

**Структура и свойства белков
Использование белков и пептидов
для решения некоторых задач
биотехнологии**

Гусев Николай Борисович

Кафедра биохимии биологического
факультета МГУ

План

Аминокислоты и первичная структура белка

Вторичная структура

Надвторичная структура

Третичная структура

Механизмы сворачивания полипептидной цепи

Биоинженерия пептидов и белков

Четвертичная структура

Фибриллярные белки различной структуры

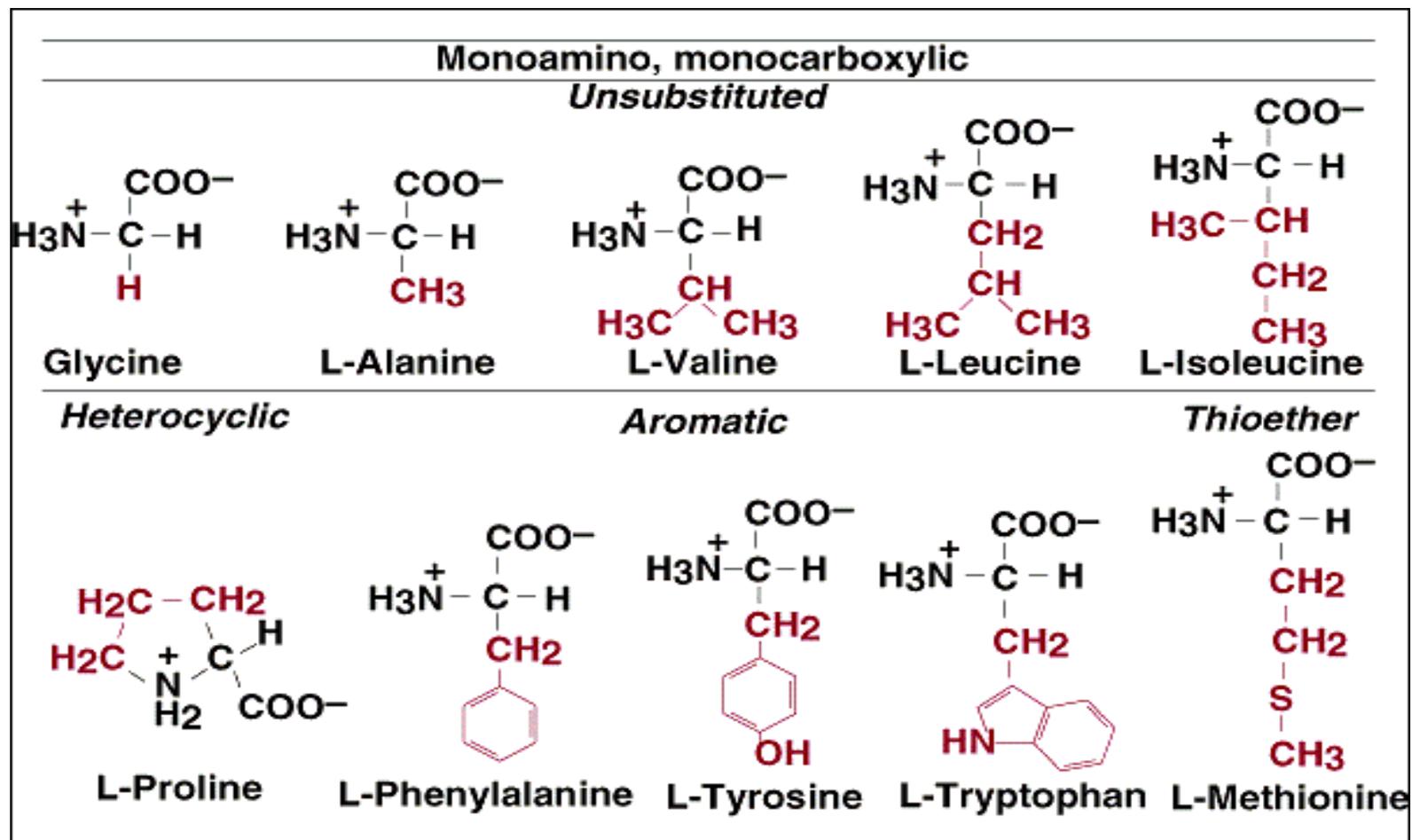
**Глобулярные белки и обратимые процессы
полимеризации и деполимеризации**

Белки-моторы (миозин, кинезин, динеин)

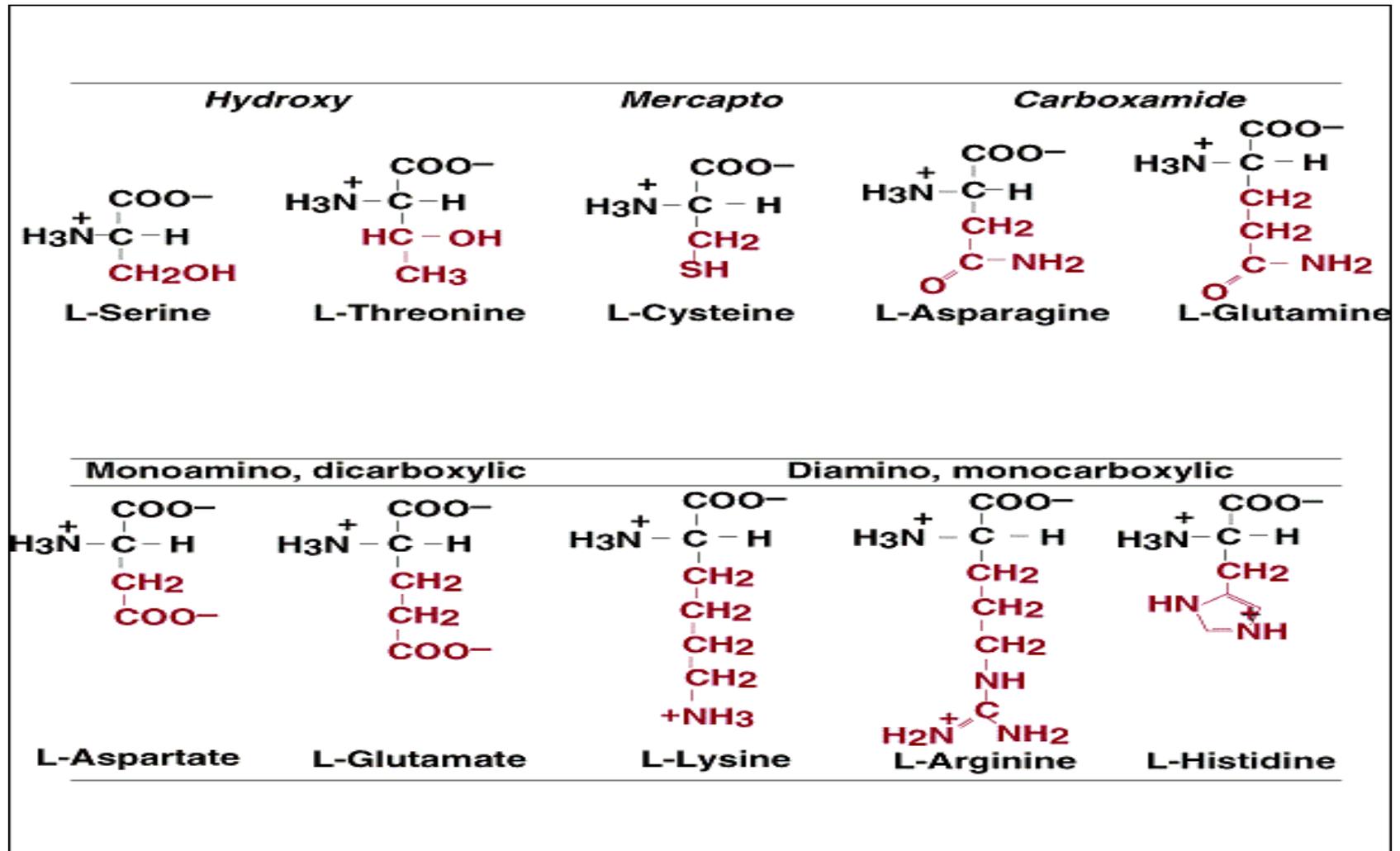
Белки-моторы в нанотехнологии

Аминокислоты и первичная структура белка

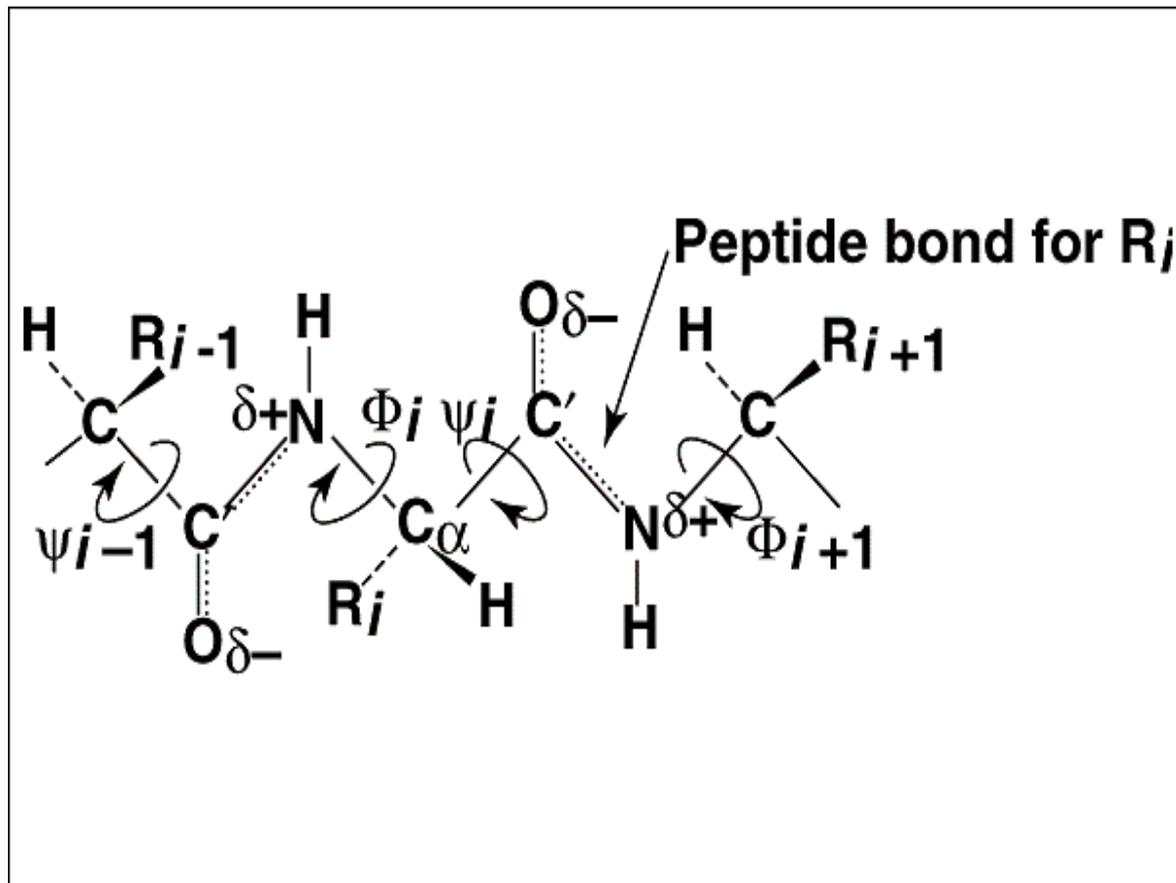
Общая классификация аминокислот



Общая классификация аминокислот

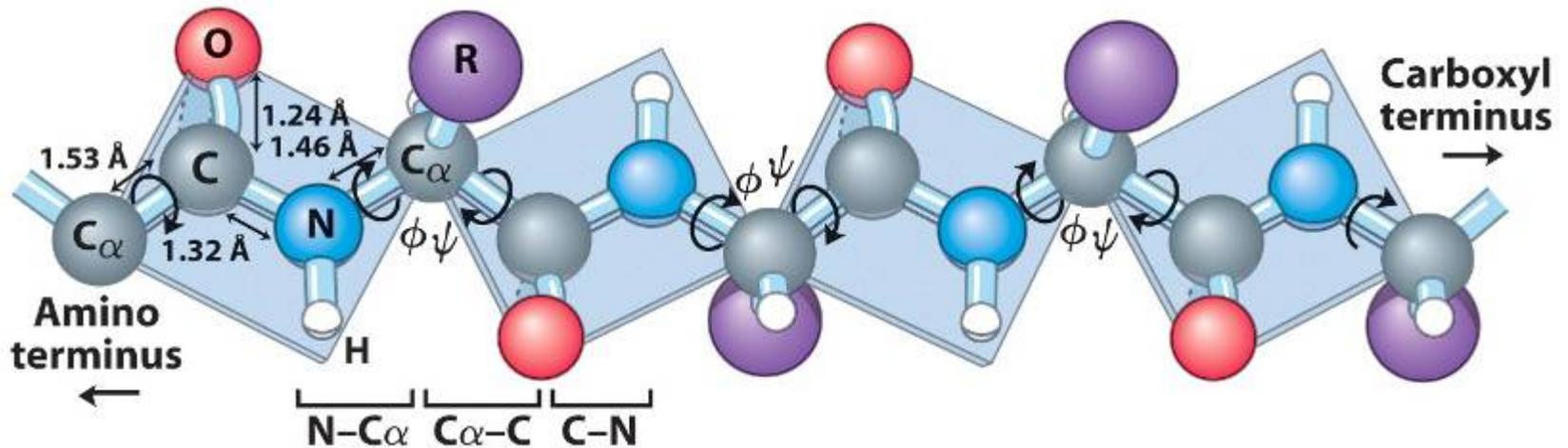


Геометрия пептидной связи

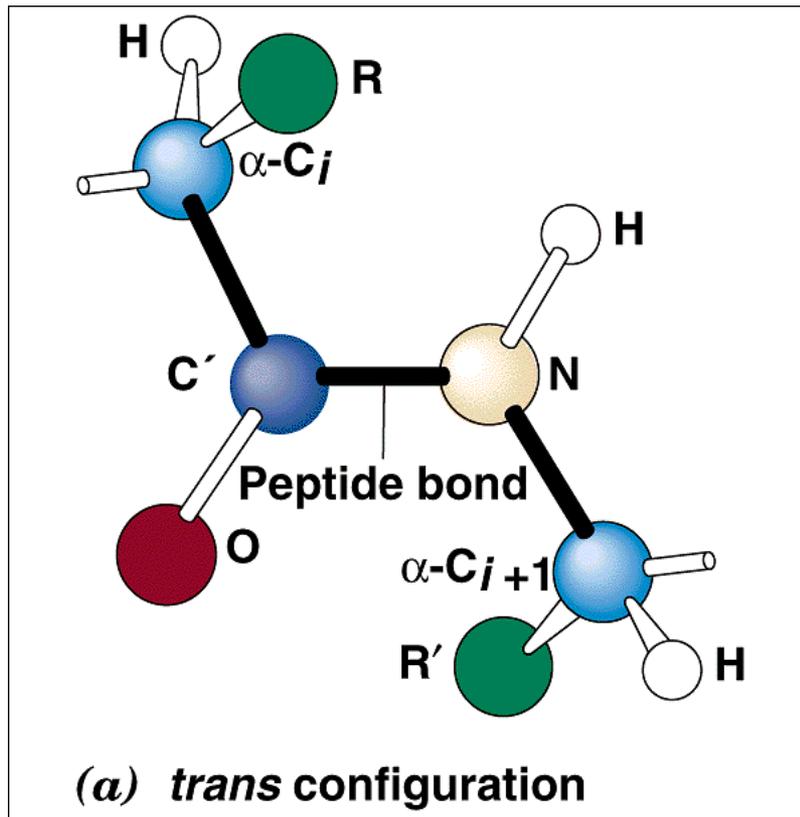


- Показаны заторможенные C-N связи, а также связи, вращение вокруг которых обеспечивает формирование углов ϕ и ψ

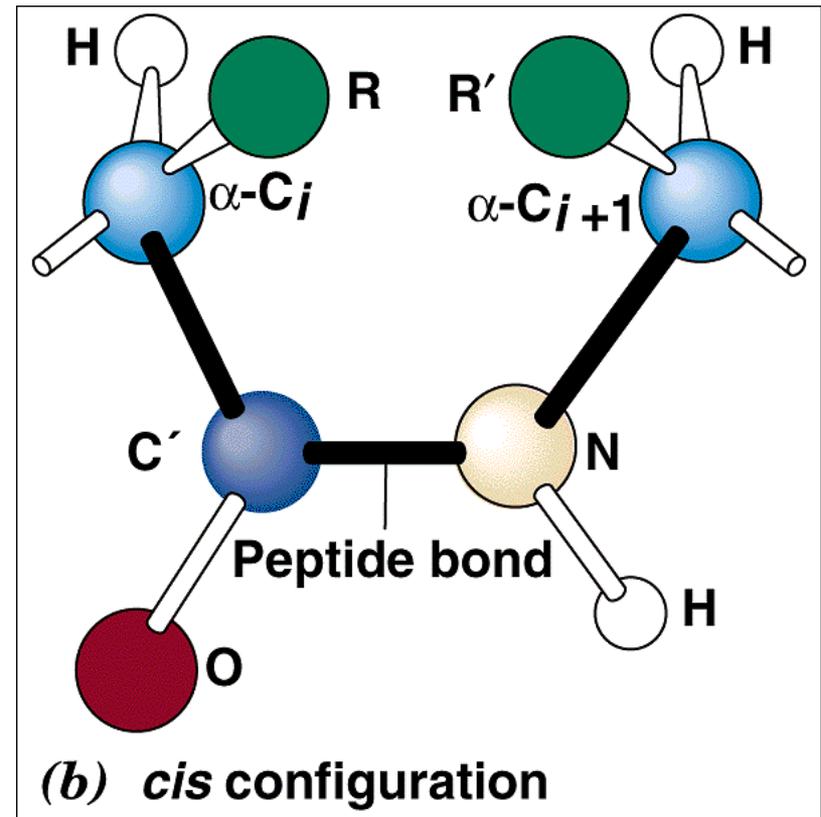
Участок полипептидной цепи. Показаны плоскости, соответствующие планарной пептидной связи и углы ϕ и ψ , вокруг которых возможно относительно свободное вращение



Цис и транс-конфигурации пептидной СВЯЗИ



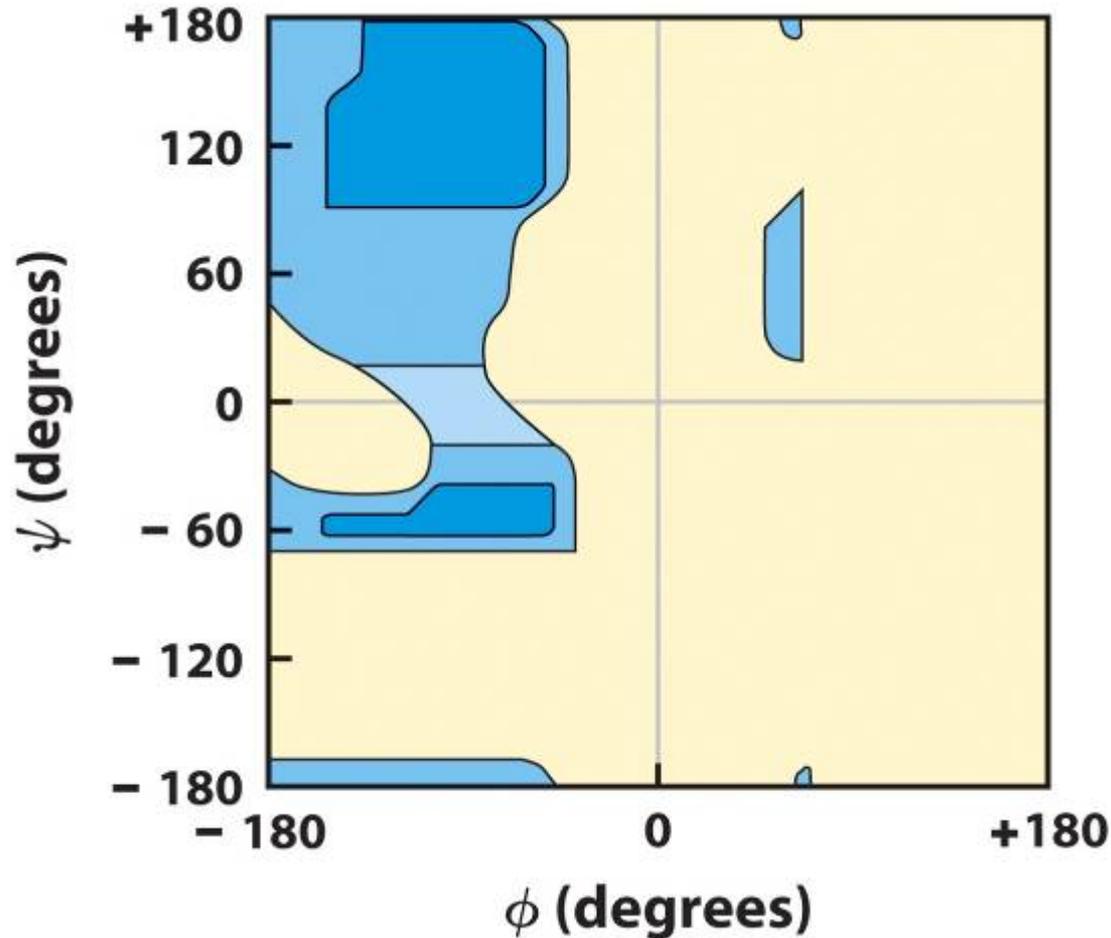
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



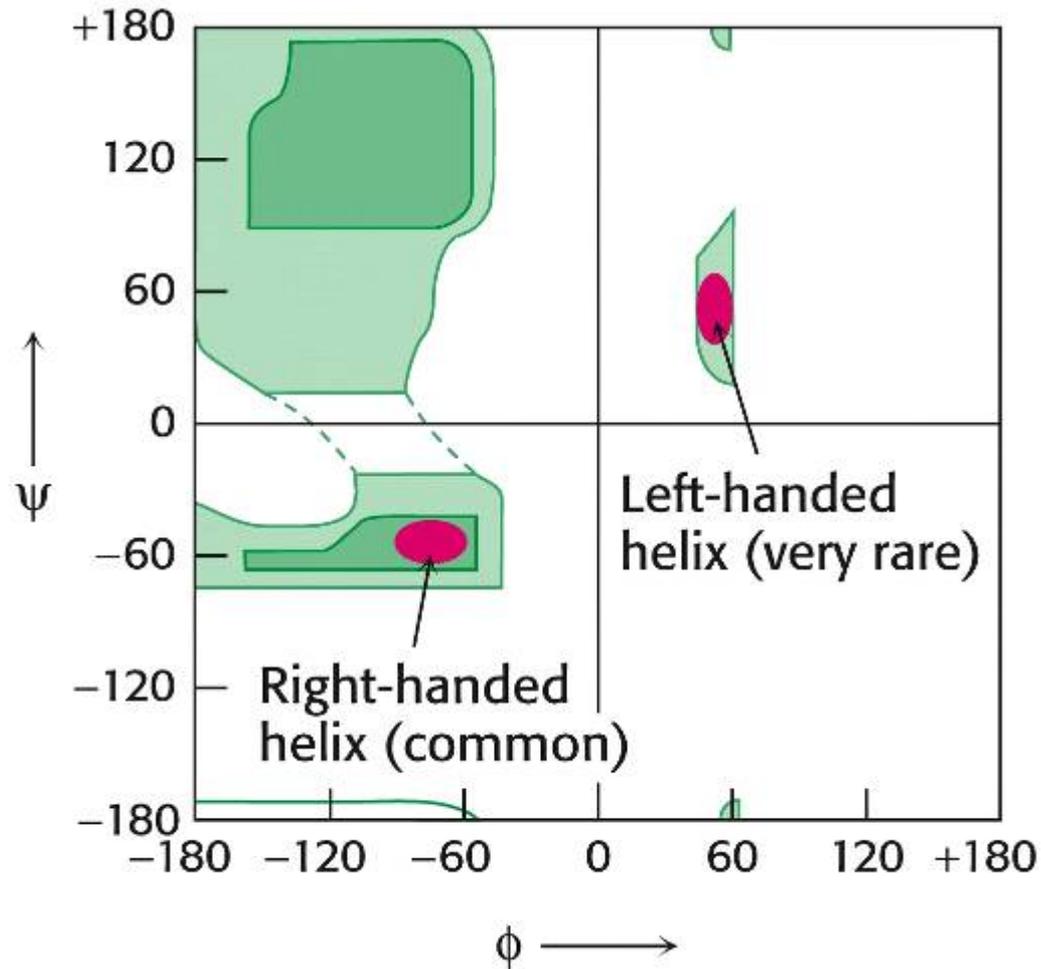
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Вторичная структура белка

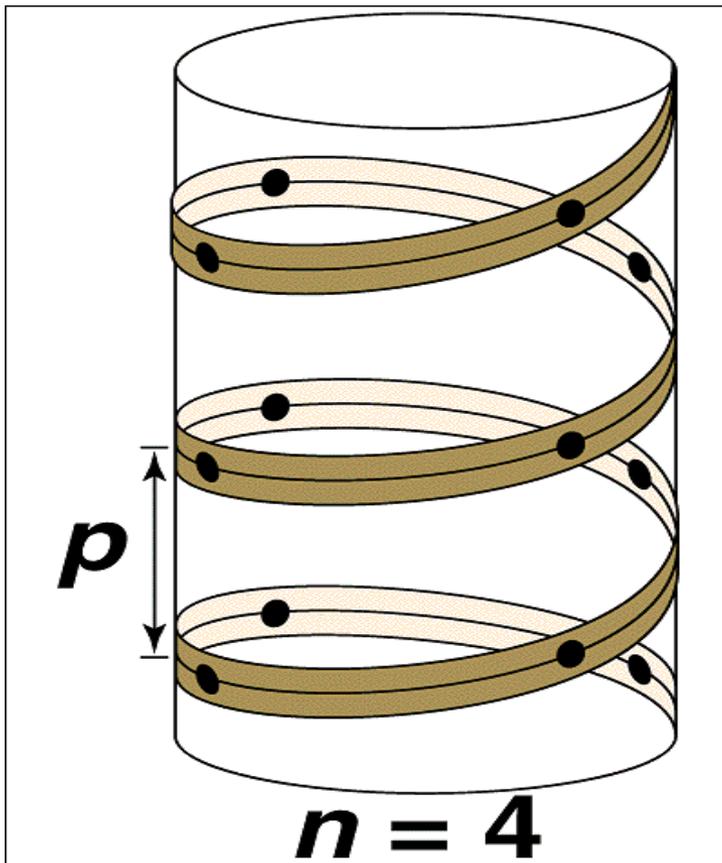
Карта Рамачандрана для Ala. Аналогичные карты для Gly имеют больше разрешенных областей, а для Pro и разветвленных аминокислот – меньше разрешенных областей



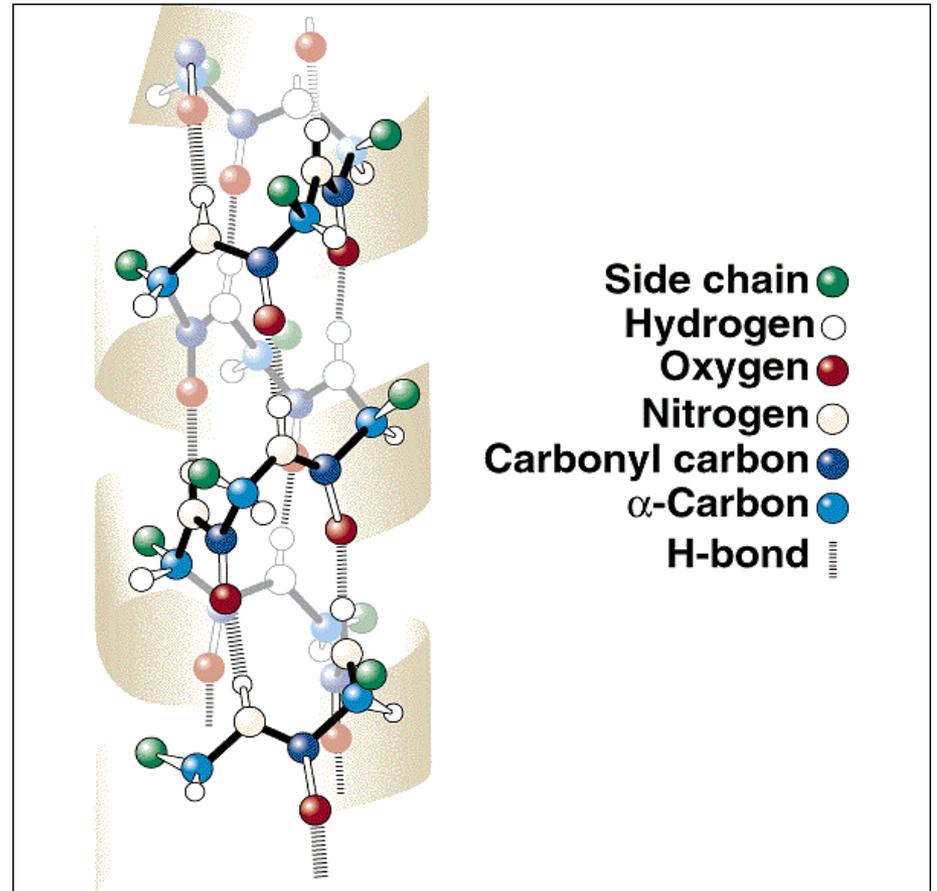
Допустимые углы ϕ и ψ для образования α -спиралей



Геометрия α -спирали

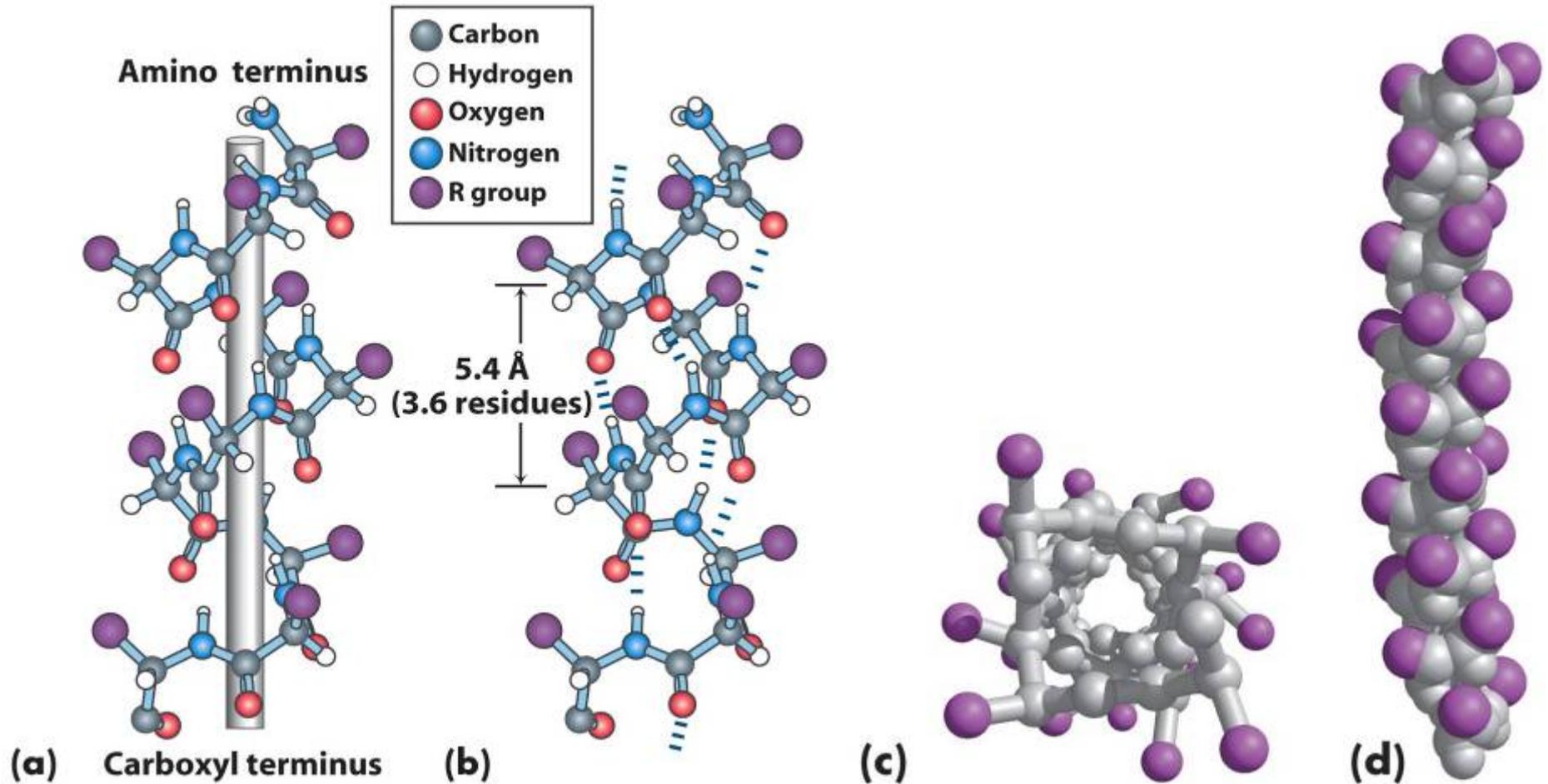


Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Строение α -спирали



Допустимые углы ϕ и ψ для образования β -складок

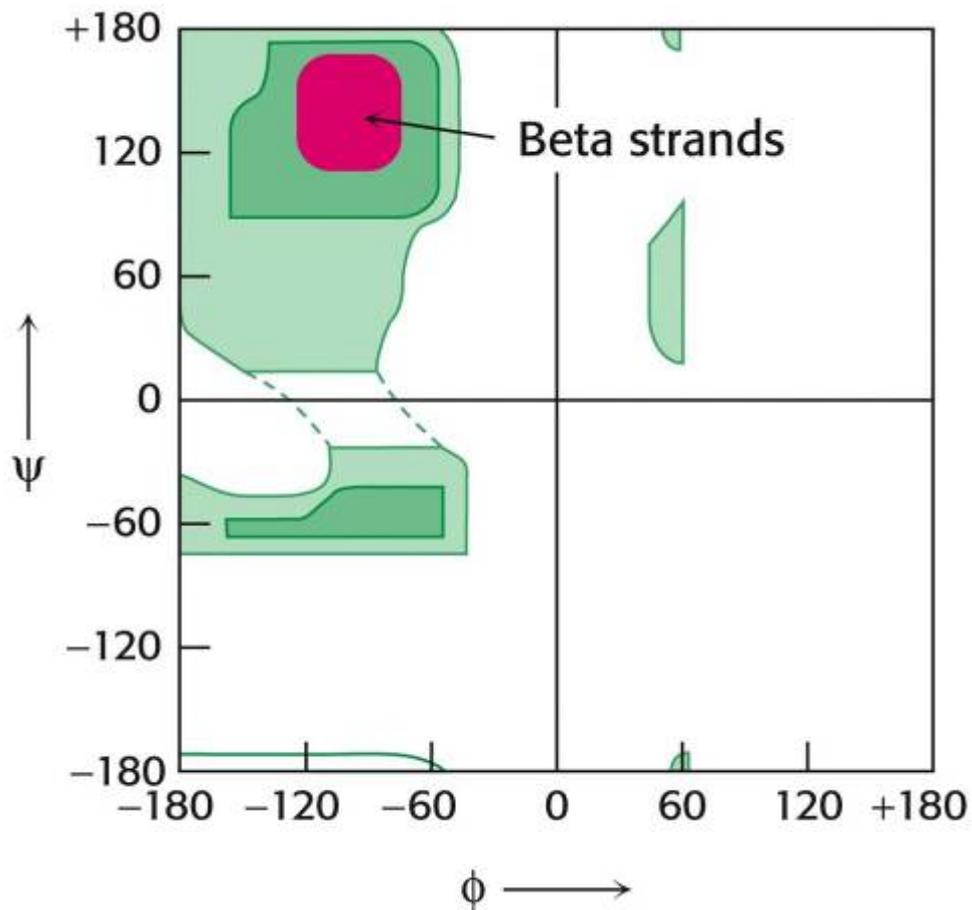
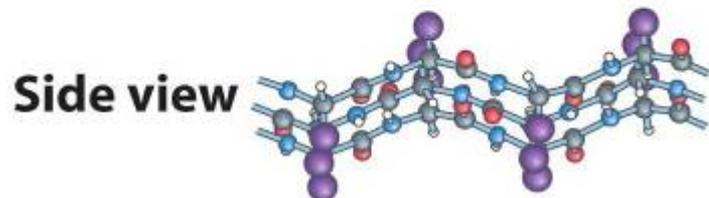
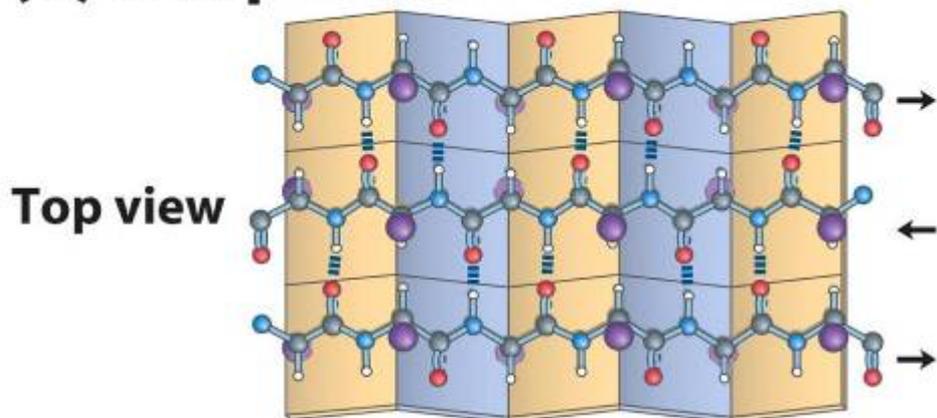
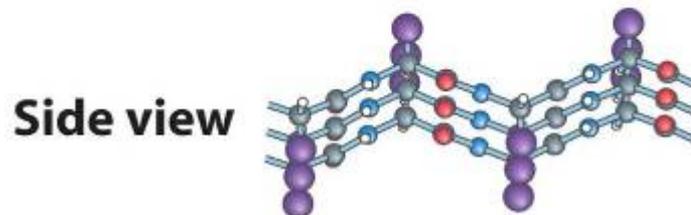
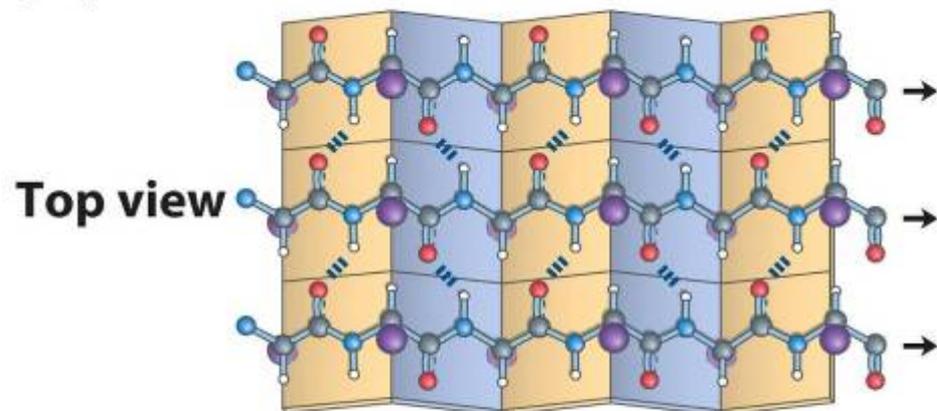


Схема строения антипараллельного (слева) и параллельного (справа) β -складчатого листа

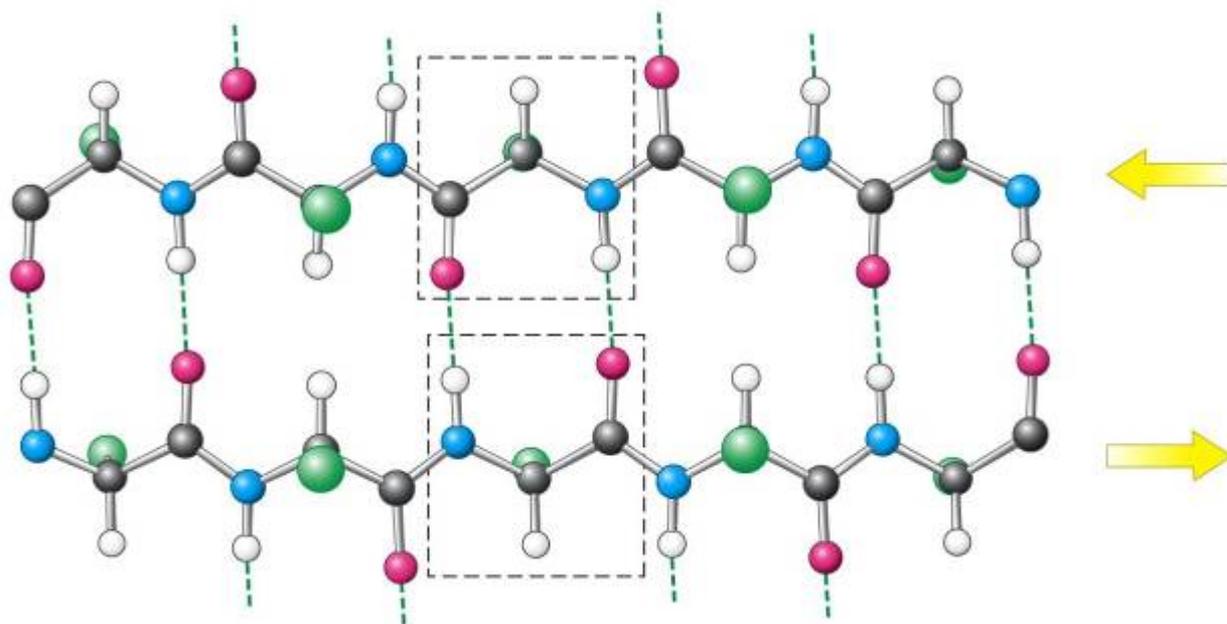
(a) Antiparallel



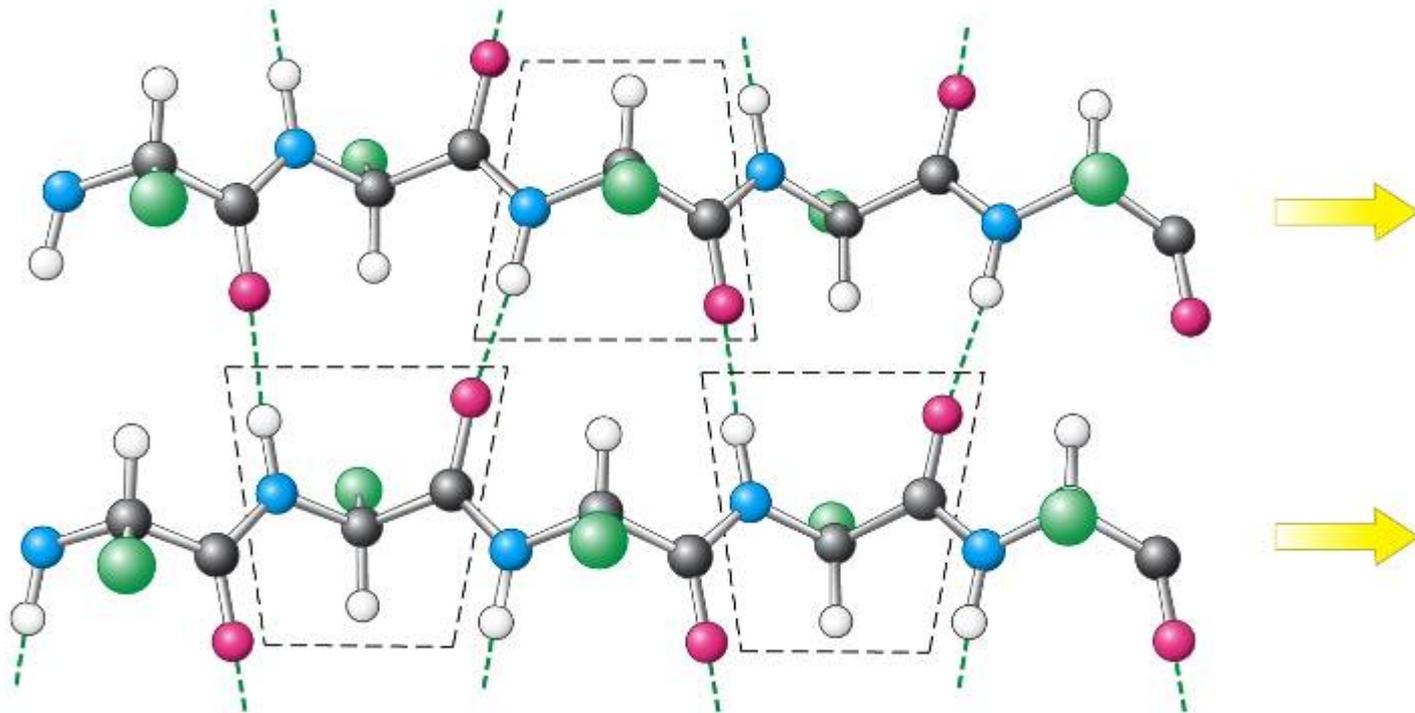
(b) Parallel



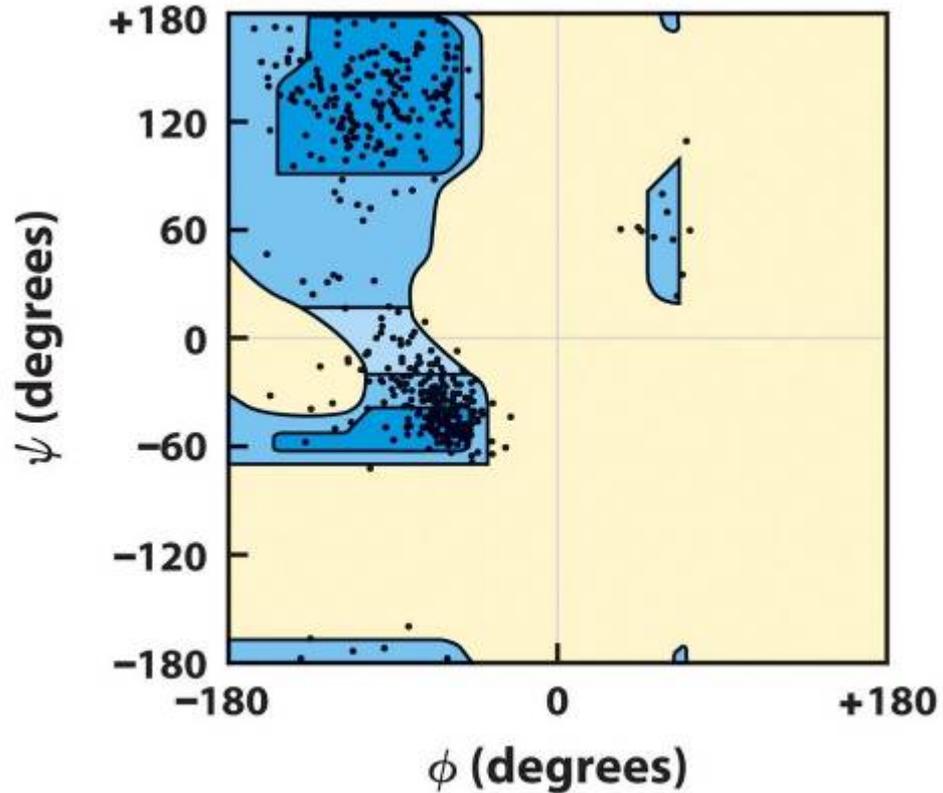
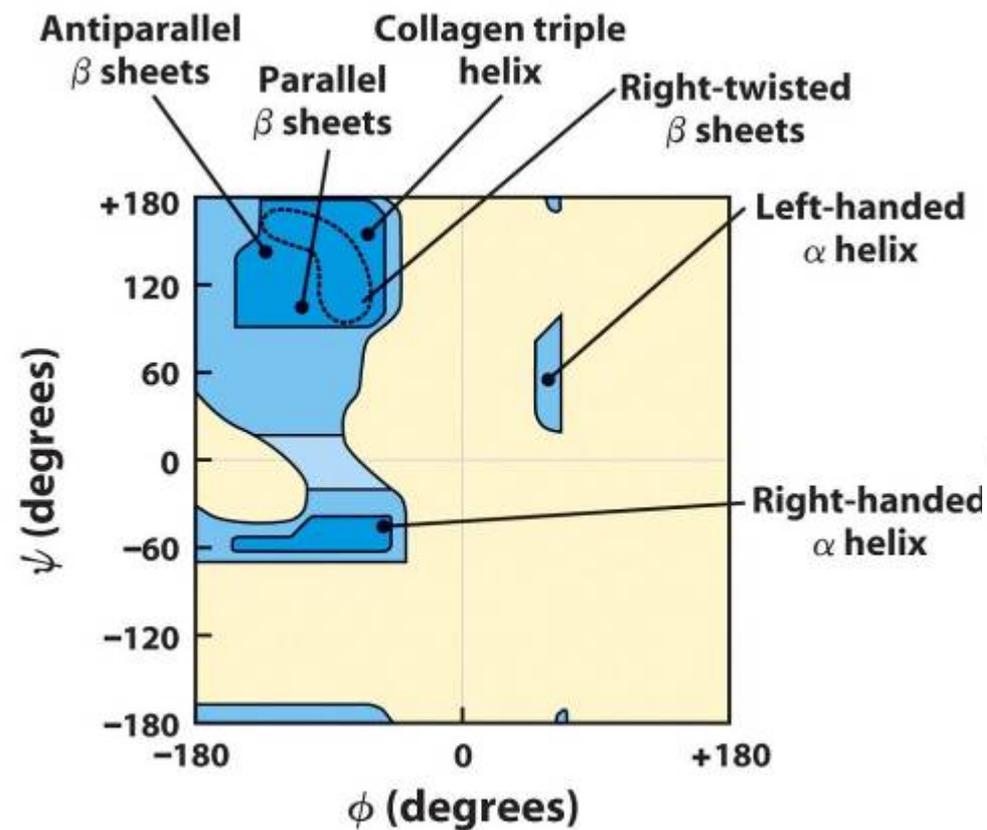
Антипараллельная β -складка



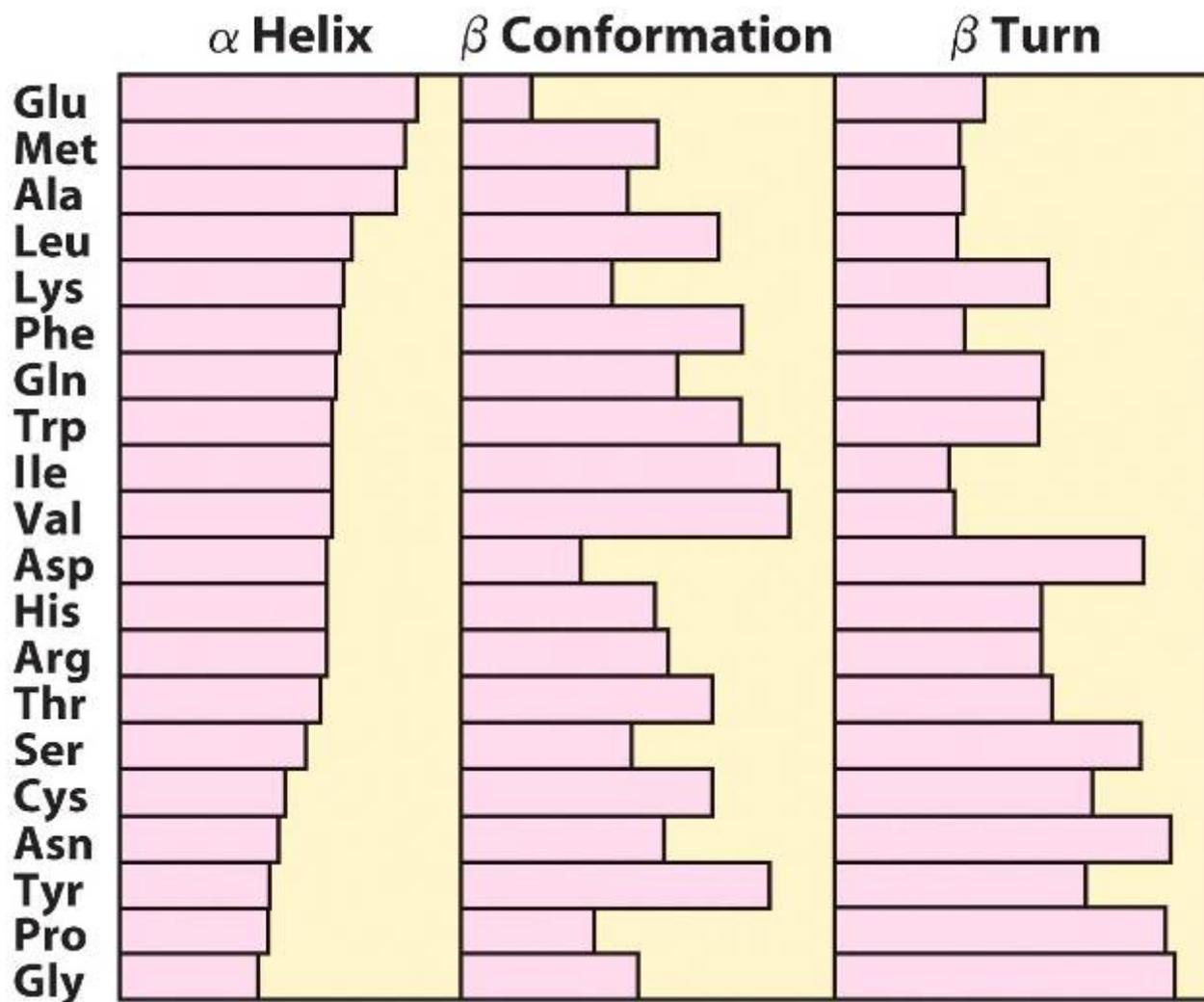
Параллельная β -складка



**Углы ϕ и ψ для некоторых разрешенных элементов
вторичной структуры (слева) и набор указанных
углов для аминокислот (за исключением Gly)
пируваткиназы (справа)**

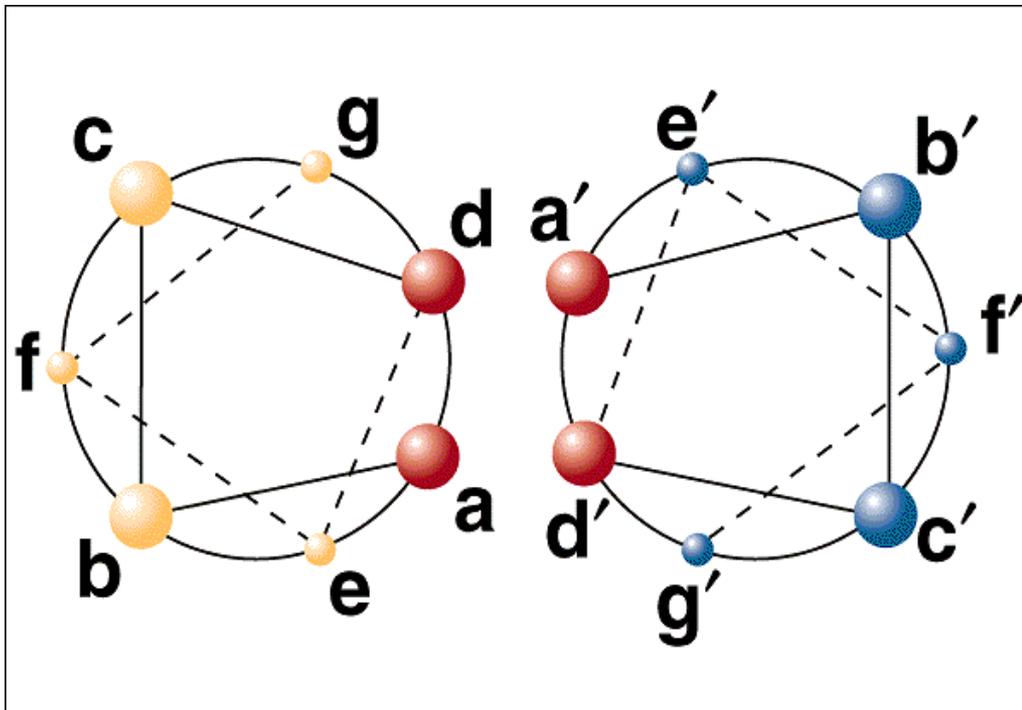


Предпочтительное расположение различных аминокислот в различных элементах вторичной структуры



Надвторичная структура белка

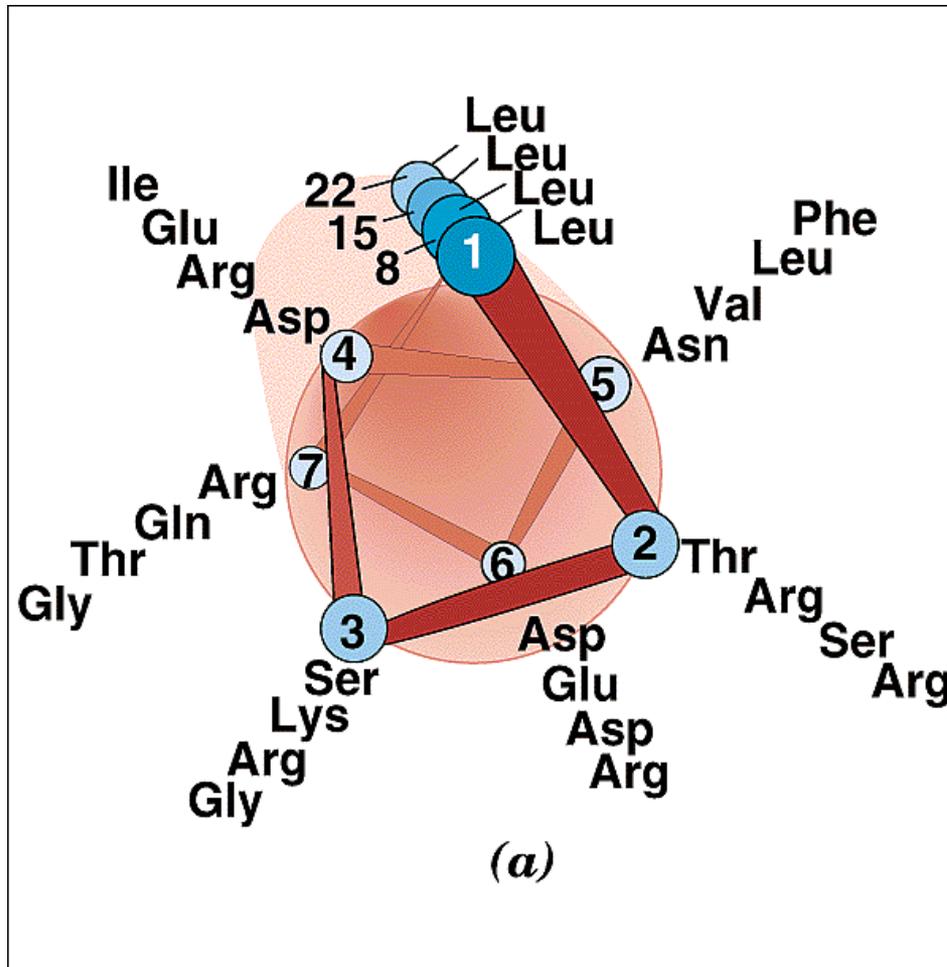
Структура типа coiled-coil (суперспирализованная α -спираль), характерная для кератинов, тропомиозина и хвоста миозина



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

- Показано образование гидрофобных контактов между остатками a'-d и a-d', а также возможные солевые мостики между остатками e-g' и e'-g

Надвторичные структуры. Лейциновая МОЛНИЯ



- Схема строения α -спирали, способной образовывать так называемую лейциновую молнию

Схема образования гидрофобных контактов между двумя α -спиралями, содержащими остатки лейцина

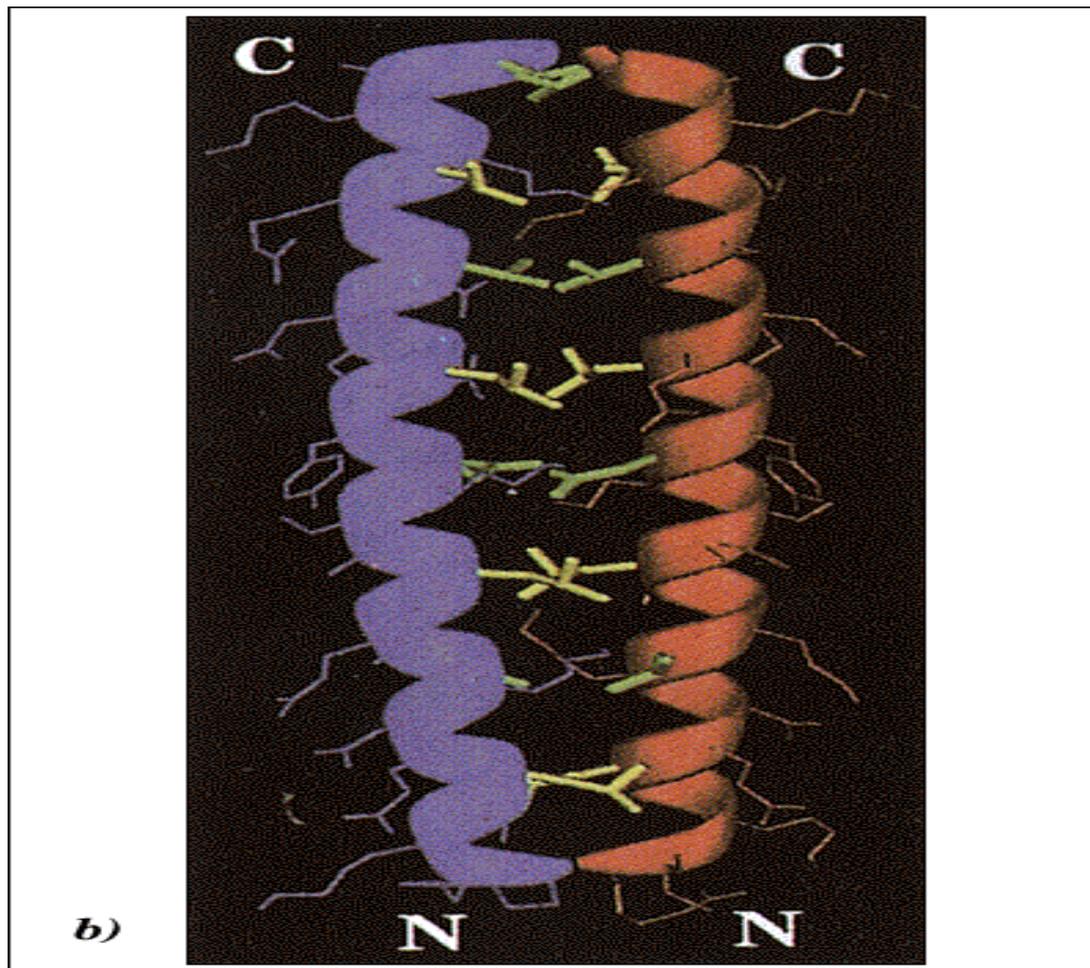
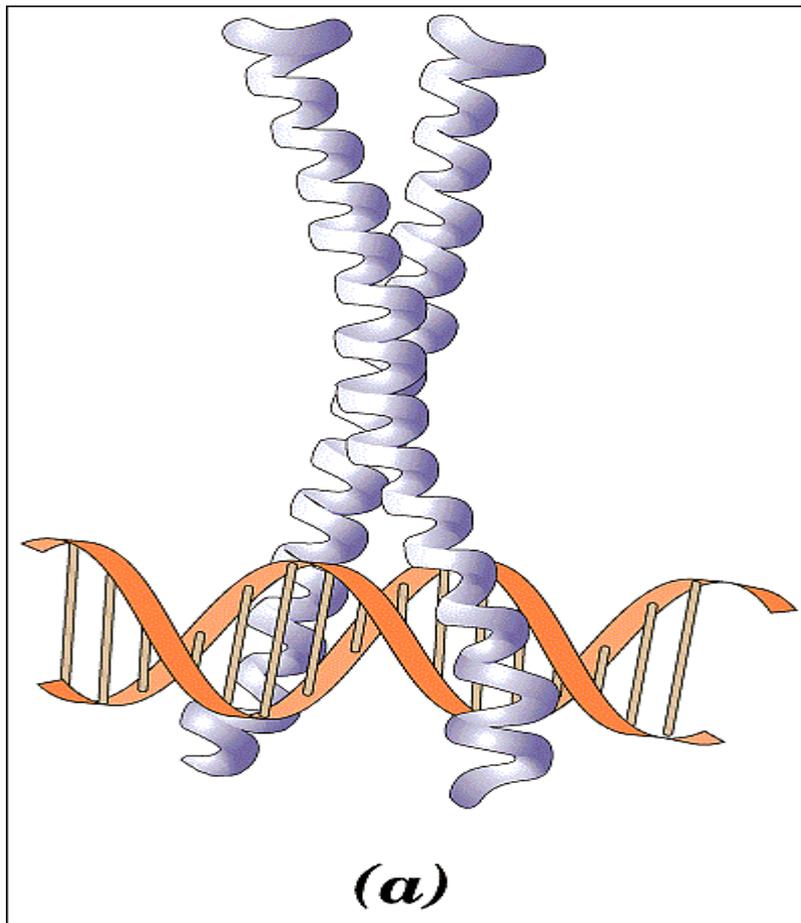
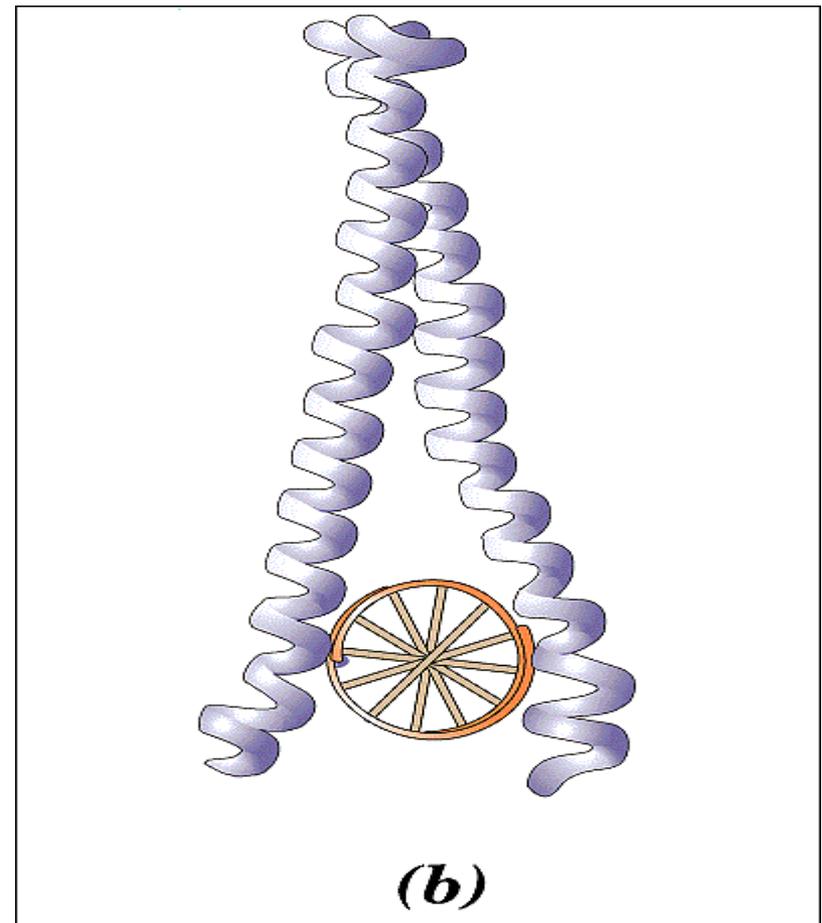


Схема контактов, образуемых двумя α -спиралями, формирующими «лейциновые молнии»



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Надвторичная структура. Схема строения Zn-пальца

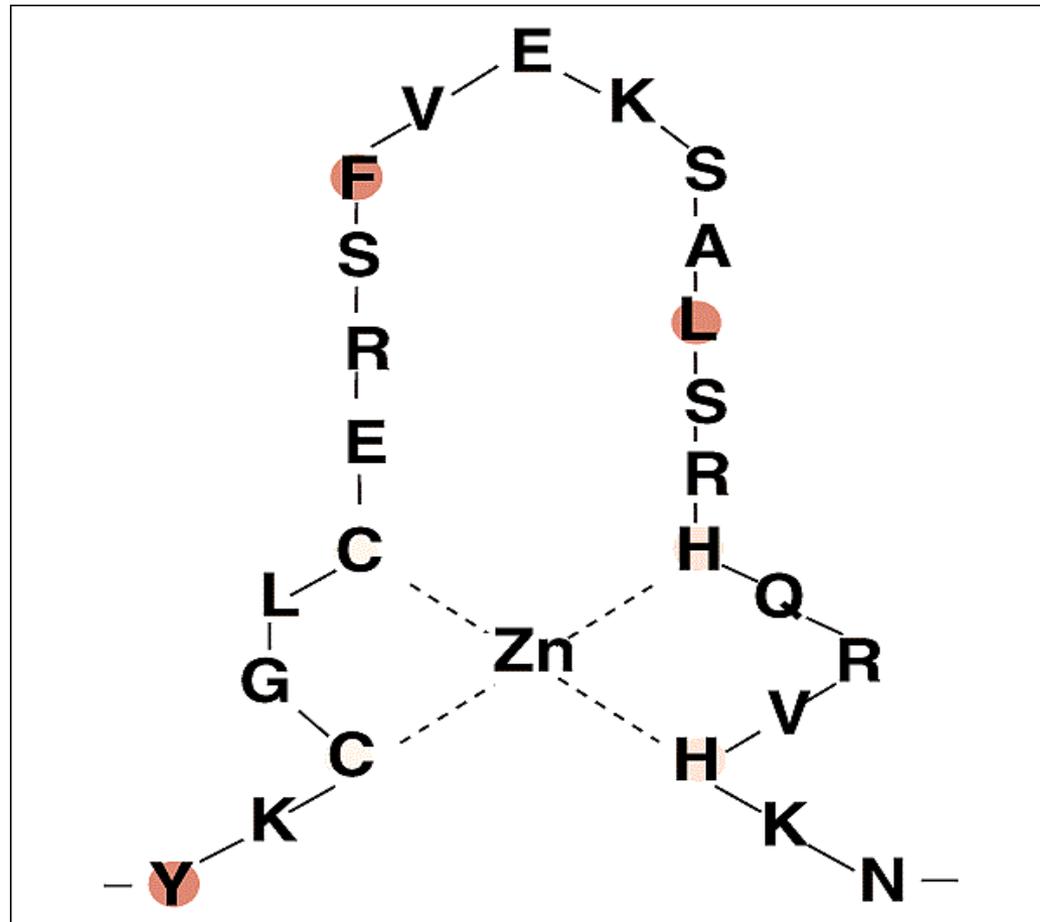
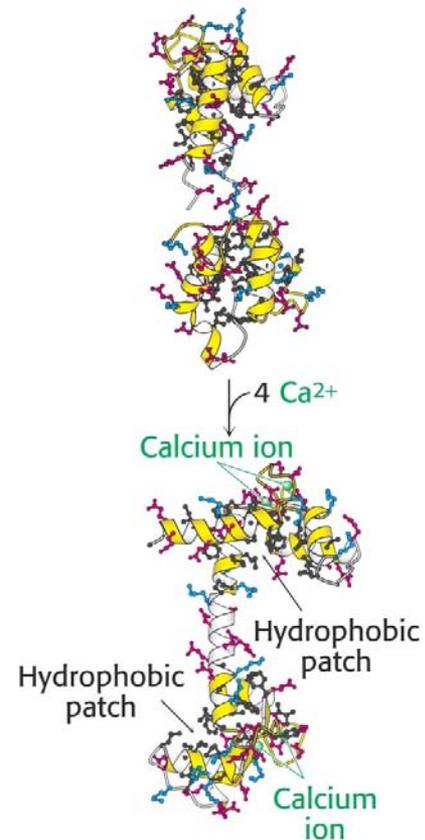
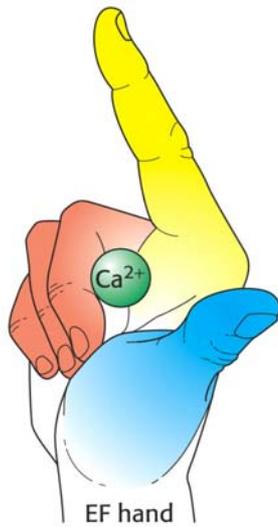
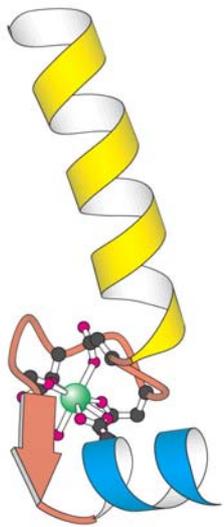
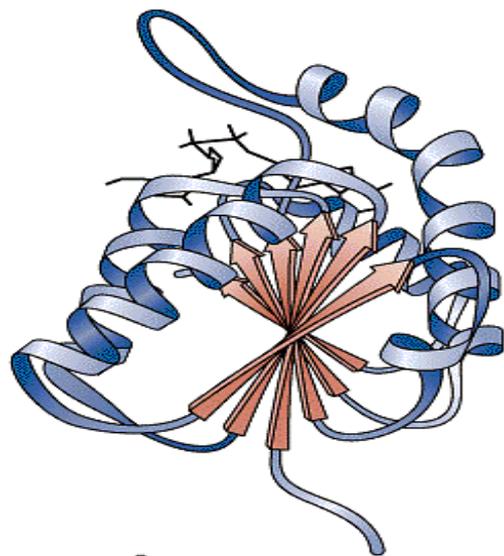


Схема строения Ca^{2+} -связывающей петли (EF-руки), и конформационные изменения, индуцируемые ионами кальция, в структуре кальмодулина

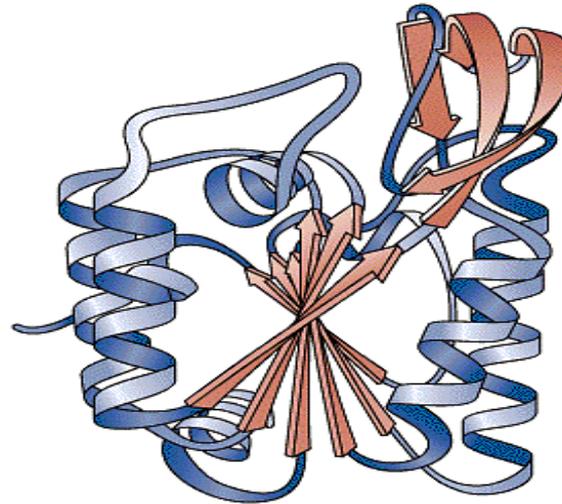


Третичная структура белка

Примеры α,β -сложенных доменов с классическим расположением повернутых β -складок

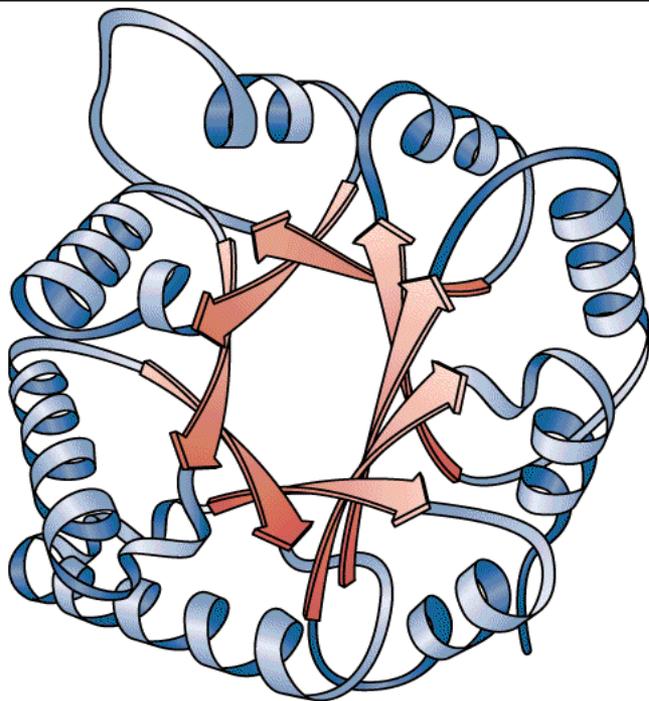


**Lactate
Dehydrogenase
domain 1**



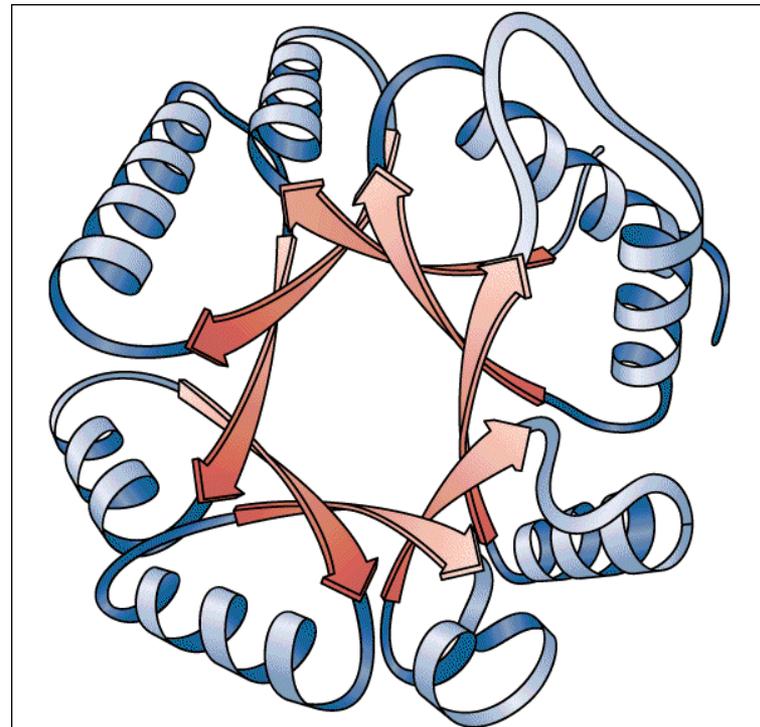
**Phosphoglycerate
Kinase domain 2**

Пример α,β -сложенного домена с β -бочкой в центре домена



Triose Phosphate Isomerase

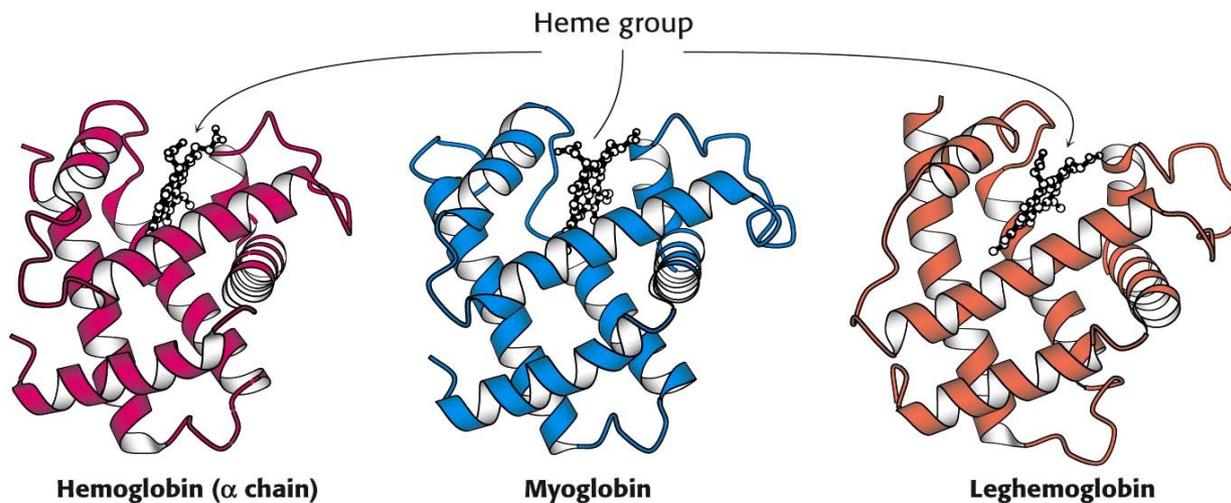
Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.



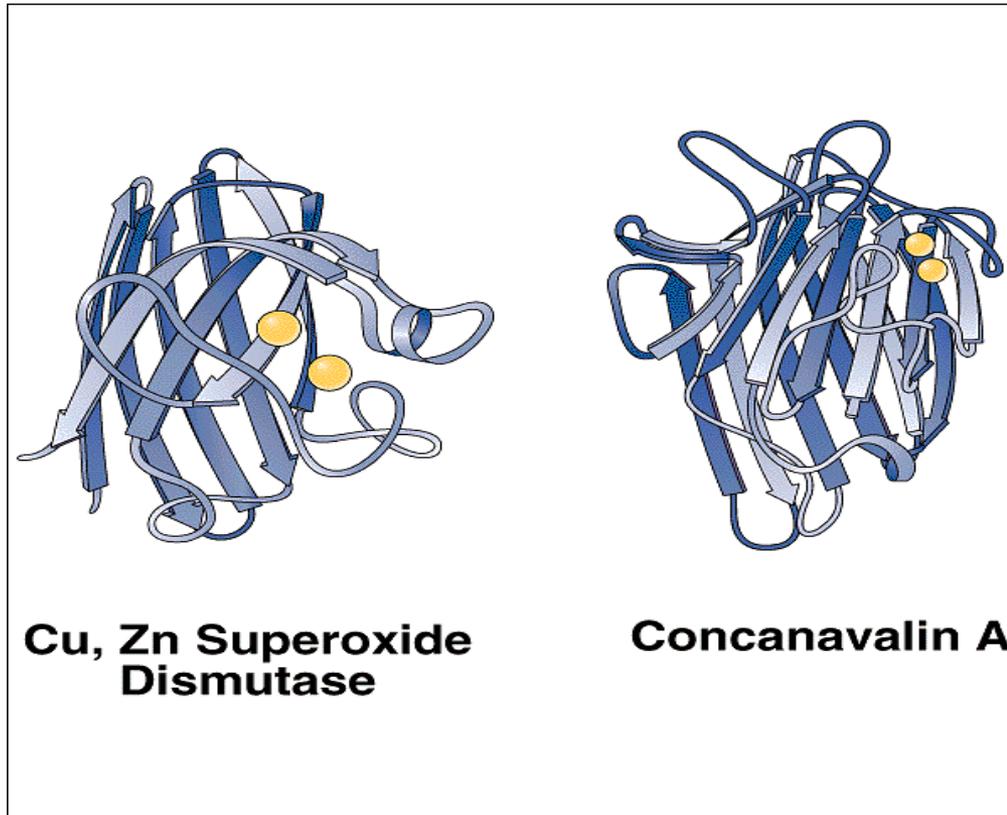
Pyruvate Kinase domain 1

Copyright © 1997 Wiley-Liss, Inc.

Консервативная третичная структура трех гем-содержащих белков



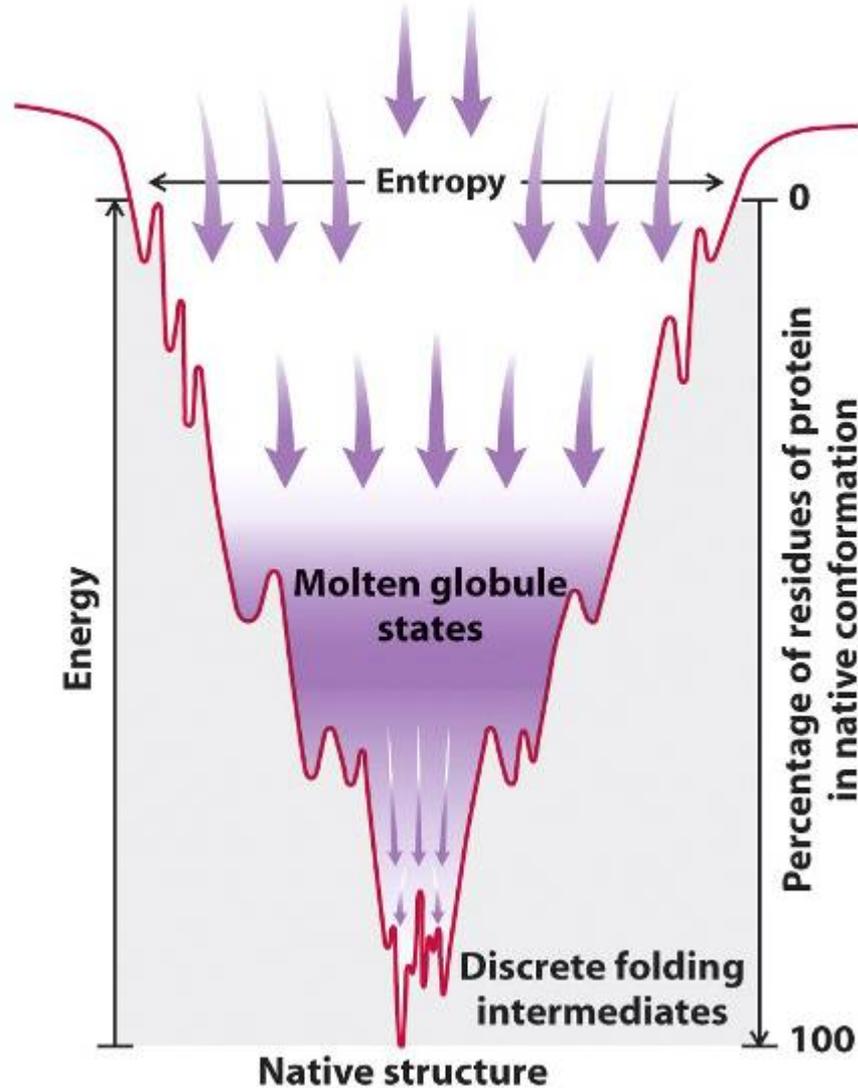
Примеры типичных β -складчатых ДОМЕНОВ



Механизмы сворачивания полипептидной цепи

Энергетический профиль сворачивания полипептидной цепи

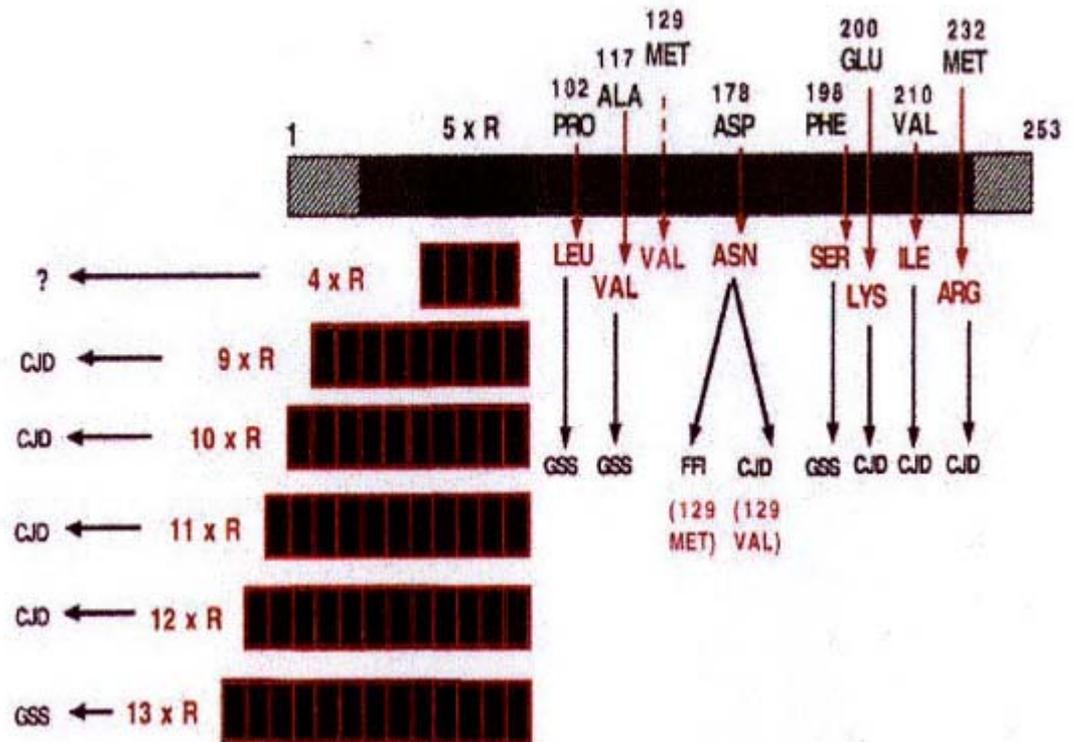
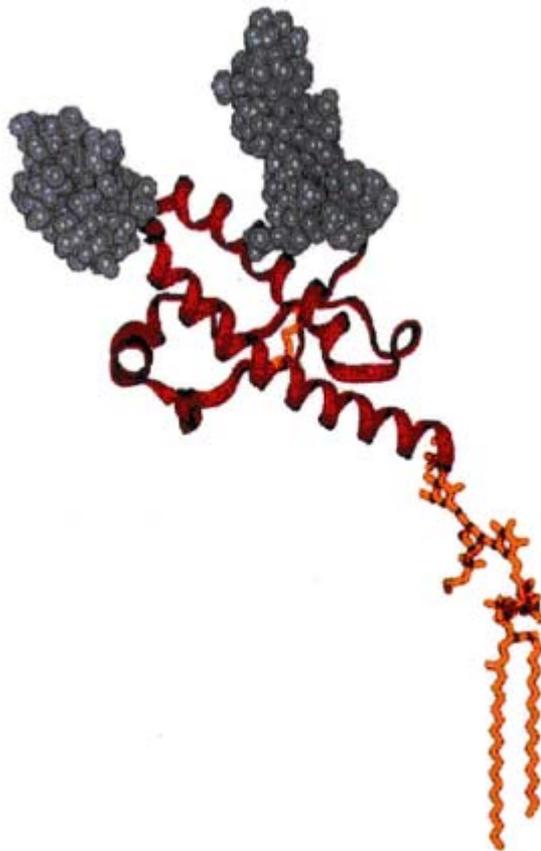
Beginning of helix formation and collapse



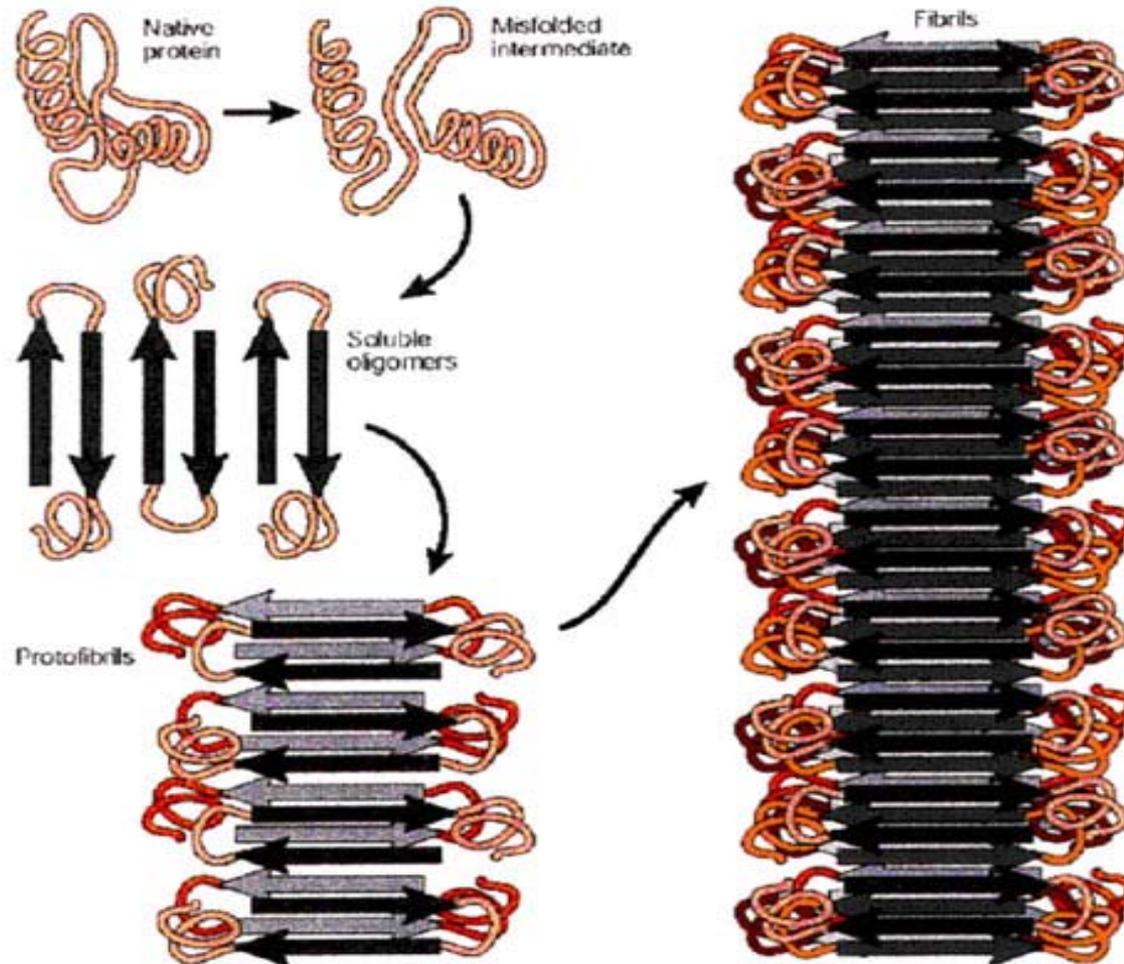
Некоторые нейродегенеративные заболевания, связанные с неправильным сворачиванием белков

Заболевание	Этиология	Характерная патология
Прионные болезни (куру, болезни Крейтцфельда-Якоба, фатальная семейная бессонница, болезнь Герстманна-Штрауслера-Шейнкера)	Спорадические, генетические или инфекционные	Губчатая дегенерация, амилоиды и другие агрегаты
Амиотрофический латеральный склероз	Спорадический	Тельца Бонна, аксональные сфероиды
Болезнь Паркинсона	Спорадический α -синуклеин, паркин	Тельца Леви
Фронтотемпоральная деменция	Мутации тау-белка	Тельца Пика
Болезнь Альцгеймера	Спорадический, пресенилин	Нейритные пластины
Болезнь Хантингтона	Хантингтин	Внутриядерные включения, цитоплазматические агрегаты
Другие полиглутаминовые болезни	Атаксин-1,3 и др	Внутриядерные включения

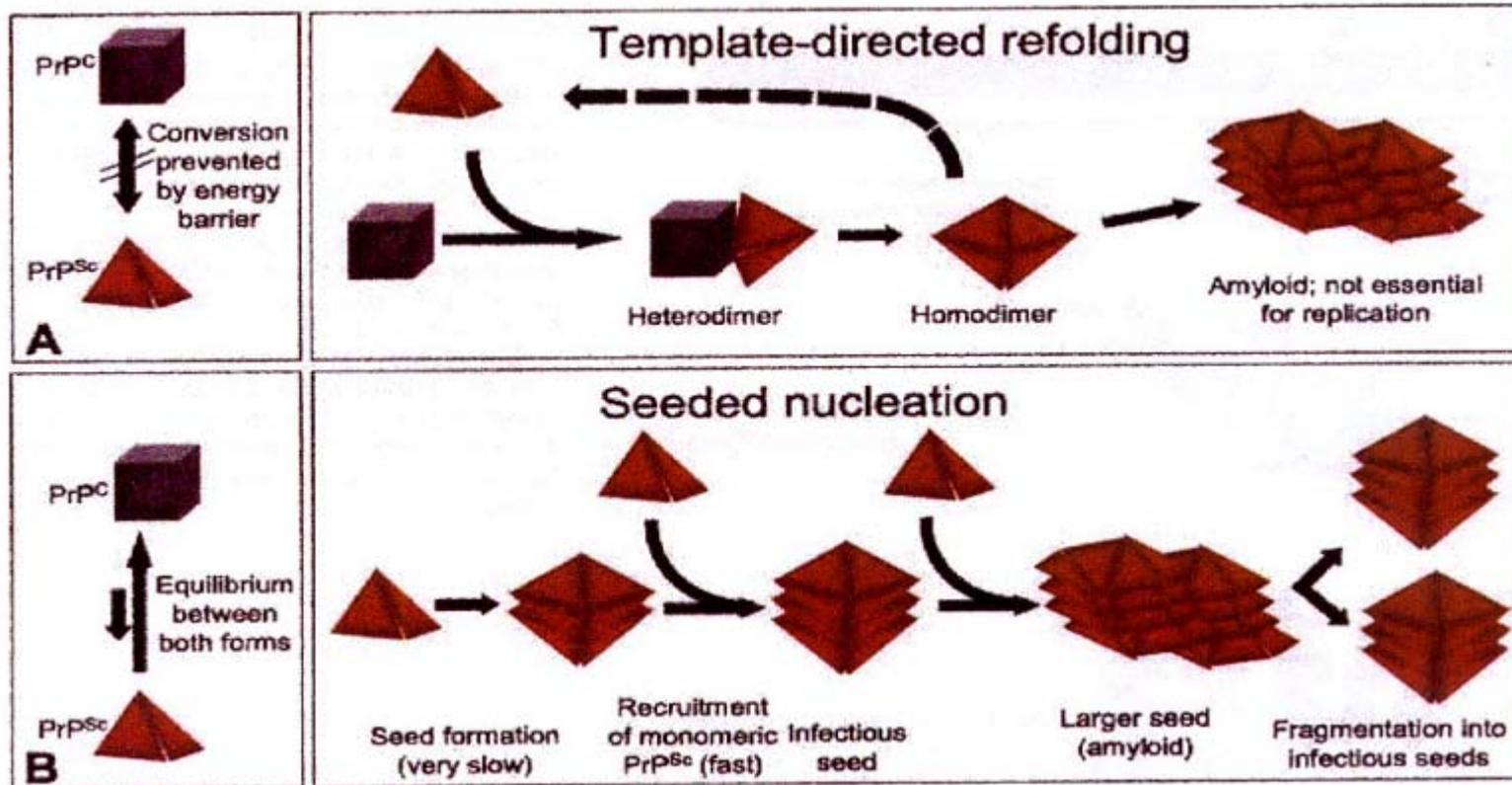
Схема строения молекулы приона (слева), и точечные мутации прионов, приводящие к различным нейродегенеративным заболеваниям (СJD – болезнь Крейцфельда-Якоба, FFI – злокачественная семейная бессонница, GSS – синдром Герстмана-Штрассера)



Возможный механизм образования β -амилоидных структур



Два возможных пути образования нерастворимых амилоидных агрегатов



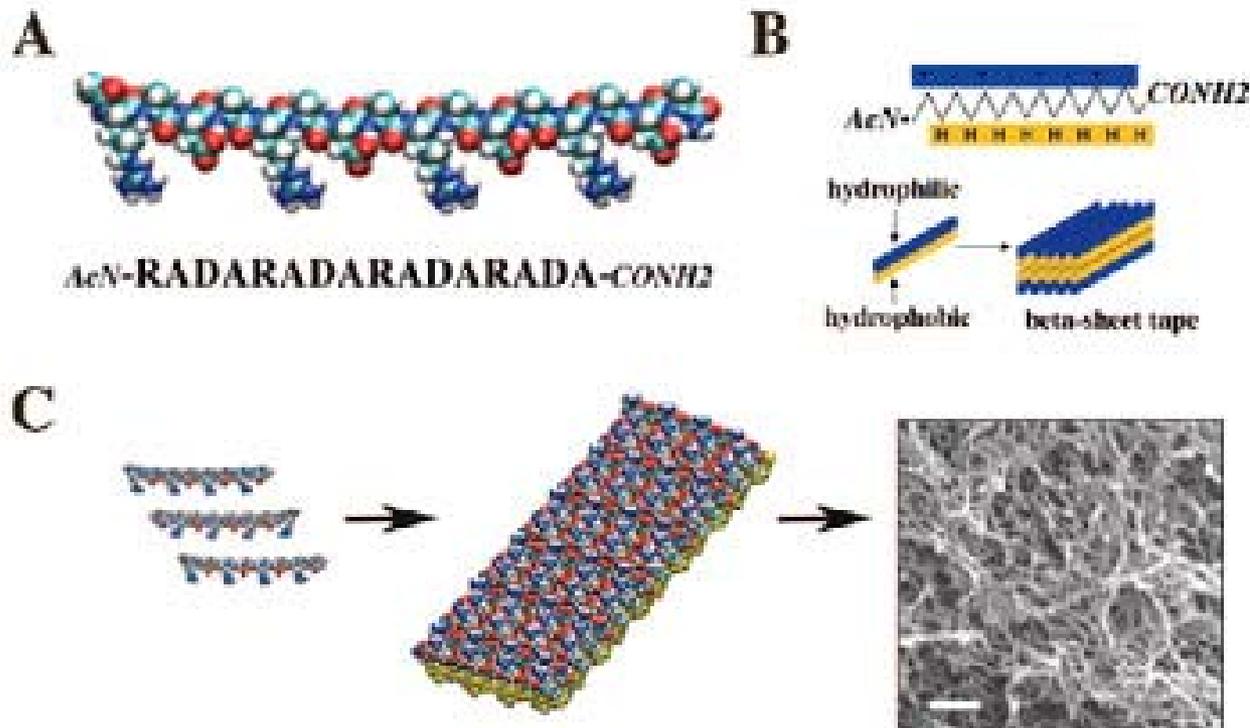
Биоинженерия пептидов и белков

Использование самоагрегирующих пептидов для образования нановолокон.

А. Молекулярная модель пептида RAD16-1. В. Двойной ковер, образованный антипараллельными β -слоями. С.

Сеть, образованная RAD16-1.

Semino, J. Dental. Res. 87, 606, 2008



Получение самоагрегирующих пептидов направленного действия.

А. Структура пептидов RAD16-1 и YIGSR-GG-RAD16-1.

Добавление YIGSSR-GG обеспечивает связывание с
внеклеточными ламининами. В. Двойной ковер, получаемый
при использовании указанных пептидов в соотношении 9/1.

Semino, J. *Dental. Res.* 87, 606, 2008

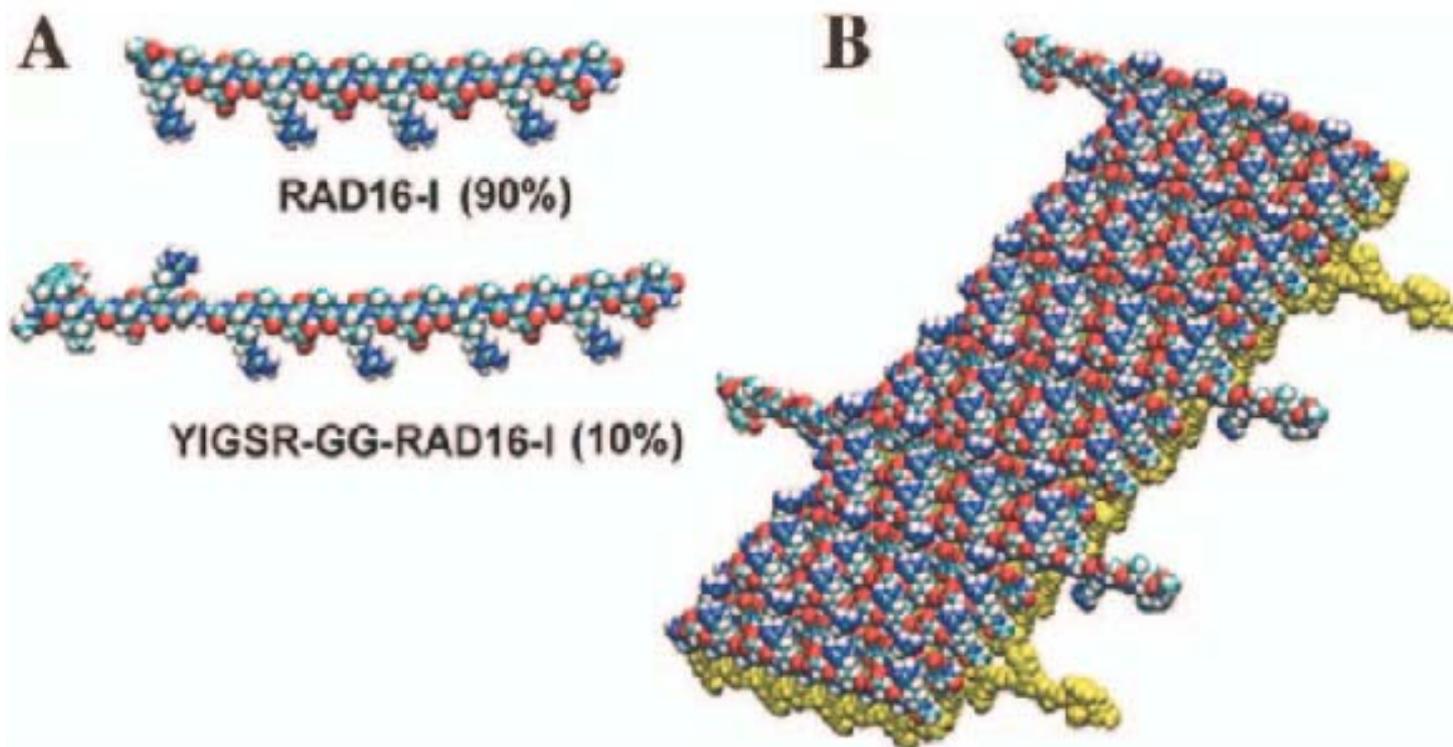
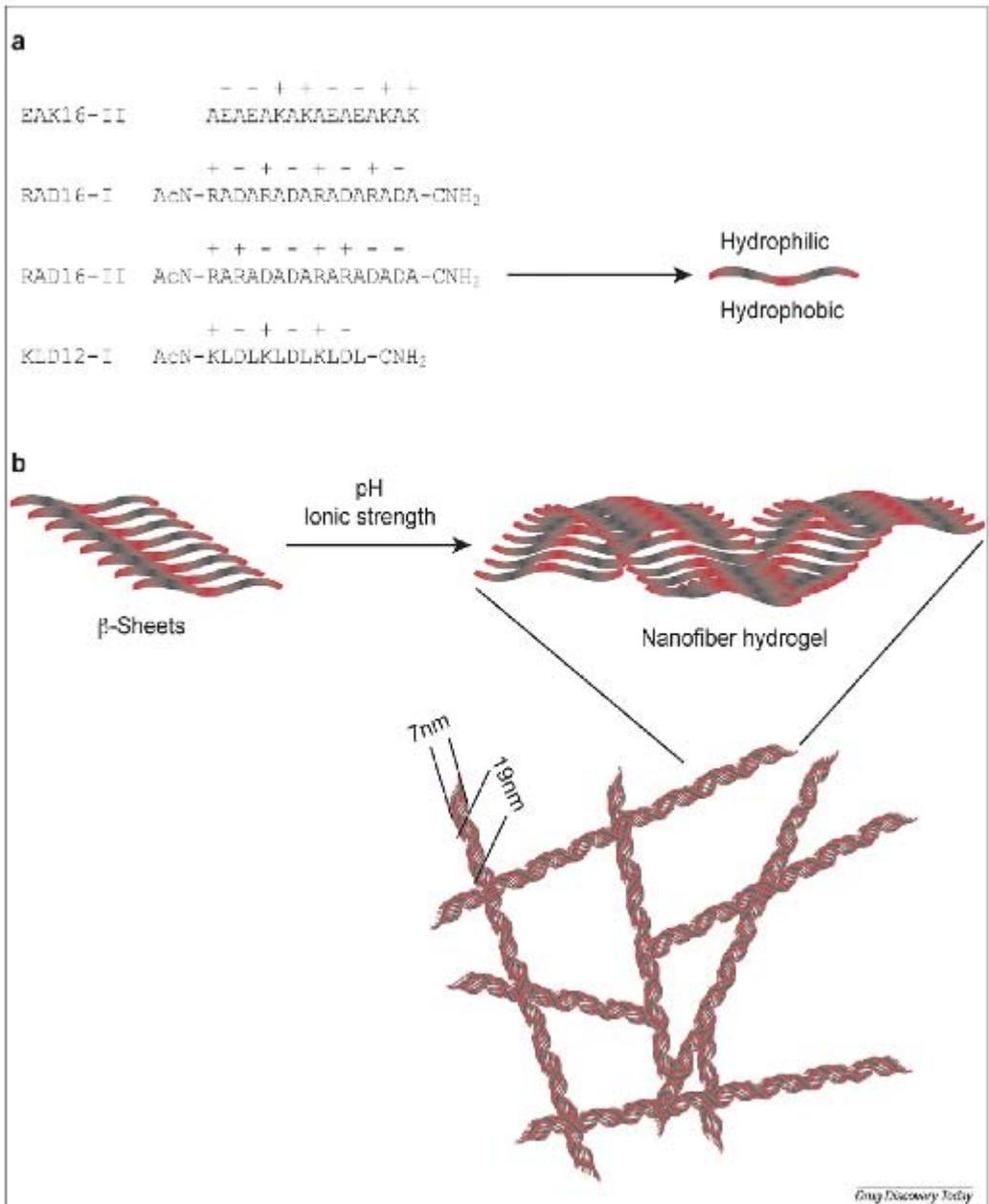


Figure 2. Peptide aggregation function. (A) Peptides RAD16-1 and its functionalized, dehydrated peptide.



Самособирающиеся пептиды образуют стабильные гидрогели

Vincent et al., *Drug Discovery Today*
12, 561, 2007

а. Примеры различных самособирающихся пептидов.

б. При низкой ионной силе пептиды собираются в стабильные β -складки, а при физиологических рН и ионной силе они формируют нановолокна диаметром 10 нм с порами диаметром 50-200 нм

Самособирающиеся пептиды обеспечивают доставку и фиксацию белков

Vincent et al., Drug Discovery

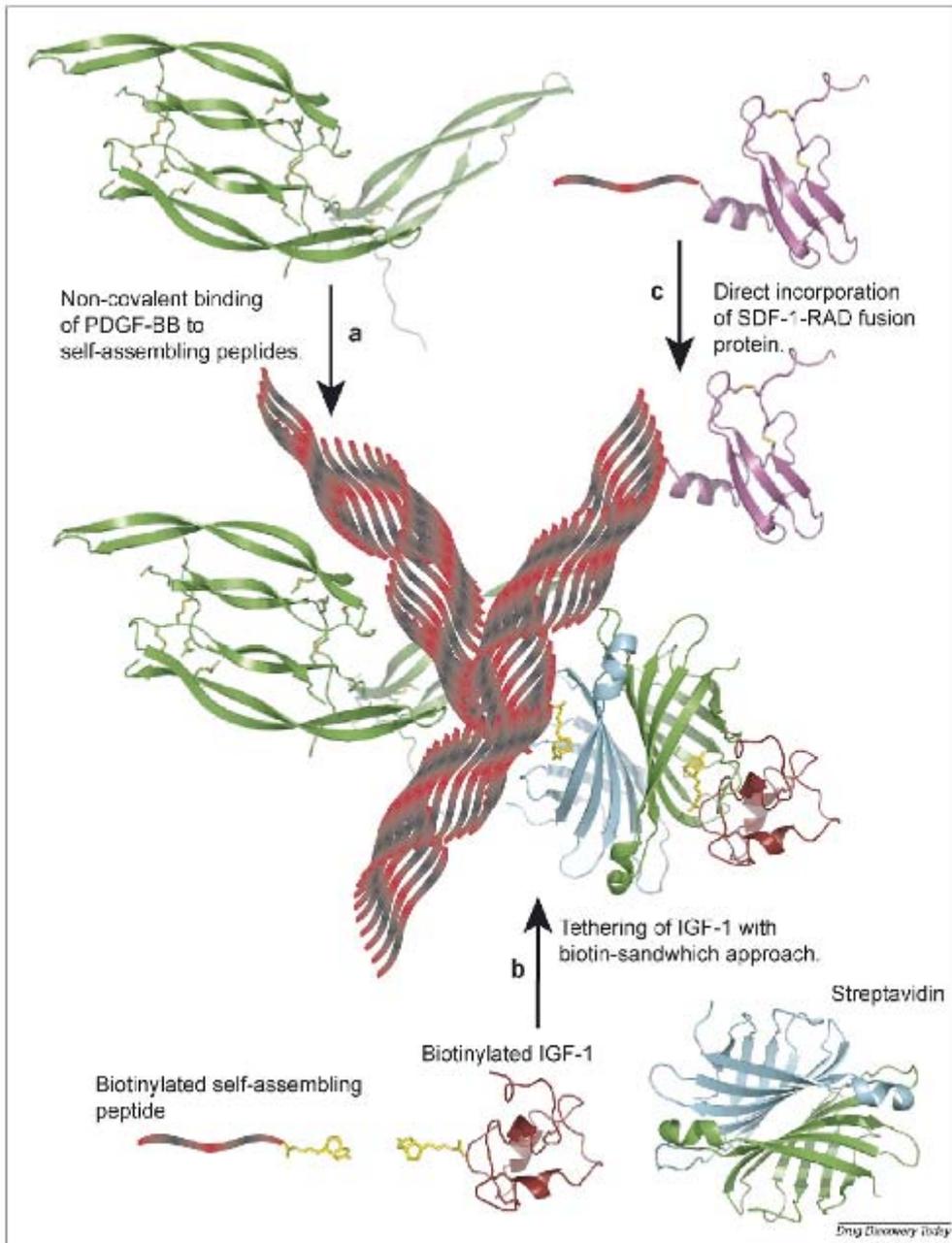
Today 12, 561, 2007

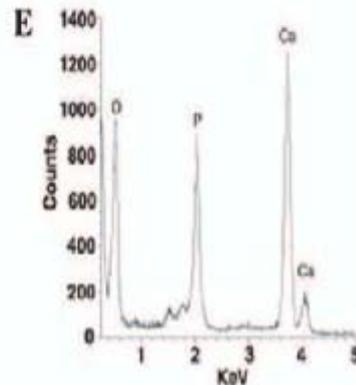
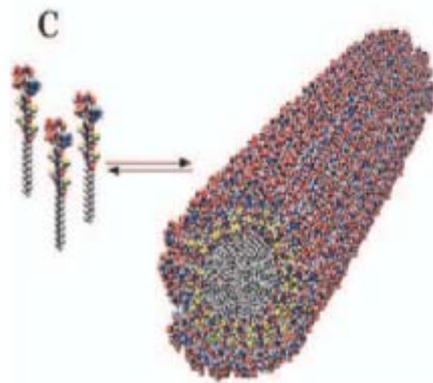
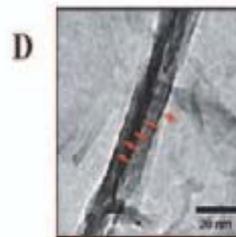
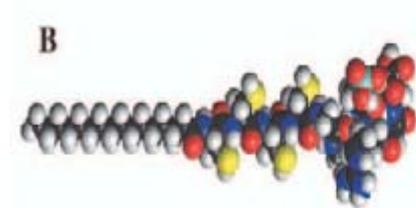
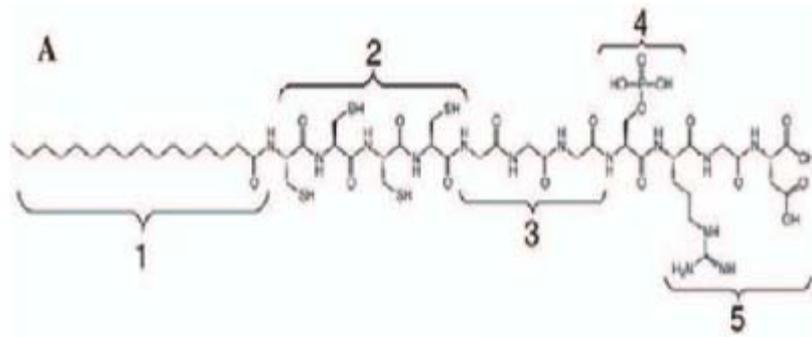
a. Доставка PDGF-BB, связывающегося с пептидами

электростатически.

b. Биотинилированные варианты пептидов связывают ростовые факторы через стрептавидин.

c. Ковалентное прикрепление белков к самособирающимся пептидам





Самосборка амфифильных пептидов

Semino, J. *Dental. Res.* 87, 606, 2008

А и В. Пептид состоит из алкильной цепи (1), 4 остатков Cys (2), 3 остатков Gly, фосфосерина (4), интегрин-связывающего домена RGD(5). С.Сборка цилиндрической нановолокна. Д.Кристаллы гидроксиапатита, накапливающиеся на нановолокнах

Пептиды, используемые для создания наночастиц для доставки макромолекул внутрь клеток

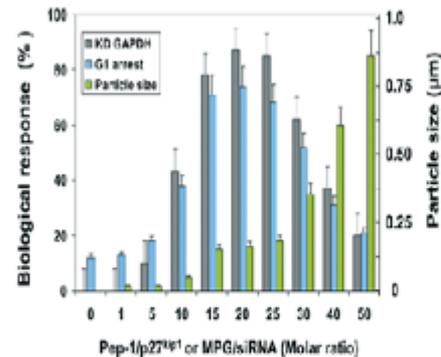
Пептиды состоят из вариабельного N-конца, линкера, содержащего последовательность WSQP, и последовательности KKKRKV, обеспечивающей проникновение в клетку и ядро. Пептиды могут содержать в своем составе α -спирали или β -складки. Размер наночастиц и эффективность доставки зависят от соотношения пептид/карго.

Morris et al., *Biol. Cell* 100, 201.2008

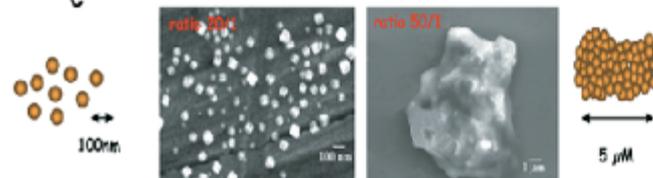
A



B



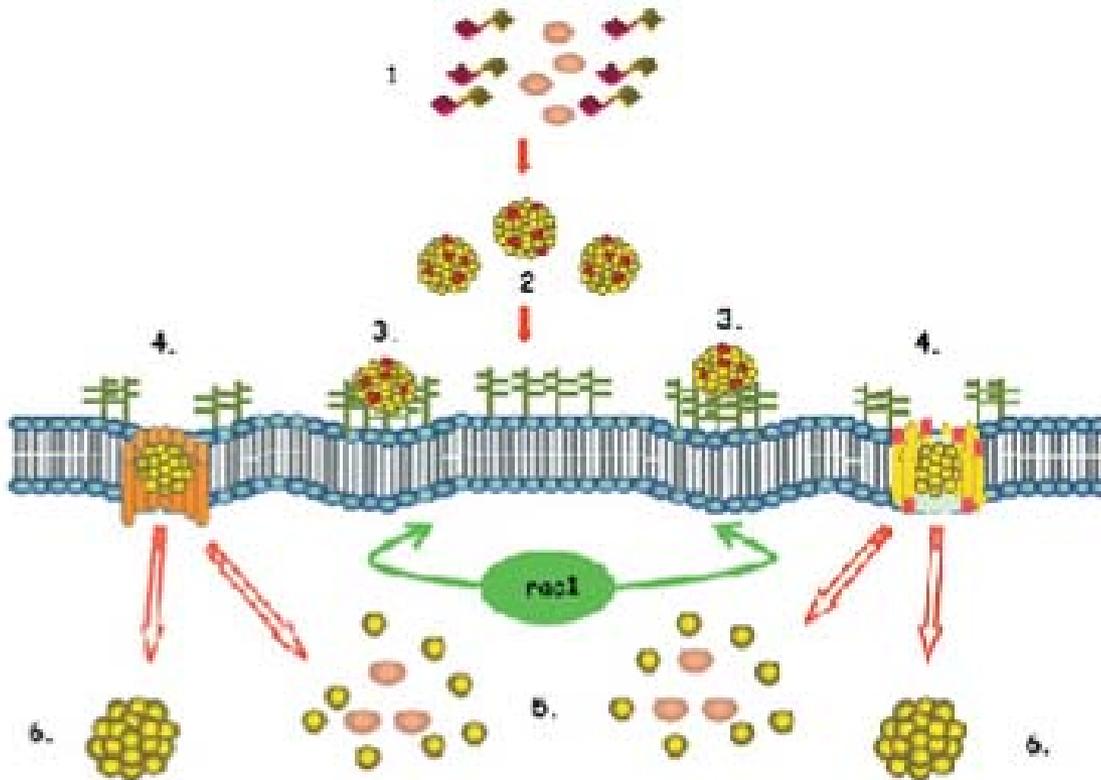
C



Возможный механизм доставки макромолекул в клетку

1-образование наночастицы, 2-взаимодействие наночастицы с поверхностью клетки, 3-4-прямое взаимодействие компонентов наночастицы с фосфолипидами с образование трансмембранной спирали или складки, 6-освобождение карго внутрь клетки

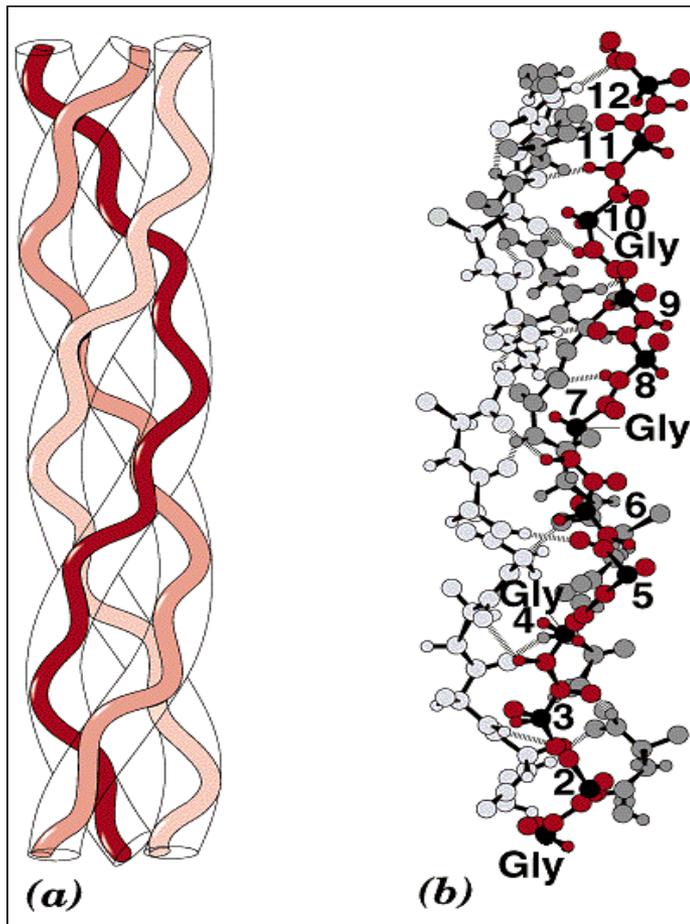
Morris et al., Biol. Cell 100, 201,2008



Четвертичная структура белка

Фибриллярные белки различного строения

Полипролиновая спираль и четвертичная структура коллагена



- На рисунке а) показан ход трех полипептидных цепей коллагена, на рисунке в) показано положение всех α -углеродных атомов и пунктиром обозначены водородные связи, стабилизирующие структуру коллагена. Все остатки Gly расположены внутри тройной полипролиновой спирали

Белки промежуточных филаментов

Paramio, Jorcano, BioEssay 24, 836, 2002

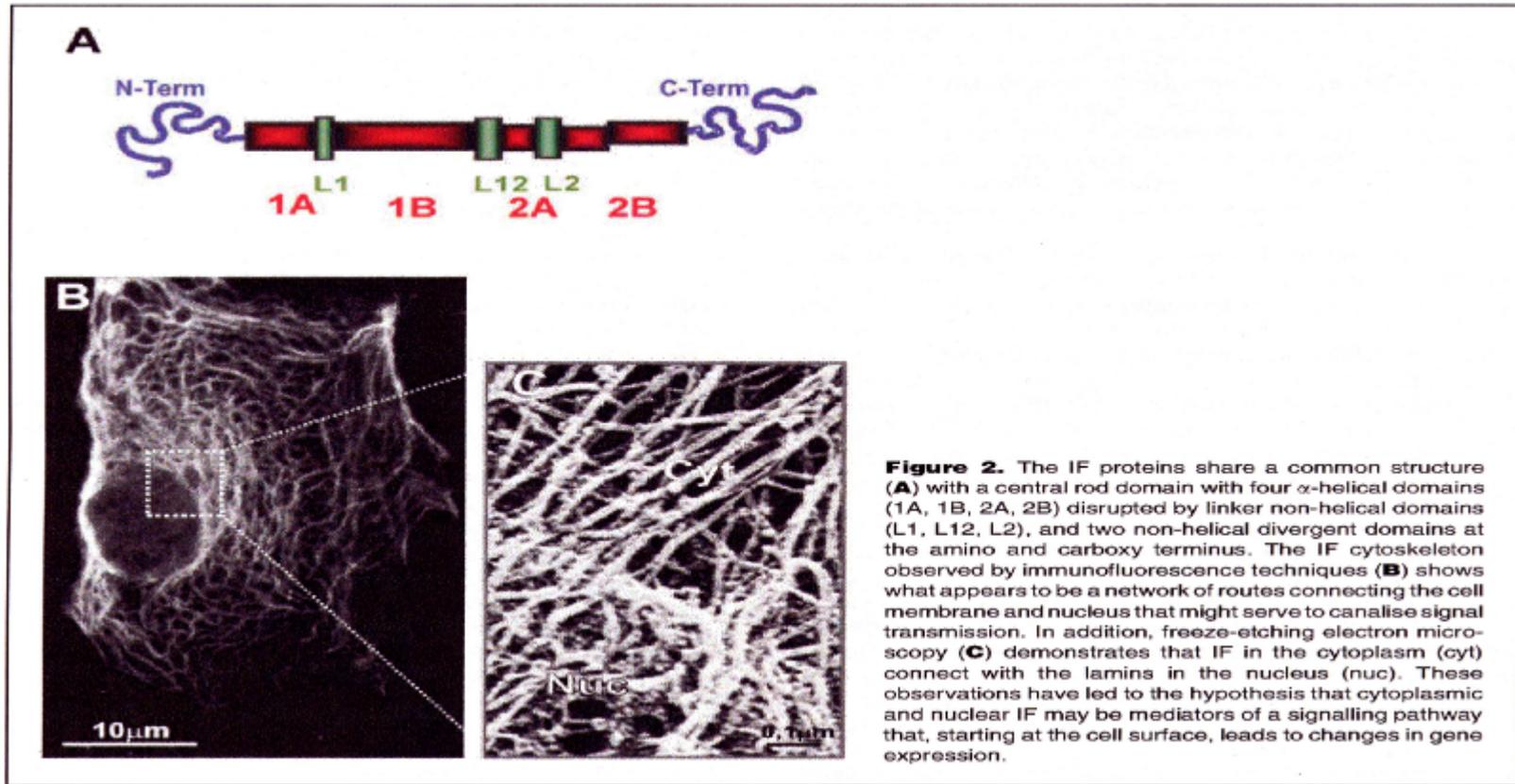


Схема строения белков промежуточных филаментов

Рис. 11-74. У всех белков промежуточных филаментов имеется гомологичная центральная область (около 310 аминокислотных остатков), формирующая протяженную α -спираль с тремя короткими участками иной структуры. N-концевой и C-концевой домены не состоят из α -спирали и сильно варьируют по размерам и последовательности аминокислот у белков разных промежуточных филаментов.



Участие неспиральных участков белков промежуточных филаментов в формировании нитей

Herrmann, Aebi, Annu. Rev. Biochem. 73, 749, 2004

774 HERRMANN ■ AEBI

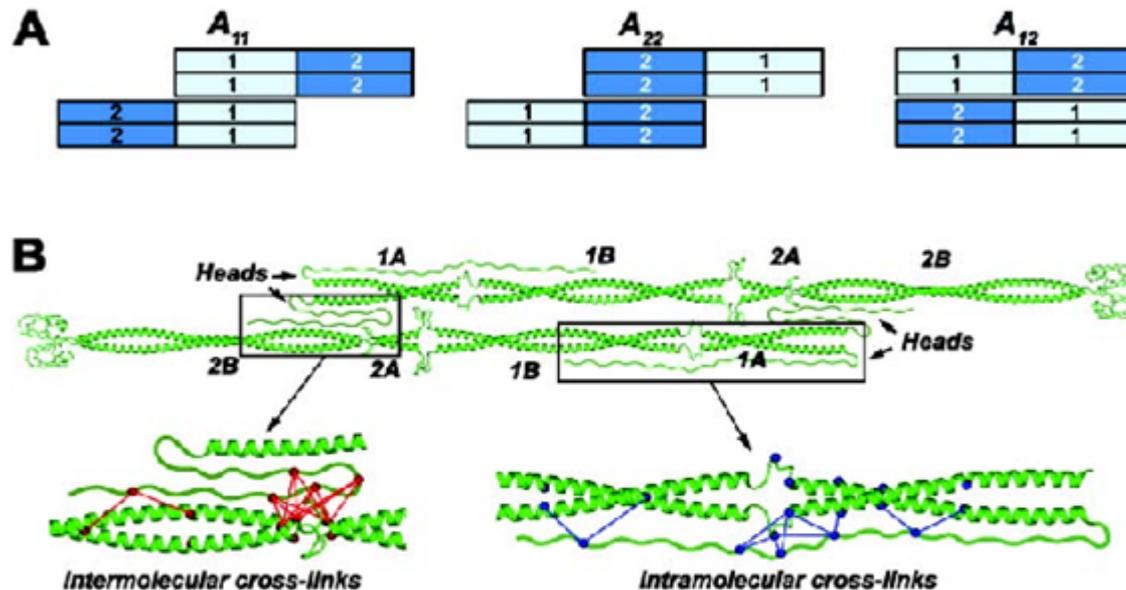


Figure 8 Orientation of the non- α -helical head domains within the tetramer of vimentin. (A) Schematic model of dimer-dimer orientation as revealed from chemically cross-linked IFs (29). (B) Atomic model of a tetramer in the A_{11} configuration with the head domains depicted according to the identification of cross-linking products (T. Wedig, L. M. Marekov, P. M. Steinert, H. Herrmann, unpublished observations). The enlarged areas depict intermolecular (red, bottom left) and intramolecular (blue, bottom right) cross-links. The dots indicate authentic lysines (in the coil) and arginines mutationally replaced by lysines (in the head).

Схема строения поперечно-полосатой мышцы

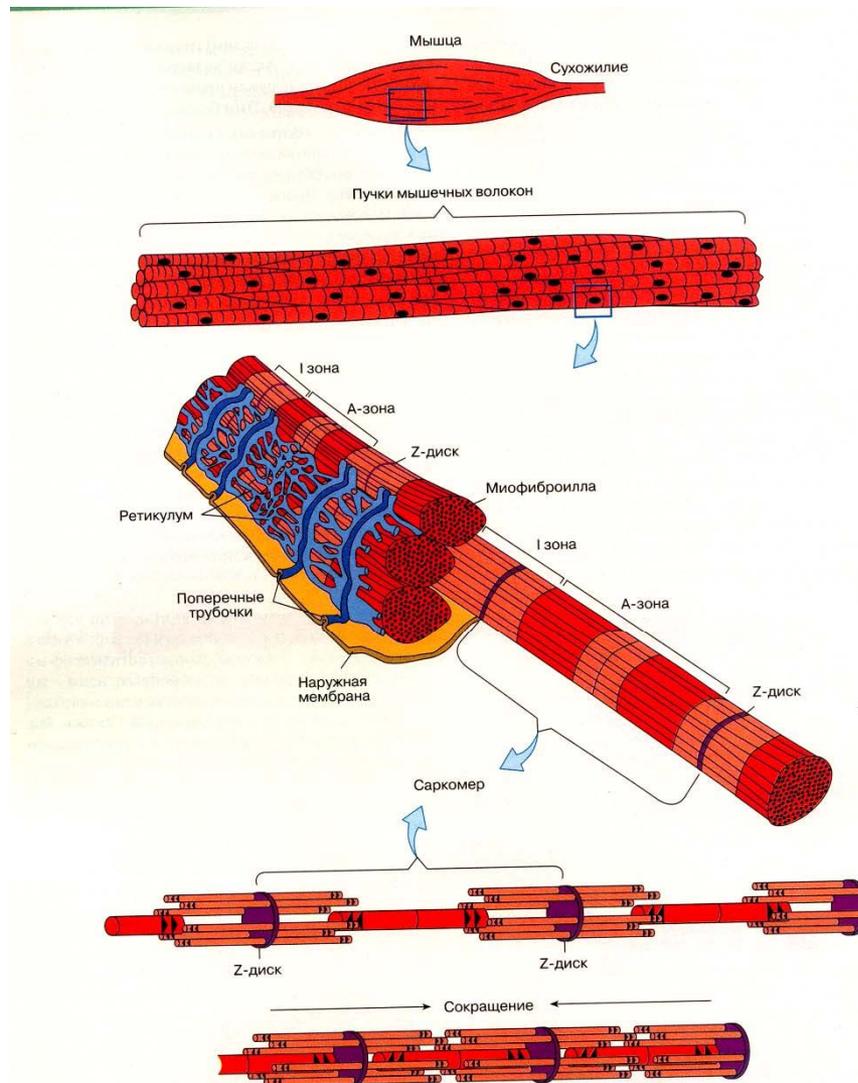


Рис. 1. Ультраструктура сократительного аппарата и иллюстрация модели скользящих нитей (по [5] с изменениями)

Схемы строения саркомера (вверху), миозинового филамента (в середине) и миозина (внизу)

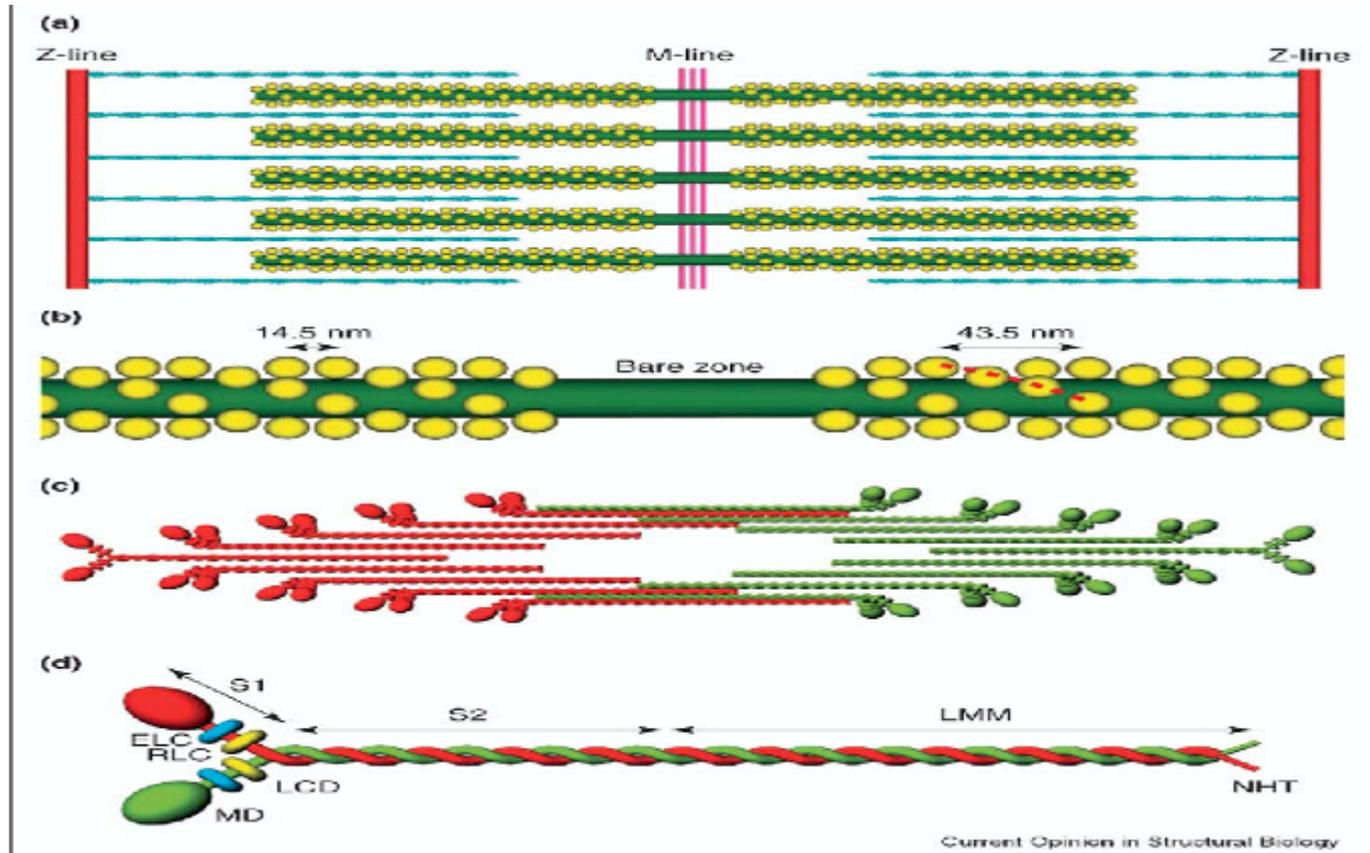
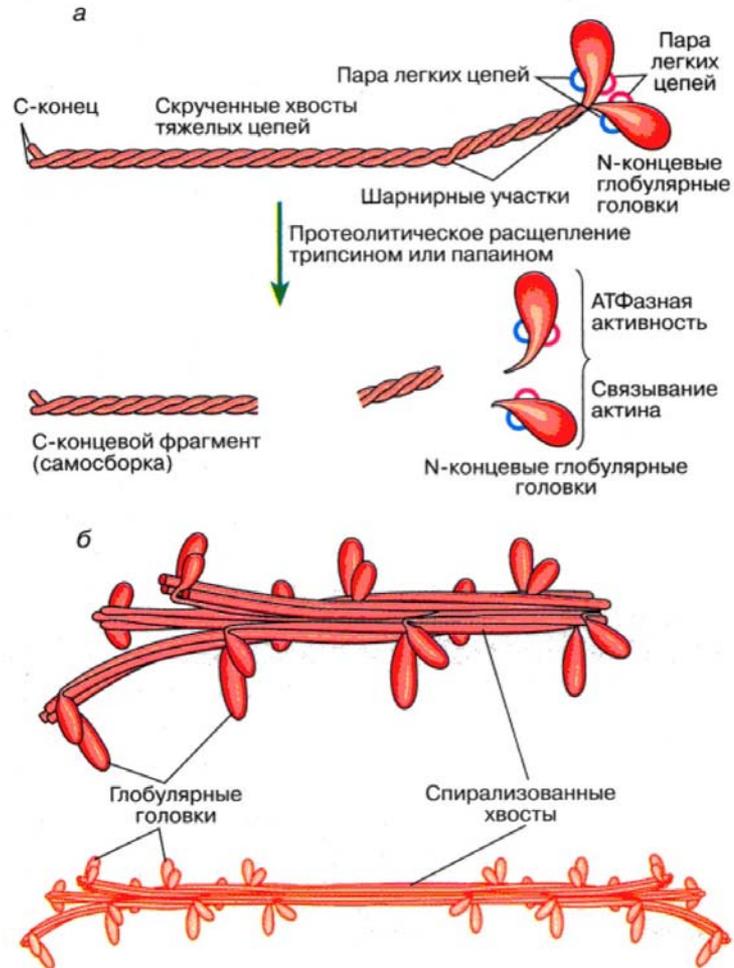
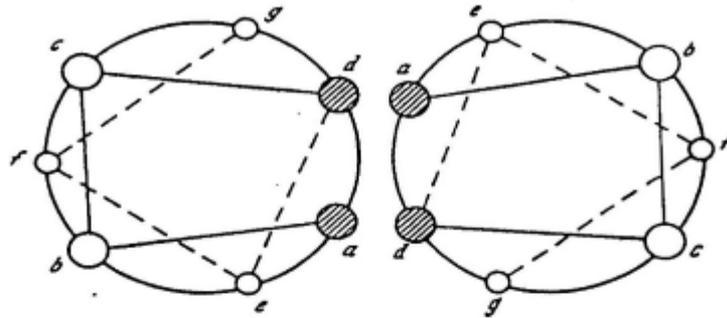


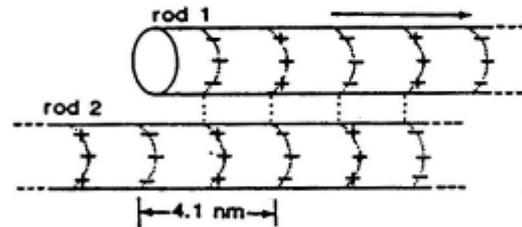
Схема строения и механизм упаковки молекул миозина



Способ упаковки хвостов молекулы миозина



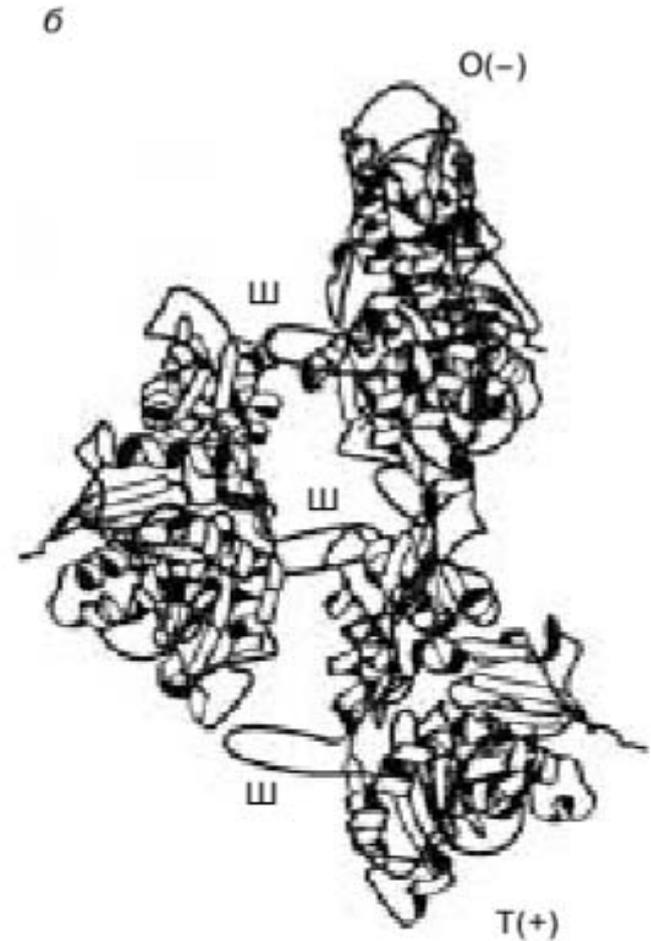
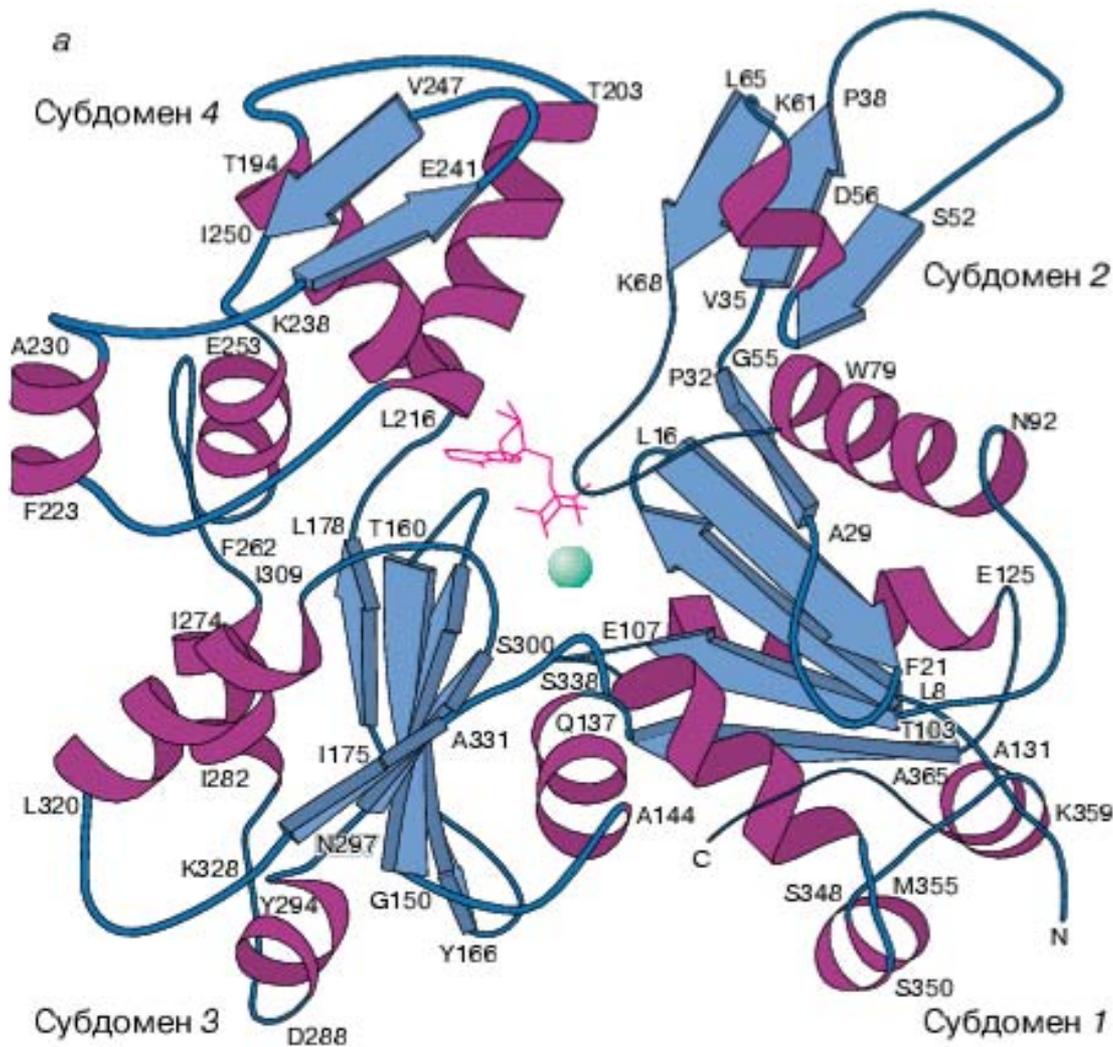
Схематическое изображение двойной спирали стержневой части молекулы миозина (поперечный разрез; вид спереди со стороны N-конца). Заштрихованы гидрофобные остатки в положениях а и d. (Д.И.Левитский и соавт. в Сб. "Белки и пептиды", Москва, Наука 1995).



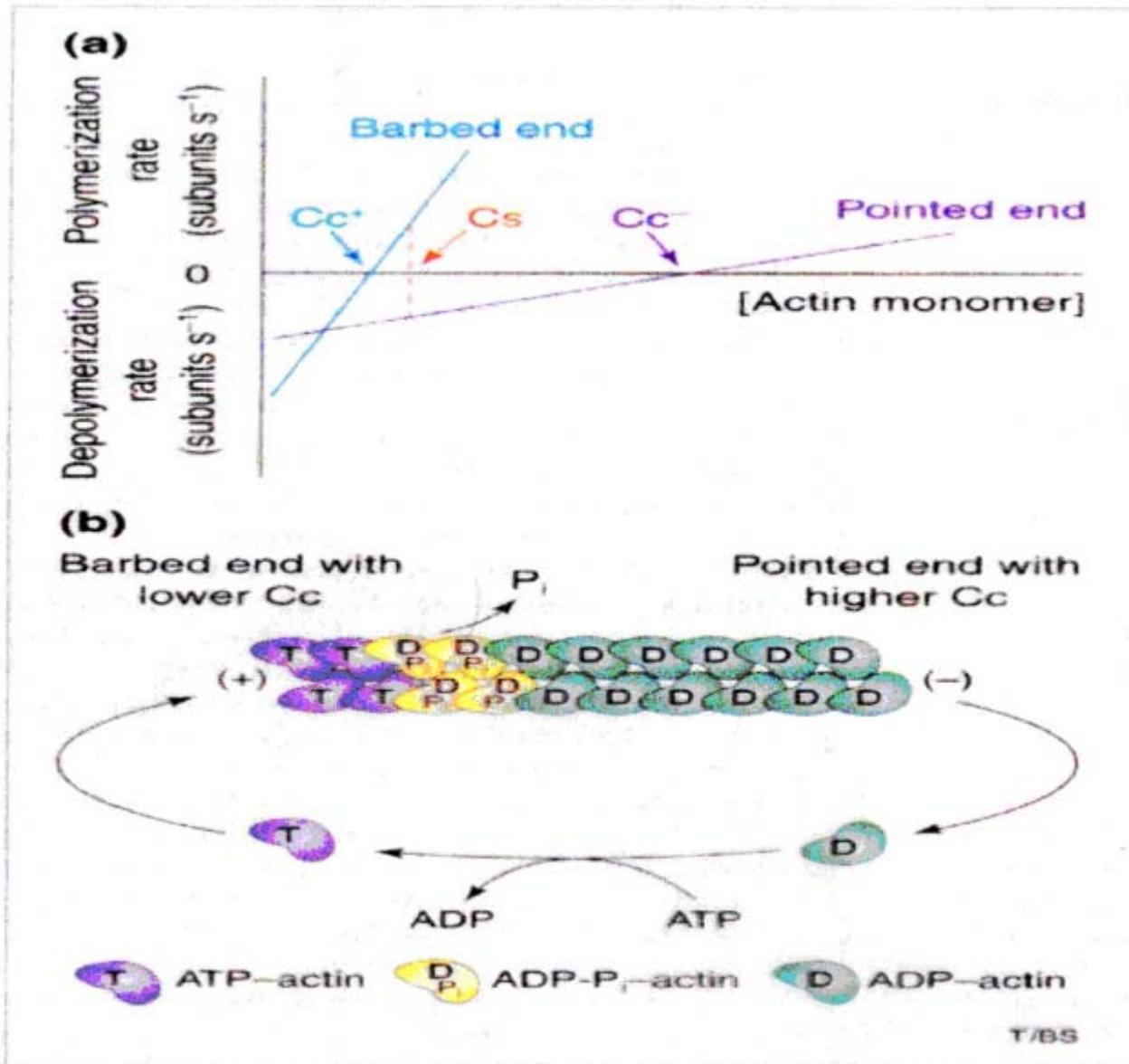
Периодическое чередование электрических зарядов на поверхности хвоста молекулы миозина. Миозиновый стержень (rod) несет на своей поверхности чередующиеся между собой зоны с преимущественно положительными и преимущественно отрицательными зарядами. Два стержня-хвоста могут взаимодействовать между собой, если отрицательно заряженная зона одного стержня взаимодействует с положительно заряженной зоной другого стержня. (G.H.Pollack "Muscles and molecules" 1990).

Глобулярные белки и обратимые процессы полимеризации и деполимеризации

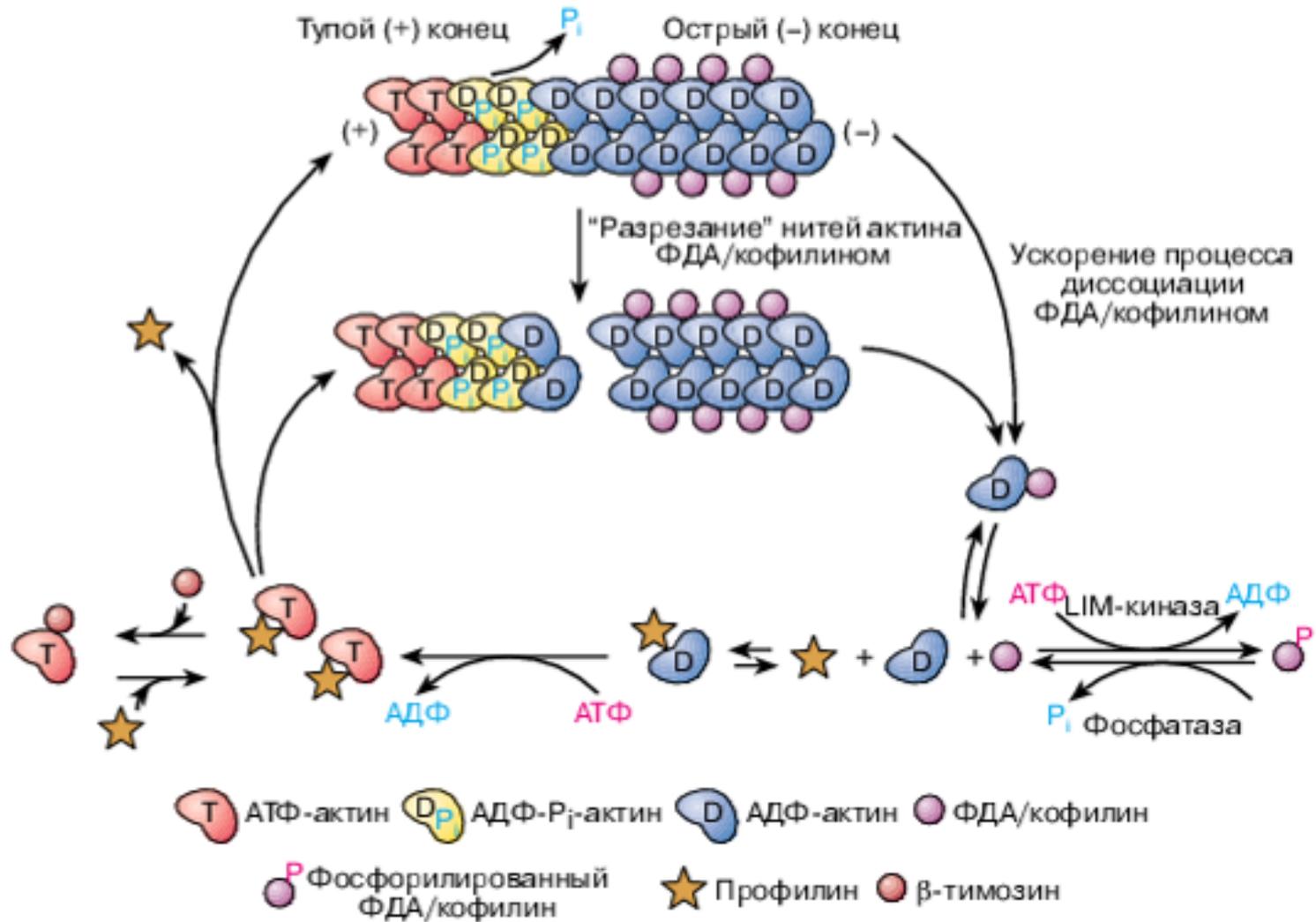
Структура мономерного и полимерного актина



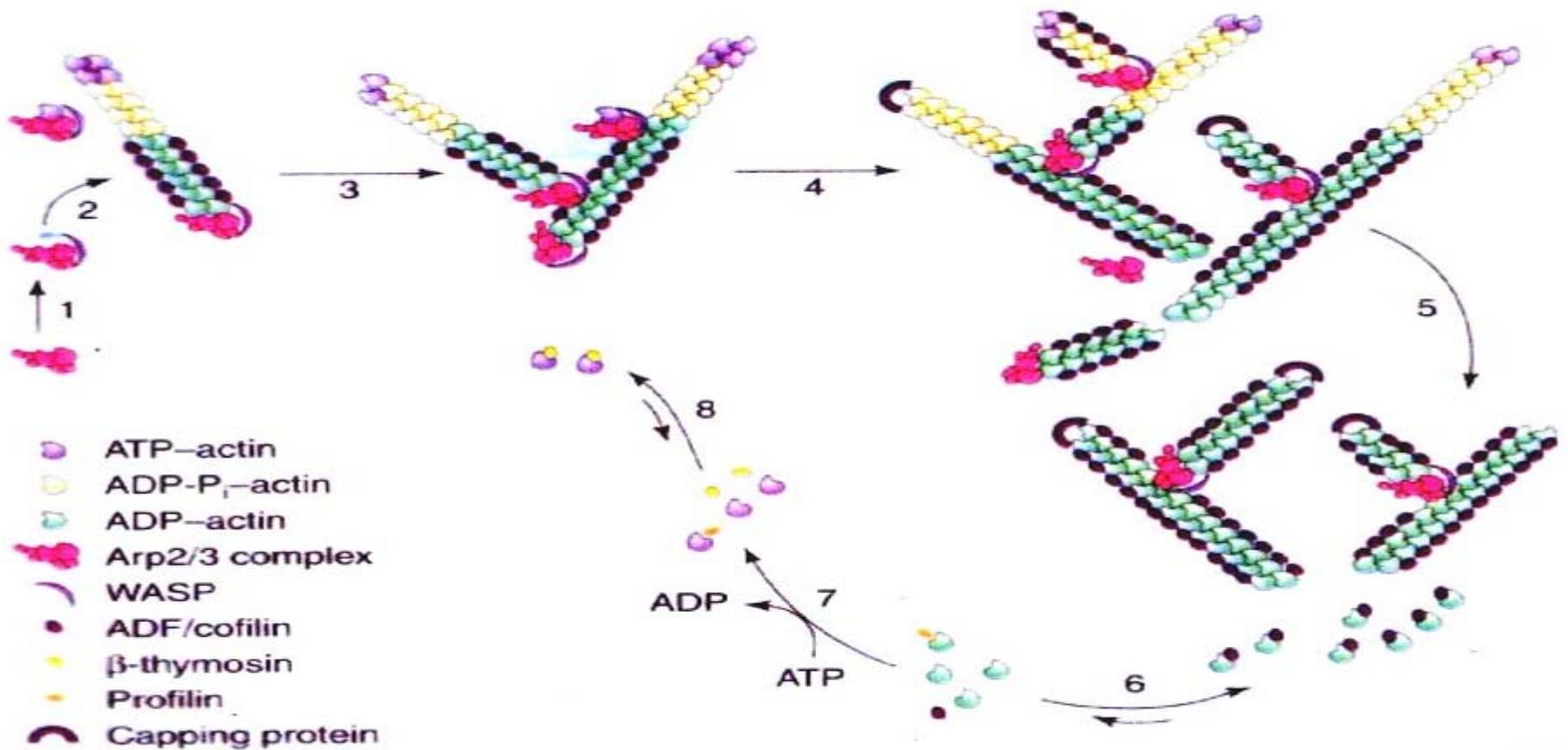
Полярность филаментов актина



Полимеризация и деполимеризация актина



Управляемая полимеризация актина



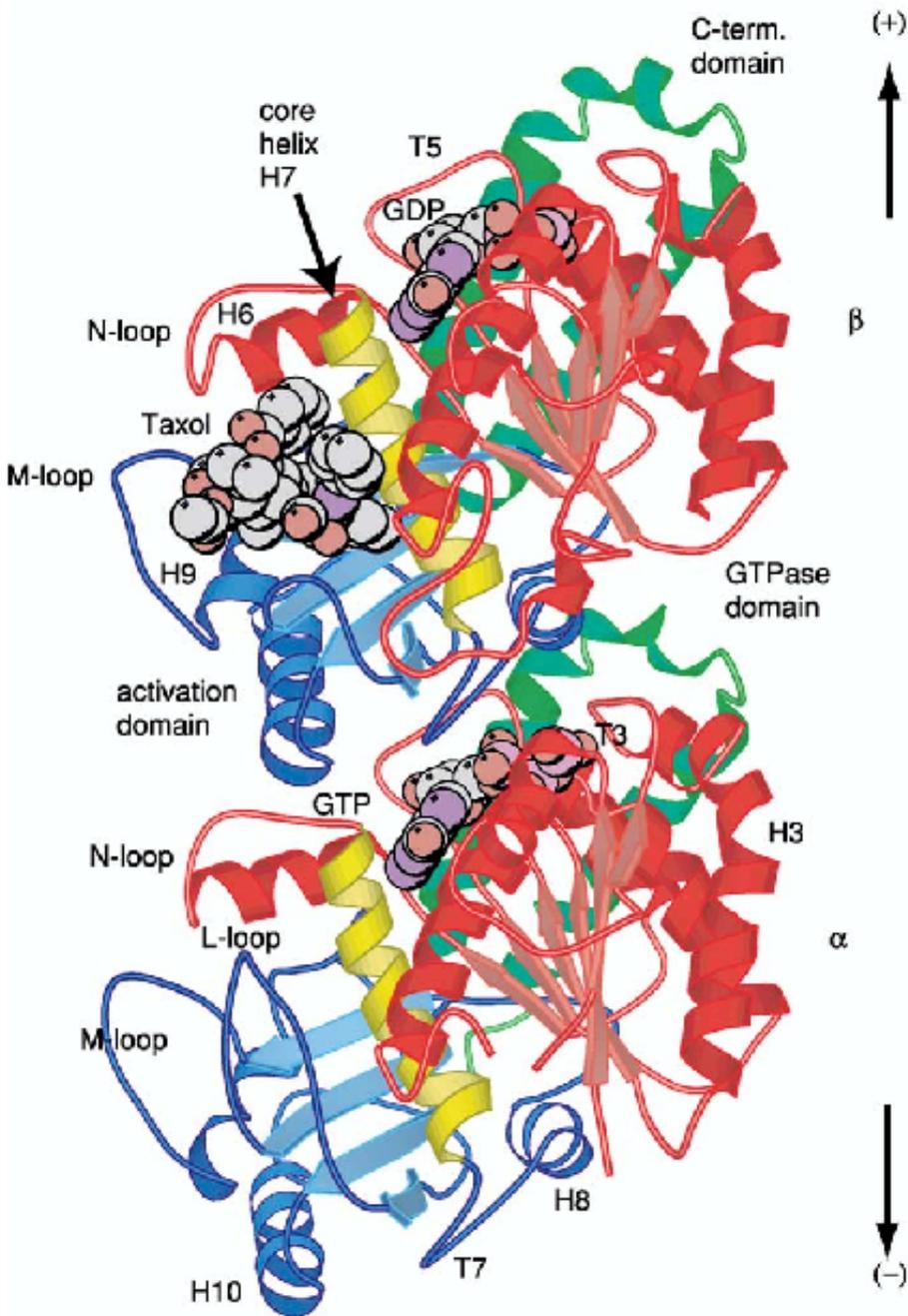


Схема строения димера тубулина

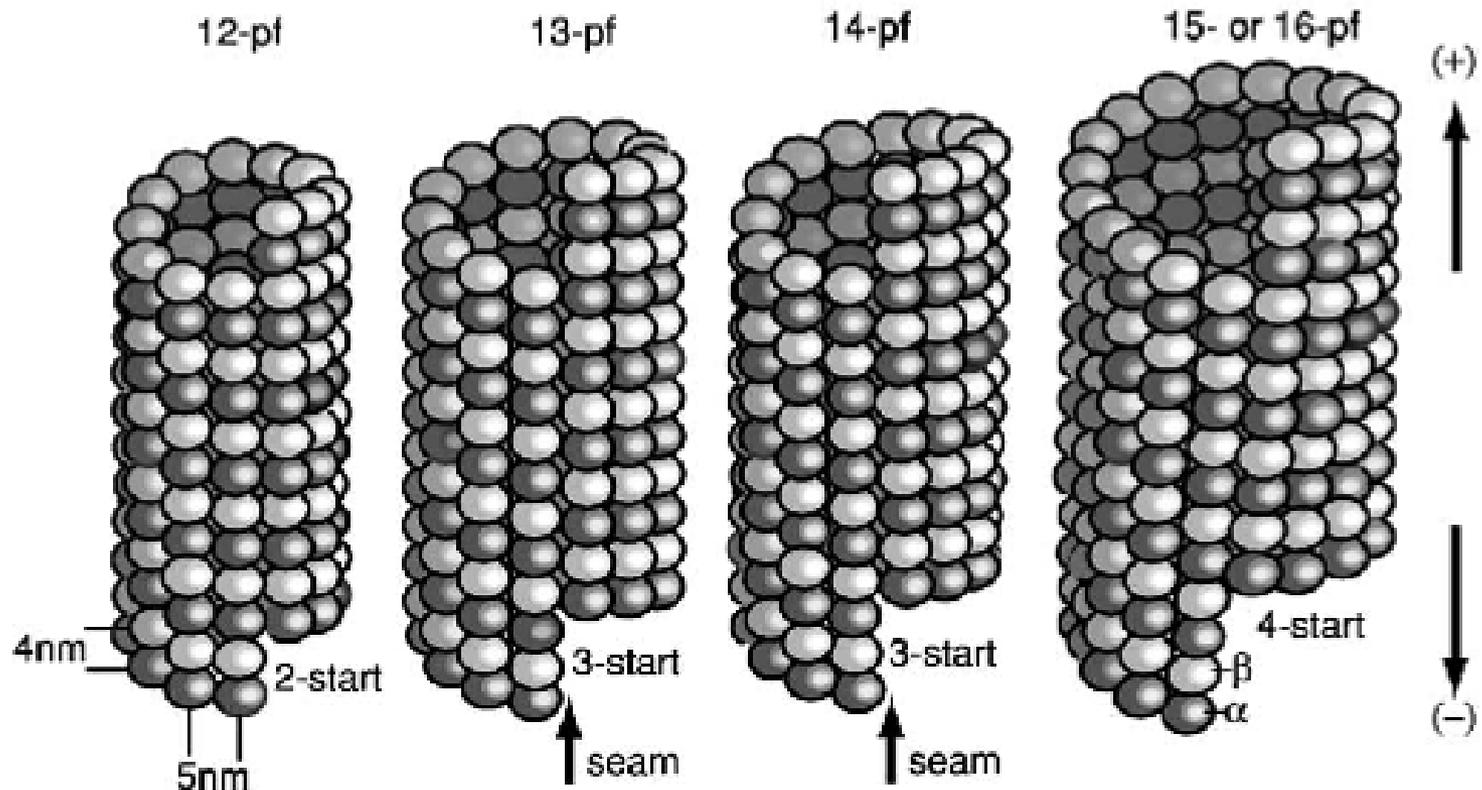
L.A. Amos, D.Schlieper *Adv. Protein Chem.* 71, 257-297,

2005

ГТР-связывающий домен обозначен красным цветом, активирующий домен – синим цветом, центральная спираль, соединяющая два домена, – желтым цветом, С-концевая последовательность – зеленым цветом. ГТР-связывающий участок формируется петлями T1-T6 α -тубулина и T7 β -тубулина. ГТР, связанный на β -тубулине гидролизован до GDP благодаря участию петель T7 и T8 α -тубулина. ГТР α -тубулина не обменивается, ГТР β -тубулина сравнительно легко обмениваем

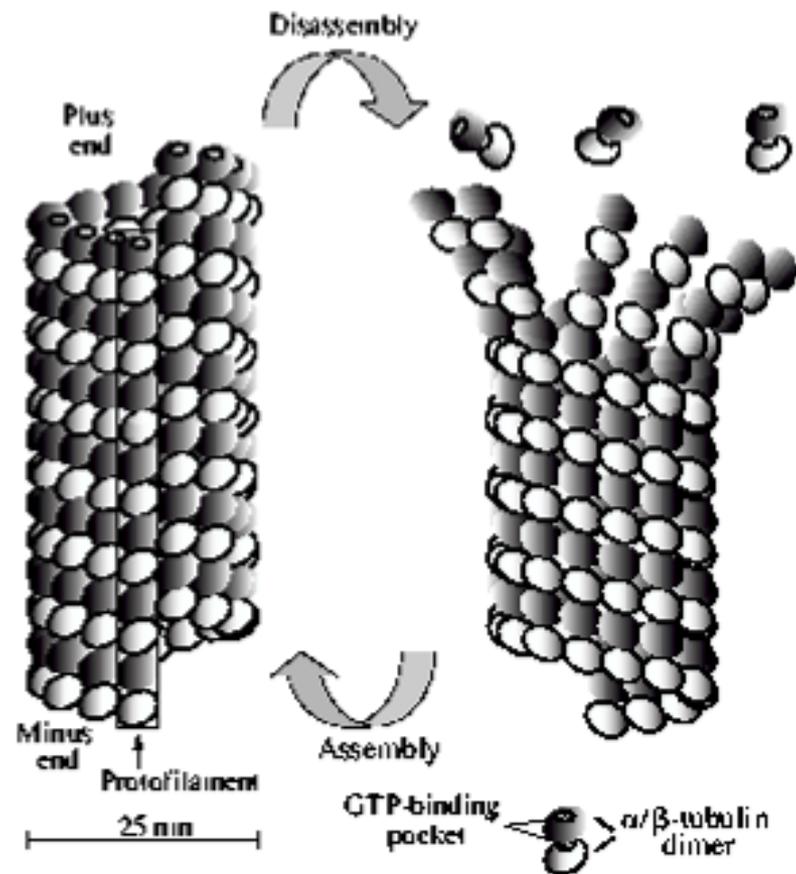
**Микротрубочки с разным количеством (12-16)
лонгитудинальных протофиламентов (pf). В
микротрубочках с 13 протофиламентами филаменты
идут строго вдоль оси цилиндра, во всех остальных
случаях филаменты в большей или меньшей степени
спирально закручены**

L.A. Amos, D.Schlieper *Adv. Protein Chem.* 71, 257-297, 2005



Процесс полимеризации тубулина

Wiese, Zheng, J. Cell Sci 119, 4143-4153, 2006

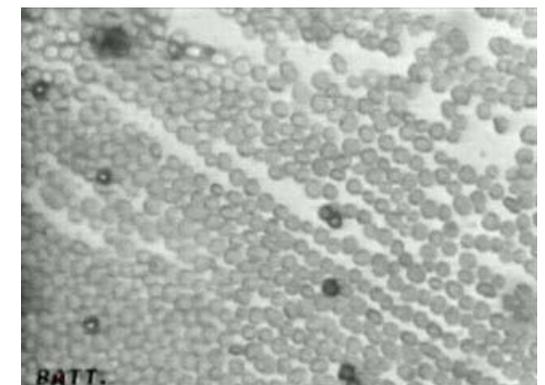
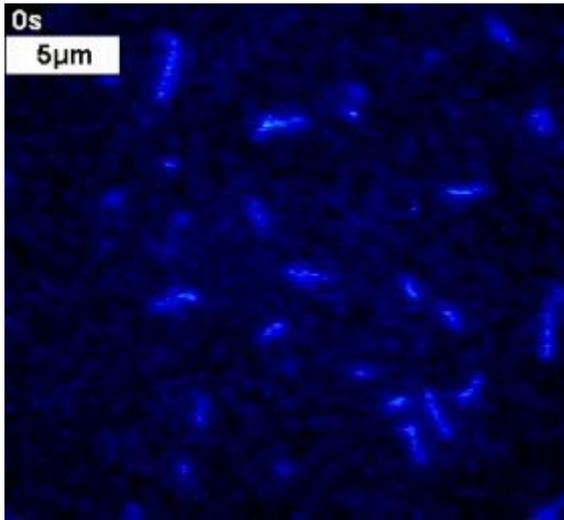
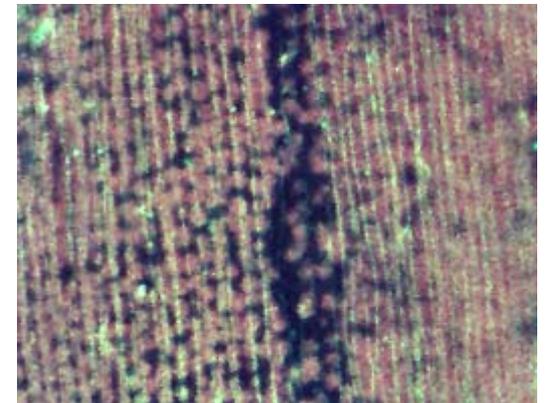
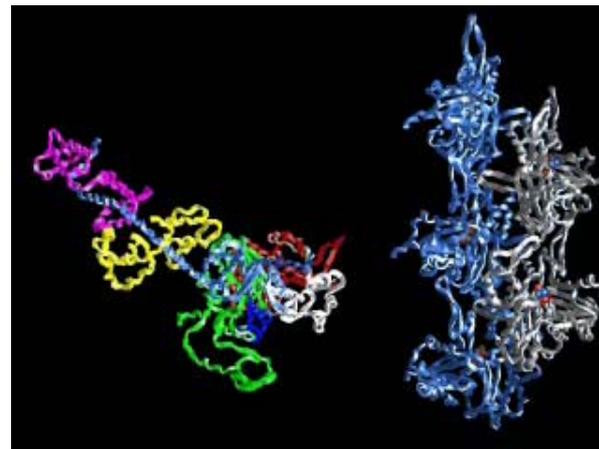
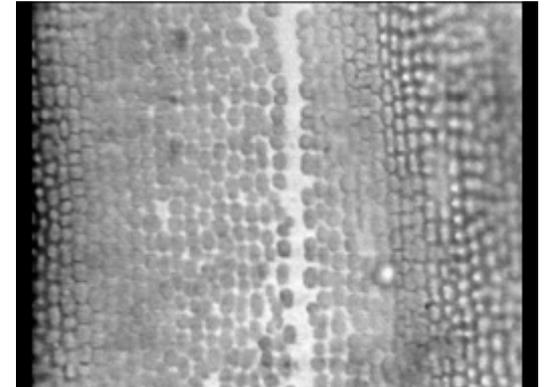
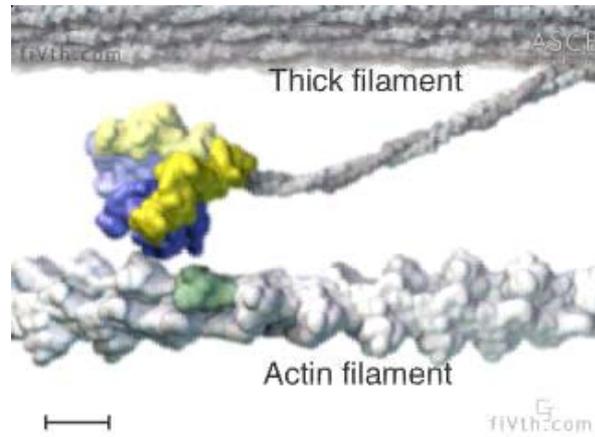
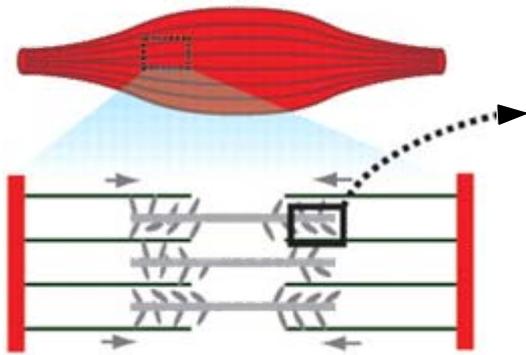


Сравнение свойств актина и тубулина

Свойства	Актин	Тубулин
Молекулярная масса	43	55
pI	4.5	5.4
Изоформы	много	много
Связывание нуклеотидов	АТФ/АДФ	GDP/GTP
Полимеризация	полярные филаменты	полярные микро трубочки
Посттрансляционные модификации	много	много
Ассоциированные белки	несколько классов	несколько классов
Белки-моторы	миозин	кинезин динеин

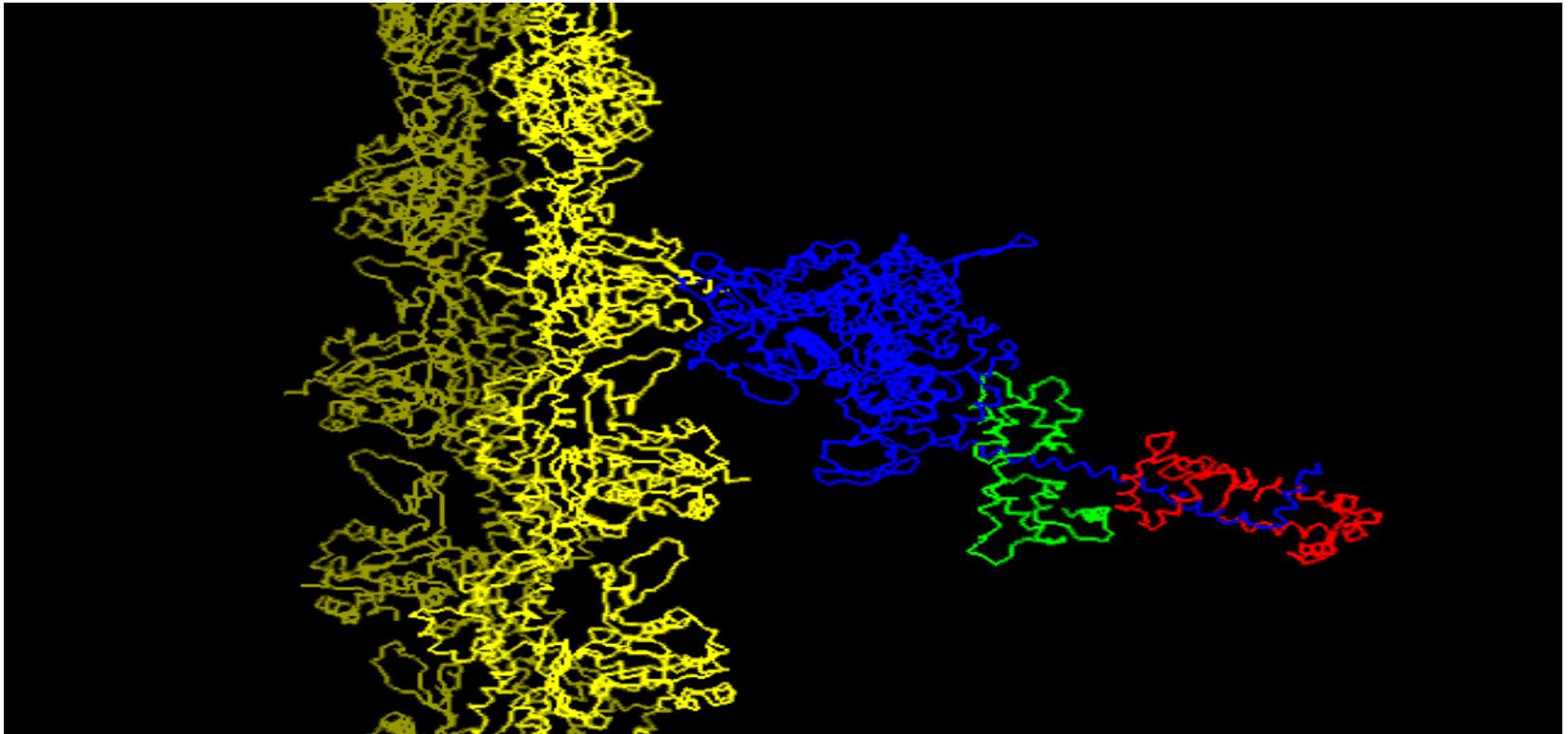
Биологические моторы (миозин, кинезин, динеин)

Наномоторы: миозин

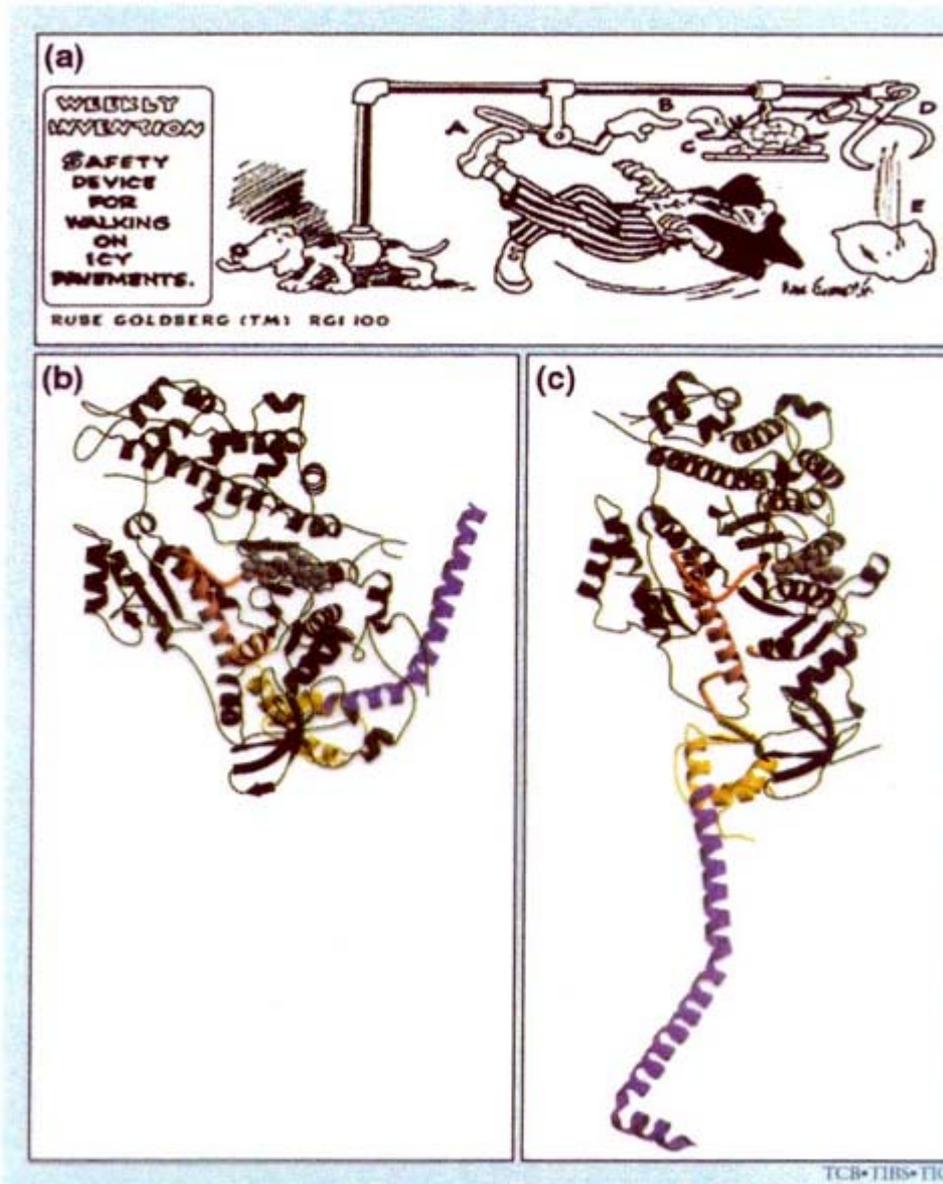


Гипотетический механизм движения головки миозина по актину

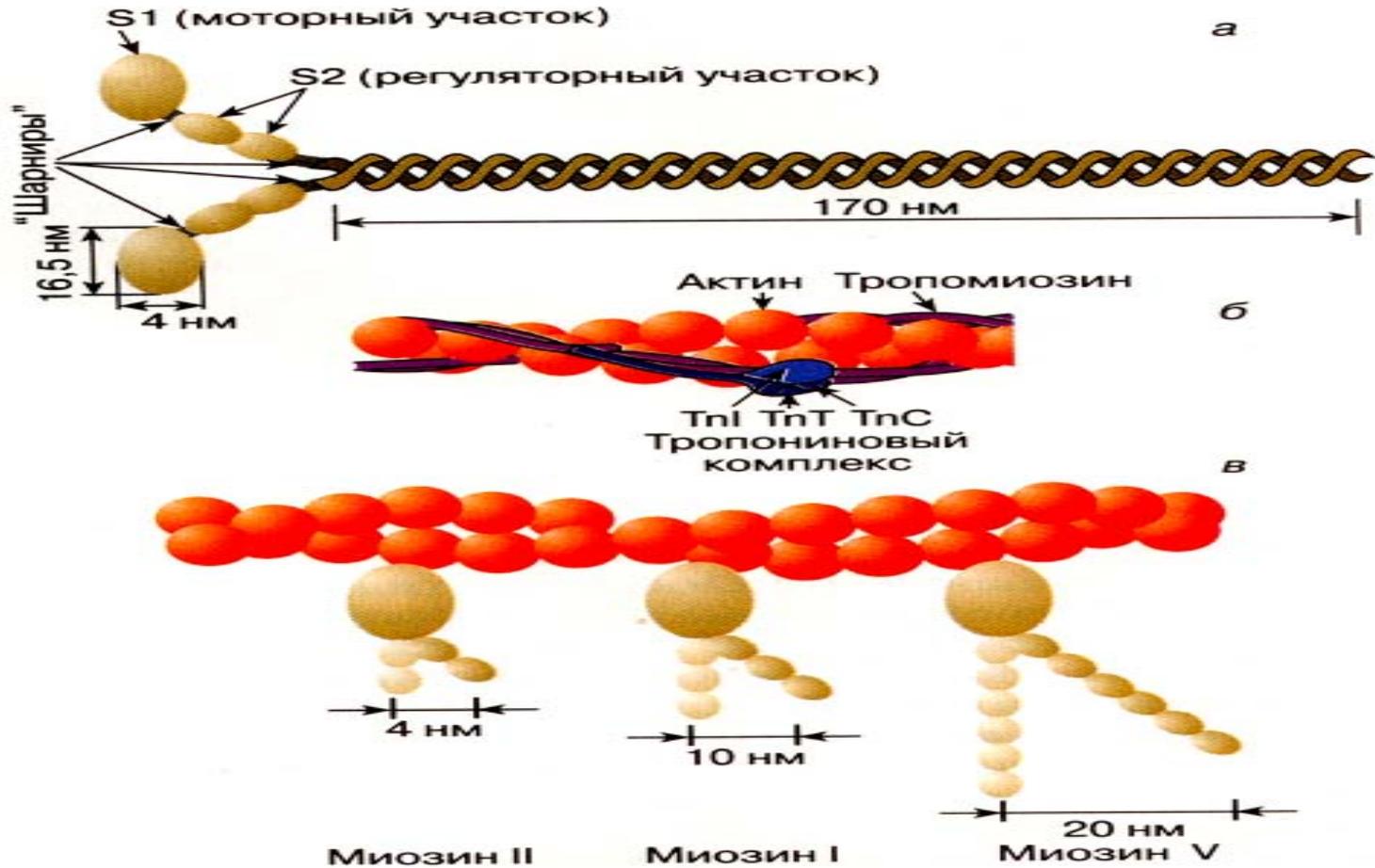
(Цатурян, Бершидский, персональное сообщение)



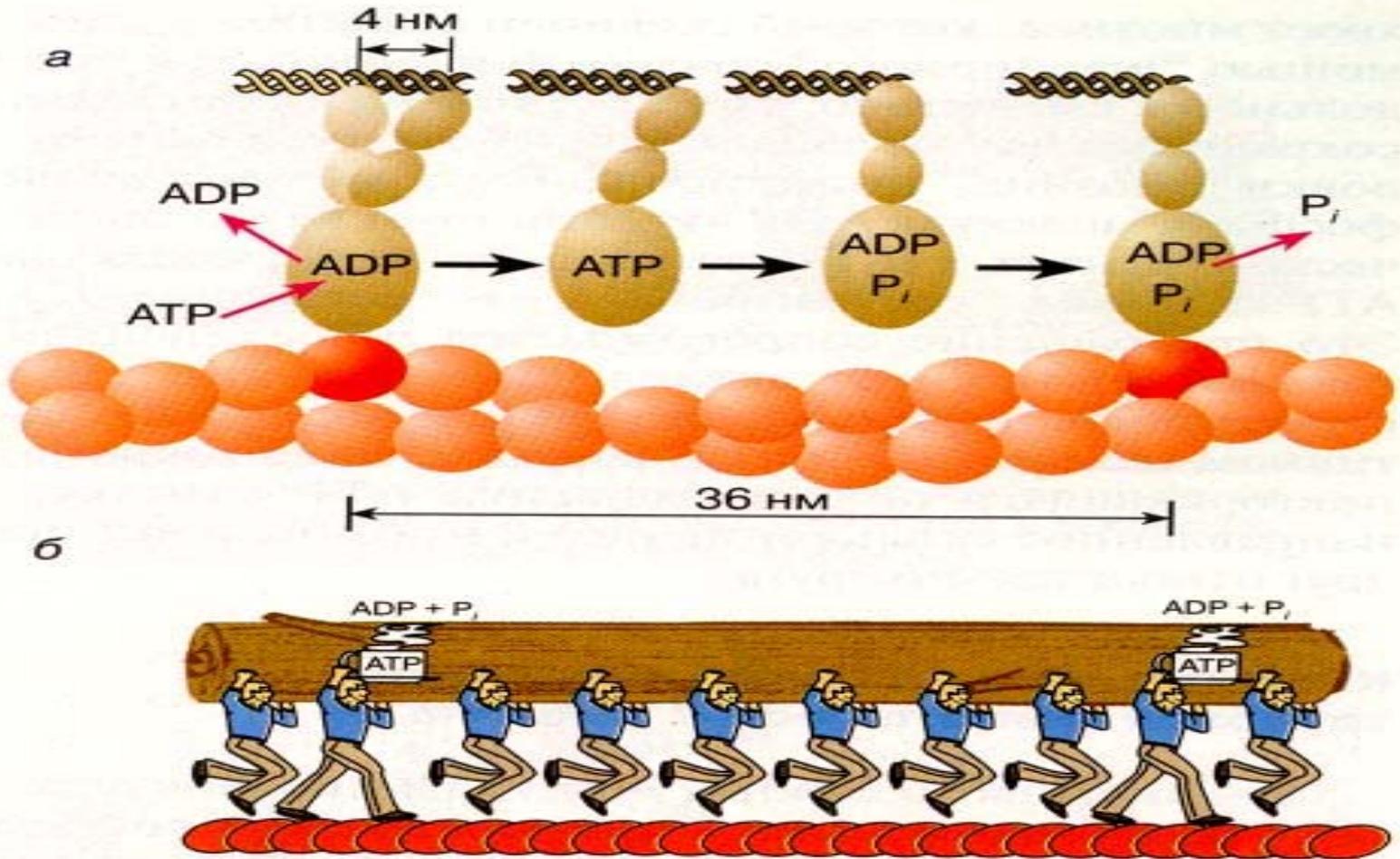
Механизм функционирования головки миозина



Зависимость размера шага от длины шейки



Упрощенная схема функционирования миозинового филамента



A Bar diagrams of recently identified human myosins

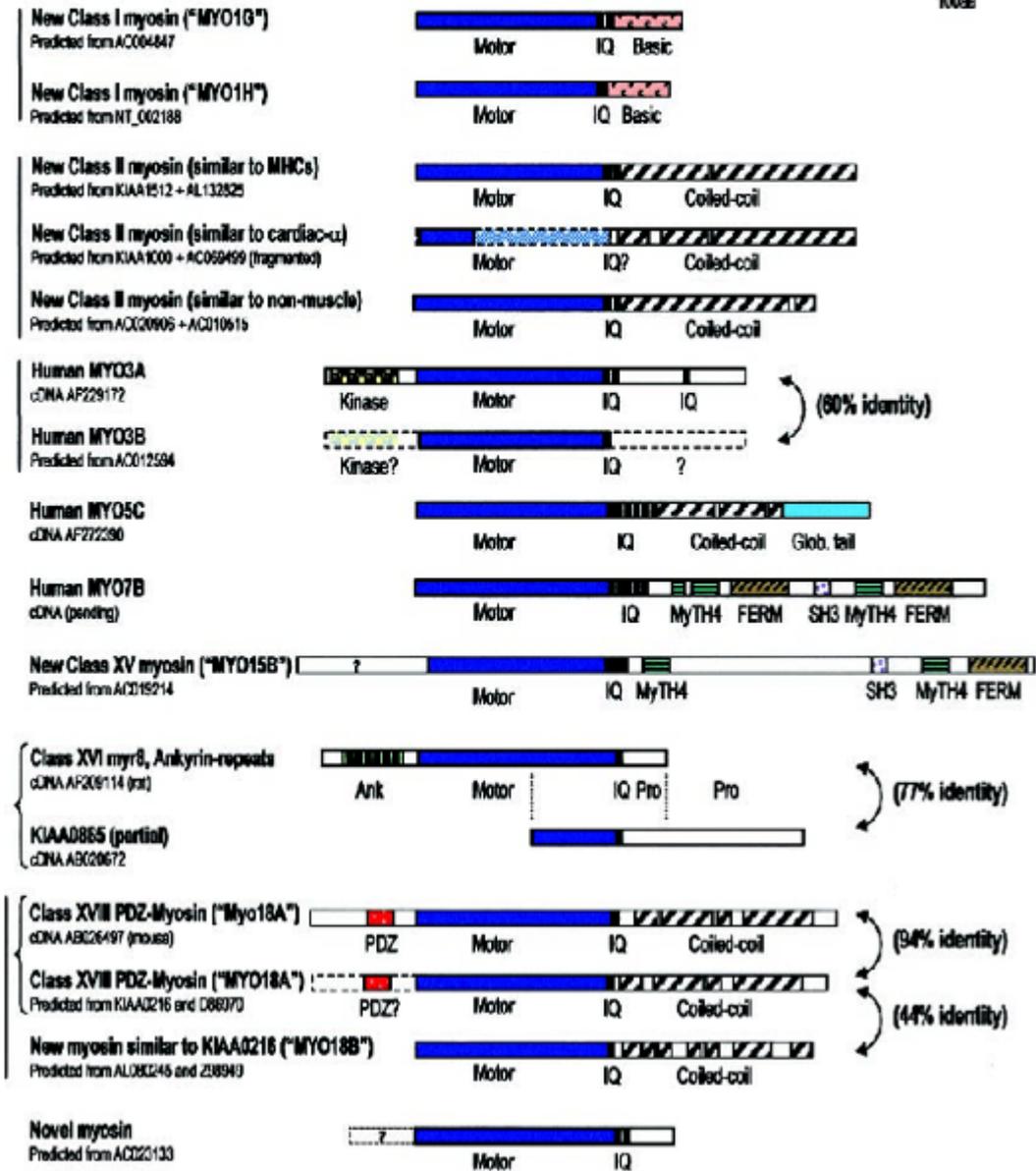


Схема строения нескольких новых типов миозина человека

J.S. Berg et al. Mol. Biol Cell 12, 780-794, 2001

Сравнение структуры кинезина и миозина V

Механизмы регуляции KR1 – зависимое от груза (cargo) сворачивание цепи кинезина. KR2 – зависимое от кальция связывание кальмодулина с легкой цепью кинезина-1. KR3 – фосфорилирование белков, ассоциированных с кинезином-1. KR4 – фосфорилирование тяжелых цепей кинезина. MR1 – связывание кальция индуцирует изменение структуры «мотора». MR2 - связывание груза (cargo) влияет на структуру белка. (Mallik, Cross, Current Biol. 14, R971, 2004)

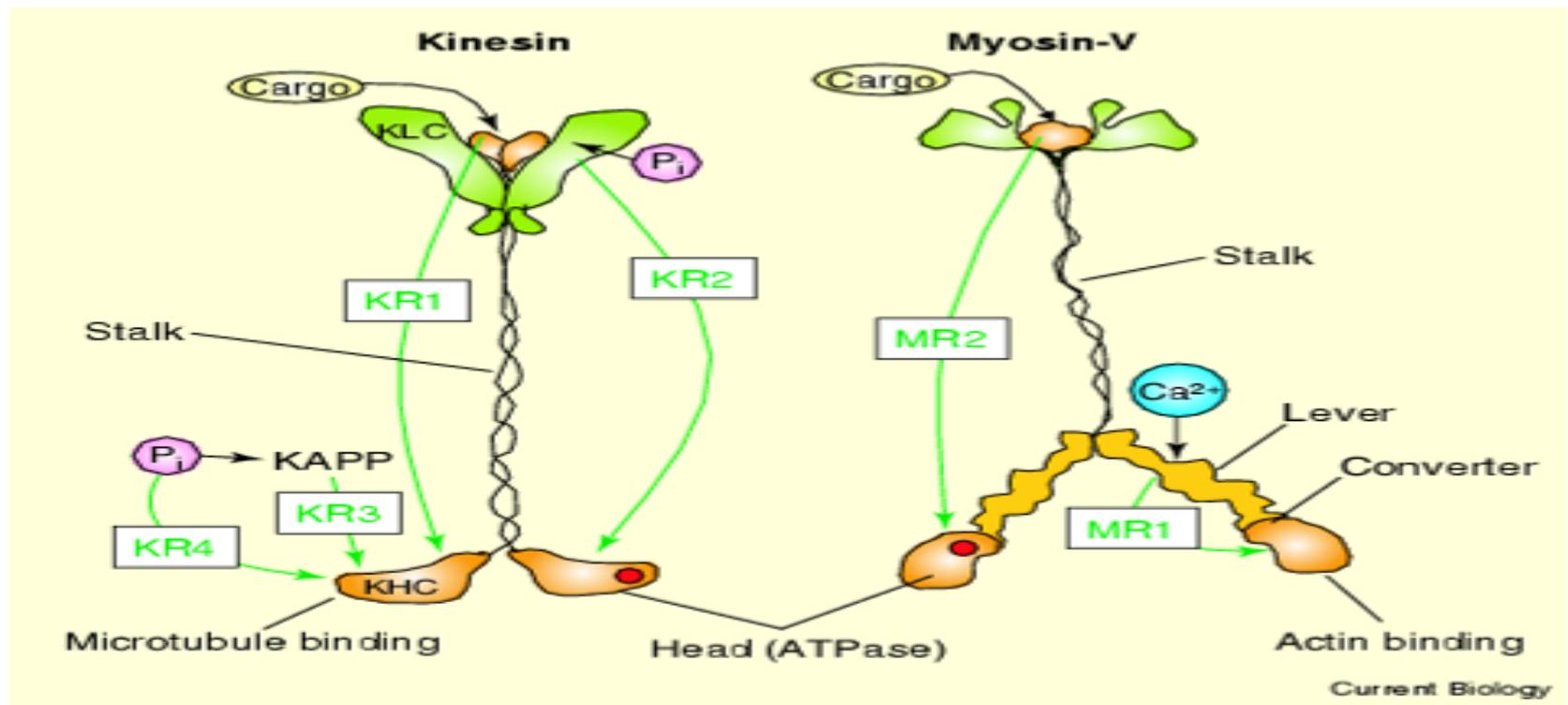


Схема строения «традиционных» и «нетрадиционных» кинезинов

KHC



AnBimC



DmNod



MmKIF2



DmNod



SpKin II



DmKIFP₄₉₀



Key: ○ globular

— coiled coil

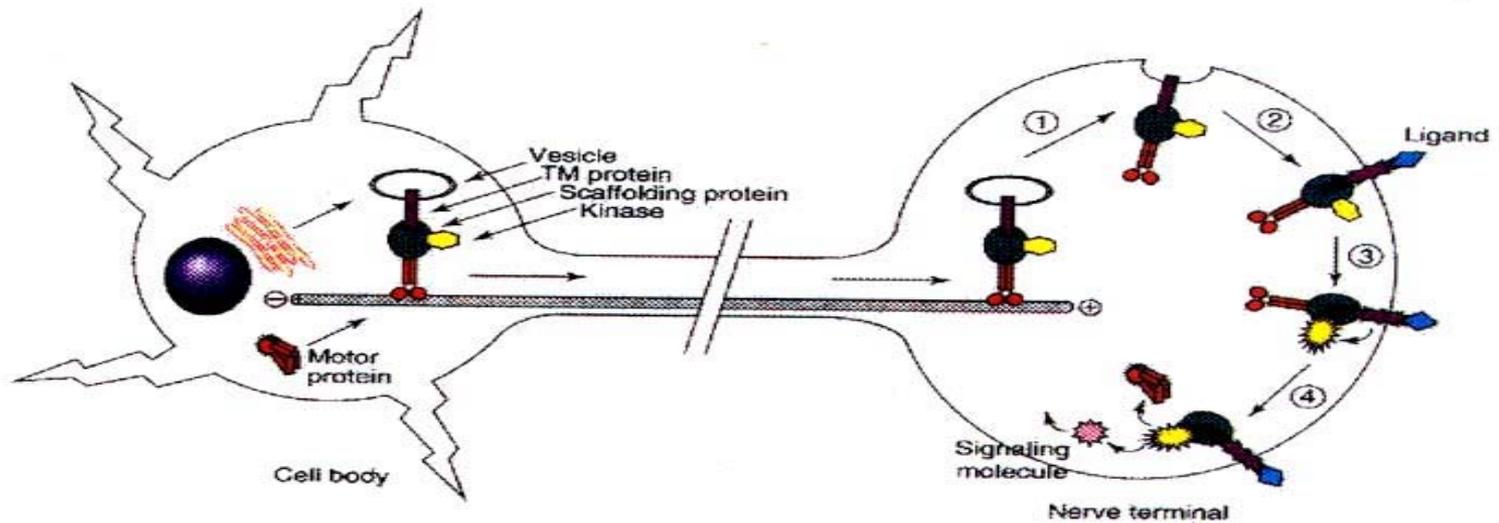


random coil



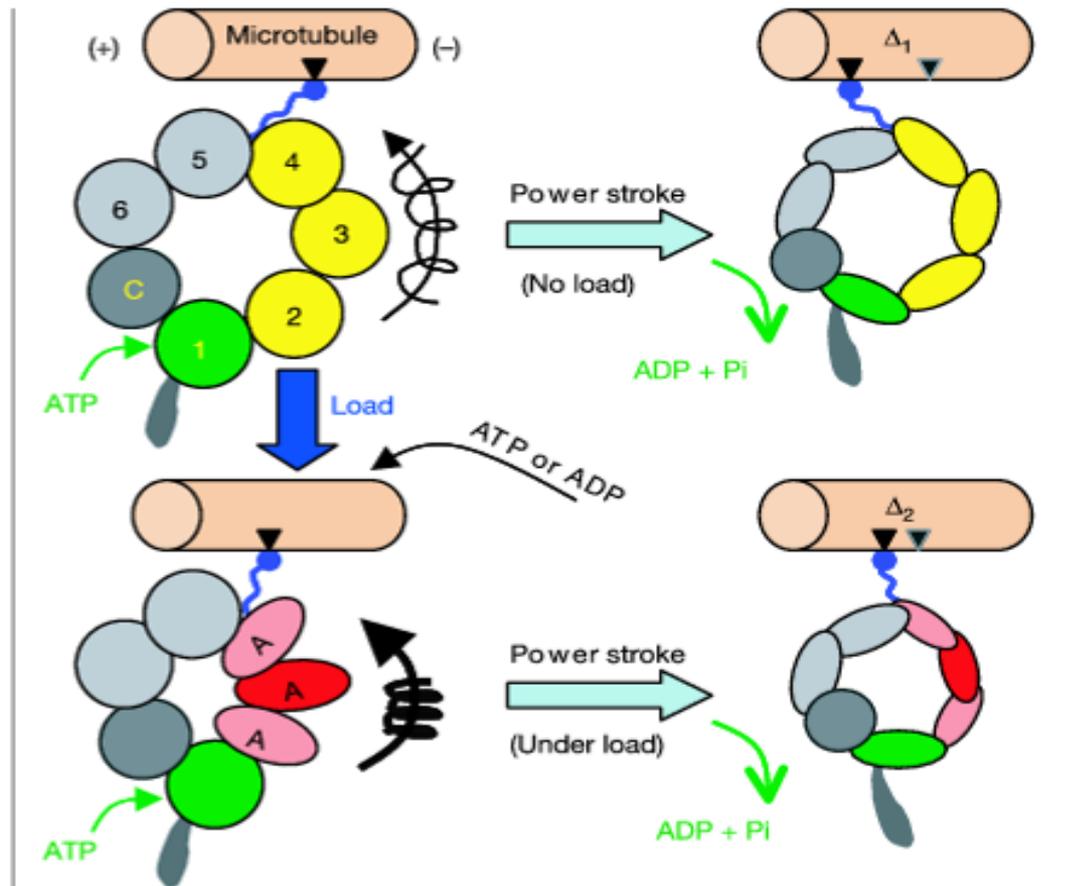
coiled coil and
random coil

Участие кинезина в транспорте везикул



Гипотетический механизм функционирования моторной части динеина

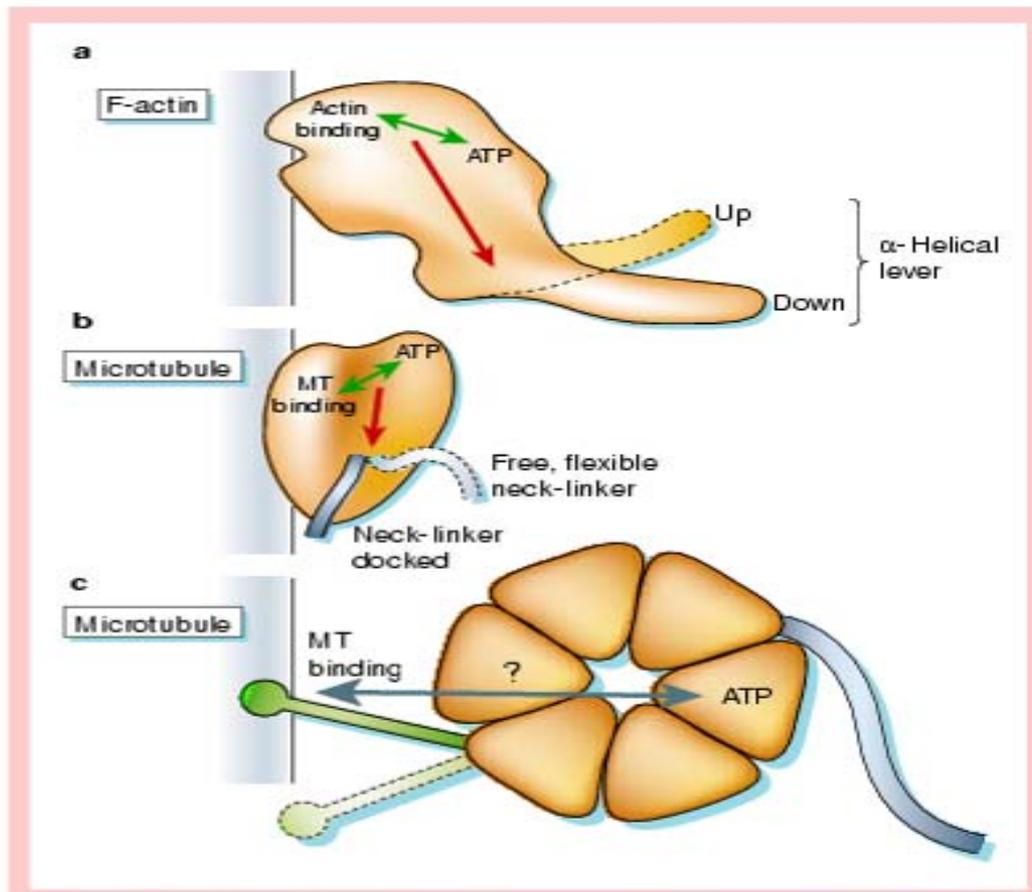
В отсутствие нагрузки (два верхних рисунка) АТФ связан только с доменом 1, сцепление между доменами 1-4 достаточно слабое, длина шага 32 нм. При приложении нагрузки (два нижних рисунка) АТФ связывается с доменам 1-4 и изменяет их структуру, сцепление между доменами 1-4 усиливается, длина шага укорачивается до 8 нм, но генерируемое усилие заметно возрастает (толстая, жесткая пружина). (Mallik et al., Nature 427, 649, 2004).



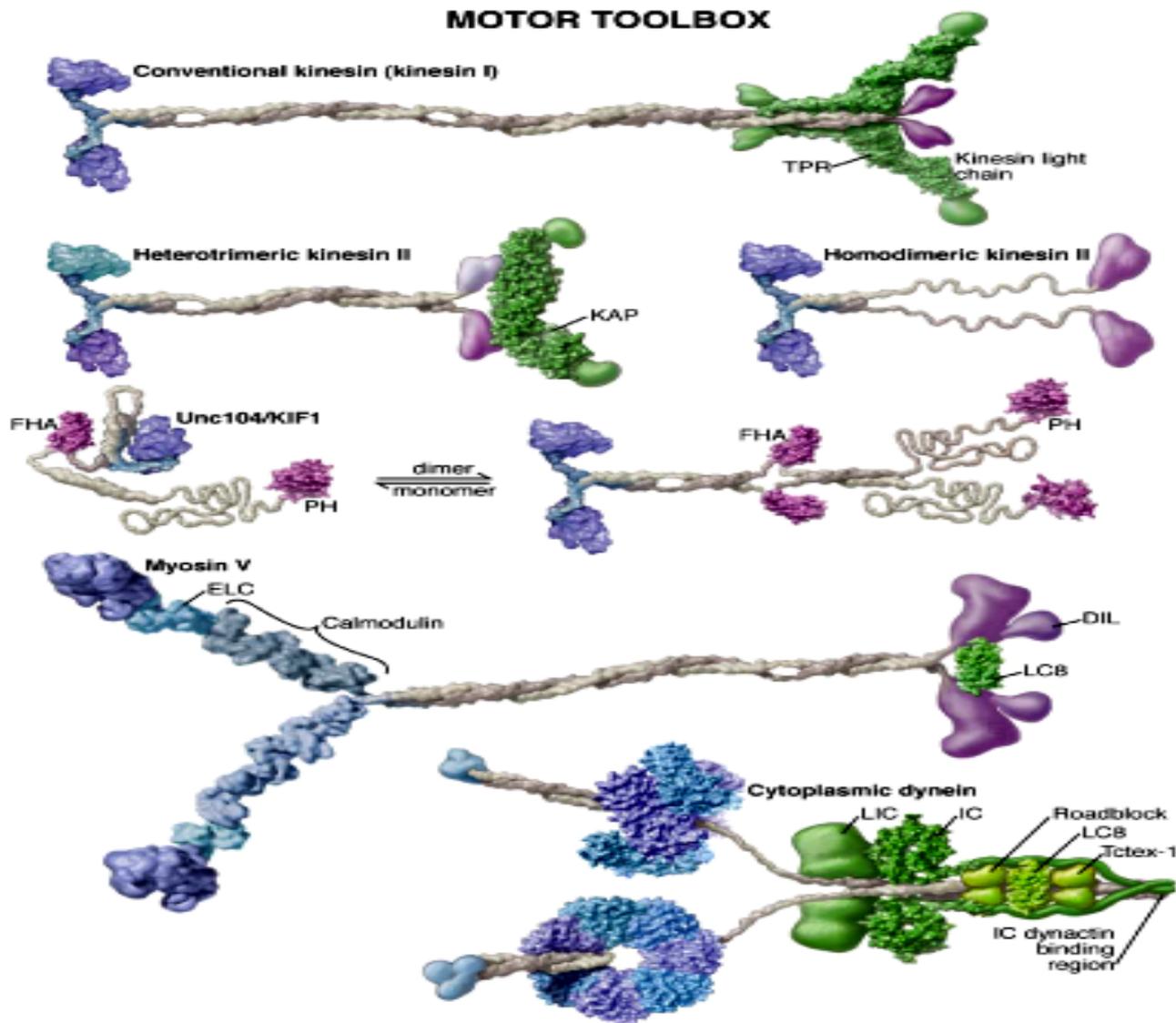
Сравнение механизмов генерации движения миозином (а), кинезином (b) и динеином (с).

Гидролиз АТФ вызывает конформационные изменения вблизи АТФ-связывающего центра (зеленые стрелки), информация передается на механический усилитель (красные стрелки). В случае динеина гидролиз АТФ сопровождается изменениями структуры, которые по пока не известному пути передаются на «ручку», меняя ее ориентацию относительно микротрубочки.

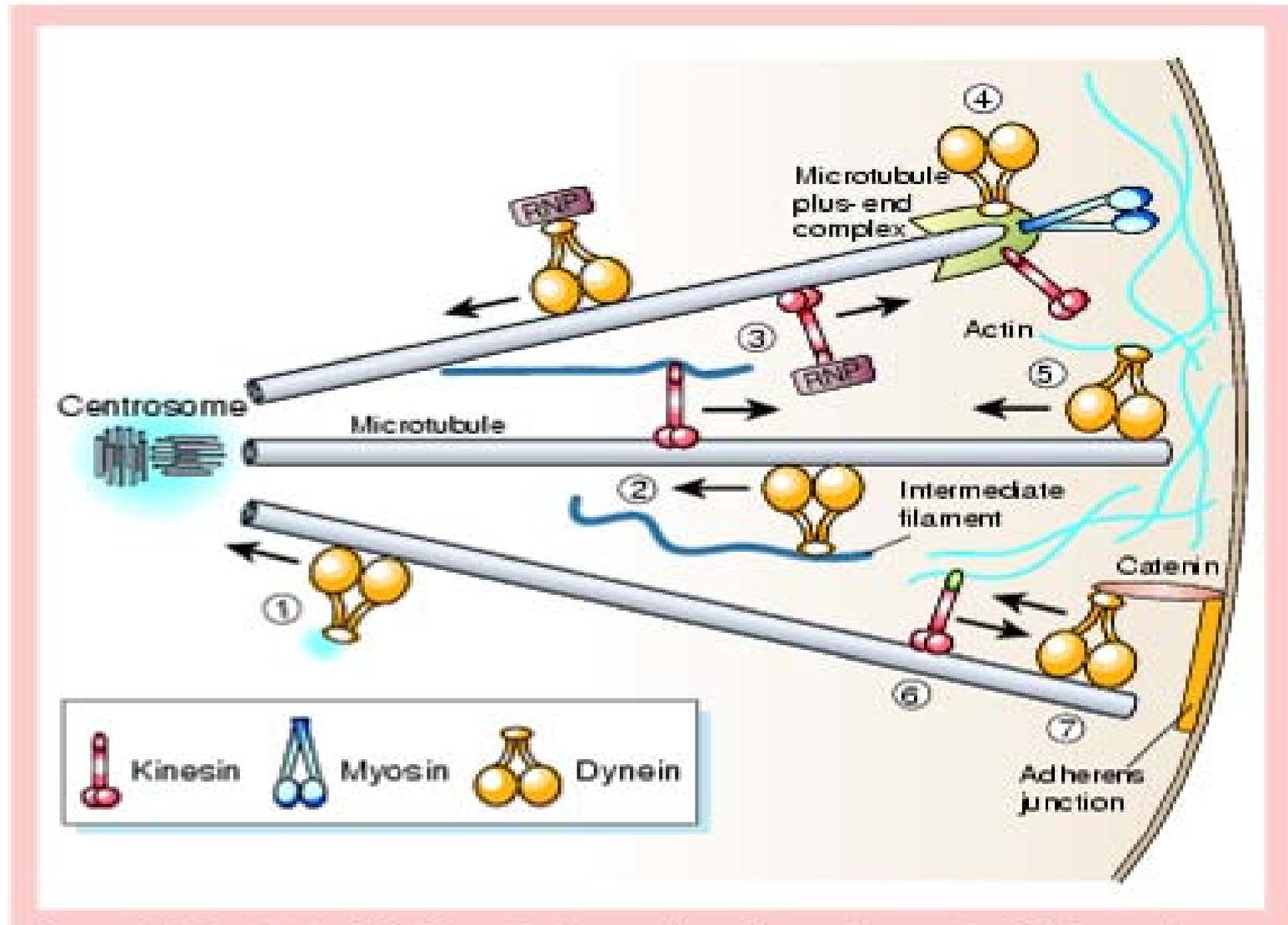
Schliwa, Woehlke, Nature 422, 759, 2003



Схематическая структура различных типов белков-моторов



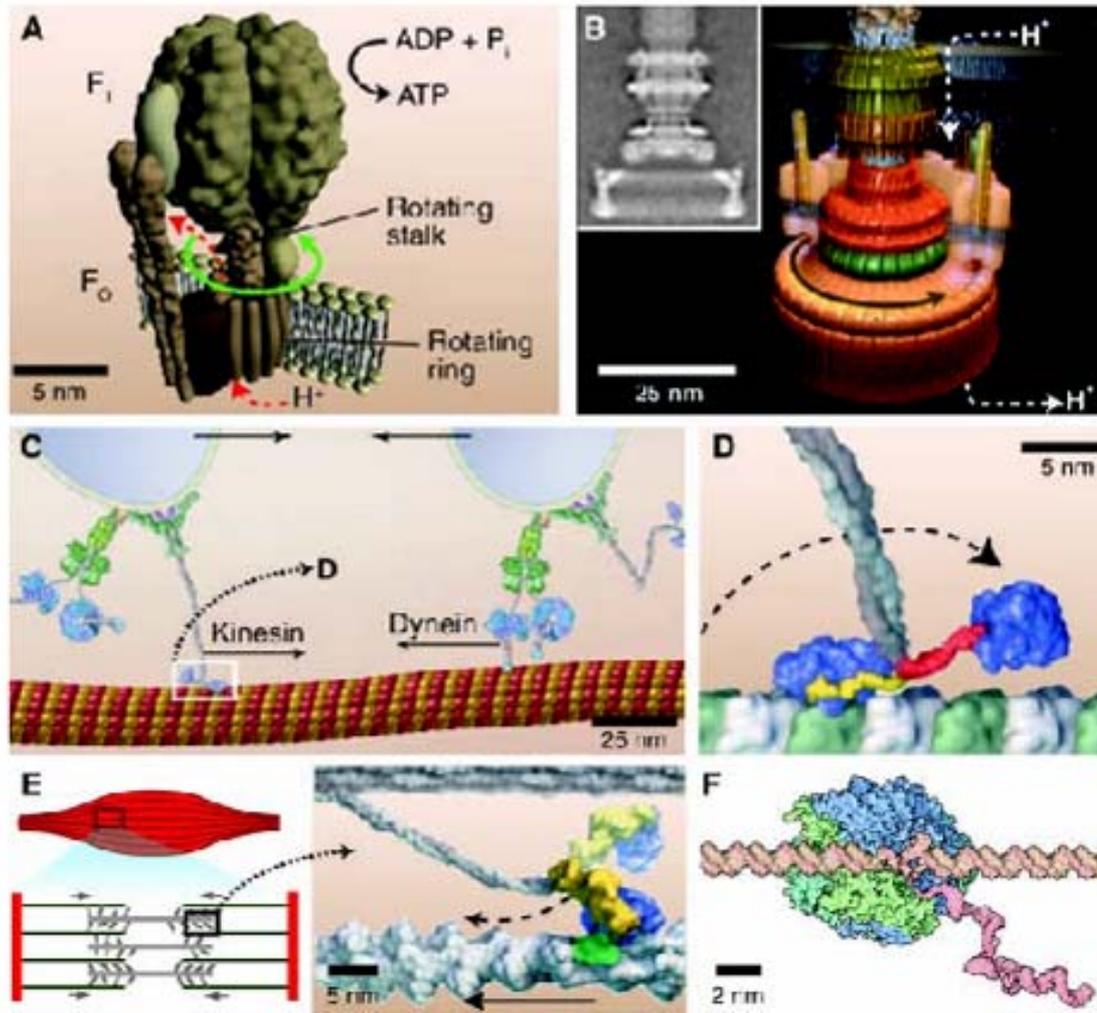
Участие различных белков-моторов в транспорте органелл



Биологические моторы и нанотехнологии

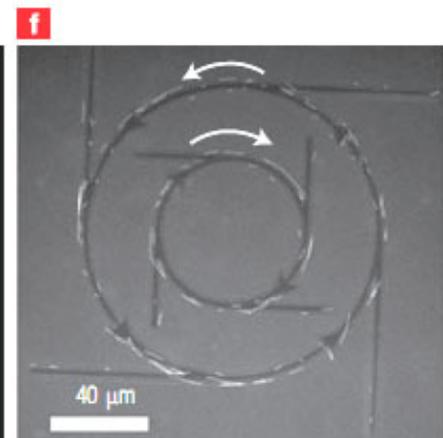
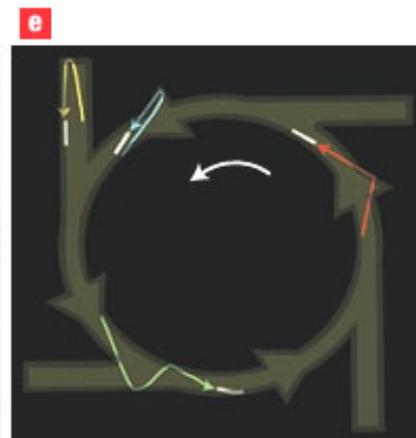
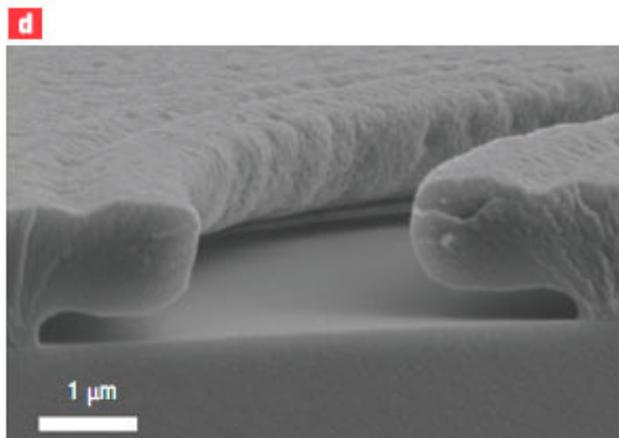
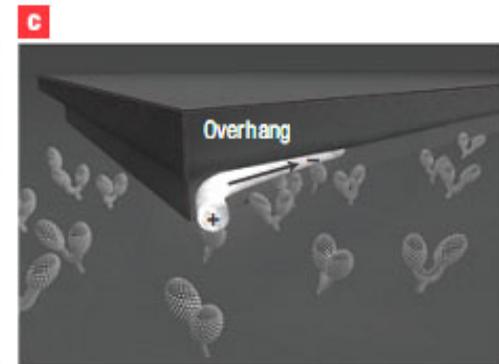
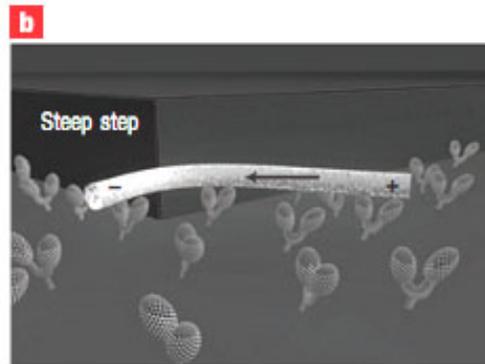
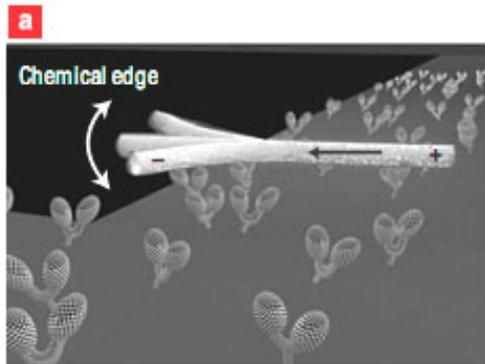
Биологические моторы и нанотехнологии

А. АТР-аза-АТР-синтаза митохондрий, В. мотор бактерий, С. разнонаправленное движение кинезина и динеина по микротрубочкам, D. Движение кинезина, E. Механизмы мышечного сокращения, F. РНКполимераза
van denHeuvel , Dekker, Science 317, 333, 2007



Механизмы управления движением микротрубочек и микрофиламентов

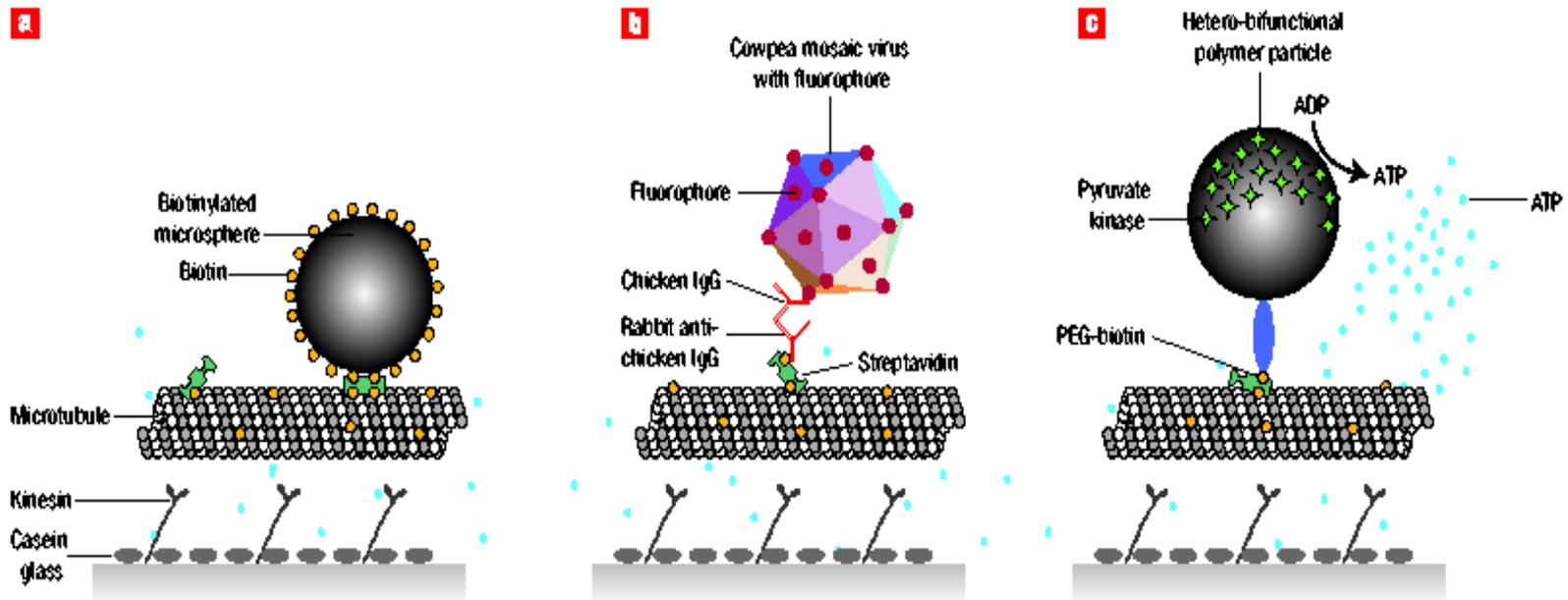
a, химические ограничения, b, высокий бортик, c, верхний «навес», d, электронная микрофотография микроканала с навесом, e, «тупики» лабиринта и стрелообразные конструкции лабиринта выполняют функции «выпрямителей» и делают движение однонаправленным
Goel, Vogel, Nature Nanotechnology, 3, 465, 2008



Выбор специфического карго

a, прикрепление биотинилированного карго к микротрубочке за счет авидина или стрептавидина, **b**, прикрепление вируса или белка за счет антител, меченых биотином, **c**, перемещение наночастиц, обеспечивающих регенерацию АТФ

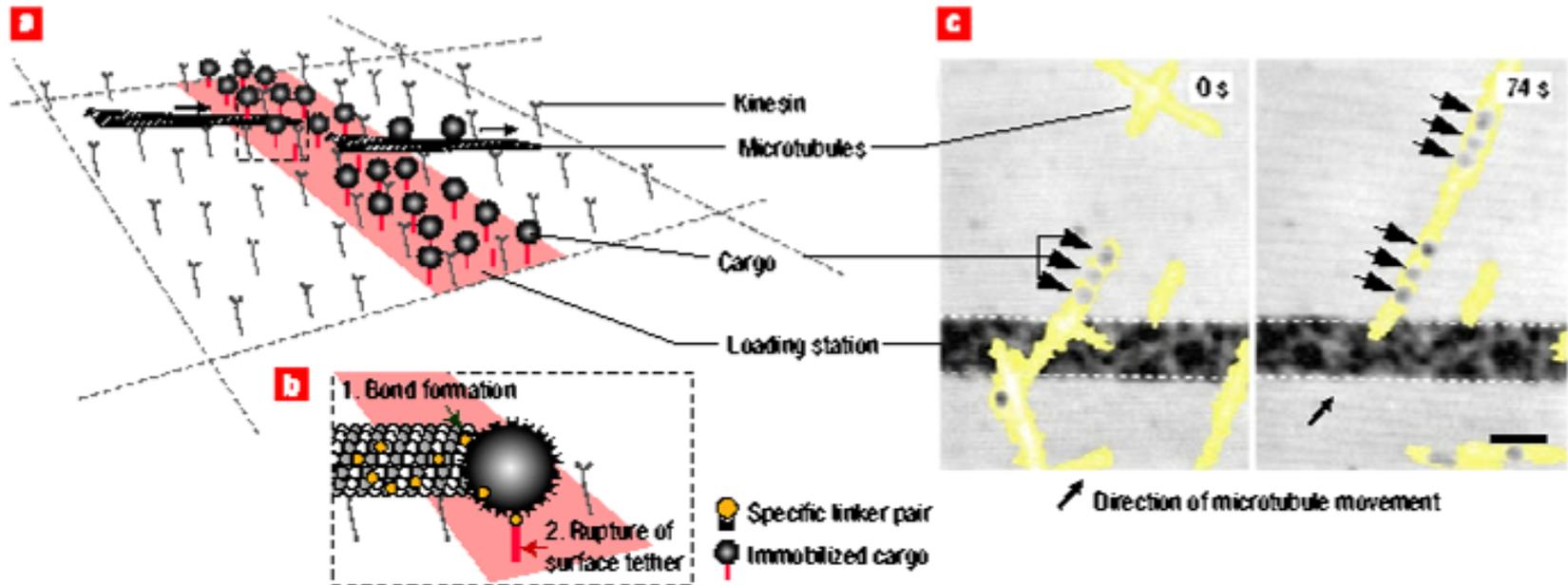
Goel, Vogel, Nature Nanotechnology, 3, 465, 2008



Создание микрозаправочных станций

На поверхности носителя создается полоса с иммобилизованным карго. Движущиеся по подложке микротрубочки или микрофиламенты, проходя через такую полосу, способны отцеплять карго от подложки и прикреплять к себе. Показано, как проходя через «заправку» микротрубочка захватывает частицы золота

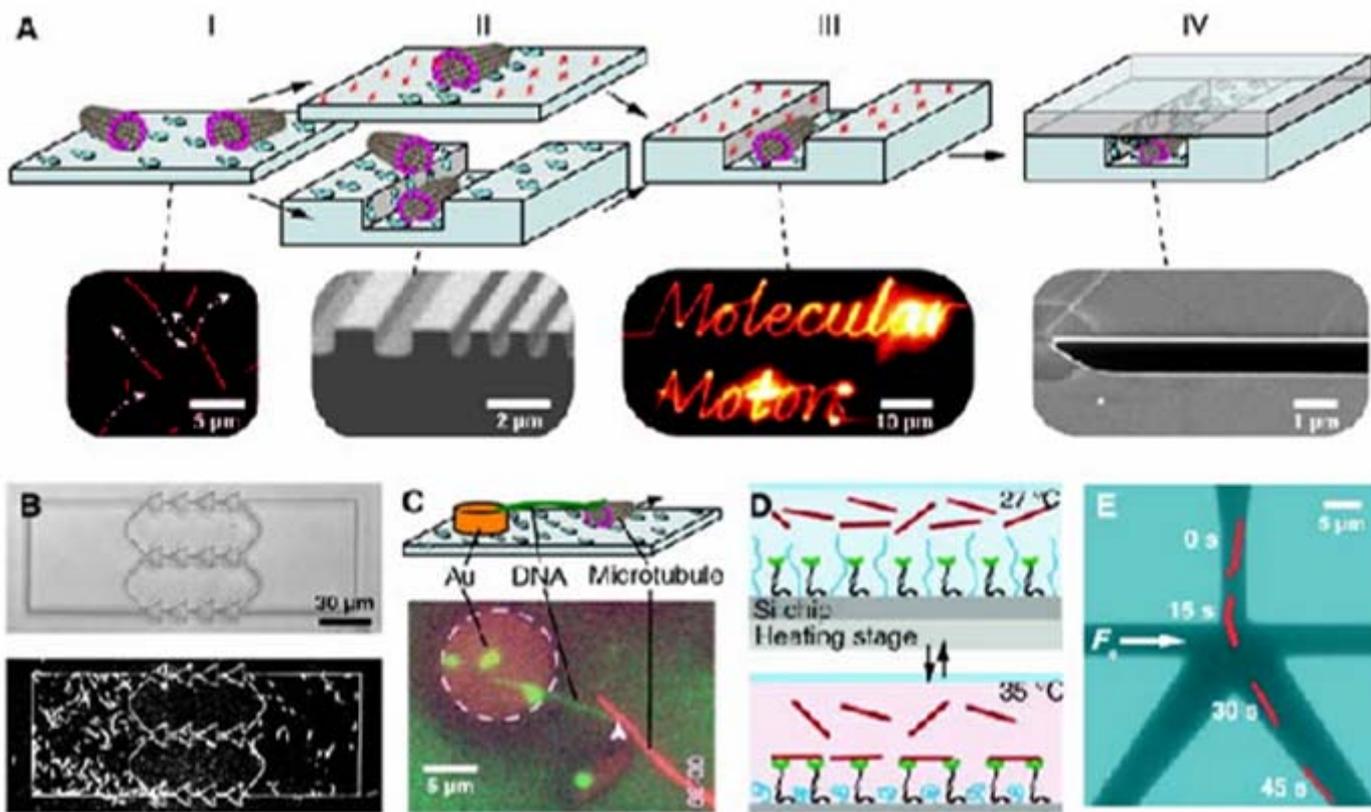
Goel, Vogel, Nature Nanotechnology, 3, 465, 2008



Механизмы, обеспечивающие направленное движение частиц

А. Создание «дорожек моторов» или «дорожек моторов» в глубине канавки, В. Механизмы избирательного накопления микротрубочек в одном из отсеков камеры (механизмы «выпрямления»). С. Механизмы «растягивания» молекулы ДНК. Д. Движение, управляемое температура зависимым изменением длины полимеров подложки. Е. Управляемое перемещение микротрубочек или микрофиламентов.

van den Heuvel, Dekker, Science 317, 333, 2007



Моторные белки в нанотехнологиях

А. Движение «мотора» бактерий. В. Искусственный мотор, приводимый в движение подвижными клетками (бактериями). К ротору «мотора приклеивают подвижные клетки, которые обеспечивают движение. С. Перемещение ДНК, закрепленной на микротрубочках, по поверхности, покрытой кинезином или динеином

van den Heuvel, Dekker, Science 317, 333, 2007

