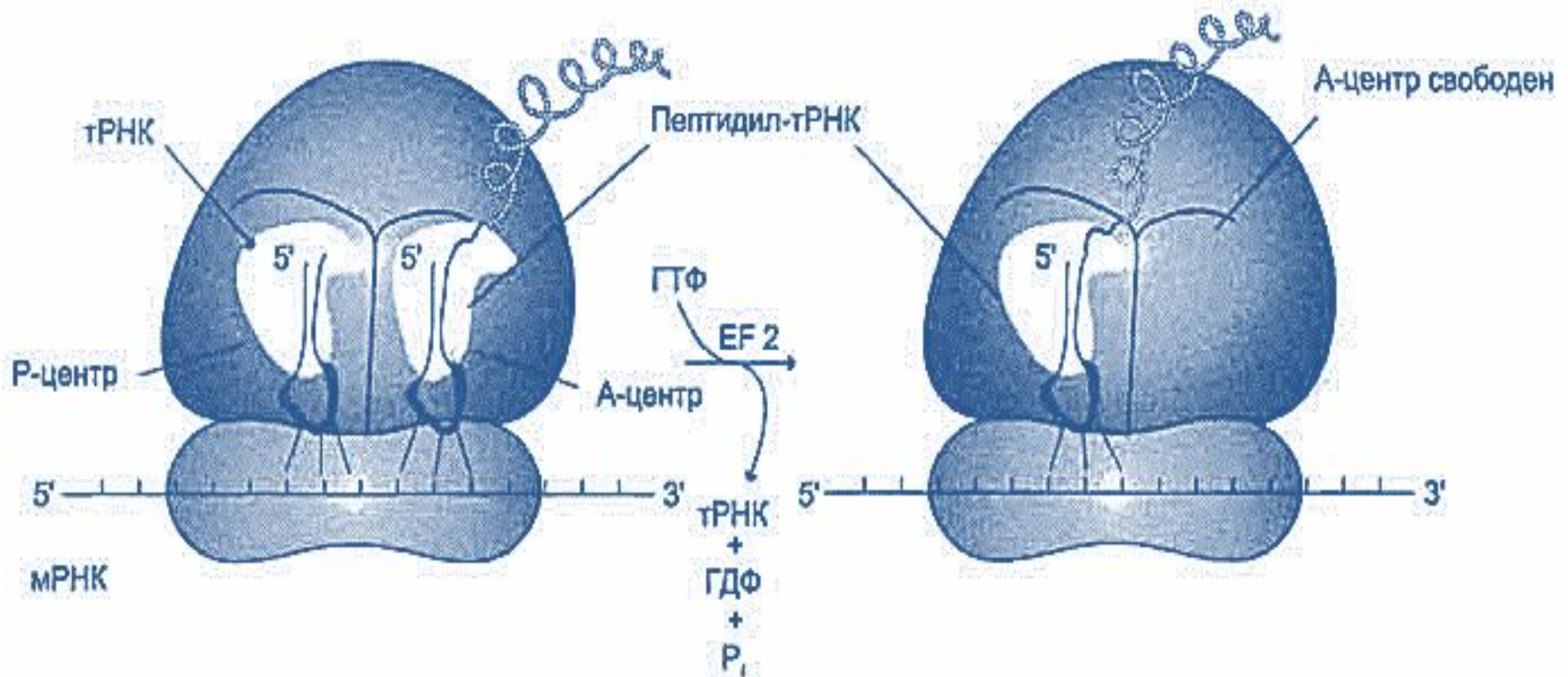
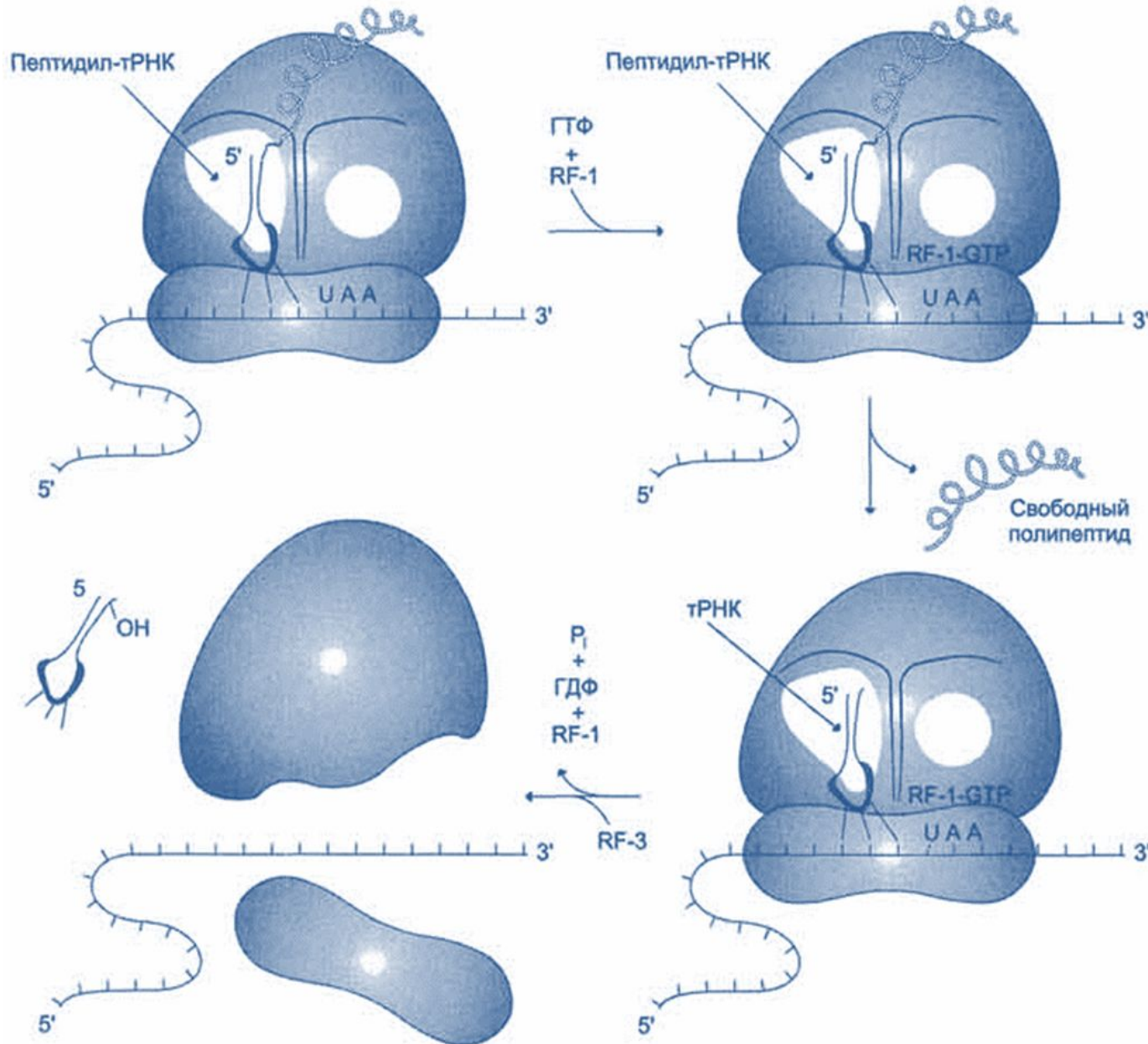


Рис. 6. Стадия транслокации. К рибосоме присоединяется фактор элонгации EF-2, и за счёт энергии ГТФ продвигает рибосому по мРНК на один кодон к 3'-концу. Пептидил-тРНК, не меняя своего положения относительно мРНК, из А-центра перемещается в Р-центр.

3. Терминация синтеза белка



Факторы терминации - 2 белковых высвобождающих фактора **RF** (от англ, *releasing factor*).

- Таким образом, матричная природа процесса трансляции проявляется в том, что последовательность поступления аминоксил-тРНК в рибосому для синтеза белка строго детерминирована мРНК.

Малая и большая субъединицы рибосомы в процессе трансляции выполняют разные функции:

- малая субъединица присоединяет мРНК и декодирует информацию с помощью тРНК и механизма транслокации,
- большая субъединица ответственна за образование пептидных связей.
- Как правило, много рибосом одновременно участвует в синтезе белка на одной и той же мРНК, образуя комплекс, который называют **полирибосомой**, или полисомой, что значительно увеличивает эффективность использования матрицы.

Посттрансляционные модификации полипептидной цепи

Посттрансляционные изменения - конформационные и структурные изменения полипептидных цепей.

Полипептидные цепи могут подвергаться структурным модификациям

- будучи ещё связанными с рибосомами,
- после завершения синтеза.

Посттрансляционные изменения:

- удаление части полипептидной цепи,
- ковалентное присоединение одного или нескольких низкомолекулярных лигандов,
- приобретение белком нативной конформации.
- В ЭР происходят фолдинг полипептидных цепей и формирование уникальной третичной или четвертичной структуры белков.
- Для поддержания нативной конформации молекул огромное значение имеет правильное формирование дисульфидных связей.

Частичный протеолиз

- **Молекулы-предшественники** - функционально неактивные молекулы многих белков, первоначально секретируемые из клеток .
- К образованию активных молекул приводит удаление части полипептидной цепи специфическими эндопротеазами.
- Некоторые белки-предшественники расщепляются в ЭР или аппарате Гольджи, другие - после секреции.

Ковалентные модификации

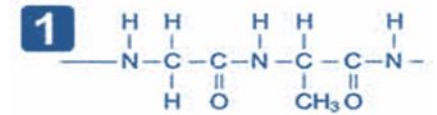
Активирование или инактивирование структурных белков и ферментов может происходить в результате присоединения различных химических групп:

- фосфатных,
- ацильных,
- метальных,
- олигосахаридных
- и некоторых других.
- **Фосфорилирование** белков осуществляется по гидроксильным группам серина, треонина и, реже, тирозина ферментами из группы протеинкиназ, тогда как дефосфорилирование катализируют гидролитические ферменты фосфопроteinфосфатазы.
- **Гликозилирование**. Белки, входящие в состав плазматических мембран или секретирующиеся из клеток, подвергаются гликозилированию. Углеводные цепи присоединяются по гидроксильным группам серина или треонина (О-гликозилирование) либо аспарагина (N-гликозилирование). Последовательное наращивание углеводного фрагмента происходит в ЭР и аппарате Гольджи.
- Многочисленным модификациям подвергаются боковые радикалы некоторых аминокислот: в тиреоглобулине йодируются остатки тирозина; в факторах свёртывания крови карбоксилируются остатки глутамата; в ЭР фибробластов гидроксилируются остатки пролина и лизина в цепях тропоколлагена

Структура белков.

Первичная структура

- Первичная структура белка – линейная последовательность аминокислотных остатков в полипептидной цепи (рис.1).



- Первичная структура каждого индивидуального белка закодирована в участке ДНК, называемом геном.



- Все молекулы индивидуального белка имеют одинаковое чередование аминокислотных остатков в белке, что в первую очередь отличает данный индивидуальный белок от любого другого.



Конформация белков

- **Конформация** - определённая пространственная трёхмерная структура, которую приобретают линейные полипептидные цепи индивидуальных белков за счёт взаимодействия функциональных групп аминокислот.
- Все молекулы индивидуальных белков (т.е. имеющих одинаковую первичную структуру) образуют в растворе одинаковую конформацию.
- Вся информация, необходимая для формирования пространственных структур, находится в первичной структуре белков.

В белках различают 2 основных типа конформации полипептидных цепей:

- вторичную структуру
- третичную структуру.

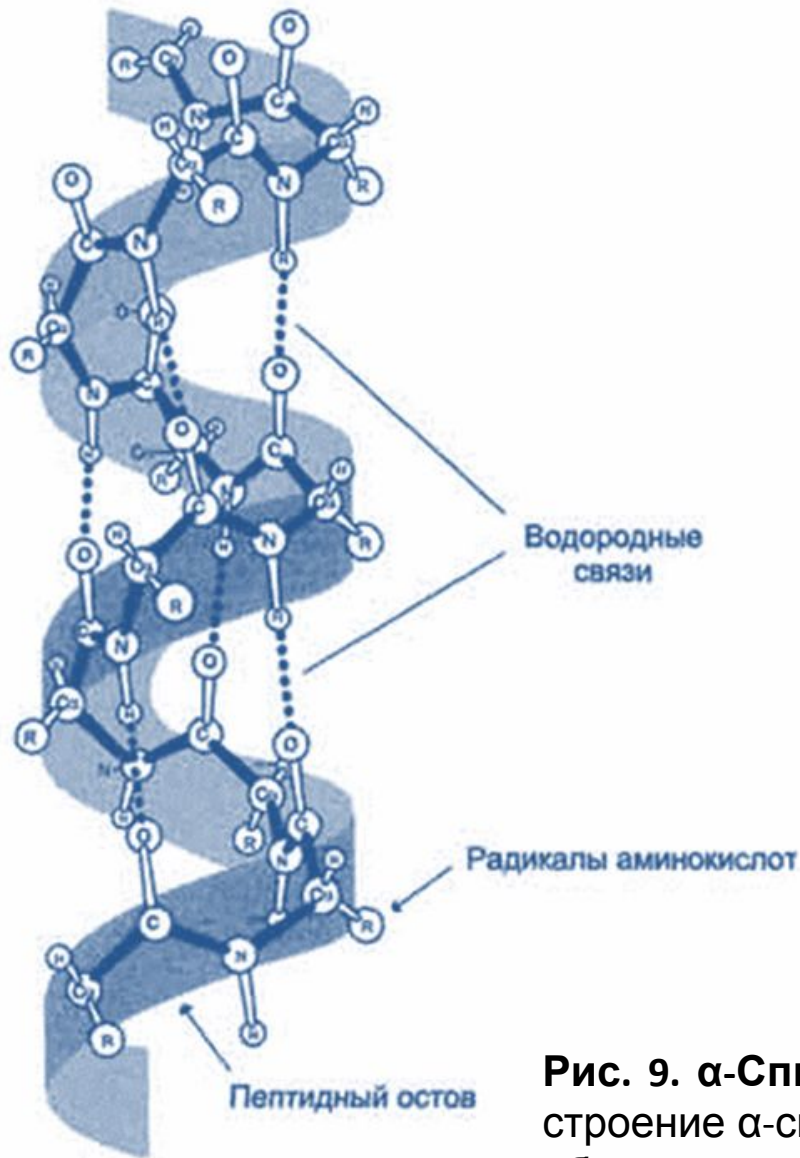
Вторичная структура белков

- **Вторичная структура белков** - пространственная структура, образующаяся в результате взаимодействий между функциональными группами, входящими в состав пептидного остова.

Пептидные цепи могут приобретать регулярные структуры двух типов:

- α -спираль и
- β -структура.

α-Спираль



В данном типе структуры пептидный остов закручивается в виде спирали за счёт образования водородных связей между атомами кислорода карбонильных групп и атомами азота аминогрупп, входящих в состав пептидных групп через 4 аминокислотных остатка.

Водородные связи ориентированы вдоль оси спирали (рис. 9).

На один виток α-спирали приходится **3,6** аминокислотных остатка.

Большое количество слабых водородных связей обеспечивает максимально возможную стабильность α-спирали.

α-Спиральная структура - наиболее устойчивая конформация пептидного остова, отвечающая минимуму свободной энергии.

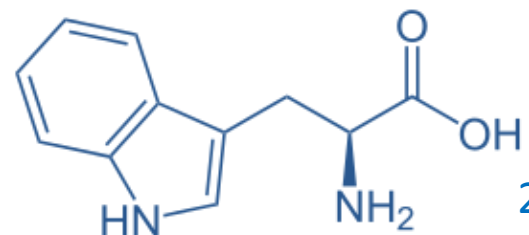
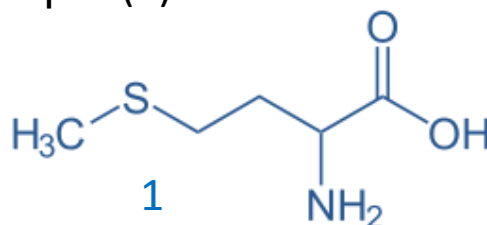
Рис. 9. α-Спираль. На рисунке показаны пространственное строение α-спирализованного участка полипептидной цепи и образование водородных связей, участвующих в формировании α-спирали.

Радикалы аминокислот, нарушающие формирование α -спирали

- Радикалы аминокислот находятся на наружной стороне α -спирали и направлены от пептидного остова в стороны.
- Они не участвуют в образовании водородных связей, характерных для вторичной структуры, но некоторые из них могут нарушать формирование α -спирали.

К ним относят:

- пролин. Обычно в этом месте пептидной цепи возникает петля или изгиб;
- участки, где последовательно расположены несколько одинаково заряженных радикалов, между которыми возникают электростатические силы отталкивания;
- участки с близко расположенными объёмными радикалами, механически нарушающими формирование α -спирали, например метионин (1), триптофан(2).



β-Структура

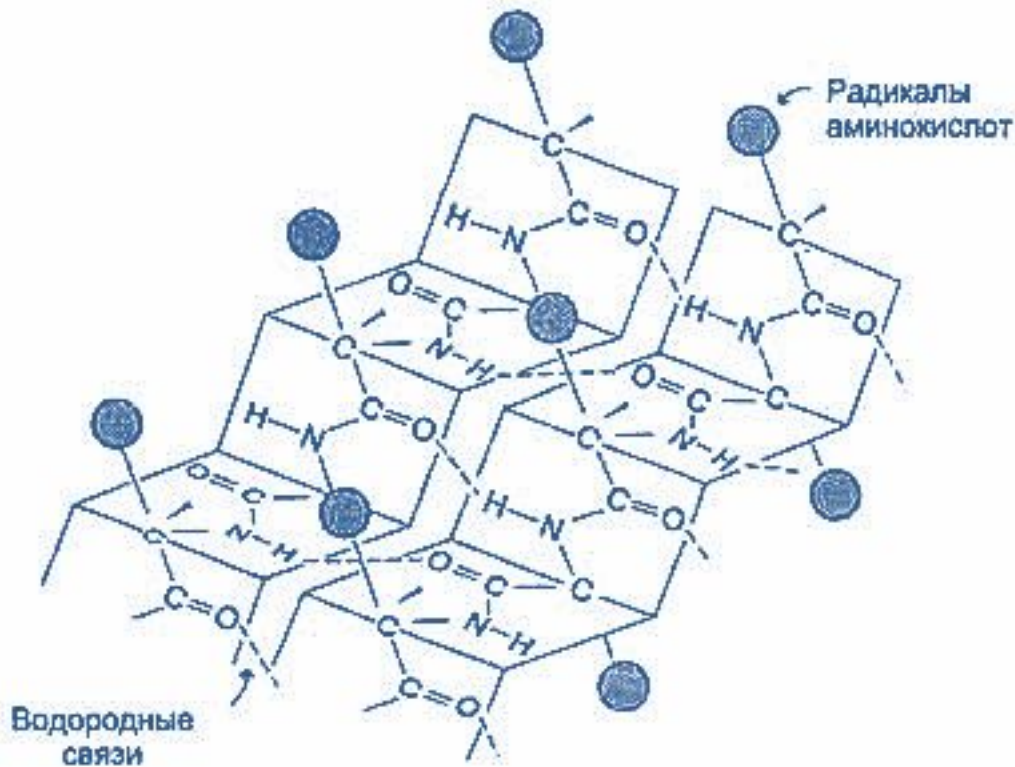


Рис. 10. Вторичная структура белков в виде β-складчатого слоя.

β-Структура формируется за счёт образования множества водородных связей между атомами пептидных групп линейных областей одной полипептидной цепи, делающей изгибы, или между разными полипептидными цепями, β-Структура образует фигуру, подобную листу, сложенному "гармошкой", - **β-складчатый слой** (рис. 10).

В β-структурах водородные связи расположены перпендикулярно полипептидной цепи.

Как α-спираль, так и β-структуры обнаружены в глобулярных и фибриллярных белках.

Нерегулярные вторичные структуры

Беспорядочные клубки - области в белках с нерегулярной вторичной структурой.

Они представлены

- петлеобразными и
- кольцеобразными структурами,

имеющими меньшую регулярность укладки, чем α -спираль и β -структура.

В каждом индивидуальном белке они имеют свою фиксированную конформацию, определяемую аминокислотным составом данного участка цепи и окружающих его участков.

Третичная структура белков

- **Третичная структура белков** - трёхмерная пространственная структура, образующаяся за счёт взаимодействий между радикалами аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии друг от друга в

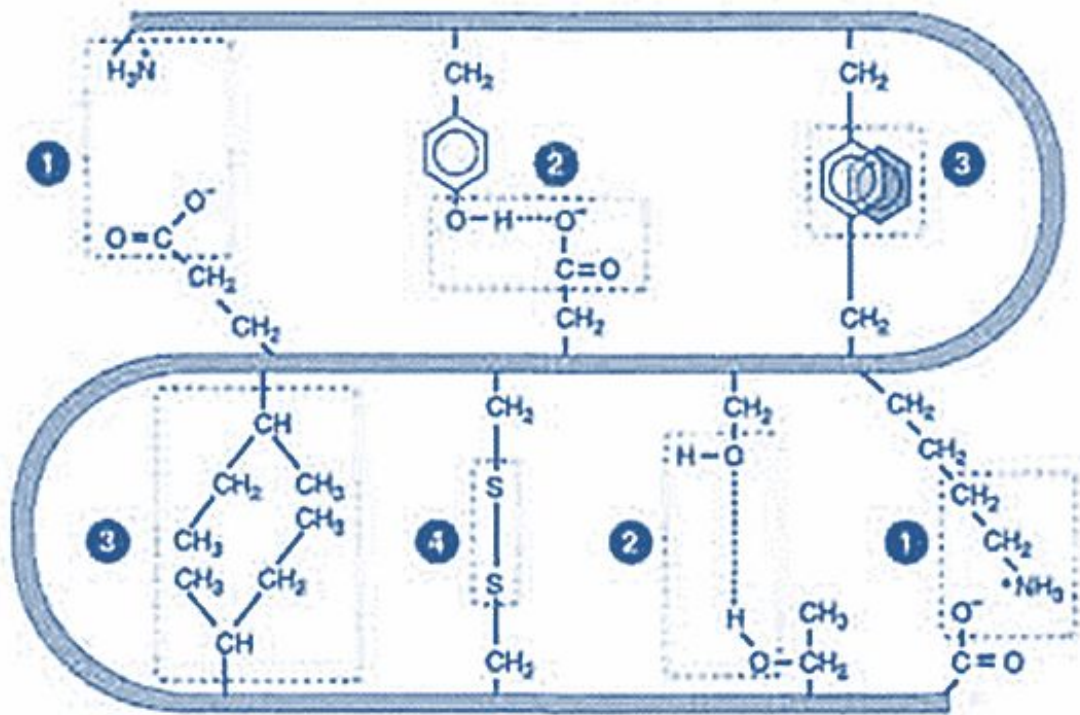


Рис. 11. Типы связей, возникающих между радикалами аминокислот при формировании третичной структуры белка.

- 1 - ионные связи;
- 2 - водородные связи;
- 3 - гидрофобные связи;
- 4 - дисульфидные связи

Конформационная лабильность белков

- Гидрофобные взаимодействия, а также ионные и водородные связи относят к числу слабых.
- Поддержание характерной для белка конформации возможно благодаря возникновению множества слабых связей между различными участками полипептидной цепи.
- Белки обладают **конформационной лабильностью** - склонностью к небольшим изменениям конформации за счёт разрыва одних и образования других слабых связей.
- Конформация белка может меняться при изменении химических и физических свойств среды, а также при взаимодействии белка с другими молекулами.
- При этом происходит изменение пространственной структуры не только участка, контактирующего с другой молекулой, но и конформации белка в целом. Конформационные изменения играют огромную роль в функционировании белков в живой клетке.

Денатурация белков

- **Денатурация белков** - разрыв большого количества слабых связей в молекуле белка с потерей нативной конформации и утратой специфической функции.
- При денатурации белков первичная структура белка не нарушается.
- При достаточно высокой концентрации белка и отсутствии сильного отталкивающего заряда молекулы денатурированного белка могут объединяться друг с другом гидрофобными взаимодействиями, при этом растворимость белка снижается и происходит образование осадка.
- Компактная, плотная пространственная структура нативного белка при денатурации резко увеличивается в размерах и становится легко доступной для расщепления пептидных связей протеолитическими ферментами.

Факторы, вызывающие денатурацию белков

- Денатурацию белков вызывают факторы, способствующие разрыву гидрофобных, водородных и ионных связей, стабилизирующих конформацию белков:
- высокая температура (более 50 °С);
- интенсивное встряхивание раствора;
- органические вещества (например, этиловый спирт, фенол и его производные);
- кислоты и щелочи;
- соли тяжёлых металлов (такие как медь, ртуть, серебро, свинец и др.);
- **детергенты** - вещества, содержащие гидрофобный углеводородный радикал и гидрофильную функциональную группу (такие вещества называют амфифильными). К наиболее известным детергентам относятся мыла (рис. 12).

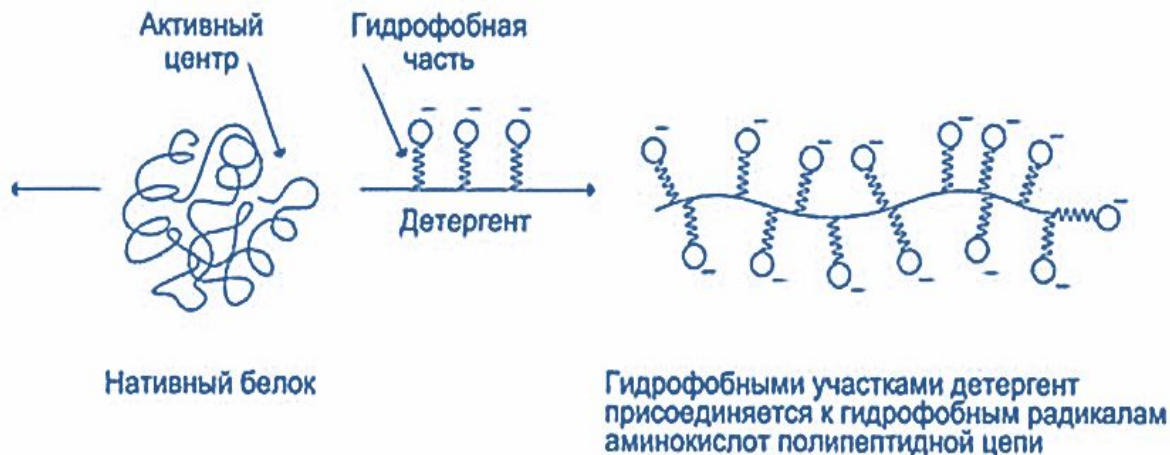


Рис. 12. Денатурация белков с помощью детергентов.

Полиморфизм белков

- **Полиморфизм белков** — существование разных форм белка, выполняющих одинаковые или очень сходные функции (изобелки).
- **Изобелки** - множественные формы белка, обнаруживаемые в организмах одного вида. Белки, выполняющие одинаковые функции в организмах разных биологических видов, носят название "гомологичные белки".
- Многие ферменты имеют несколько изоформ и носят название **изоферментов**.
- **Изоферменты**, или изоэнзимы — это различные по аминокислотной последовательности изоформы или изотипы одного и того же фермента, существующие в одном организме, но, как правило, в разных его клетках, тканях или органах.

Изоферменты

- — это ферменты, синтез которых кодируется разными генами, у них разная первичная структура и разные свойства, но они катализируют одну и ту же реакцию.

Виды изоферментов:

- **Органые** — ферменты гликолиза в печени и мышцах.
- **Клеточные** — малатдегидрогеназа цитоплазматическая и митохондриальная (ферменты разные, но катализируют одну и ту же реакцию).
- **Гибридные** — ферменты с четвертичной структурой, образуются в результате нековалентного связывания отдельных субъединиц (лактатдегидрогеназа — 4 субъединицы 2 типов).
- **Мутантные** — образуются в результате единичной мутации гена.
- **Аллоферменты** — кодируются разными аллелями одного и того же гена.

Ферменты: катализаторы и регуляторы

- **Ферменты** — это белки, обладающие специфическими каталитическими свойствами, то есть каждый фермент катализирует одну или несколько сходных реакций.
- **Субстраты** — молекулы, которые присоединяются к ферменту и изменяются в результате реакции.
- **Активный центр** - часть молекулы фермента, которая обеспечивает связывание субстрата и катализ.

Общие свойства катализаторов и ферментов

1. Сами не вызывают химическую реакцию, а только ускоряют реакцию, которая протекает и без них;
2. Не влияют на энергетический итог реакции;
3. В обратимых реакциях ускоряют как прямую, так и обратную реакцию, причем в одинаковой степени.

Общие свойства ферментов

1. Высокая эффективность действия — ускоряют реакцию в 10^8 – 10^{12} раз;
2. Высокая избирательность ферментов к субстратам (субстратная специфичность) и к типу катализируемой реакции (специфичность действия);
3. Высокая чувствительность к неспецифическим физико-химическим факторам среды — температуре, pH, ионной силе раствора;
4. Высокая чувствительность к химическим реагентам;
5. Высокая и избирательная чувствительность к физико-химическим воздействиям тех или иных химических веществ, которые благодаря этому могут взаимодействовать с ферментом, улучшая или затрудняя его работу (активаторы и ингибиторы).

Регуляторные белки

- К регуляторным белкам относят большую группу белковых гормонов, участвующих в поддержании постоянства внутренней среды организма, которые воздействуют на специфические клетки-мишени.

Например, гормон инсулин выделяется в кровь при повышении концентрации глюкозы в крови после еды и, стимулируя использование глюкозы клетками, снижает концентрацию глюкозы до нормы, т.е. восстанавливает гомеостаз.

- К регуляторным относят белки, присоединение которых к другим белкам или иным структурам клетки регулирует их функцию.

Например, белок кальмодулин в комплексе с четырьмя ионами Ca^{2+} может присоединяться к некоторым ферментам, меняя их активность.

Регуляторные ДНК-связывающие белки, присоединяясь в определённые моменты к специфичным участкам ДНК, могут регулировать скорость считывания генетической информации .

Белки регулируют

- продвижение клетки по клеточному циклу,
- транскрипцию,
- трансляцию,
- сплайсинг,
- активность других белков и
- многие другие процессы.

Важнейшую роль в регуляции внутриклеточных процессов играют **протеинкиназы** и **протеинфосфатазы** — ферменты, которые активируют или подавляют активность других белков путём присоединения к ним или отщепления фосфатных групп.